

ANÁLISE GENÔMICA E SEQUENCIAMENTO
AUTOMÁTICO DE rDNA EM POPULAÇÕES DE
FUSARIUM OXYSPORUM

Alana Sarmento Monteiro

ALANA SARMENTO MONTEIRO

**ANÁLISE GENÔMICA E SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO DE rDNA EM
POPULAÇÕES DE *FUSARIUM OXYSPORUM***

**Dissertação apresentada como requisito à
obtenção do grau de Mestre em Química e
Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.**

Orientadora: Profa. Dra. Denise Wanderlei Silva

**MACEIÓ
2004**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial:

À Professora Dra. Denise Wanderlei pela orientação, pela oportunidade, pelos ensinamentos e, sobretudo, pelo exemplo e paciência;

Ao Professor Dr. Eduardo Ramalho pela colaboração durante a realização deste trabalho;

À Professora Dra. Iraíldes pelo apoio e pelos trabalhos cedidos;

Aos colegas de laboratório Rosa, Luciana, Flávia, Lusia, Hamilton, Daniela, André, Giselle, Sabrina, Patrícia, Patrese, Pedranne e a professora Alba pelo convívio, amizade e auxílio prestado, em especial às amigas Janice e Deyse pelo apoio nos momentos difíceis e pela contribuição na realização deste trabalho;

À Universidade Federal de Alagoas, Departamento de Química, pela oportunidade de realização do curso de mestrado em Química e Biotecnologia;

Ao GEMPRO, laboratório onde se realizou este trabalho;

À FAPEAL, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus pais Eliel e Yone
e meus irmãos Renata e Diogo
pelo constante apoio e carinho

Dedico

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	
2.1. O Gênero <i>Fusarium</i>	6
2.2. <i>Fusarium</i> como Fitopatógeno.....	7
2.3. Marcadores Moleculares.....	9
2.3.1. RAPD (Fragmentos polimórficos de Amplificação ao Acaso).....	9
2.3.1. RFLP (Polimorfismo de Fragmentos de Restrição).....	10
2.4. Sequenciamento Automático de DNA.....	11
2.5. Análise Filogenética.....	13
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1. Obtenção dos Isolados de <i>Fusarium oxysporum</i>	19
4.2. Preparação das Microculturas e Identificação dos Isolados de <i>Fusarium oxysporum</i>	20
4.3. Extração do DNA Genômico.....	20
4.4. Análise dos RFLPs da Região IGS.....	22
4.5. Amplificação RAPD-PCR.....	23
4.6. Amplificação PCR das Regiões do DNA Ribossomal.....	24
4.7. Sequenciamento das Regiões do DNA Ribossomal.....	25
5. RESULTADOS	
5.1. Confirmação dos Isolados de <i>Fusarium oxysporum</i>	28
5.2. Extração do DNA Genômico.....	28
5.3. Amplificação da Região Intergênica.....	29
5.4. Análise de RFLPs da Região IGS.....	30
5.5. Amplificação RAPD-PCR.....	39

5.6. Amplificação PCR das Regiões do DNA Ribossomal.....	44
5.7. Sequenciamento das Regiões do DNA Ribossomal.....	45
5.8. Identificação Eletrônica das Sequências.....	47
5.9. Análise Filogenética das Regiões do DNA Ribossomal.....	52
6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÕES.....	69
8. REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICES	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografia de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> mostrando: a) macroconídios (MA); b) conidióforos (C) e microconídios (MI) em falsas cabeças.....	28
Figura 2. Amplificação da região IGS.....	29
Figura 3. Amplificação da região IGS.....	30
Figura 4. Padrões RFLPs produzidos pela digestão com enzimas de restrição da região IGS do isolado 135D2AF.....	30
Figura 5A. Haplotipos dos RFLPs produzidos pela digestão da região IGS com a enzima de restrição <i>Bgl</i> II.....	32
Figura 5B. Haplotipos dos RFLPs produzidos pela digestão da região IGS com a enzima de restrição <i>Bgl</i> II.....	32
Figura 6. Cladograma UPGMA retangular baseado nos haplotipos dos RFLPs da região IGS de isolados de <i>F. oxysporum</i> gerados por <i>Bgl</i> II.....	34
Figura 7. Padrões RFLPs produzidos pela digestão da região IGS com a enzima de restrição <i>Sal</i> I.....	35
Figura 8. Cladograma UPGMA retangular baseado nos haplotipos dos RFLPs da região IGS de isolados de <i>F. oxysporum</i> gerados por <i>Sal</i> I.....	36
Figura 9. Padrões RFLPs produzidos pela digestão da região IGS com a enzima de restrição <i>Sma</i> I.....	37
Figura 10. Cladograma UPGMA retangular baseado nos haplotipos dos RFLPs da região IGS de isolados de <i>F. oxysporum</i> gerados por <i>Sma</i> I.....	38

Figura 11. Perfil RAPD-PCR para seleção do iniciador utilizando o isolados 135D2AF de <i>Fusarium oxysporum</i>	39
Figura 12. Perfil de bandas de DNA obtidas por RAPD de 21 isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> utilizando o iniciador OPR5.....	40
Figura 13. Dendrograma de agrupamento obtido pelo algoritmo UPGMA através do coeficiente de similaridade de Jaccard, para as 42 bandas geradas pelos polimorfismos de RAPD.....	43
Figura 14. Produtos amplificados da região ITS completa gerados pelos iniciadores ITS4/ITS5. Gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio.....	44
Figura 15. Produtos amplificados da região ITS completa gerados pelos iniciadores ITS4/ITS5. Gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio.....	45
Figura 16. Página inicial da ferramenta BLAST do NCBI. A seta indica a opção blastn utilizada para comparações em pares.....	47
Figura 17. Janela para colagem da seqüência e submissão (Blast!) (seta) para análise.....	47
Figura 18. Resultado da análise de similaridade. Linhas vermelhas indicam escores >200.....	48
Figura 19. Seqüências (subject) de <i>Fusarium</i> obtidas após alinhamento em pares com <i>Foc</i> (FOC1F) que apresentaram alinhamento significativo. Número de acesso estão na frente de cada espécie, seguida pelo score e E-value do alinhamento.....	49
Figura 20. Dendrograma consenso construído pelo método de agrupamento NJ utilizando a distância Kimura-2-parameter (gamma) baseado nas seqüências da região ITS completa e parte do gene 28S rRNA de 21 isolados de <i>Fusarium oxysporum</i>	54

Figura 21. Dendrograma bootstrap construído pelo método de agrupamento NJ utilizando a distância Kimura-2-parameter (gamma) baseado nas seqüências da região ITS completa e parte do gene 28S rRNA de 21 isolados de <i>Fusarium oxysporum</i>	55
Figura 22. Dendrograma consenso construído pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a distância Kimura-2-parameter (gamma) baseado nas seqüências da região ITS completa e parte do gene 28S rRNA de 21 isolados de <i>Fusarium oxysporum</i>	56
Figura 23. Dendrograma bootstrap construído pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a distância Kimura-2-parameter (gamma) baseado nas seqüências da região ITS completa e parte do gene 28S rRNA de 21 isolados de <i>Fusarium oxysporum</i>	57
Figura 24. Dendrograma consenso construído pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a distância Kimura-2-parameter (gamma) baseado nas seqüências da região ITS completa e parte do gene 28S rRNA de 21 isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> e de 18 isolados obtidos do GenBank.....	58
Figura 25. Dendrograma bootstrap construído pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a distância Kimura-2-parameter (gamma) baseado nas seqüências da região ITS completa e parte do gene 28S rRNA de 21 isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> e 18 obtidos do GenBank.....	59
Figura 26. Dendrograma consenso construído pelo método de agrupamento NJ e UPGMA utilizando a distância Kimura-2-parameter (gamma) baseado nas seqüências da região ITS completa e parte do gene 5.8S rRNA de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	60
Figura 27. Dendrograma bootstrap construído pelo método de agrupamento NJ e UPGMA utilizando a distância Kimura-2-parameter (gamma) baseado nas seqüências da região ITS completa de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> , seus respectivos cultivares/hospedeiros e suas procedências.....	19
Tabela 2. Concentrações dos reagentes utilizados para amplificar a região IGS.....	22
Tabela 3. Reação de digestão com enzimas de restrição.....	23
Tabela 4. Concentração final dos reagentes utilizados na amplificação RAPD-PCR.....	24
Tabela 5. Matriz construída com base na presença (1) e ausência de bandas (0) de DNA nos padrões eletroforéticos produzidos pelos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> . Retângulos azuis, amarelos e verdes correspondem as f. spp. <i>cubense</i> , <i>lycopersici</i> e <i>passiflorae</i> , respectivamente.....	42
Tabela 6. Nucleotídeos amplificados após sequenciamento da região ITS1, ITS2 e 5.8S rDNA e seus respectivos isolados.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

∞ - infinito

1x – uma vez

°C – graus Celsius

ADE - água destilada esterilizada

ARDRA - análise de restrição de DNA ribossômico amplificado

BD – batata-dextrose

BDA - batata-dextrose-ágar

BLAST – “basic local alignment search tool”

Blastn – alinhamento nucleotídeo-nucleotídeo

cDNA – DNA complementar ao mRNA

CECA – Centro de Ciências Agrárias

CIA - clorofórmio-álcool isoamílico

CTAB – cetiltrimetil brometo de amônio (hexadecyltrimethylammonium bromide)

dATP – trifosfato de desoxiadenosina

dCTP – trifosfato de desoxicitosina

dGTP – trifosfato de desoxiguanosina

DNA – ácido desoxiribonucleico

dNTPs – desoxiribonucleotídeos trifosfato

ddNTPs – didesoxiribonucleotídeos trifosfato

dTTP – trifosfato de desoxitimidina

EDTA – ácido etileno diamino tetra-acético

EF-1 α - fator de alongamento

ETS – espaço transcrito externo (“external transcribed spacer”)

E-value - valores esperados

Fig. – figura

F.o. – *Fusarium oxysporum*

Foc - *F. oxysporum* f.sp. *cubense*

Fol - *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Fop - *F. oxysporum* f.sp. *passiflorae*

Fos - *F. oxysporum* f.sp. *capsici*

f. sp. - *forma specialis*
f. spp. - *formae speciales*
IGS – espaço intergênico (“intergenic spacer”)
InDel – inserção ou deleção
ITS – espaço interno transcrito (“internal transcribed spacer”)
kb – quilobase (mil pares de bases)
kV - quilovolts
L – litro
ls-rRNA - subunidade maior do RNA ribossômico
UV – ultra violeta
M – molar
µg/mL – microgramas por mililitro
µL – microlitro(s)
mg – miligrama
MgCl₂ – cloreto de magnésio
MilliQ – água destilada deionizada e estéril
min – minuto(s)
mL – mililitro
mM – milimolar
mRNA – RNA mensageiro
mtDNA - DNA mitocondrial
NaCl – cloreto de sódio
NCBI – National Center for Biotechnology Information
ng – nanograma
NJ – “neighbour joining”
nt - nucleotídeo
NTS – espaço não-transcrito (“non-transcribed spacers”)
OTUs – unidades taxonômicas operacionais
PAUP – análise filogenética usando parsimônia (“phylogenetic analysis using parsimony”)
pb – pares de base
PCR – reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction”)
PMT – “photomultiplier tube”

RAPD – polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (“random amplified polymorphic DNA”)

rDNA – DNA ribossômico

RFLP – polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (“restriction fragment length polymorphism”)

RNA – ácido ribonucleico

RNase – ribonuclease

rpm – rotações por minuto

rRNA – RNA ribossômico

seg – segundo(s)

ss-rRNA - subunidade menor do RNA ribossômico

Taq polimerase – DNA polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*

TE - 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA

Tris – tris [hidroximetil] aminometano

U – unidade

UPGMA – método de agrupamento de pares por média aritmética (“unweighted paired group method of analysis”)

V – volts

VCGs - grupos de compatibilidade vegetativa

RESUMO

Monteiro, A. S. **Análise Genômica e Sequenciamento Automático de rDNA em Populações de *Fusarium oxysporum***. 2004. 112f. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) - Laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica (GEMPRO), Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2004.

O complexo *Fusarium oxysporum* é responsável por murchas em uma variedade de plantas e seus representantes são agrupados em *formae speciales*, de acordo com a sua patogenicidade a hospedeiros específicos. A diversidade genética de 21 isolados do complexo, representados por *F. oxysporum*, f. sp. *cubense*, f. sp. *lycopersici*, f. sp. *passiflorae* e f. sp. *capsici*, foi avaliada utilizando RFLPs da região IGS, RAPD-PCR e sequenciamento de DNA da região ITS1-ITS2 e do gene 5,8S rRNA. Amplificação RAPD com o iniciador OPR5 gerou 42 bandas polimórficas e a análise de agrupamento demonstrou que a população é geneticamente heterogênea. Comparações dos perfis genéticos gerados pelas análises visual e fenética sugerem um alto nível de variação genética entre os isolados, que foram sub-divididos em seis grupos principais. Entretanto, não houve correlação entre os perfis de banda RAPD-PCR e f. spp. Análise dos RFLPs, produzidos pela digestão com enzimas de restrição, *Bgl*II, *Sma*I e *Sal*I da região IGS, identificou vários haplotipos. Perfis de bandas e análise fenética geradas não mostraram separação clara entre as f. spp. e não dá suporte à separação baseada em hospedeiros. Sequências de DNA do gene 5,8S rRNA e da região espaçadora ITS de diversas f. spp. de *F. oxysporum* foram analisadas visando a detecção de um marcador molecular intraespecífico para as f. spp. Os iniciadores ITS4/ITS5 mostraram alta especificidade para a espécie e geraram uma banda única de aproximadamente 550-570 pb. Bases de DNA foram determinadas em um sequenciador MegaBace1000, alinhadas com o programa ClustalX (1.83) e geraram cladogramas a partir do programa Mega2 (2.1), utilizando os métodos NJ e UPGMA, que agrupou os isolados em vários grupos. Os resultados sugerem que a região, apesar de pouco variável, poderia ser utilizada como um marcador molecular para resolver relações entre f. spp. de *F. oxysporum*. Entretanto, ela foi altamente conservada para comparações dentro da população de *Foc* estudada. Em geral, a região ITS2 foi mais variável que a ITS1 e o gene 5,8S rRNA não foi parsimonicamente informativo. Sequências de 18 isolados representando *F.oxysporum*, inclusive de um isolado patogênico a humanos e de outro associado a árvores, foram selecionadas do GenBank e combinadas com nossas sequências. Reconstrução filogenética também não foi compatível com a separação de espécies em f. spp. e concorda com relatos anteriores de origens evolucionárias independentes dentro das f. spp. O diagnóstico eletrônico através da ferramenta de Bioinformática blastn identificou *Fusarium* em nível de gênero. Os resultados questionam o valor preditivo do sistema denominado *forma specialis* dentro do complexo *F. oxysporum* e sugere a investigação de sistemas mais confiáveis para identificação de populações do patógeno.

Palavras-chave: *Fusarium oxysporum*, RFLPs, RAPDs, sequenciamento de DNA.

ABSTRACT

Fusarium oxysporum complex causes wilt disease in a wide variety of plants and are grouped into *formae speciales* based on their host range. Twenty-one isolates of the complex which represented *F. oxysporum*, f. sp. *cubense*, f. sp. *lycopersici*, f. sp. *passiflorae*, and f. sp. *capsici* were assessed for genetic diversity using RFLPs of the IGS region, RAPD-PCR, and DNA sequencing of ITS1- ITS2 and 5.8S rRNA gene. RAPD amplification with primer OPR5 generated 42 polymorphic bands and cluster analysis showed that the population is genetically heterogeneous. Comparison of the banding patterns both visually and by phenetic analysis suggests high level of genetic variation among the isolates and sub-divided them into six major groups. However, there was no correlation between RAPD-PCR banding pattern and f. spp. RFLPs produced by digestion with restriction endonucleases, *Bgl*II, *Sma*I, and *Sal*I were used to further analyse the IGS region and identified several IGS haplotypes which did not differentiate among f. spp. Banding patterns and phenetic analysis generated do not showed clear separation among f. spp. and do not support separation based on host. DNA sequences of 5.8S rRNA gene and flanking intergenic transcribed spacers of several f. spp. from *F. oxysporum* were analyzed in order to detect molecular marker intraspecific for the f. spp. Primers ITS4/ITS5 showed good specificity for the species and yielded a unique fragment of approximately 550-570 bp. DNA bases determined in a Megabace1000 sequencer were further aligned and cladograms reconstructed with ClustalX (1.83) and Mega2 (2.1), respectively. ITS analysis grouped strains into several clusters based on NJ and UPGMA. The results suggested that the region could be used as a genetic marker to resolve relationships among f. spp. of *F.oxysporum*, however, it was too conserved for comparisons within a population of *Foc*. Overall, the ITS 2 was more variable than the ITS1 region and 5.8S rRNA gene was not parsimonically informative. Sequences of 18 isolates representing *Fusarium oxysporum*, including a human pathogenic one and another associated to trees, was chosen from GenBank and combined with our sequences. Phylogenetic reconstruction was not compatible with the separation of the species into f. spp. and agreed with previous reports of independent evolutionary origins within f. spp. Electronic diagnostic using Blastn could be used as a Bioinformatic tool identify *Fusarium* at genus level, only. Our results questioned the predicated value of the *forma specialis* naming system in the separation of different f. spp. in *F.oxysporum* complex and suggest the investigation of more reliable systems to identify the pathogen population.

Key-words: *Fusarium oxysporum*, RFLPs, RAPDs, DNA sequencing.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos constituem um grupo numeroso de organismos bastante diversificado filogeneticamente e de grande importância ecológica e econômica.

O gênero *Fusarium* é um dos mais importantes na fitopatologia mundial, geralmente causando murchas em diferentes culturas (BOOTH, 1971), tendo nos últimos anos adquirido também importância devido à produção de micotoxinas responsáveis por doenças em pessoas e animais (HAWKSWORTH *et al.*, 1995).

A identificação das espécies de *Fusarium*, tradicionalmente, baseada em características culturais, morfológicas (conidióforos, conídios e clamidósporos), em odores e, mais recentemente, através da produção de micotoxinas, o que tem gerado controvérsias em relação à identificação das espécies (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

Fusarium oxysporum Schlechtend é uma das espécies de maior variabilidade dentro do gênero *Fusarium*, possuindo populações patogênicas e não patogênicas, *formae speciales* (f. spp.) para um único e para grupos de hospedeiros (BAAYEN *et al.*, 2000).

As técnicas biomoleculares são importantes ferramentas auxiliares na taxonomia e caracterização dos isolados de *Fusarium* e têm dado suporte na identificação das espécies. Essas técnicas, têm ainda permitido a análise da variabilidade do DNA, pois identifica pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados marcadores moleculares.

Os marcadores moleculares têm sido muito utilizados para caracterizar populações de fitopatógenos. Esses permitem avaliar os níveis de diversidade genética e relações filogenéticas inter e intraespecíficas, inclusive identificar raças e patótipos particulares.

Mais recentemente, o advento de técnicas baseadas em PCR apresentou uma nova opção ao uso de marcadores moleculares. A técnica foi desenvolvida em meados da década de 80 (MULLIS e FALOONA, 1987) e alcançou uso disseminado e extenso em diversas áreas de biologia quase que imediatamente (WHITE *et al.*, 1989).

A técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e de iniciadores específicos ou não. Tais iniciadores delimitam a seqüência de DNA de fita dupla a ser amplificada, cujos resultados são milhões de cópias idênticas (MULLIS e FALOONA, 1987; WHITE *et al.*, 1989).

Entre os tipos mais comuns de marcadores moleculares destacam-se o RFLP e o RAPD. A técnica de RAPD, desenvolvida por Williams *et al.* (1990) e Welsh e McClelland (1990), envolve amplificação simultânea de várias regiões no genoma utilizando iniciadores de seqüência arbitrária, e tem sido utilizada para estudos genéticos, taxonômicos e ecológicos de diversos fungos (ABBASI *et al.*, 1999; ALZATE-MARIN *et al.*, 1997; FUNGARO *et al.*, 1996; MUTHUMEENAKSHI *et al.*, 1998; PAAVANEM-HUHTALA *et al.*, 2000; VILARINHOS *et al.*, 1995).

Além de analisarem a variabilidade genética, estes marcadores moleculares podem determinar relações filogenéticas, como também colaborar na identificação de uma determinada raça ou patótipo. Existe ainda a possibilidade de estarem intimamente associados a genes de avirulência, e de colaborarem em clonagens de genes (MAJER *et al.*, 1996). Em adição, apresentam a vantagem de serem gerados independentemente do fenótipo e revelarem polimorfismos altamente informativos em seqüências de DNA de organelas e núcleo.

A variabilidade genética existente em isolados de *formae speciales* de *F. oxysporum* também tem sido avaliada utilizando a técnica de RAPD (ASSIGBETSE *et al.*, 1994; BENTLEY *et al.*, 1995; MANULIS *et al.*, 1993; NELSON *et al.*, 1997; SILVA-HANLIN *et al.*, 1999; WOO *et al.*, 1996; WOUDT *et al.*, 1995; WRIGHT *et al.*, 1996).

Um dos grupos mais usados de marcadores moleculares, e que foi o primeiro a ser desenvolvido, são os RFLPs (ZAHA *et al.*, 2003). Quando clivados com enzimas de restrição, expressam, por eletroforese, as diferenças de comprimento de fragmentos de DNA, observadas por meio da hibridização desses fragmentos com seqüências homólogas do DNA marcado com radioatividade ou por luminescência. Os RFLPs podem ser causados por mudanças de pares de bases, rearranjo de DNA, inserção e/ou deleção ou diversidade natural na seqüência de nucleotídeos, entre ou dentro de populações. Esses também possibilitam a identificação de maior número de locos polimórficos e, por conseguinte, foram a primeira ferramenta eficaz para a seleção assistida por marcadores.

A unidade repetida do DNA nuclear ribossômico (rDNA) também tem sido usada extensivamente para estudos com enzimas de restrição em *F. oxysporum*, como a região IGS (EDEL *et al.*, 2001; CAI *et al.*, 2003) ou ITS (O'DONNELL, 1992; OLIVEIRA e COSTA, 2002).

O arranjo gene-espaco-gene de ordem multicópia é responsável pela alta popularidade do rDNA. Porções de regiões gênicas são tão altamente conservadas que

todos os heterólogos investigados hibridizam fortemente com eles, contudo outras regiões gênicas variam consideravelmente para comparar níveis taxonômicos moderados. Os espaços, particularmente o espaço intergênico, freqüentemente varia significativamente até o nível interespecífico (BRUNS *et al.*, 1991).

O uso de seqüências de DNA para estudos evolucionários pode superar muito dos problemas associados com as análises por enzimas de restrição. O grande número de caracteres comparados pode aumentar substancialmente o poder de resolução.

Também pode ser observado o modo da variação de seqüência como, por exemplo, se a mudança é transversão ou transição, e o grau de movimento do nucleotídeo pode ser medido; essas observações podem ser incorporadas nas análises filogenéticas de várias maneiras.

Os resultados de diferentes laboratórios podem ser diretamente comparados e a publicação de seqüências e sua deposição em banco de dados eletrônicos facilita a confirmação de resultados e suas aplicações, sem a necessidade da obtenção de linhagens, clones ou repetição de experimentos (BRUNS *et al.*, 1991).

Em contraste com o sequenciamento de RNA, a reação de PCR desenvolvida por Mullis e Faloona (1987) foi seguida por biólogos para sequenciar DNA de muitas espécies em poucos dias. Muitos métodos são avaliáveis para sequenciamento direto de produtos de PCR. Estes incluem métodos que geram e sequenciam fitas simples ou que diretamente sequenciam fitas duplas. A exatidão do sequenciamento direto de produtos de PCR é melhor do que sequenciamento de RNA, pois ambas as fitas podem ser determinadas.

Uma segunda vantagem é que outras regiões que não as dos genes RNA nucleares são acessíveis para análise de seqüência. Outra importante vantagem do PCR é que apenas minúsculas quantidades de DNA são necessárias. Como resultado, fungos raros ou parasitas obrigatórios são agora acessíveis à sistemática molecular (BRUNS *et al.*, 1991).

Praticamente todos os estudos de sequenciamento de DNA em fungos têm focado genes do rRNA. Sua popularidade se deve à presença de regiões conservadoras universais que servem como posições "cartilhas" ideais. Regiões diferenciadas dos genes de DNA mitocondrial e ribossômico divergem em diferentes graus (SEIFERT *et al.*, 1995).

O DNA que codifica para RNA ribossômico apresenta-se como um grupo gênico, no qual existem os genes 18S, 5,8S e 28S. Estes genes são separados por regiões denominadas ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA

ribossômico maduro. O grupo gênico que codifica para rRNA aparece repetido centenas de vezes no genoma fúngico. O fato desse grupo gênico apresentar algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis, tem permitido a análise de variação de diferentes níveis taxonômicos (HIBBET, 1992; ZAHA *et al.*, 2003).

A região 18S, por exemplo, é a mais conservada e por isso é utilizada apenas para comparação de organismos distantemente relacionados. A porção 28S é mais variável e, portanto, é apropriada para a comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos, de diferentes espécies (WHITE *et al.*, 1990).

As regiões ITS evoluem rapidamente e, então, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados relativamente curtos (500 a 800 pb), e aparecerem em grande número de cópias no genoma, permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade. Como consequência disso, há um número crescente de seqüências ITS de *F. oxysporum* que estão atualmente disponíveis nos bancos de dados de seqüências de nucleotídeos (MORICCA *et al.*, 1998; ABD-ELSALAM *et al.*, 2003).

A utilização de programas computacionais de reconstrução filogenética, como MEGA2, que permite a comparação entre seqüências, têm contribuído para a identificação de regiões variáveis e filogeneticamente informativas no genoma de fungos, na identificação do tipo de mutação, se Indel (inserção ou deleção), transições ou transversões, as mais comuns, e na determinação das relações genéticas entre populações fúngicas.

As seqüências de DNA que são polimórficas, ou seja, freqüentemente variáveis entre espécies fúngicas, tais como as seqüências ITS, são boas candidatas para a detecção de uma espécie e exclusão de todas as demais. Por exemplo, diferenças na região ITS têm sido usadas para desenvolver testes, baseados em PCR, para o diagnóstico de fungos causadores de micose na espécie humana, produtores de toxinas em amostras de alimentos, bem como patógenos de plantas, sem o prévio isolamento do fungo. O fato das seqüências de rDNA estarem presentes em grande número de cópias no genoma, favorece a alta sensibilidade do diagnóstico via PCR.

As seqüências de ácidos nucléicos em fita única e de aminoácidos, bem como estruturas tridimensionais de proteínas e genomas inteiros, são depositadas em bancos de dados especializados, disponíveis na Internet, o GenBank. Os bancos de dados podem ser divididos em bancos de seqüências primárias (contendo informações sobre as seqüências

de ácidos nucléicos e de proteínas) e de seqüências secundárias (contendo bancos de dados de estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas, informações sobre enzimas de restrição, sítios de clivagem, etc).

O banco de informações de domínio público, o NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), oferece a coleção mais completa de dados de seqüências nucleotídicas de vários tipos de organismos disponíveis em todo o mundo. O banco disponibiliza diversas ferramentas computacionais com funções específicas, sendo uma das mais utilizadas é o BLAST, um algoritmo baseado no método heurístico para a submissão de seqüências e posterior alinhamento através da homologia dessas seqüências com outras depositadas no GenBank. O blastn realiza pesquisas em seqüências de nucleotídeos com bancos de dados de seqüências também de nucleotídeos (GIBAS e JAMBECK, 2001).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium*, classificado como Hyphomiceto, da ordem Moniliales, família Tuberculariaceae, tem sido investigado por muitos pesquisadores e atraído mais atenção que qualquer outro grupo de fungos (HAWKSWORTH *et al.* 1995; LIDDEL, 1991). Este gênero foi estabelecido por Link em 1809, para espécies com esporos fusiformes e conídios sem septos, fundamentados em estudos conduzidos em *Fusarium roseum* (BOOTH, 1971).

Tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo em praticamente todos os ambientes, tendo espécies cosmopolitas e outras com ocorrência restrita a determinados sítios, predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio das regiões temperadas, encontrando também espécies que apresentam íntima associação com seus hospedeiros (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

O gênero *Fusarium* inclui espécies que produzem macroconídios hialinos, geralmente septados, possuindo as células basal e apical diferenciadas, o que implica em grande importância na taxonomia das espécies. Os macroconídios podem apresentar as seguintes formas: delgado, com aspecto de agulha; com curvatura dorsal e ventral; com a curvatura do lado dorsal mais pronunciada que no lado ventral; com as células apical e basal (típico de *Fusarium*); podem ser grossos, papilados, em forma de gancho, afilados, em forma de pé, em forma de pé alongado, distintamente entalhados e escassamente entalhados. Os microconídios também apresentam diferentes formas, podendo ser: ovais, reniformes ou alantoides, obovóides com a base truncada, piriformes, napiformes ou globosos. Quanto aos clamidosporos, podem estar presentes ou ausentes (HAWKSWORTH *et al.* 1995). O fungo pode sobreviver na forma de micélio, conídios ou clamidosporos (AGRIOS, 1988).

A primeira grande revisão das espécies de *Fusarium* foi realizada por Wollenweber e Reinking (1935), a qual descrevia em seu trabalho, “Die Fusarien”, 65 espécies, 55 variedades e 22 f. spp., agrupadas em 16 seções. Desde então, aproximadamente 1000 espécies de *Fusarium* já foram descritas.

Os fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* são patógenos de plantas bem conhecidos e também são contaminantes de alimentos. O gênero *Fusarium* tem sido

relatado como o maior agente fúngico oportunista. Desde então, novos agentes antifúngicos vêm demonstrando uma variável atividade contra isolados de *Fusarium* e, dependendo da espécie, uma rápida identificação em nível de espécie é requerido (HENNEQUIM *et al.*, 1999).

Este grupo de fungos é ainda responsável por numerosas toxicoses e micoses em animais e humanos (NELSON *et al.*, 1981; MARASAS *et al.*, 1984; JOFFE, 1986). A Moniliformina é uma toxina sintetizada por várias espécies de *Fusarium*, entre elas, *F. oxysporum*, *F. guttiforme* e *F. graminearum*. Experimentos conduzidos por Zhang e Li (1989) e CHEN *et al.*, (1990) sugerem uma possível conexão entre a ingestão de toxinas produzidas por *Fusarium* e a ocorrência de uma doença crônica do coração, também conhecida como 'doença de Keshan', comum em algumas regiões da Ásia. *Fusarium* é um grupo de fungos cosmopolita, onde se insere *F. graminearum*, que pode ser utilizado como fonte de proteína para consumo humano (ANDERSON e SOLOMONS, 1984). Entretanto, o interesse predominante neste gênero, permanece principalmente por causa de sua função como fungo fitopatogênico, atacando muitas culturas de interesse econômico.

Fusarium oxysporum produz os seguintes tipos de esporos assexuais: microconídios, macroconídios e clamidosporos (AGRIOS, 1988). O microconídio tem um ou dois septos e é o tipo de esporo mais abundante e frequentemente produzido pelo fungo em todas as condições. Ele é também o tipo de esporo mais frequentemente produzido dentro dos vasos das plantas infectadas. Já o macroconídio tem de três a cinco septos, é gradualmente pontudo e curvado nas extremidades. Esses esporos são comumente encontrados na superfície das plantas mortas pelo patógeno. Os clamidosporos são estruturas de resistência com a parede espessa, produzidos através de micélios velhos ou de macroconídios (AGRIOS, 1988).

2.2. *Fusarium* como Fitopatógeno

O gênero *Fusarium* possui muitas espécies que são patógenos de plantas, geralmente causando murchas (BOOTH, 1971). Algumas dessas estão associados com o teleomorfo *Gibberella*. O micélio dos fungos invade o tecido vascular e, junto com os conídios, bloqueiam o xilema, evitando, deste modo, o movimento de água. Se uma quantidade suficiente de vasos forem bloqueados, ocorre a murcha.

A murcha também pode ser decorrente das toxinas produzidas pelos fungos deste gênero, afetando a permeabilidade de membranas celulares e interrompendo o metabolismo celular.

Como vários outros fitopatógenos, *Fusarium oxysporum* tem várias f. spp. que infectam muitos hospedeiros causando diversas doenças. *F. oxysporum* é uma espécie com considerável variação morfológica e fisiológica. O interesse nesses fungos surge por causa de sua habilidade em causar doenças de importância econômica na planta hospedeira (ARMSTRONG e ARMSTRONG, 1981).

Isolados patogênicos de *F. oxysporum* são morfológicamente semelhantes, mas diferem em sua especificidade a hospedeiros distintos, resultam em *forma specialis* (f. sp.) (SNYDER e HANSEN, 1940). Mais de 150 formas específicas ao hospedeiro já foram descritas (BAAYEN *et al.*, 2000), cada uma delas representando isolados com habilidade de causar murcha em um hospedeiro único (HAWKSWORTH *et al.*, 1995). Estas f. spp. são subdivididas em raças, de acordo com a sua especificidade a cultivares do hospedeiro.

Fusarium oxysporum é um saprófita ativo e abundante do solo e matéria orgânica, sendo algumas formas fitopatógenos específicos. Sua habilidade saprofítica torna possível sua sobrevivência em solos durante o ciclo da colheita, em restos de plantas infectadas.

Alguns tipos de *F. oxysporum*, além de serem causadores de murcha, atacam importantes culturas de tomate, banana, batata doce, e pêra. Por exemplo, o Mal do Panamá, doença causada por *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) à cultura da banana, foi responsável pelo abandono de milhares de acres de plantações de banana na América Central e Brasil (ALVES *et al.*, 1986).

Desde que a doença foi reportada pela primeira vez no Brasil, em São Paulo, em 1930, o cultivo comercial da banana Maçã (altamente suscetível) foi praticamente eliminado das áreas produtoras deste Estado (ALVES *et al.*, 1986). Desde então, a Fusariose tem sido responsável pela substituição progressiva das cultivares Maçã e Gros Michel, altamente suscetíveis à doença, por cultivares resistentes ou tolerantes, de menor valor comercial. *Foc* apresenta raças virulentas a cultivares de banana em todo o mundo, que afetam principalmente as cultivares Maçã, seguido da Prata, Pacovan e Prata anã (ALVES *et al.*, 1986).

2.3. Marcadores Moleculares

2.3.1. RAPD (Fragmentos de DNA Polimórficos de Amplificação ao Acaso)

O marcador RAPD é um dos mais utilizados, sendo um tipo especial de PCR utilizado para detecção de polimorfismo genético, representado pelas diferenças em número ou comprimento das bandas entre isolados, decorrentes da diferença em número e localização de sítios de ligação no DNA (SWENSEN, 1995). A vantagem deste método é que ele requer pouco material genômico para a amplificação do DNA (10-25 ng DNA/reação), e para cada iniciador ou oligonucleotídeo, cerca de 10 polimorfismos podem ser computados, cujo número é proporcional ao número de iniciadores testados. Apenas um iniciador com 10 pb é utilizado, e a região amplificada exponencialmente via PCR corresponde à região entre os sítios de ligação opostos (SWENSEN, 1995). Em adição, o RAPD é um método relativamente fácil e que requer prévio conhecimento da seqüência de nucleotídeo (BACHMANN, 1994).

Um dos primeiros trabalhos onde o método RAPD foi usado, descreve a comparação de 21 isolados de *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*, raças 1 e 2 (CROWHURST *et al.*, 1991). Os dois principais grupos de isolados diferenciados pelo método correspondiam a populações com fatores sexuais distintos, e o DNA produzido pelo PCR servia como sonda para identificar as referidas populações.

Grajal-Martin *et al.* (1993) conseguiram diferenciar a raça 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* de três outras raças por marcadores RAPDs, utilizando iniciadores ou oligonucleotídeos comerciais. Da mesma maneira, raças patogênicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* que atacam cravos, puderam ser distinguidas de vários isolados não patogênicos pelos marcadores (MANULIS *et al.*, 1993).

Grupos de patogenicidade puderam ser facilmente detectados pela utilização de RAPD por Assigbetse *et al.* (1994), após terem testado 46 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

Em *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, os marcadores RAPDs mostraram ser mais seguros para a identificação de raças patogênicas que técnicas tradicionais (KELLY *et al.*, 1994). Em estudo similar, três populações de *Fusarium oxysporum* foram comparadas através de polimorfismos detectados por RAPD. Os padrões dos marcadores comprovaram

a heterogeneidade destas populações, sugerindo que rearranjos aconteceram no genoma por inteiro, devido a processos parassexuais (BULAT *et al.*, 1995).

A exequibilidade da utilização de marcadores RAPD em populações de *F. moniloforme* var. *subglutinans* como indicadores de patogenicidade foi verificada por Ramalho Neto (1995). Padrões gerados por RAPD agruparam isolados de *F. moniloforme subglutinans* patogênicos em um único grupo, distinguindo-os dos isolados não patogênicos.

Resultados obtidos através da análise do perfil genético de isolados de *Foc* obtidos por RAPD/PCR têm sido contraditórios. Bentley *et al.* (1994) encontraram RAPDs eficiente para analisar a variação genética dentro de populações do fungo. Dois grupos diferentes foram identificados, um compatível com a raça 4 e outro com raças 1 e 2. Posteriormente, Bentley *et al.* (1995) analisaram isolados de *Foc* utilizando o mesmo método e encontraram correlação entre padrões de bandas de DNA e raças, para vários isolados australianos, mas não entre isolados de uma coleção mundial.

2.3.2. RFLP (Polimorfismos no Comprimento de Fragmentos de Restrição)

O'Donnell e Gray (1995) avaliaram a relação filogenética e variação genética dentro de 24 isolados do complexo *Fusarium solani* através da seqüência de rDNA e marcador RFLP, e concluíram que esta espécie é formada por subespécies filogenéticas distintas. Utilizando a mesma técnica, Ouellet e Seiffert (1993) diferenciaram *F. graminearum* de outras 11 espécies que atacam trigo, além de terem permitido a identificação de diversas raças desta espécie, provenientes de isolados morfológicamente semelhantes.

Appel e Gordon (1995) não encontraram correlação entre raças de *F. oxysporum* f. sp. *melonis* com padrões de RFLP da região IGS do rDNA, mas sim com VCGs e mtDNA.

Os padrões RFLPs foram consistentes com as diferentes espécies de *Fusarium*. Numa outra abordagem, é possível detectar-se polimorfismos de fragmentos de restrição do mtDNA de fungos utilizando enzimas denominadas '4 base-cutter'. Estudos desenvolvidos por Thomas *et al.* (1994) caracterizaram as raças 1 e 4 dentro de uma população de *Foc* após digestão do DNA genômico com *HaeIII*. Considerando que o DNA genômico é rico em C+G e o DNA mitocondrial em A+T, essas enzimas facilmente revelam padrões eletroforéticos correspondentes ao DNA de mitocôndria.

A região ITS tem sido utilizada para inferir diversidade genética em populações de *Fusarium*, entretanto, com resultados variáveis. Por exemplo, Waalwijk *et al.* (1996) não encontraram variação entre seqüências da região em *F. proliferatum* e *F. fujikuroi*, enquanto que O'Donnel (1992) encontrou diferenças suficientes para separar raças de *F. sambucinum*.

A instabilidade de isolados de fungos cultivados em laboratório contribui para que a separação dos isolados de *Foc* seja difícil quando fundamentada apenas em características culturais, as quais nem sempre estão relacionadas com a patogenicidade (JEGER *et al.*, 1995).

Resistência de plantas a doenças não é apenas controlada por mecanismos do hospedeiro, mas também pela habilidade do patógeno em superá-las (JEGER *et al.*, 1995). Portanto, estudos que promovem um melhor entendimento da diversidade e variabilidade patogênica do patógeno são importantes tanto para programas de melhoramento de plantas como para seleção de cultivares com resistência à Murcha de *Fusarium*.

A ordem de similaridade entre isolados, que sugere uma relação entre os padrões RAPD e de RFLP, pode ser representada na forma de dendrogramas gerados por métodos que contêm distância genética, como, por exemplo, os programas NJ e UPGMA (SNEATH e SOKAL, 1973), que são baseados em um algoritmo de agrupamento sequencial. Estes métodos podem ser encontrados em programas como MEGA2 (KUMAR *et al.*, 2001).

2.4. Sequenciamento Automático de DNA

Regiões dos iniciadores evolutivamente estáveis e seqüências altamente variáveis são encontradas em genes nuclear do rDNA, onde as seqüências altamente conservadas do RNA ribossômico, 18S, 5,8S e 28S, são interrompidas pelas regiões ITS1 (entre 18S e 5,8S) e ITS2 (entre 5,8S e 28S). Essas regiões são relatadas entre espécies próximas (TORRES *et al.*, 1990; ABD-ELSALAM *et al.*, 2003) e entre *f. spp*, variando conforme o gênero (WHITE *et al.*, 1990).

Seqüências do espaço interno transcrito do DNA ribossômico são usadas para comparar espécies de *Fusarium* nas seções *Elegans*, *Liseola* e *Dlaminia*. Teleomorfo de *Fusarium* de várias seções são classificados em *Gibberella* ou *Nectria*. Em contraste, nenhum teleomorfo tem sido descrito para espécies pertencentes à seção *Elegans*, em *F. oxysporum* e *F. redolens* (GERLACH e NIRENBERG, 1982). O núcleo das seções de

Fusarium, incluindo *Liseola*, relacionados com *Gibberella*, e a análise das seqüências de parte do gene que codifica o RNA ribossômico 28S de várias espécies de *Fusarium* e gêneros relacionados indica que *Elegans* está mais proximamente relacionado com *Liseola* (GUADET *et al.*, 1989).

Variações nas regiões ITS1 e ITS2, e no gene 5,8S rRNA, em isolados de *Fusarium sambucinum* (teleomorfo = *Gibberella pulicaris*), foram examinadas através da amplificação de PCR e do sequenciamento direto, para medir a divergência intraespecífica dentro da região ITS. A análise das seqüências revelou três tipos de ITS (A, B e C), apresentando divergência extremamente baixa. Surpreendentemente, o nível de divergência intraespecífica observado entre os tipos é muito maior que o encontrado em outras espécies (O'DONNELL, 1992).

O sequenciamento do gene rRNA 28S também foi utilizado na identificação de espécies de *Fusarium* que causam infecções nos seres humanos. Dentre as quais se destacam: *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme* (*Fusarium verticilloides*), *Fusarium oxysporum* e *Fusarium dimerum*, que juntas somam 95% das infecções. Ao contrário dos métodos convencionais, os resultados independem da experiência de um micologista, fazendo este método rápido e confiável na identificação de espécies de *Fusarium* isoladas dos pacientes (HENNEQUIN *et al.*, 1999).

Em fungos, a identificação em nível de espécie é de fundamental importância para fins epidemiológicos e pode ser de extrema necessidade devido ao fato de que alguns novos agentes antifúngicos exibem atividade variável dependendo da espécie de *Fusarium* (ARIKAN *et al.*, 1998; SANCHE *et al.*, 1997).

O MegaBace 1000 é um seqüenciador automático composto por 96 capilares constituídos de fibra de vidro, que analisam e determinam a ordem dos nucleotídeos presentes na amostra através de eletroforese e fluorescência, já que os ddNTPs do pré-mix para PCR se encontram marcados com cromóforos.

Os fragmentos de DNA migram através da matriz linear de poliacrilamida dentro dos capilares, onde ocorre a separação eletroforética do DNA. O laser excita a fluorascéina, idêntica para as quatro bases nitrogenadas, e esta em seguida excita a rodamina, diferente para cada base. Então os cromóforos emitem sinais em forma de eletroferograma, onde os picos produzidos representavam as bases nitrogenadas, identificadas através de diferentes cores (Adenina: verde; citosina: azul; Guanina: preto; Timina: vermelho), as quais são traduzidas em seqüências lineares.

2.5. Análise Filogenética

Existem, essencialmente, três métodos para classificar sistematicamente os organismos. A sistemática tradicional, baseada em caracteres escolhidos *a priori*, de acordo com a sua importância para o taxonomista, utiliza, no caso dos fungos, observações morfológicas e culturais de suas colônias. A filogenia sistemática ou cladística estuda as relações evolucionárias através da utilização de técnicas de biologia molecular e busca grupos filogenéticos, baseados na rota evolucionária dos organismos (TEHLER, 1994). De acordo com os filogeneticistas os grupos devem ser naturais ou monofiléticos (AVISE, 1994). A essência da cladística é agrupar organismos de acordo com sinapomorfias ou caracteres derivados compartilhados, que são herdados e reconhecem grupos monofiléticos (TEHLER, 1994; SPATAFORA e BLACKWELL, 1994).

Já a fenética, baseada em taxonomia numérica, utiliza similaridade total entre os organismos para reconstruir relações entre os organismos, através de métodos de distâncias evolucionárias (geralmente número de substituições de nucleotídios e aminoácidos separando duas OTUs) que são computadas para todos os pares de taxa. Não há polarização (direção da mudança) dos caracteres ou interpretações evolucionárias (LI e GRAUR, 1991).

O programa MEGA2 (KUMAR *et al.*, 2001) reconstrói a filogenia de um grupo baseado em distâncias evolucionárias. As árvores ou dendrogramas gerados são denominados fenogramas. Dentro desta categoria existem dois métodos de distância para reconstrução de dendrogramas: O UPGMA e o NJ (LI e GRAUR, 1991), ambos utilizados nesta pesquisa.

O UPGMA é o método mais simples, utilizado para construir dendrogramas que refletem similaridades fenotípicas entre OTUs, mas pode ser utilizado também na reconstrução de árvores filogenéticas se as taxas de evolução são aproximadamente constantes entre as linhagens estudadas. O método utiliza um algoritmo de agrupamento sequencial no qual relações topológicas são identificadas em ordem de similaridade (LI e GRAUR, 1991).

No método NJ, ou vizinhos juntos são OTUs conectadas através de um nóculo interno simples. NJ identifica, sequencialmente, pares de vizinhos que minimizam o comprimento total da árvore (LI e GRAUR, 1991).

As seqüências podem ser avaliadas através do alinhamento múltiplo (ClustalX 1.8) (THOMPSON *et al.*, 1997) ou por comparações de seqüências em pares (pairwise) utilizando blastn (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

As sínteses filogenéticas, biológicas, e morfológicas de espécies próximas de *Fusarium* têm revitalizado a taxonomia do gênero. Doze espécies sexuadas de *Gibberella* de importância agrícola foram analisadas quanto à diversidade filogenética, biológica e química do gênero. Mesmo as espécies intimamente relacionadas com *Gibberella* diferem no modo de reprodução, distribuição geográfica e de hospedeiros, a patogênese da planta e a produção de toxinas e de outros metabólitos biológicos (DESJARDINS, 2003).

Para estudar o agente etiológico da Giberela, o fungo *Fusarium graminearum*, genealogias alélicas foram construídas de seis genes nucleares de cópia única, das linhagens selecionadas para representar a diversidade genética deste patógeno. Excluindo uma linhagem híbrida, todas as seis genealogias recuperaram as mesmas sete linhagens biogeograficamente organizadas, sugerindo que representam espécies filogeneticamente distintas. A análise de parsimônia mostrou relacionamento entre as sete linhagens do clado *F. graminearum* com isolados de *Fusarium* causadores de Giberela. A evidência filogenética está presente também na hibridização introgressiva e na recombinação intragênica entre linhagens do clado de *Fusarium graminearum* na natureza (O'DONNELL *et al.*, 2000).

A identificação molecular e os estudos filogenéticos abrangem grande extensão em polimorfismos nas seqüências do rDNA em espécies de *Fusarium*. Em adição ao fragmento do rDNA que abrange os espaços transcritos internos ITS1 e ITS2 e a seqüência de 5,8S, dois genes recentemente caracterizados (*cbh-C* e *topII*) são usados como marcadores moleculares na genotipagem de espécies de *Fusarium*. As análises filogenéticas baseadas nos dados dos genes permitiram a distinção das espécies e foram mais informativas do que aquelas que resultaram das seqüências do rDNA (HATSCH *et al.*, 2004).

Quinze isolados de *Fusarium oxysporum* e um de *F. subglutinans* foram selecionados para representar diversidade baseada nas diferenças em raças patogênicas, VCGs, mtDNA, haplótipo IGS e perfil genético de DNA, a fim de observar a origem da virulência dentro de *F. oxysporum*, o relacionamento entre linhagens patogênicas e não patogênicas e a evolução de diferentes raças de *F. oxysporum* f. sp. *melonis*. A análise de

parsimônia bootstrap de seqüências da região IGS mostrou uma árvore filogenética significativa (APPEL e GORDON, 1996).

Namiki *et al.* (1994) avaliaram o relacionamento filogenético de cinco *formae speciales* em 50 isolados de *Fusarium oxysporum* que causam doenças em plantas através da técnica do perfil genético de DNA (fingerprinting) com seqüências repetitivas de DNA nuclear. Seis linhagens patogênicas também foram avaliadas. Utilizando análise parsimônia e suportes estatísticos, foi observado que as *formae speciales* apresentam variação intraespecífica distinguível ao de nível de DNA e de seus hospedeiros.

A seqüência homogênea de unidades repetidas de rDNA é mantida em populações de muitas espécies (DOVER, 1982). Por causa da abundância de rRNA nas células e das seqüências conservadas contidas, o rRNA tem sido visto como uma molécula primitiva na reconstrução filogenética da história dos organismos (WOESE, 1987)

Modelos de estruturas secundárias (GUTELL e FOX, 1988) e comparações de seqüências de nucleotídeos de diversos organismos mostram que os rRNAs são compostos por uma estrutura com núcleo localizado junto a regiões de seqüências sem núcleo (WOESE, 1987). Os eucariontes têm regiões de seqüências inseridas dentro da estrutura básica de rRNA e nos procariontes é ausente (HANCOCK e DOVER, 1991). Segundo Hassouna *et al.* (1984), as seqüências dessas regiões geralmente são menos resistentes que as seqüências de estruturas com núcleo e tem sido chamadas de domínios e referidas como regiões D. O padrão de descendência entre espécies diferentes (LAKE, 1987; WOESE, 1987) ou próximas (GUADET *et al.*, 1989; GUÉHO *et al.*, 1990) tem sido determinado usando seqüências de regiões variáveis ou conservadas do rRNA.

De acordo com Guadet *et al.* (1989), entre espécies de *Fusarium* a região D2 é muito mais variável que o domínio D1 ou o domínio D7. Tautz *et al.* (1987) mostraram que variações de seqüências em espécies ou raças têm sido encontradas em regiões do rDNA de alguns organismos, mas a maioria das seqüências de *Fusarium* usa um molde de rRNA que não está incluído nessas regiões. Tanto a região D2 como o rRNA podem ser utilizados como informativos em fungos próximos de vários grupos filogenéticos (GUÉHO *et al.*, 1990; KURTZMAN e ROBNETT, 1991; LOGRIECO *et al.*, 1991). Por causa do domínio D2, as seqüências são altamente variáveis nos diferentes grupos de organismos, mostrando ser uma boa região da seqüência para estudar o gênero *Fusarium*.

Enquanto a seqüência homogenética do rRNA é mantida em muitas espécies (DOVER, 1987; GUADET *et al.*, 1989), o rDNA de alguns organismos contém seqüências

heterogenéticas tanto em espécies como em indivíduos (DOVER, 1989; SEPERACK *et al.*, 1988). De acordo com Peterson (1991), o conhecimento de resultados da variação intraespecífica é de fundamental importância na interpretação dos dados. Devido aos organismos terem sido encontrados em diferentes níveis de variabilidade de seqüências intraespecíficas, é necessário determinar essa característica no grupo que está sendo estudado. Uma baixa variação de seqüências intraespecíficas de rRNA sugere que a maioria das espécies de *Fusarium* poderiam ser identificadas nas seqüências de bases de rRNA.

Guadet *et al.* (1989) estudaram seqüências de rRNA de 51 linhagens de espécies de *Fusarium*. Espécies com o teleomorfo *Gibberella* foram agrupadas juntas e as espécies com o teleomorfo *Nectria* foram colocadas em um outro grupo. Atuais distinções morfológicas entre as espécies examinadas por Guadet *et al.* (1989) são sustentadas pela necessidade da variação das seqüências entre raças dessas espécies (Peterson, 1991).

Segundo Bruns *et al.* (1991) e Samuels e Seifert (1995), variações nas seqüências dos nucleotídeos demonstra relação entre vários níveis, dependendo da seqüência escolhida para análise. Os genes rDNA têm sido aplicados para analisar a maioria dos eventos evolucionários. Considerando que o espaço transcrito interno do rDNA é menos conservado, ele tem sido usado com sucesso para investigar o relacionamento entre espécies.

A reconstrução filogenética dos organismos, utilizando seqüências de nucleotídeos, tem sido realizada através de cálculos da distância matriz, da análise parsimônica (BRUNS *et al.*, 1989), de programas de probabilidade máxima (GUÉHO *et al.*, 1990), ou operador métrico (LAKE, 1987). Peterson (1991) afirma que diferente do método analítico, o interesse principal é a qualidade dos dados. Como Avise (1989) destacou, as fontes múltiplas dos dados podem ser necessárias para confirmar a filogenia e que dados de seqüências de rRNA da região D2 são ótimas medidas de similaridade genética entre espécies.

Carbone e Kohn (1993), Chen (1992) e Vilgalys e Hester (1990) mostraram que regiões do rDNA geralmente são escolhidas para estudos taxonômicos e filogenéticos, devido aos dados das seqüências que estão disponíveis e por conter regiões conservadas e variáveis, permitindo a diferença de gênero, espécie ou nível intraespecífico. Em fungos ou em outros organismos, a região não codificante do rDNA tem sido usada como regiões variáveis.

O espaço interno transcrito do rDNA pode desenvolver variação dentro do gênero e é usado na diferenciação de espécies. Entretanto, a variabilidade de seqüências é geralmente muito baixa ou indetectável em nível intraespecífico (LEE e TAYLOR, 1992). Apesar do surpreendente grau de divergência de seqüências ITS dentro de espécies de *F. sambuncinum* terem sido relatadas (O'DONNELL, 1992), poucas diferenças foram encontradas em *F. oxysporum* (AVELANGE, 1994).

Apesar do nível de conservação da região ITS ser alto intraespecificamente (LEE e TAYLOR, 1992), ela tem sido variável o suficiente para diferenciar grupos de *Fusarium solani* (OLIVEIRA e COSTA, 2002).

Neste trabalho, a região ITS de isolados de *Fusarium oxysporum* amplificada por PCR foi determinada em um sequenciador automático de DNA MegaBace 1000. Esse equipamento separa e analisa fragmentos de DNA, marcados com cromóforos, através de eletroforese e fluorescência, respectivamente.

A análise de seqüências de rRNA de f. spp. de *Fusarium oxysporum*, utilizando diversos métodos biomoleculares, RFLPs e RAPDs, resultou em dados concretos na determinação de afinidades genéticas dentro da população do fitopatógeno. Seqüências da região ITS e 5,8S rDNA possibilitou a reconstrução filogenética e avaliação da correlação de f.spp. com hospedeiros e cultivares.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a variabilidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* através da detecção de rDNAs polimórficos, utilizando RAPDs, RFLPs da região IGS e sequenciamento da região ITS e 5,8S rDNA e determinar a possível associação entre polimorfismo de DNA e marcadores moleculares.

3.2. Específicos

- Verificar a ocorrência de DNA polimórfico, por RAPDs e RFLPs, em DNA repetitivo (região IGS) de diferentes isolados de *F. oxysporum* obtidos de vários hospedeiros;
- Relacionar haplotipos gerados por RFLPs da região IGS com especificidade ao hospedeiro;
- Relacionar padrões de bandas RAPD com f.spp. dos isolados estudados;
- Produzir seqüências amplificadas da região ITS de rDNA;
- Determinar as relações filogenéticas entre isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), f. sp. *passiflorae* (*Fop*), f. sp. *lycopersici* (*Fol*) e f. sp. *capsici* (*Fos*);
- Verificar se tais agrupamentos gerados pelos padrões moleculares, baseados em análises de similaridade, utilizando-se os métodos NJ e UPGMA podem ser relacionados com os hospedeiros;
- Avaliar se cada f. spp. apresenta uma origem evolucionária única.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica – GEMPRO do Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade da Universidade Federal de Alagoas/CECA/UFAL, no período de setembro de 2001 a janeiro de 2004.

4.1. Obtenção dos Isolados de *Fusarium oxysporum*

Os isolados de *Fusarium oxysporum* foram obtidos da coleção de culturas do Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade (isolados FOC1F, FOC10F, FOC12F, FOC13F, FOC16F, 36D1F, 68D1F, 159DF, 167DF 169D1F, 211D1F, 209DF, 213D2F, 276D2F, 193D2F, 135D2AF e 170D1F) e do Laboratório GEMPRO (isolados FOC4F, FOC7F, FOC17F e FOC20F) do CECA, UFAL.

Na Tabela 1 estão listados os isolados de *Fusarium oxysporum*, com seus respectivos hospedeiros, cultivares e origens geográficas.

Tabela 1. Isolados de *Fusarium oxysporum*, seus respectivos cultivares/hospedeiros e suas procedências

ISOLADO	f. sp.	ORIGEM GEOGRÁFICA*	HOSPEDEIRO*	CULTIVAR
FOC1F	<i>cubense</i>	Porto Real do Colégio	Banana	Maçã
FOC4F	<i>cubense</i>	São Brás	Banana	São Tomé
FOC7F	<i>cubense</i>	Feliz Deserto	Banana	Prata
FOC10F	<i>cubense</i>	Palmeira dos Índios	Banana	Pacovan
FOC12F	<i>cubense</i>	Palmeira dos Índios	Banana	Maçã
FOC13F	<i>cubense</i>	Joaquim Gomes	Banana	Maçã
FOC16F	<i>cubense</i>	Porto Calvo	Banana	Maçã
FOC17F	<i>cubense</i>	Jacuípe	Banana	Maçã
FOC20F	<i>cubense</i>	Jundiá	Banana	Maçã
36 D1F	<i>lycopersici</i>	*	Tomate	—
68 D1F	<i>lycopersici</i>	*	Tomate	—
159 DF	<i>lycopersici</i>	*	Tomate	—
167 DF	<i>lycopersici</i>	*	Tomate	—
169 D1F	<i>lycopersici</i>	*	Tomate	—
211 D1F	<i>lycopersici</i>	*	Tomate	—
209 DF	<i>lycopersici</i>	*	Tomate	—
213 D2F	<i>lycopersici</i>	*	Tomate	—
276 D2F	<i>passiflorae</i>	*	Maracujá	—
193 D2F	<i>passiflorae</i>	*	Maracujá	—
135 D2 AF	<i>passiflorae</i>	*	Maracujá	—
170 D1F	<i>capsici</i>	*	Pimentão	—

* Municípios de Alagoas

* Provenientes de mercados de Maceió

* Banana: *Musa* spp.; Tomate: *Lycopersicon* sp.; Maracujá: *Passiflora* sp.; Pimentão: *Capsicum* sp.

Após isolamento, as culturas foram incubadas em meio BDA por 6-7 dias, à temperatura de 25°C, e em seguida mantidos em tubos de ensaio com BDA a 4°C, para posterior confirmação da espécie.

4.2. Preparação das Microculturas e Identificação dos Isolados de *Fusarium oxysporum*

Para o preparo de microculturas foi utilizado o modelo bloco de ágar, segundo Menezes e Silva-Hanlin (1997), modificado de Sutton, onde foram vertidos cerca de 20 mL do meio de cultura numa placa de Petri, permitindo a sua solidificação. Em seguida, cortou-se o ágar em pequenos blocos quadrados (1 cm²), com o auxílio de um bisturi flambado e colocou-se um bloco de ágar no centro de uma lâmina de microscópio, apoiada sobre um suporte de vidro, dentro de uma placa de Petri, contendo um disco de papel filtro, com o mesmo diâmetro da placa. Todo o material utilizado para o preparo da microcultura foi previamente esterilizado em autoclave.

Numa etapa posterior, inoculou-se o bloco de ágar com pequenos fragmentos de micélio, colocados em cada lado do bloco, cobriu-se o bloco ou o disco com lamínula e adicionou-se sobre o papel de filtro 5 a 10 mL de água destilada esterilizada, para manter um ambiente saturado de umidade. Incubou-se o conjunto por 24 a 48 horas, à temperatura ambiente (22-25°C). Após o período de incubação, retirou-se a lamínula com auxílio de uma pinça flambada e colocou-a sobre uma lâmina contendo uma gota de Azul de Amann. A avaliação consistiu de observações morfológicas das estruturas fúngicas características sob microscópio óptico, em aumento de 400 vezes.

4.3. Extração do DNA Genômico

O protocolo de extração adotado foi o de Graham *et al.* (1994), com algumas modificações (Silva, 1996), o qual é recomendado para preparação de DNA genômico fúngico. Fragmentos da colônia do fungo foram transferidos para microtubos Eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de BD. Em seguida, os tubos foram incubados para crescimento do fungo em um agitador, por 3 dias. Após este período, os tubos foram centrifugados por 2

min a 13.300 rpm e o excesso de BD (sobrenadante) descartado com o auxílio de uma pipeta.

O micélio foi lavado uma vez com 100 μ L de ADE, e centrifugado por 2 min a 13.300 rpm, sendo o excesso de água retirado com pipeta. Foi adicionado 100 μ L de tampão de extração CTAB (cetiltrimetil brometo de amônio) (4% CTAB; 100 mM Tris-HCl, pH 8; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA), previamente aquecido a 65°C.

O micélio foi macerado utilizando pistilo plástico até a solução adquirir uma consistência gelatinosa. Em seguida, adicionou-se 400 μ L do tampão de extração, também aquecido a 65°C, e homogeneizou-se, com o auxílio de uma ponteira, por aproximadamente 3 min.

As amostras foram incubadas em banho-Maria por 20 min a 55-65°C. Em seguida, foram centrifugadas por 5 min a 13.000 rpm e o sobrenadante coletado e passado para um novo tubo.

Foi adicionado um volume de CIA na proporção de 24:1 e inverteu-se gentilmente os tubos por 5 min, até que uma emulsão homogênea fosse formada.

Logo após, os tubos foram centrifugados por 1 min a 13.000 rpm e a fase sobrenadante foi cuidadosamente retirada para que a interface não fosse perturbada. Esta foi transferida para um novo tubo.

Adicionou-se 1/10 volumes de acetato de sódio (3 M, pH 4,8) e dois volumes de etanol absoluto gelado, sendo os tubos gentilmente agitados.

Em seguida, os tubos foram colocados no freezer a -20°C por, no mínimo, 3 horas, para permitir a precipitação do DNA e em seguida centrifugados por 2 min a 13.000 rpm para formação do DNA precipitado. O sobrenadante foi descartado através da inversão dos tubos sobre um papel toalha e mantidos assim até secar o excesso do líquido. Lavou-se o DNA precipitado com etanol a 70% gelado (v/v) (100 μ L), que foi descartado em papel toalha e deixado em temperatura ambiente até evaporar todo o álcool.

Ressuspendeu-se o DNA com 50 μ L do Tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA, pH 8), contendo 1 μ L de RNase (10 mg/mL). Os tubos foram então incubados a 37°C por 30 min e após esfriarem, mantidos estocados a 5°C.

Após realizada a extração do DNA, foi feito um gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL), para que o fragmento fosse visualizado através de eletroforese (4v.cm⁻¹) e em seguida, fotografado. As soluções foram preparadas segundo Sambrook *et al.* (1989).

4.4. Análise dos RFLPs da região IGS

Dois iniciadores específicos (25S/4 = 5' – GAACGCCTCTAAGTCAGAATCC – 3' e 18S/4 = 5' – GAGACAAGCATATGACTACTGGC – 3') foram empregados para amplificar a região IGS (ETS e NTS).

Diversas concentrações dos reagentes foram testadas visando otimizar a amplificação da região por PCR. Foram avaliadas as seguintes concentrações do iniciador: 1 µM (estoque), 0,2 µM, 0,02 µM e 0,004 µM. O DNA foi diluído em ADE: 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:80 e 1:100. As concentrações testadas do MgCl₂ foram 1,5 mM e 3,0 mM. As concentrações dos reagentes da reação mais eficiente são mostradas na Tabela 2, para um volume final de 50 µL.

Tabela 2. Concentrações dos reagentes utilizados para amplificar a região IGS

Reagente	Concentração final
H ₂ O Milli-Q	---
Tampão PCR 10X	[1X]
dNTPs	0,2 mM cada
MgCl ₂	3,0 mM
Iniciador I *	0,004 µM
Iniciador II *	0,004 µM
<i>Taq</i> Polimerase	2,5 U
DNA Template	(10 – 50 ng)

* Iniciador I ⇒ 25S/4 = 5' – GAACGCCTCTAAGTCAGAATCC – 3'

* Iniciador II ⇒ 18S/4 = 5' – GAGACAAGCATATGACTACTGGC – 3'

A reação PCR foi ajustada para o seguinte programa: um ciclo: 2 min de desnaturação a 95°C e 2 min de plataforma a 72°C; 38 ciclos: 1 min de desnaturação a 94°C, 1 min de pareamento a 57°C, 3 min extensão a 72°C e um ciclo final: 1 min de pareamento a 57°C e 6 min de extensão a 72°C.

Foi realizado um teste de digestão simples do fragmento da região IGS de um único isolado (135D2AF) utilizando cinco endonucleases de restrição (*SalI*, *SmaI*, *ClaI*, *PstI* e *BglI*), a fim de observar a presença de RFLPs e selecionar os iniciadores para as digestões subsequentes (Tabela 3).

O tampão utilizado em todas as amostras foi o One-Phor-All (100 mM Tri-acetato, pH 7,5; 100 mM acetato de magnésio; 500 mM acetato de potássio) (Amersham Biosciences). As amostras foram incubadas durante a noite, à temperatura de 37°C.

Os fragmentos de restrição gerados foram submetidos a eletroforese (4v.cm⁻¹) e visualizados em gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio. Os tamanhos dos fragmentos IGS amplificados foram estimados por comparação com um marcador de 1 kb (Life Technologies).

Tabela 3. Reação de digestão com enzimas de restrição

Reagente	Volume/Concentração				
DNA	5,5µL(10-50ng)	5,5µL(10-50ng)	5,5µL(10-50ng)	5,5µL(10-50ng)	5,5µL(10-50ng)
Tampão	1,0 µL/1X	1,0 µL/1X	1,0 µL/1X	1,0 µL/1X	1,0 µL/1X
Enzimas	1,5 µL/10U <i>BglII</i>	1,5 µL/10U <i>ClaI</i>	1,5 µL/10U <i>PstI</i>	1,5 µL/10U <i>SaII</i>	1,5 µL/10U <i>SmaI</i>

Os fragmentos de restrição foram tratados como loci distintos e sua presença ou ausência codificados por 1 e 0, respectivamente, visando a construção de cladogramas através do programa TreeView.

4.5. Amplificação RAPD-PCR

O DNA do isolado 135D2AF foi utilizado para a otimização da reação RAPD - PCR. Foram testadas diferentes concentrações de MgCl₂ e de três iniciadores (Operon Technologies Inc.) testados: Iniciador OPR 3 (AGCGCCATTG), Iniciador OPR 5 (ACGCACAACC) e Iniciador OPR 8 (CAGCACTGAC). As variações de concentração do iniciador e do MgCl₂ estão especificadas na Tabela 4.

As reações para amplificação RAPD/PCR foram realizadas em um termociclador utilizando-se o seguinte programa segundo White *et al.* (1990): desnaturação por 2 min a 95°C, pareamento por 2 min a 55°C e extensão a 72°C por 45 seg. Trinta e oito ciclos adicionais foram efetuados de seguinte forma: 95°C por 30 seg (desnaturação), 55°C por 30 seg (pareamento), e 72°C por 45 seg (extensão). Um ciclo final permitiu a extensão da fita dupla de DNA por 10 min a 72°C.

Tabela 4. Concentração final dos reagentes usados na amplificação RAPD-PCR

Reagente	Concentração Final								
H ₂ O	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tampão	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X
dNTP	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM
MgCl ₂	3,0 mM	3,0 mM	3,0 mM	3,0 mM	3,0 mM	3,0 mM	3,5 mM	3,5 mM	3,5 mM
Iniciador	0,02µM	0,1 µM	0,02µM	0,1 µM	0,02µM	0,1 µM	0,02µM	0,1 µM	0,1 µM
Taq Polimerase	2,5U	2,5U	2,5U	2,5U	2,5U	2,5U	2,5U	2,5U	2,5U
DNA Template	10-50ng	10-50ng	10-50ng	10-50ng	10-50ng	10-50ng	10-50ng	10-50ng	10-50ng
	Iniciador OPR3			Iniciador OPR5			Iniciador OPR8		

Produtos (bandas) gerados pela amplificação PCR foram submetidos à eletroforese (4v.cm⁻¹) e separados de acordo com o tamanho em gel de agarose a 1,2%, sendo fotografados posteriormente.

Uma matriz de similaridade baseada no Coeficiente de Associação de Jaccard (CAJ) que calcula similaridades considerando variáveis binárias (0 para ausência e 1 para presença de banda) foi gerada a partir dos dados.

O coeficiente é calculado segundo a fórmula $CAJ = a / (a + b + c)$, onde a = (1,1) para ambos os isolados com a mesma banda; b = (1,0) para o primeiro com a banda e o segundo sem a banda e c = (0,1) para o segundo com a banda e o primeiro sem a banda (SNEATH e SOKAL, 1973). Quanto maior a semelhança entre duas linhagens, maior é o valor do coeficiente de similaridade.

4.6. Amplificação PCR das Regiões do DNA Ribossomal

Dois iniciadores específicos (ITS 5: 5' – GCAAGTAAAAGTCGTAACAAGG – 3' e ITS 4: 5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'), desenhados por White *et al.* (1990), foram empregados para amplificar as regiões ITS1-ITS2, 5,8 rDNA e porção do 28S rDNA de 21 isolados, que constituem um fragmento de cerca de 600 pb.

As reações foram efetuadas em volumes de 50 µL, cada uma contendo de 10 a 50 ng do DNA, 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), tampão da Taq 1X, 0,004 µM dos iniciadores, 2,5 U de Taq DNA polimerase e 3,0 mM de MgCl₂.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador utilizando-se o seguinte programa, adotado por Silva (1996): desnaturação por 2 min a 95°C, pareamento por 30 seg a 55°C, e extensão a 72°C por 45 seg. Foram realizados 38 ciclos adicionais de

95°C/30 seg (desnaturação), 55°C/30 seg (pareamento), e 72°C/45 seg (extensão). Um ciclo final permitiu a extensão da fita dupla de DNA.

Os produtos de PCR gerados foram fotografados após eletroforese em gel de agarose a 1,2% na presença de brometo de etídio (0,5 µg/mL).

4.7. Sequenciamento das Regiões do DNA Ribossomal

As amostras resultantes da reação de PCR da região ITS1-ITS2, 5,8S rDNA e porção 28S rDNA foram seqüenciadas. O sequenciamento foi realizado com os iniciadores ITS 4 (reverse – iniciador reverso) e ITS 5 (forward – iniciador anverso), cujas seqüências estão especificadas no item 4.6, tendo cada isolado sido seqüenciado nas duas direções em reações separadas.

Preparou-se o pré-mix em dois tubos de Eppendorf de 0,5 µL, contendo 4,0 µL de água destilada estéril, 0,1 µL do iniciador ITS4 ou ITS5 (0,004 µM) (um iniciador em cada tubo) e 4,0 µL do kit ET Terminator, resultando um total de 8,1 µL. O pré-mix foi agitado rapidamente. Em seguida foi adicionado 0,5 µL de DNA (10 – 50 ng/µL) e acrescentado água destilada estéril para 10 µL. Agitou-se-se novamente e efetuou-se uma rápida centrifugação. Logo após a placa foi para o termociclador.

A ciclagem da reação de PCR para sequenciamento foi a seguinte: um ciclo inicial a 95°C por 2 seg (desnaturação); 35 ciclos a 95°C por 10 seg (desnaturação), 50°C por 10 seg (pareamento dos iniciadores) e 60°C por 1 min (extensão); e um ciclo final a 4°C - ∞.

Para a precipitação do DNA após a reação de sequenciamento, adicionou-se 1 µL de acetato de amônio (7,5 M), deu-se uma rápida centrifugação para precipitar o sal e incubou-se a placa por 20 seg. Em seguida, adicionou-se 2,5 volumes de etanol absoluto. Logo após, efetuou-se agitação em vortex, 3x por 1 min, e incubou-se por 15 min à temperatura ambiente. Centrifugou-se a placa por 45 min a 4000 rpm e descartou-se o sobrenadante, invertendo-a. Foi adicionado 150 µL de etanol 70% e efetuada nova centrifugação por 10 min a 4000 rpm à temperatura ambiente.

Descartou-se o sobrenadante por inversão da placa, efetuou-se uma rápida centrifugação com a placa invertida e logo após adicionou-se 10 µL de tampão de carregamento (tampão de formamida – 70% de formamida e 1 mM de EDTA). Dissolveu-se o DNA precipitado através de agitação em vortex, e após uma rápida centrifugação, armazenou-se a placa no freezer a -20°C.

Os parâmetros de eletroforese selecionados durante o sequenciamento foram: voltagem de injeção da amostra, 2 kV; tempo de injeção da amostra, 80 seg; voltagem da corrida, 9 kV e o tempo da corrida, 100 min, suficiente para a polimerização de aproximadamente 600 nt.

O parâmetro químico selecionado foi “ET Terminators”, enquanto que os parâmetros opcionais foram: “photomultiplier tube” (PMT₁) a 750 V; “photomultiplier tube” (PMT₂) a 750 V; temperatura durante a corrida de 44°C e “Base Caller: Cimarron, 1.53 Slim Phredify”.

As corridas efetuadas foram devidamente analisadas através de programas disponíveis no pacote de softwares do MegaBace1000. O “Sequence Analyser” gerou os eletroferogramas de cada isolado e através do programa “ScoreCard” foram obtidas as informações estatísticas de cada seqüência, como número de nucleotídeos obtidos e a eficiência.

O “ScoreCard” é programa específico para análise da qualidade das seqüências produzidas pelo seqüenciador MegaBace1000.

O programa foi ajustado para um “phred” de 20, conseqüentemente, em verde estão destacadas as amostras que obtiveram sequenciamento de mais de 400 nt, em amarelo de 101-400 nt e em vermelho, abaixo de 100 nt. As seqüências em amarelo e vermelho foram repetidas visando obter um número superior a 400 nt (Apêndice 6).

O alinhamento de seqüências em pares da região ITS1-5,8S rDNA-ITS2 e porção do 28S rDNA de cada uma das 21 seqüências obtidas com o iniciador F, foi efetuado por meio de comparação com seqüências da mesma região, ITS, de *Fusarium* disponíveis no banco de dados do GenBank. As seqüências foram avaliadas através do programa BLAST, utilizando a ferramenta blastn (nucleotídeo-nucleotídeo).

Para avaliação filogenética das seqüências da região ITS, da subunidade 5,8S do rRNA e 28S do rDNA foram utilizados dois métodos de distância, o UPGMA, que assume uma taxa constante de substituição de nucleotídeos para todas as linhagens, e NJ, uma versão simplificada do método de evolução mínima (ME), que não exige que as taxas de substituição sejam constantes.

O modelo selecionado para a estimativa da distância e os tipos de substituições para serem incluídas no cálculo de distância comparando seqüências em pares foi o *Kimura's-Two-Parameter (gamma) Model (K-2-P g)*, que corrige para múltiplas mutações de ponto, considerando as taxas de substituições transicionais e transversionais entre os sítios.

Espaços e bases indeterminadas, N, foram tratadas como deleção completa. Nucleotídeos e informações perdidas, alinhamento dos espaços e símbolos idênticos foram codificados por (?), (-) e (.), respectivamente. A matriz de distância genética entre os isolados se encontram no Apêndice 8.

5. RESULTADOS

5.1. Confirmação dos Isolados de *Fusarium oxysporum*

Foram efetuadas microculturas dos 21 isolados do complexo *Fusarium oxysporum* (*F.o.*), patogênicos a quatro diferentes hospedeiros: banana (*F. oxysporum* f. sp. *cubense* - *Foc*), tomate (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersic* - *Fol*), maracujá (*F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* - *Fop*) e pimentão (*F. oxysporum* f. sp. *capsici* - *Fos*). Todas as estruturas fúngicas preparadas em lâminas de vidro e observadas através de um microscópio óptico foram confirmadas como pertencentes à espécie (Fig. 1).

Os microconídios apresentaram-se elipsoidais, às vezes curvos, unicelulares, produzidos em falsas cabeças, a partir de conidióforos tipo monofiálides; macroconídios com uma célula apical atenuada e outra basal, preferencialmente em forma de canoa, com 4 a 6 células; clamidosporos presentes. Em meio BDA as colônias apresentaram crescimento micelial aéreo, cotonoso, reverso geralmente púrpura a creme.

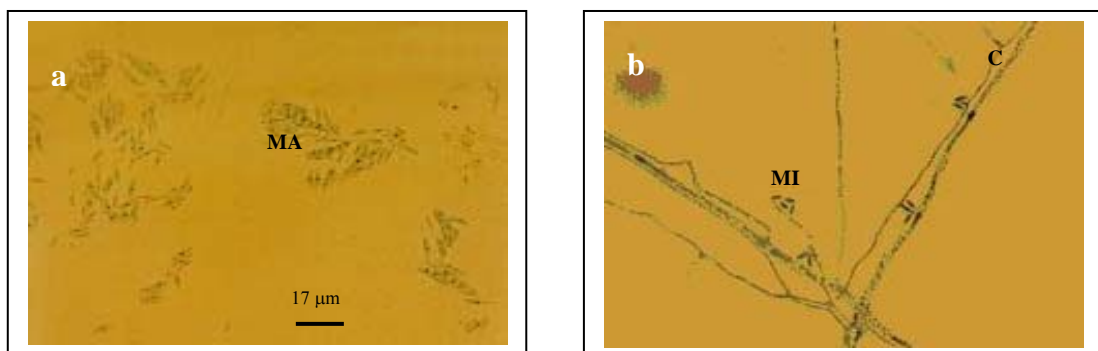


Figura 1. Microfotografia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* mostrando: a) macroconídios (MA); b) conidióforos (C) e microconídios (MI) em falsas cabeças.

5.2. Extração do DNA Genômico

Através do método CTAB foi obtido DNA genômico dos isolados de *Fusarium oxysporum* avaliados. Foi aplicado, no primeiro poço do gel, um marcador de peso molecular de 1kb para identificação do tamanho do fragmento de DNA obtido, o qual, foi em seguida, visualizado através de eletroforese ($4v.cm^{-1}$) em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio.

O tratamento da amostra com RNase contribuiu para a alta qualidade do DNA obtido. Todas as amostras apresentaram DNA de alto peso molecular (> 11 kb).

5.3. Amplificação da Região Intergênica (IGS)

O DNA diluído em 1: 30 de ADE e concentração de $MgCl_2$ de 3 μM foram as condições que proporcionaram melhor amplificação da região IGS. Um outro procedimento foi o de modificar a temperatura de anelamento da termociclagem, de 57°C para 58°C e 59°C, mas resultados não foram satisfatórios.

Um fragmento único de aproximadamente 2,5 kb foi amplificado em todos os isolados de *F. oxysporum* (Figs. 2 e 3).

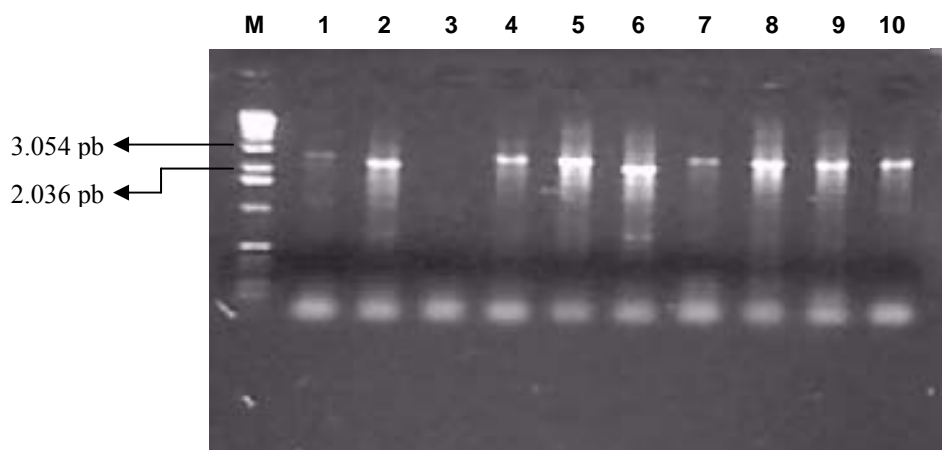


Figura 2. Amplificação da região IGS de 10 isolados de *F. oxysporum*. M – marcador 1kb, 1 - isolado 36D1F, 2 - isolado 68D1F, 3 - isolado 159DF, 4 - isolado 167D1F, 5 - isolado 169D1F, 6 - isolado 211D1F, 7 - isolado 209DF, 8 - isolado 276D2F, 9 - isolado 193D2F e 10 -isolado 135D2AF. Gel de agarose a 1% e corado com 0,5 μL ($\mu g/mL$) de brometo de etídio.

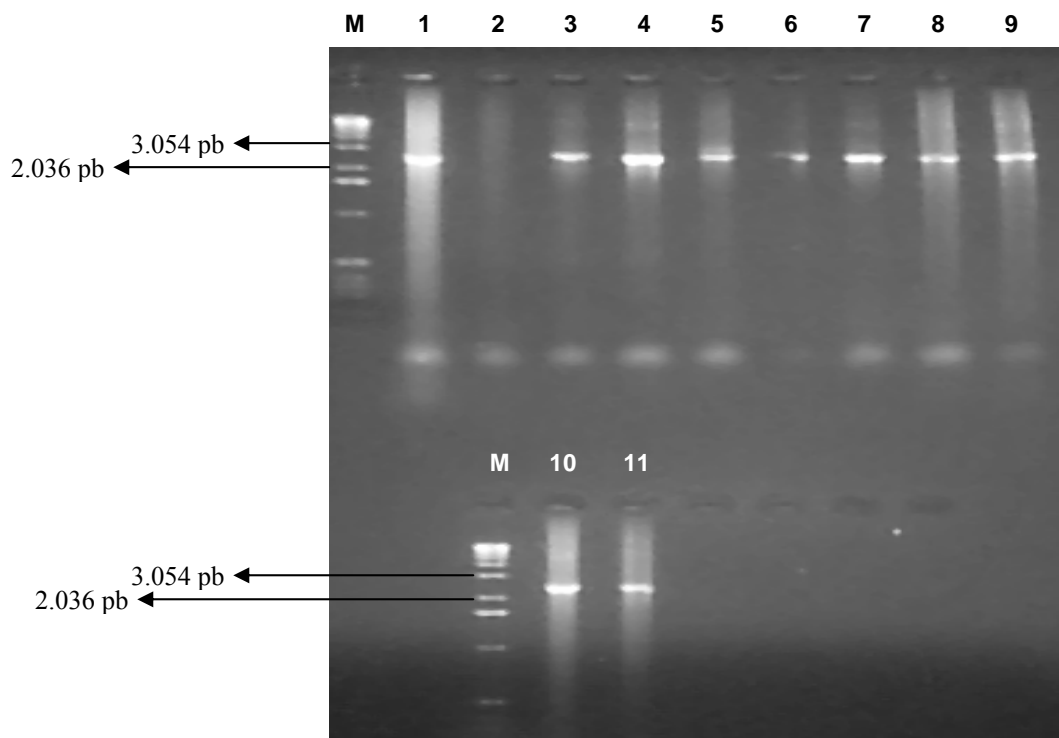


Figura 3. Amplificação da região IGS de 11 isolados de *F. oxysporum*. M – marcador 1kb, 1 - isolado FOC1F, 2 - isolado FOC4F, 3 - isolado FOC7 F, 4 - isolado FOC10F, 5 - isolado FOC12F, 6 - isolado FOC13F, 7 - isolado FOC16F, 8 - isolado FOC17F, 9 - isolado FOC20F, 10 -isolado 213D2F e 11- isolado 170D1F. Gel de agarose a 1% e corado com 0,5 μ L (μ g/mL) de brometo de etídio.

5.4. Análise de RFLPs da Região IGS

O tamanho total do fragmento amplificado, estimado pela soma dos tamanhos dos fragmentos de restrição gerados, variou entre 2,4 e 2,6 kb (Fig. 4).

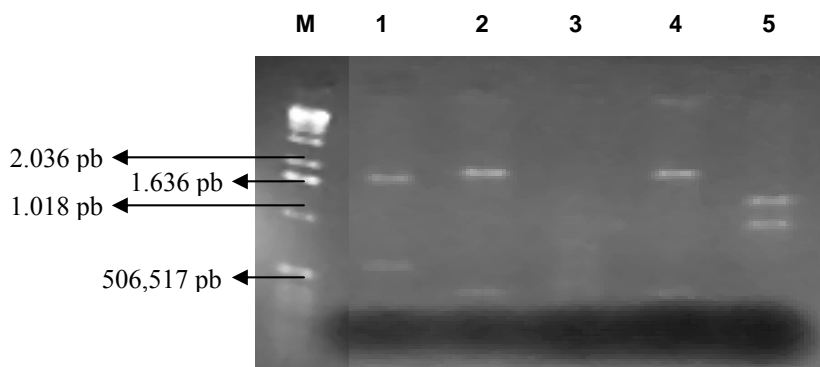


Figura 4. Padrões RFLPs produzidos pela digestão com enzimas de restrição da região IGS do isolado 135D2AF. M - marcador 1Kb, (1) – enzima *BglI*, (2) – enzima *ClaI*, (3) – enzima *PstI*, (4) – enzima *Sall* e (5) – enzima *SmaI*.

Das enzimas testadas, foi verificado que a região IGS do isolado 135D2AF selecionado apresentou um sítio de restrição para todas as enzimas, exceto para *PstI* (poço 3). Quando o isolado foi digerido com as enzimas *ClaI* (poço 2) e *SaII* (poço 4) constatou-se que o padrão de restrição das bandas estimado foi semelhante. *SmaI* (poço 5) produziu um padrão diferente dos demais.

O tamanho aproximado dos fragmentos gerados após a digestão foi: no poço 1 - uma banda de 1,9 kb e uma de 0,7 kb; no poço 2 - uma banda de 2,0 kb e uma de 0,4 kb; no poço 3 - (amostra não visualizada); no poço 4 - uma banda de 2,0 kb e uma de 0,4 kb; e no poço 5 - uma banda de 1,4 kb e outra de 1,2 kb.

Fragmentos únicos gerados por digestões simples com *BglII* (Fig. 5), *SaII* (Fig. 7) e *SmaI* (Fig. 9) foram simbolizados por letras do alfabeto, representando diferentes haplotipos de IGS.

A matriz binária e de similaridade genética dos RFLPs da região IGS digerida com as enzimas *BglII*, *SaII* e *SmaI* estão disponíveis nos Apêndices 1, 2 e 3, respectivamente.

- **Enzima *BglII***

A matriz binária (Apêndice 1), gerada a partir da digestão da região IGS com *BglII*, demonstra a presença de seis tipos diferentes de fragmentos de restrição. Dentre os isolados avaliados, a enzima gerou um total de quatro haplotipos (A-D), incluindo fragmentos com sítios de digestão ausentes (Fig.5).

Para determinação da proximidade entre os isolados, haplotipos foram submetidos a análise fenética UPGMA. A análise foi efetuada através do programa FreeTree, que gerou, através do programa TreeView, um cladograma (Fig. 6). Valores de bootstrap são mostrados como percentagens de 500 replicações, próximos aos internós e ramos.

A maioria dos isolados de banana, tomate e maracujá, apresentaram haplotipo B (Figs. 5 e 6), isto é, produziram duas bandas de pesos moleculares de aproximadamente 2,0 e 0,7 kb.

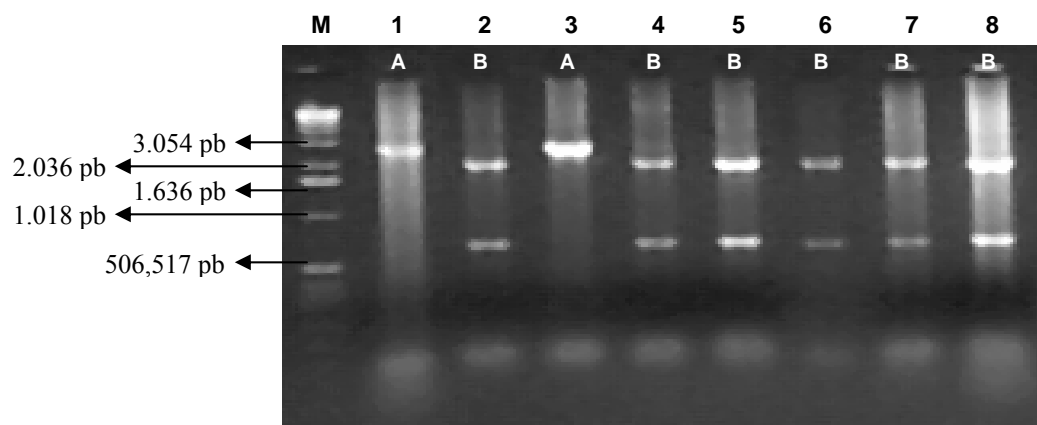


Figura 5A. Haplotipos dos RFLPs produzidos pela digestão da região IGS de 8 isolados de *F. oxysporum* com a enzima de restrição *Bgl*I. M – marcador 1Kb, (1) - isolado FOC1F, (2) - isolado FOC7F, (3) - isolado FOC10F, (4) - isolado FOC12F, (5) - isolado FOC13F, (6) - isolado FOC16F, (7) - isolado FOC17F, (8) - isolado FOC20F.

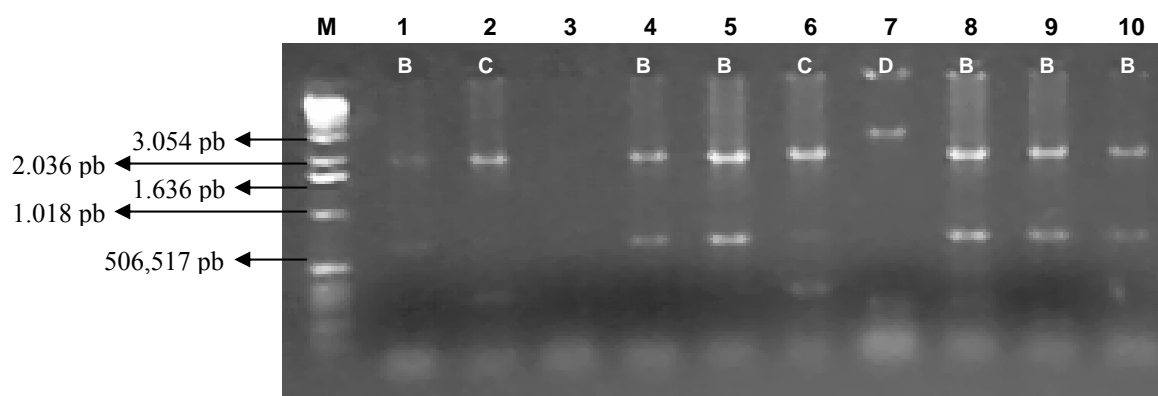


Figura 5B. Haplotipos dos RFLPs produzidos pela digestão da região IGS de 10 isolados de *F. oxysporum* com a enzima de restrição *Bgl*I. M – marcador 1Kb, (1) - isolado 36D1F, (2) - isolado 68D1F, (3) - isolado 159DF, (4) - isolado 167DF, (5) - isolado 169D1F, (6) - isolado 211D1F, (7) - isolado 209DF, (8) - isolado 276D2F, (9) - isolado 193D2F e (10) -isolado 135D2AF.

Os isolados de banana maçã e prata, obtidos de Porto Real do Colégio (poço 1) e de banana pacovan de Palmeira dos Índios (poço 3), não apresentaram sítio de restrição para a enzima *Bgl*I e fazem parte do haplotipo A (Figs. 5A e 6).

Dois isolados provenientes de tomate (poços 2 e 6) apresentaram padrão diferente dos demais, tendo sido evidenciadas duas bandas com pesos moleculares aproximados de 2,1 e 0,4 kb e fazem parte do haplotipo C (Figs. 5B e 6).

Em geral os isolados se agruparam em haplotipos congruentes com os RFLPs produzidos. Não houve relação entre os haplotipos gerados e especificidade ao hospedeiro. Uma dicotomia basal com alto suporte de bootstrap (100%) foi observada, sendo favorável à separação do isolado 209DF, de tomate, haplotipo D, dos demais. O haplotipo A formou um grupo representado por dois isolados de banana (FOC10F e FOC1F), basal em relação aos tipos C e B. Observou-se uma dicotomia separando dois isolados de tomate (211D1F e 68D1F), haplotipo C, do grupo formado pelo haplotipo B (Figs. 5 e 6).

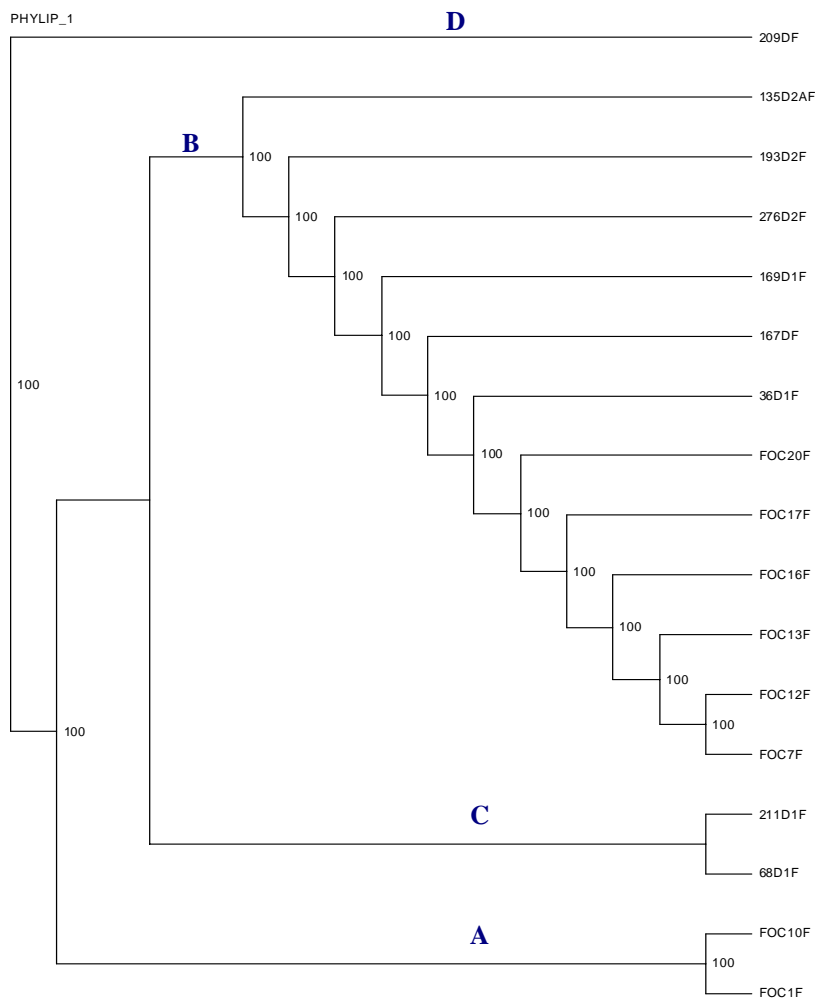


Figura 6. Cladograma UPGMA retangular baseado nos haplotipos dos RFLPs da região IGS de 18 isolados *F. oxysporum* gerados por *BglI*. A-D: haplotipos. Programa para análise e visualização, FreeTree e TreeView (Phylip), respectivamente.

- **Enzima *SalI***

A Figura 7, gerada a partir da digestão da região IGS com *SalI*, sugere a presença de seis tipos diferentes de fragmentos de restrição contabilizados no Apêndice 2. Dentre os isolados avaliados, a enzima gerou um total de quatro haplotipos (A-D). A maioria dos isolados, com exceção de FOC1, 213D2F e 170D1F, apresentou o mesmo padrão de bandas, com um sítio de restrição na região IGS (Fig. 7).

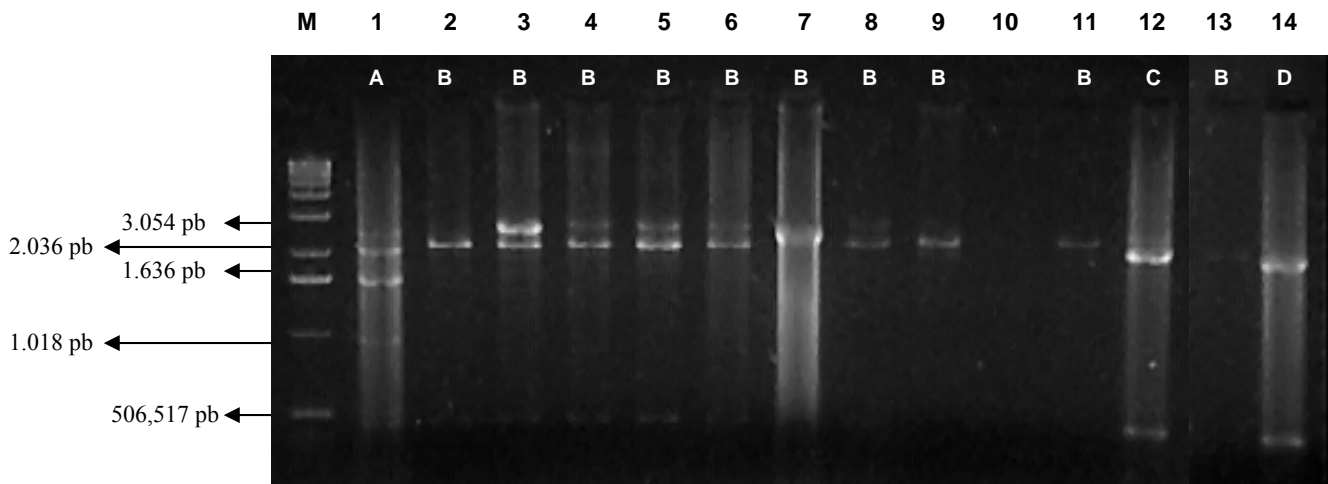


Figura 7. Padrões RFLPs produzidos pela digestão da região IGS de 14 isolados de *F. oxysporum* com a enzima de restrição *SalI*: M – marcador 1Kb, (1) - FOC1F, (2) - FOC7F, (3) - FOC10F, (4) - FOC12F, (5) - FOC16F, (6) - FOC17F, (7) - FOC20F, (8) - 36D1F, (9) - 68D1F, (10) - 159DF, (11) – 211D1F, (12) – 213D2F, (13) – 135D2AF, (14) – 170D1F.

O isolado FOC1 de banana maçã de Porto Real do Colégio representando o haplotipo A (poço 1) e o de tomate, 213D2, haplotipo C, apresentaram três sítios de restrição para a *SalI*, gerando quatro bandas. O obtido de pimentão, 170DF (poço 14) apresentou apenas um sítio de restrição, gerando duas bandas (uma banda de 2,2 kb e uma de 0,4 kb).

No cladograma gerado (Fig. 8) eles formaram um grupo separado dos demais isolados, haplotipo B, representado por isolados de banana, tomate e um de maracujá.

Em geral não foi detectada relação direta entre haplotipos gerados pela digestão com a enzima e f. spp.

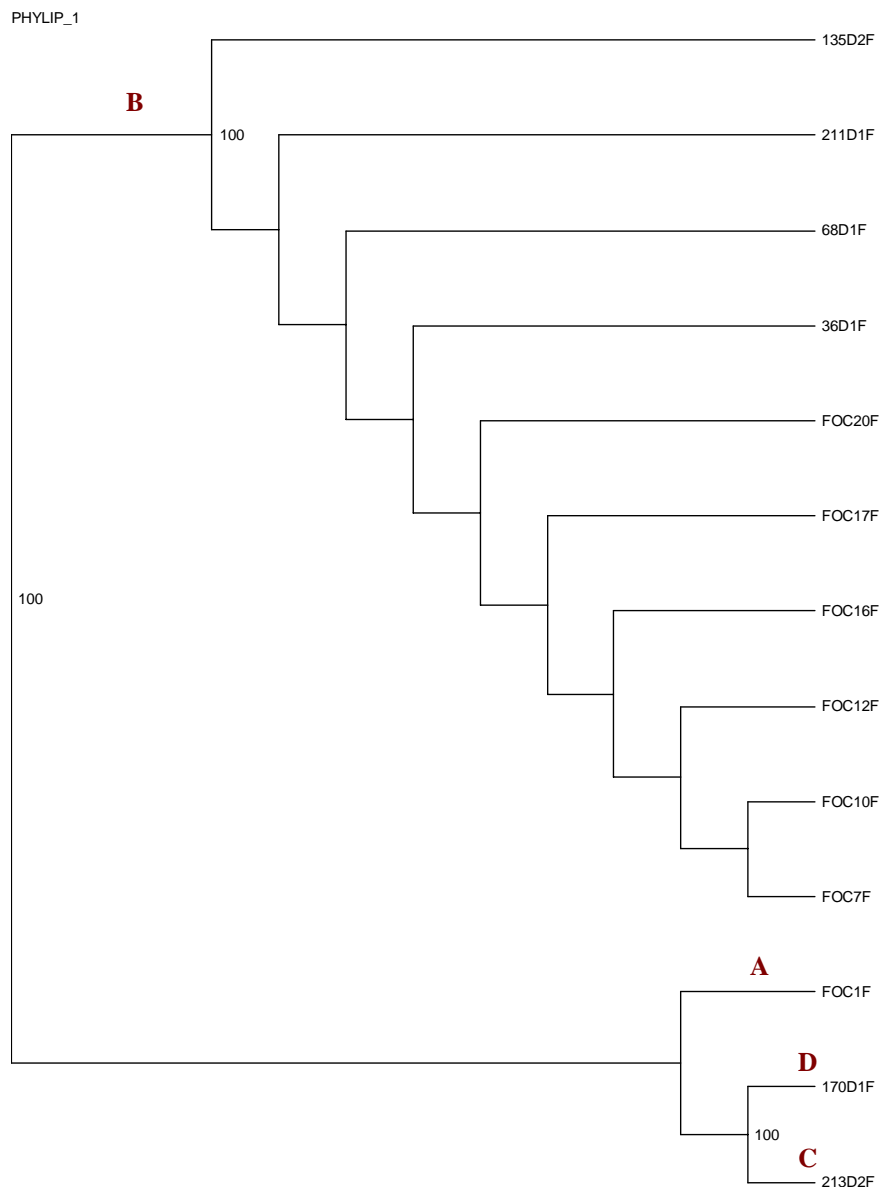


Figura 8. Cladograma UPGMA retangular baseado nos haplotipos dos RFLPs da região IGS de 14 isolados *F.oxysporum* gerados por *Sall*. A-D: haplotipos. Programa para análise e visualização, FreeTree e TreeView (Phylip), respectivamente.

- **Enzima *Sma*I**

A Figura 9, gerada a partir da digestão da região IGS com *Sall*, sugere a presença de sete tipos diferentes de fragmentos de restrição (Apêndice 3). Dentre os isolados avaliados, a enzima gerou um total de quatro haplotipos (A-D).

Foi observado que o padrão de bandas dos isolados de diferentes cultivares de banana obtidos de diferentes regiões do Estado (poços 2, 4, e 6) foi idêntico, apresentando um sítio de restrição e gerando uma banda de 1,4 kb e outra de 1,1 kb. O mesmo padrão foi observado em um isolado de tomate, 36DF (poço 8) e constituem o haplotipo B (Figs. 9 e 10).

O isolado de tomate, 68DF (poço 9) também apresentou um sítio de restrição, mas gerou bandas com pesos moleculares diferentes em relação ao fragmento menor, de apenas 0,8 kb, enquanto que outro isolado de tomate, 211D1F (poço 11), que gerou uma banda de 1,9 kb e outra de 0,5 kb (Fig. 9).

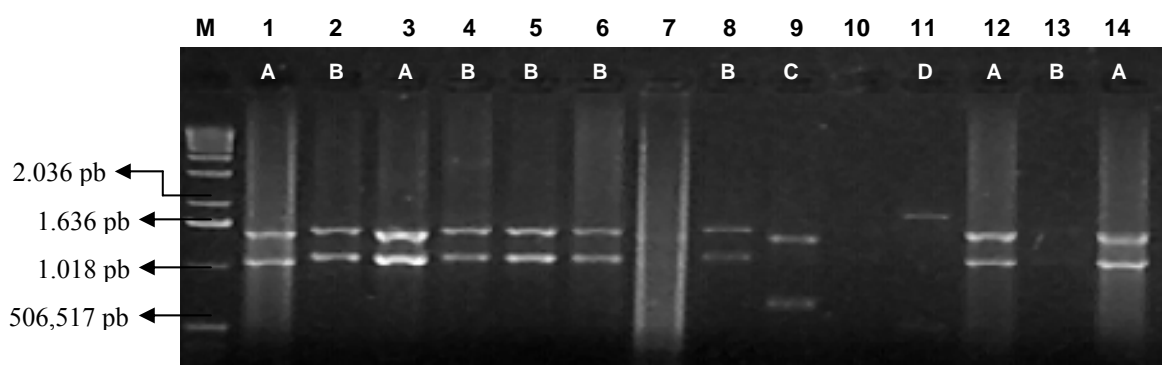


Figura 9. Padrões RFLPs produzidos pela digestão da região IGS de 14 isolados de *F. oxysporum* com a enzima de restrição *Sma*I: M - marcador 1Kb, (1) - FOC1F, (2) - FOC7F, (3) - FOC10F, (4) - FOC12F, (5) - FOC16F, (6) - FOC17F, (7) - FOC20F, (8) - 36D1F, (9) - 68D1F, (10) - 159DF, (11) - 211D1F, (12) - 213D2F, (13) - 135D2AF e (14) - 170D1F.

A Figura 10 mostra a topologia obtida a partir da digestão da região IGS com *Sma*I. O haplotipo mais basal foi representado por um ramo único conduzindo ao isolado 211D1F de tomate.

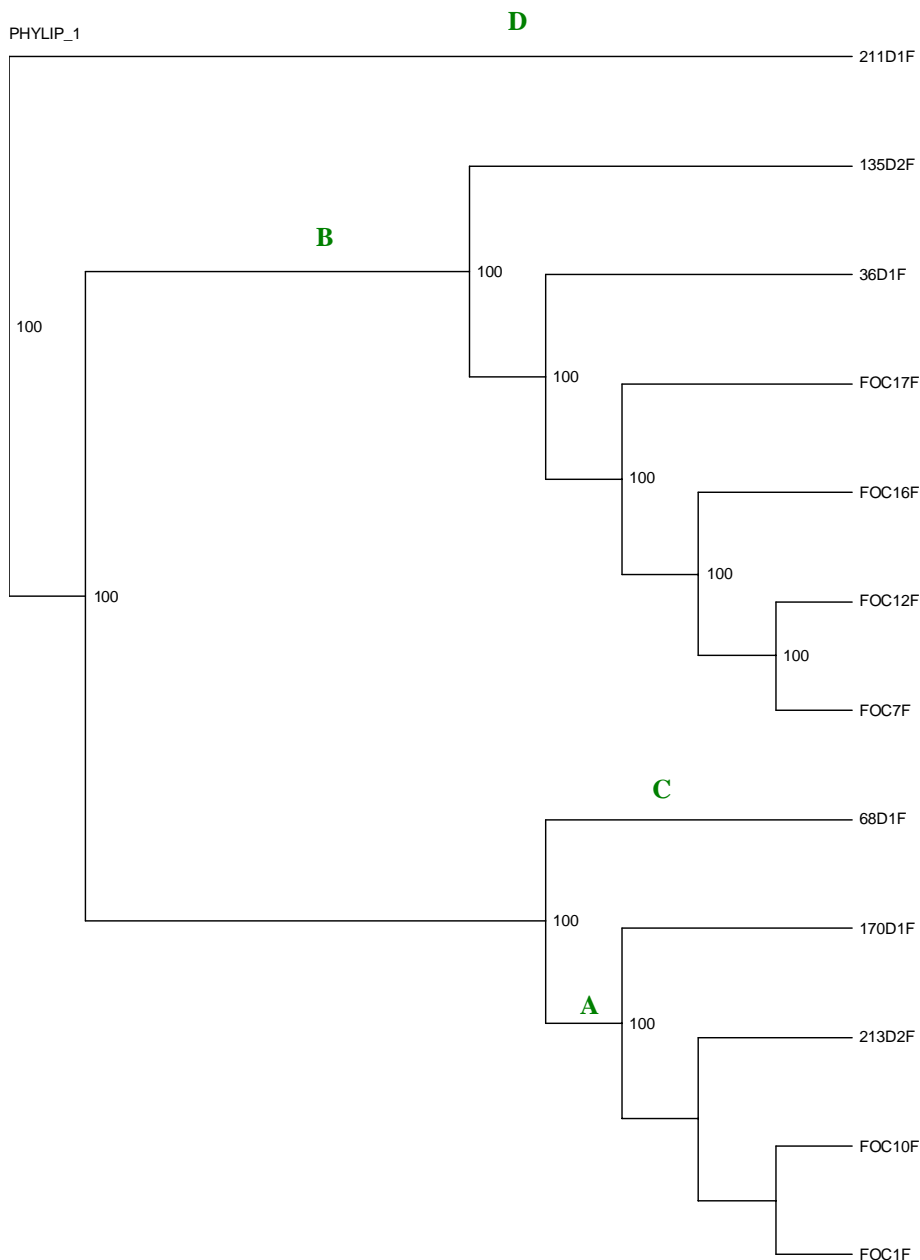


Figura 10. Cladograma UPGMA retangular baseado nos haplotipos dos RFLPs da região IGS de 14 isolados *F. oxysporum* gerados por *Sma*I. A-D: haplotipos. Programa para análise e visualização, FreeTree e TreeView (Phylip), respectivamente.

Houve uma dicotomia com suporte de bootstrap de 100% representando isolados pertencentes aos haplotipos C-A e B. O primeiro representado por isolados de tomate, pimentão e banana e o segundo por isolados de banana, um de tomate e um de maracujá. Não foi detectada correlação entre haplotipos produzidos pela digestão da enzima *Sma*I e *f. spp.*

5.5. Amplificação RAPD-PCR

O iniciador OPR5 foi selecionado no teste de otimização e utilizado para amplificar os demais isolados. Com esse iniciador foram geradas quatro bandas polimórficas (poço 4 da Fig. 11).

A melhor condição da reação de amplificação para o iniciador 5 foi 3,0 mM de $MgCl_2$ e 0,1 μM do iniciador.

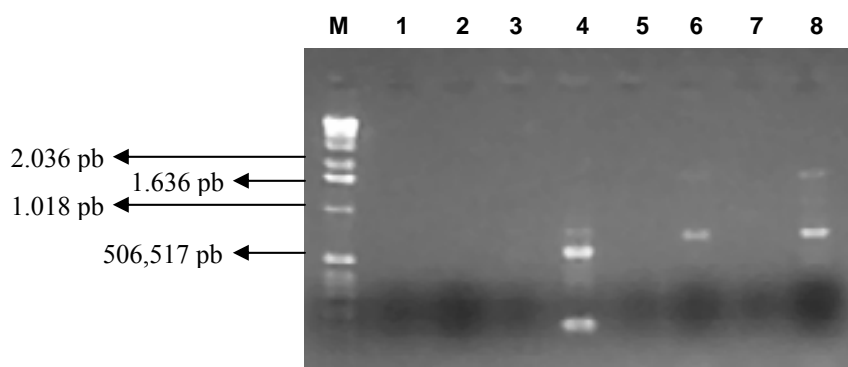


Figura 11. Perfil RAPD-PCR para seleção do iniciador utilizando o isolado 135D2AF de *F.oxysporum*. M - marcador 1Kb, 1-2 iniciador OPR3, 3-4 iniciador OPR5, 5-8 iniciador OPR8. Gel de agarose a 1,2%, corado com 0,5 μL ($\mu g/mL$) de brometo de etídio.

Após a seleção do iniciador, foi realizada uma reação de RAPD com os 21 isolados (Fig. 12). O padrão das bandas produzidas por este iniciador foi utilizado para avaliar a variabilidade genética dos isolados de diferentes f. spp. do complexo *F. oxysporum*.

A análise visual de bandas (Fig. 12) sugeriu isolados com alta similaridade, o que permitiu o estabelecimento de grupos genéticos (Fig. 13).

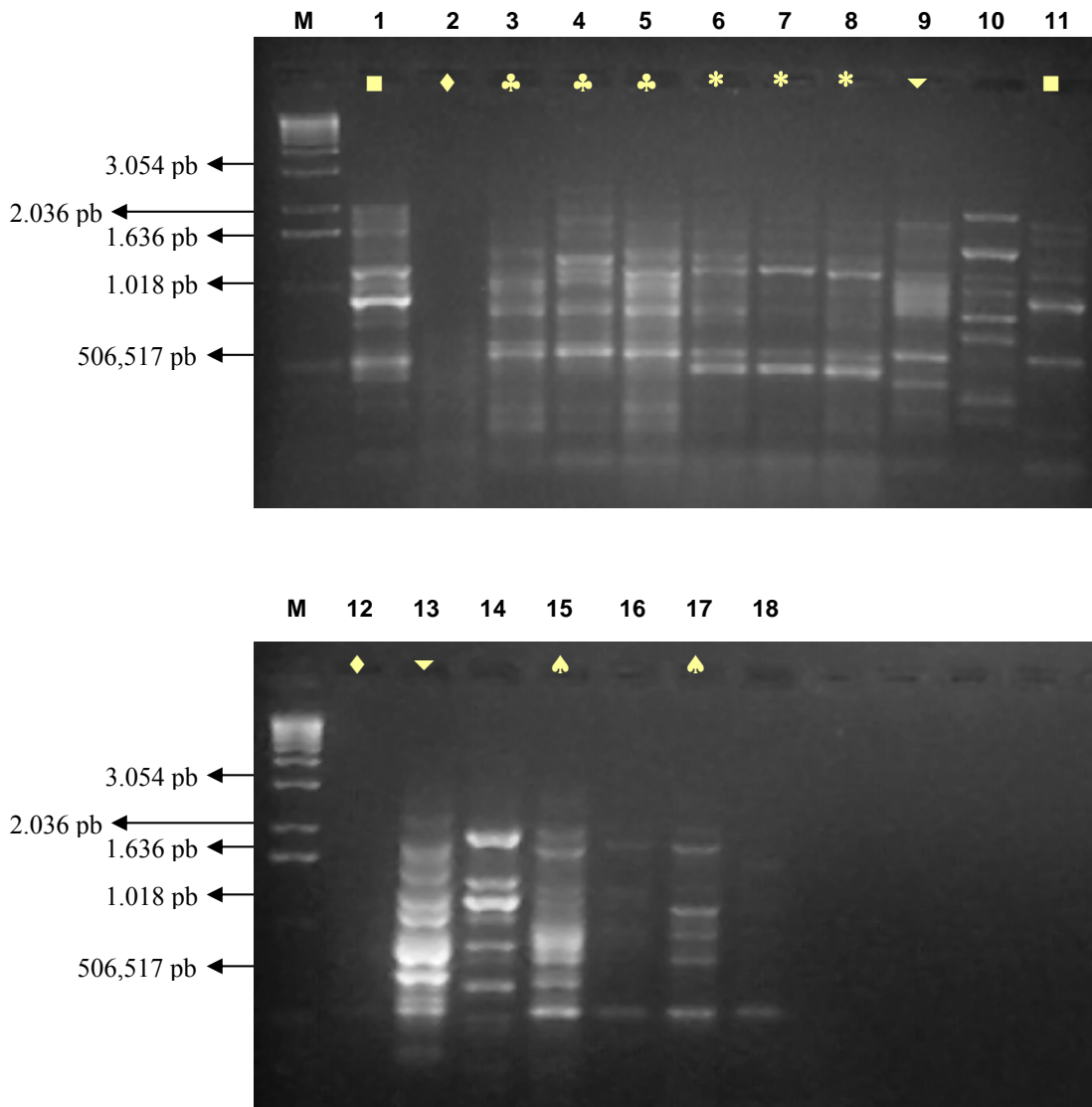


Figura 12. Perfil de bandas de DNA obtidas por RAPD de 18 isolados de *F.oxysporum* utilizando o iniciador OPR5. (1) - isolado FOC1F, (2) - isolado FOC4F, (3) - isolado FOC7F, (4) - isolado FOC10F, (5) - isolado FOC12F, (6) - isolado FOC13F, (7) – isolado FOC17F, (8) – isolado FOC20F, (9)– isolado 36D1F, (10) – isolado 68D1F, (11) – isolado 159DF, (12) – isolado 167D1F, (13) – isolado 169DF, (14) – isolado 211D1F, (15)– isolado 213D2F, (16) – isolado 276D2F, (17) – isolado 193D2F, (18)– isolado 135D2AF. Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. M – marcador de 1 Kb. Símbolos correspondem aos clusters da Fig. 13.

A Tabela 5 mostra a matriz binária para os fragmentos amplificados com presença (1) e ausência (0) de banda. Através da análise visual das bandas (Fig. 12) não ficou evidenciada a presença de uma banda única para todos os isolados da espécie *F. oxysporum* que pudesse ser um potencial marcador molecular da espécie.

Apenas uma banda polimórfica (Nº 29), representada pelo retângulo azul (Tabela 5), foi compartilhada por todos os isolados de *Foc*, entretanto, alguns isolados de *Fol* também apresentaram a mesma banda (retângulo amarelo), não podendo ser aceita como um marcador da f. sp. *cubense*.

O mesmo ocorreu com as duas bandas compartilhadas pelos isolados de *Fop*, 11 e 26 (retângulos verdes) que também foram evidenciadas em isolados de *Foc* e *Fol*. Também não foi detectada a presença de uma banda única que separasse os isolados de *Foc* provenientes de diferentes cultivares de banana, e que potencialmente fosse um marcador molecular para raça.

Na Fig.13, encontra-se o dendrograma gerado pela matriz do método de reconstrução fenética UPGMA e valores estatísticos, bootstrap, estão apresentados nos ramos.

Tabela 5. Matriz construída com base na presença (1) e ausência de bandas (0) de DNA nos padrões eletroforéticos produzidos pelos 18 isolados de *F. oxysporum* (Fig. 12). Retângulos azuis, amarelos e verdes correspondem as f. spp. *cubense*, *lycopersici* e *passiflorae*, respectivamente

	FOCF	FOC4	FOC7F	FOC11	FOC12F	FOC13F	FOC15F	FOC20F	FOC7F	FOC11	FOC12F	FOC13F	FOC15F	FOC20F	FOC7F	FOC11	FOC12F	FOC13F	FOC15F	FOC20F
42	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
30	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
28	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
26	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	*	1	1	1	1	1
25	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
24	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
23	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
19	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
17	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
16	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
15	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
14	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
12	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Os polimorfismos detectados foram analisados utilizando o coeficiente de Jaccard de similaridade. Cinco grupos principais foram formados.

Os isolados de banana, *Foc*, com exceção de um procedente de banana São Tomé (FOC4) e de banana Maçã (FOC1F), apresentam padrões de bandas similares e formam um cluster com dois subgrupos (♣ e *) (Fig. 13). Dentro do último subgrupo, dois isolados de banana Maçã (FOC13F e FOC20F) se agruparam em 100% das replicações, mas apresentaram similaridade genética de apenas 44,4%. O subgrupo formado por FOC7F e FOC12F, de banana Maçã e Prata, respectivamente, apresentaram similaridade genética de 47,4%, a maior obtida nesta comparação.

Outro grupo foi formado por 169D1F e 36D1F de *Fol* (▼), com suporte de 100% de bootstrap, e similaridades de 38,0%.

Um terceiro grupo foi formado por dois isolados de *Fol* e um de *Foc*, FOC1F. Um dos isolados de tomate apresentou similaridade genética de 39,0% com o isolado de banana e suporte de bootstrap de 100% (■).

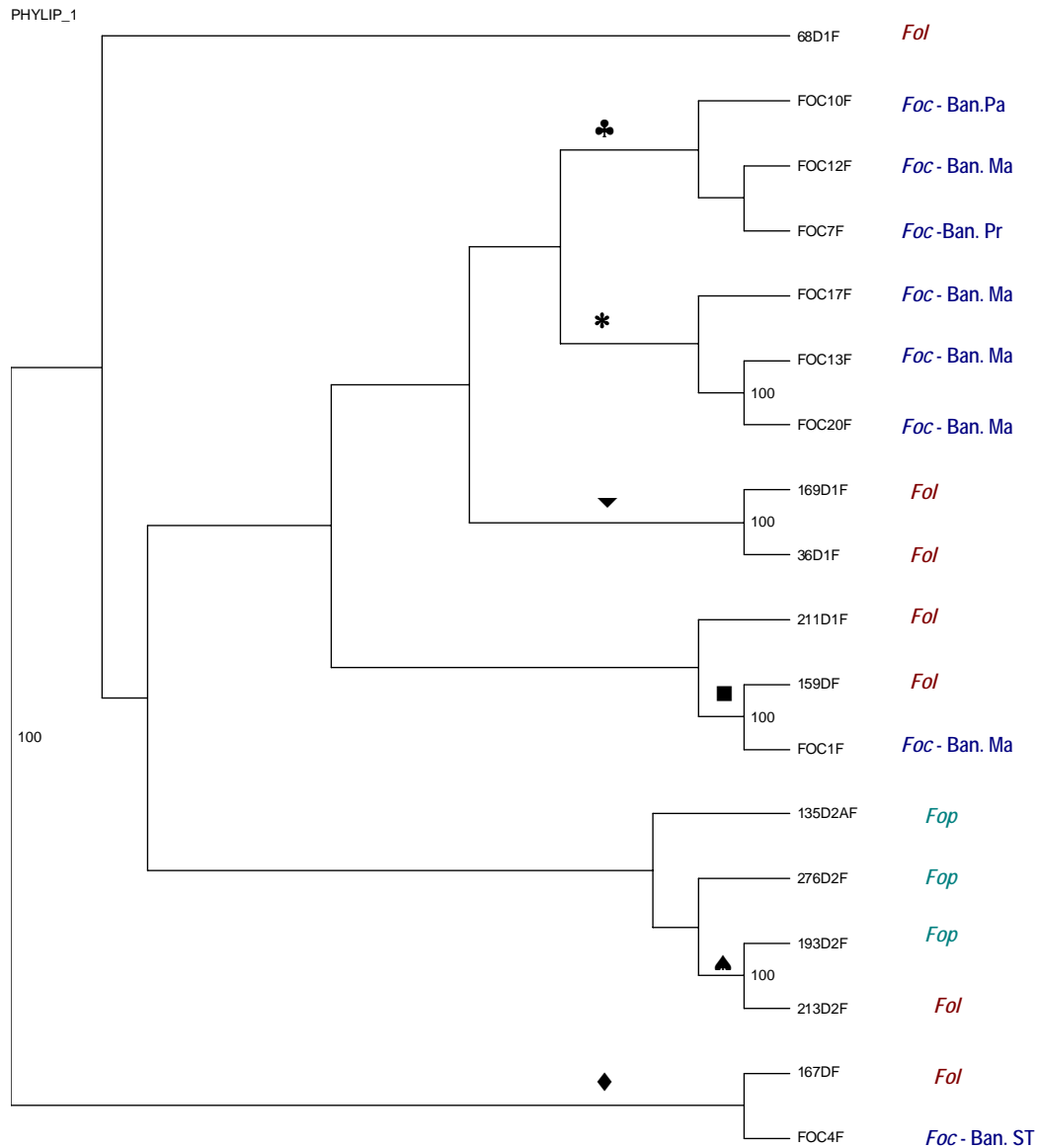


Figura 13. Dendrograma de agrupamento obtido pelo algoritmo UPGMA através do coeficiente de similaridade de Jaccard, para as 42 bandas geradas pelos polimorfismos de RAPD de 18 isolados de *F. oxysporum*. Símbolos correspondem aos perfis das bandas gerados na Fig. 12.

Apesar dos isolados de *Fop* se agruparem, um dos isolados, o 193DF, veio junto em 100% das replicações com um isolado de *Fol* (2132F) (♣), e apresentaram similaridade de 42,8%.

O último grupo (♦), com similaridade de 12,5% entre si, foi representado por um isolado de *Fol* (167DF) e outro de *Foc* (FOC4F), proveniente de banana São Tomé. Estes dois isolados foram os mais divergentes da população estudada, com dicotomia basal apresentando suporte de 100% de bootstrap.

5.6. Amplificação PCR das Regiões do DNA Ribossomal

A reação de PCR para a amplificação do espaço interno transcrito (ITS1 e ITS2) e da subunidade de 5,8S do rRNA e 28S rDNA foi realizada utilizando os 21 isolados de *Fusarium*. Os iniciadores utilizados na reação de PCR foram os pares ITS4/ITS5, e mostraram especificidade para a região ITS do gênero *Fusarium*.

As condições ótimas para a amplificação do rDNA dos isolados foram a temperatura de 55°C e 0,004 µM de cada iniciador.

As Figuras 14 e 15 ilustram o resultado da amplificação da região ITS, um fragmento com cerca de 550-570 pb gerado para todos os isolados.

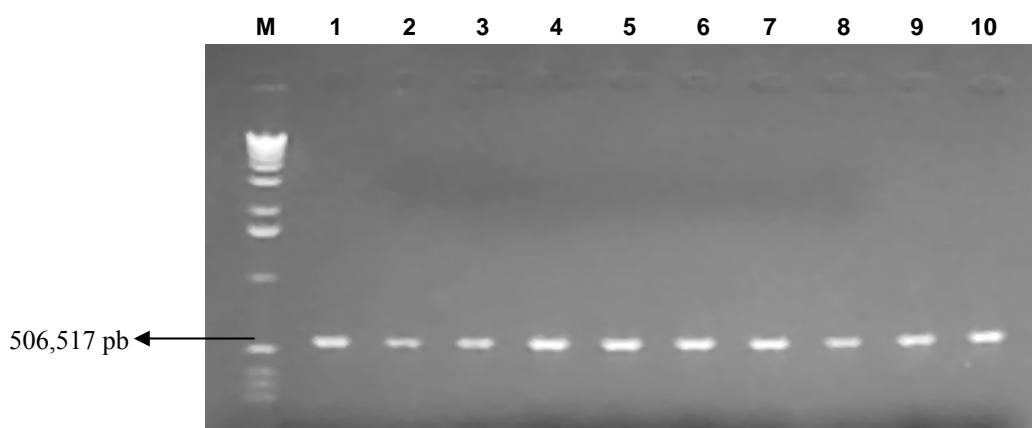


Figura 14. Produtos amplificados da região ITS completa de 10 isolados de *F. oxysporum* gerados pelos iniciadores ITS4/ITS5. Gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio. (M) – marcador 1 Kb, (1) FOC1F, (2) FOC4F, (3) FOC7F, (4) FOC10F, (5) FOC13F, (6) FOC16F, (7) 36D1F, (8) 167DF, (9) 170D1F e (10) 193D2F.

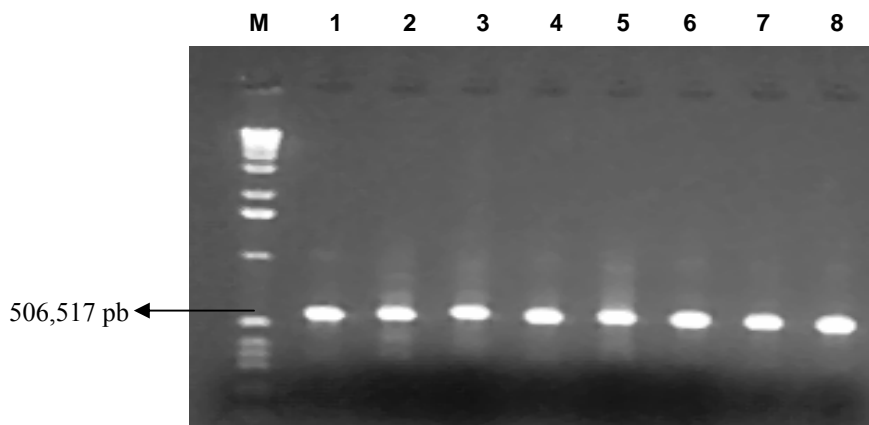


Figura 15. Produtos amplificados da região ITS completa de 8 isolados de *F. oxysporum* gerados pelos iniciadores ITS4/ITS5. Gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio. (M) – marcador 1 Kb, (1) 68D1F, (2) 159 DF, (3) 169 D1F, (4) 211D1F, (5) 209 DF, (6) 213D2F, (7) 276D2F, (8) 135D2AF.

5.7. Sequenciamento das Regiões do DNA Ribossomal

No final do sequenciamento, 42 eletroferogramas, dois para cada isolado, correspondendo aos iniciadores utilizados nas duas direções, foram gerados. Dois eletroferogramas foram selecionados e incluídos no Apêndice (5).

Os iniciadores mostraram boa especificidade para a espécie *Fusarium oxysporum*, e uma média de 500 nt de cada isolado foram sequenciados.

A Tabela 6 mostra, para cada isolado, o número de bases seqüenciadas e a eficiência do sequenciamento com os iniciadores ITS5 (F) e ITS4 (R), cujos dados foram extraídos do programa “ScoreCard” (Apêndice 6).

Tabela 6. Nucleotídeos amplificados após sequenciamento da região ITS1, ITS2 e 5,8S do rDNA e seus respectivos isolados

Isolados	Nucleotídeos (F) - ITS 5 No. de bases seqüenciadas/eficiência	Nucleotídeos (R) - ITS 4 No. de bases seqüenciadas/eficiência
FOC 1F	517/98	511/96
FOC 4F	518/94	522/96
FOC 7F	543/94	506/97
FOC 10F	528/96	522/97
FOC 12F	209/83	509/96
FOC 13F	526/97	505/97
FOC 16F	553/88	513/96
FOC 17F	511/97	511/97
FOC 20F	513/95	502/97
36 D1F	500/97	519/96
68 D1F	529/85	511/97
159 DF	530/86	520/96
167 DF	521/96	488/96
169 D1F	177/85	513/92
211 D1F	274/82	512/97
209 DF	149/80	523/94
213 D2F	586/86	527/98
276 D2F	276/82	501/97
193 D2F	500/96	550/92
135 D2AF	504/91	493/97
170 D1F	517/96	524/94

5.8. Identificação Eletrônica das Sequências



Figura 16. Página inicial da ferramenta BLAST do NCBI. A seta indica a opção blastn utilizada para comparações em pares.

Para exemplificar, selecionou-se a ferramenta blastn (comparações em pares entre nucleotídeos) e colou-se a sequência de *Foc*, FOC1F (Fig. 17).

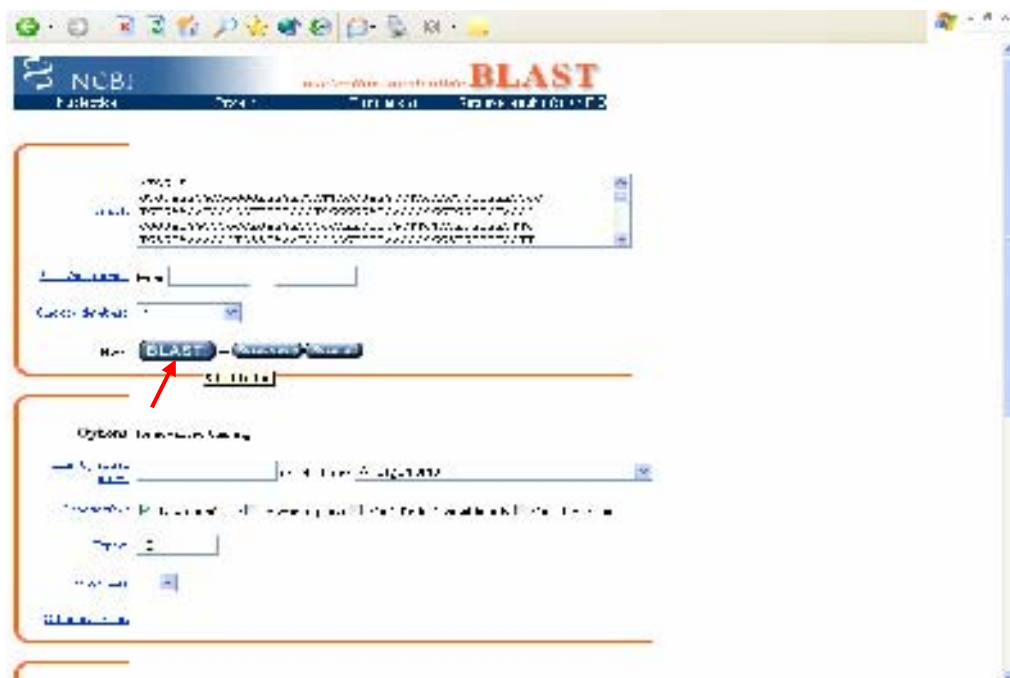


Figura 17. Janela para colagem da sequência e submissão (BLAST!) (seta) para análise.

A seqüência submetida para análise (query), de 553 nt, foi comparada com seqüências depositadas no GenBank (subject).

A distribuição dos “hits” do BLAST, ou seja, seqüências onde foi encontrada alta homologia (linhas vermelhas), está disponível na Fig. 18.

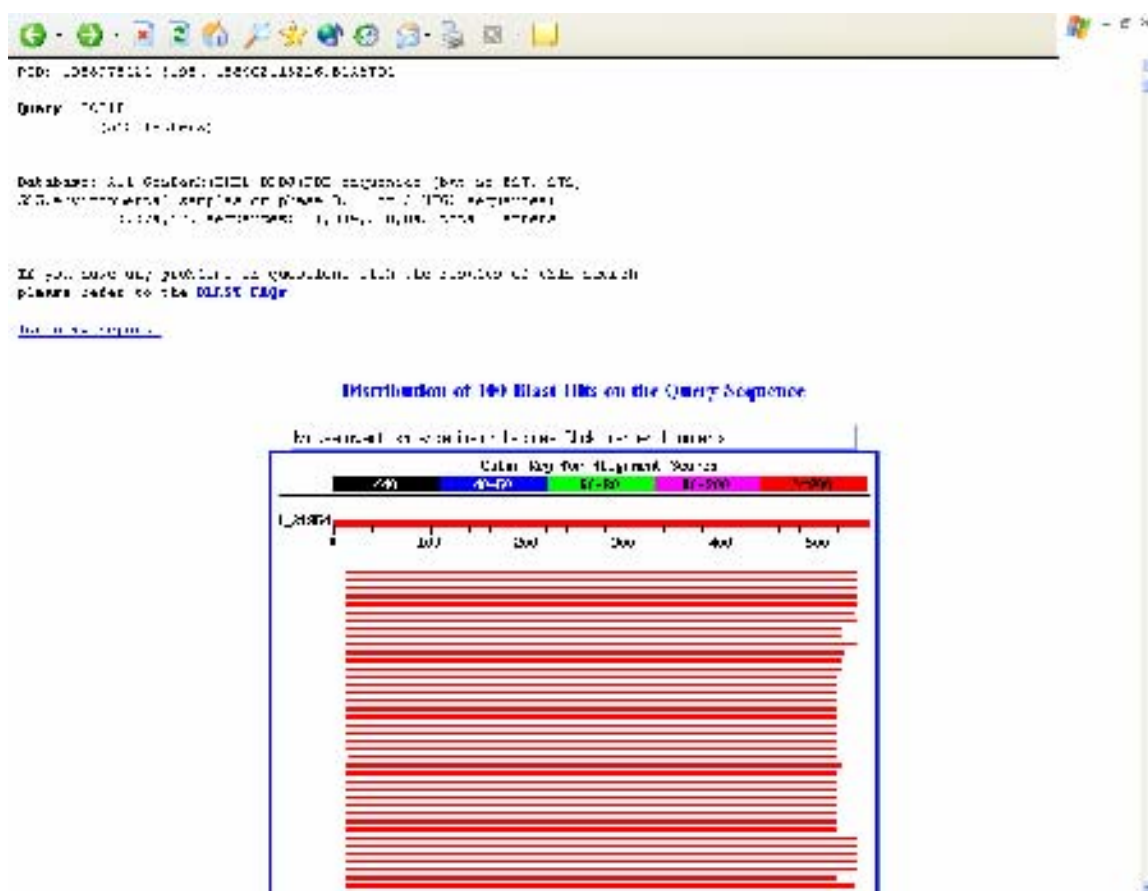


Figura 18. Resultado da análise de similaridade. Linhas vermelhas indicam escores > 200.

Foi evidenciada a produção de alinhamentos significantes (altos escores e baixos E-values) da seqüência de FOC1F com diferentes espécies de *Fusarium*, f. spp. de *F. oxysporum*, inclusive com o teleomorfo, *Gibberella fujikuroi* (Figs. 19 e 20).

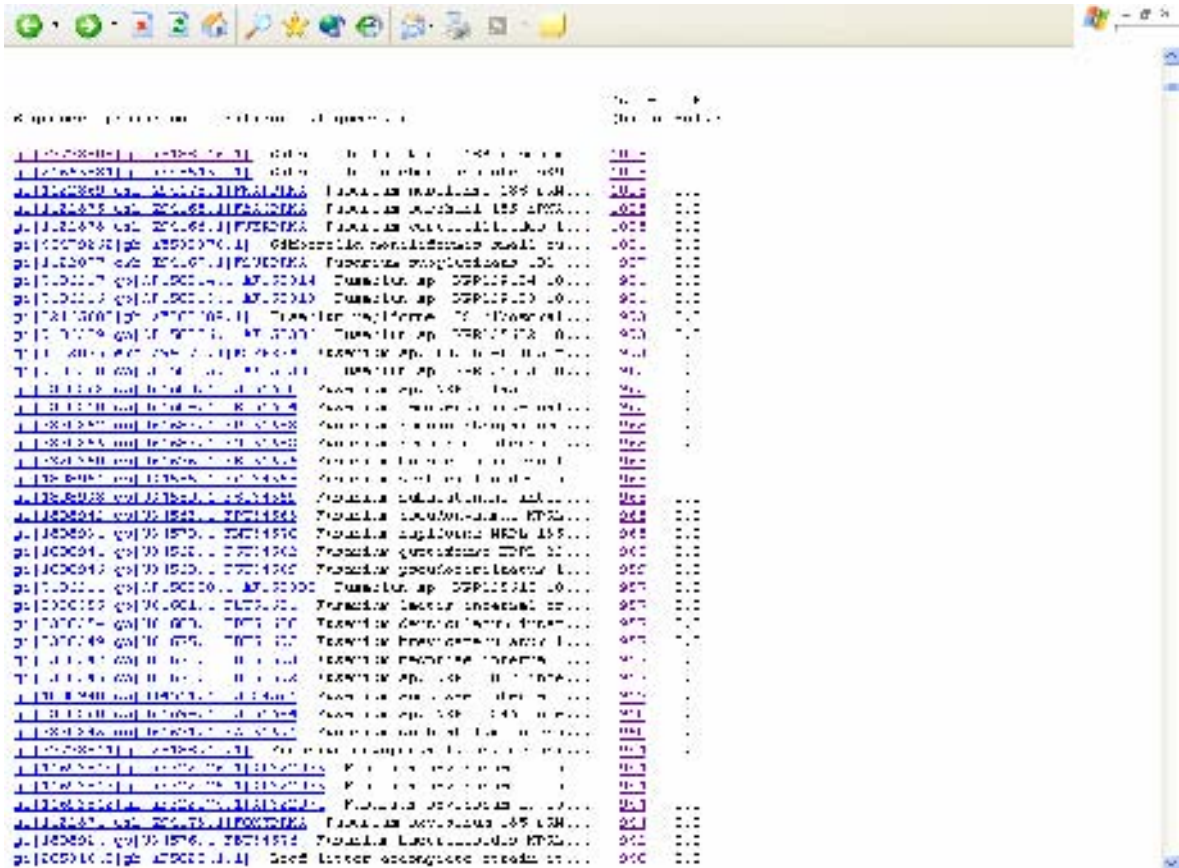


Figura 19. Sequências (subject) de *Fusarium* obtidas após alinhamento em pares com *Foc* (FOC1F) que apresentaram alinhamento significativo. Número de acesso estão na frente de cada espécie, seguida pelo escore e E-value do alinhamento.

Visando comprovar a inexequibilidade do diagnóstico eletrônico para identificação de f. spp. de *F. oxysporum* a partir das regiões ITS e 5,8S rDNA, comparou-se o alinhamento da seqüência de *Foc* com *Gibberella* e *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

Alinhamento 01: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* FOC1F (query) X *Gibberella fujikuroi* (subject)

```
>gi|37778808|gb|AY188916.1|
Gibberella fujikuroi 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
    internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene
    and internal transcribed spacer 2, complete sequence;
    and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
    Length = 1136

Score = 1005 bits (507), Expect = 0.0
Identities = 524/527 (99%), Gaps = 2/527 (0%)
Strand = Plus / Plus

Query: 14  ggagggatcattaccga|gtttacaactcccaaaccctgtgaacataccaattgttgc 73
          |||
Sbjct: 18  ggagggatcattaccga|gtttacaactcccaaaccctgtgaacataccaattgttgc 76
```

```

Query: 74 tcggcggatcagcccgctcccggtaaaacgggacggccccccagaggacccccaaactct 133
          |||
Sbjct: 77 tcggcggatcagcccgctcccggtaaaacgggacggccccccagaggacccctaaactct 136

Query: 134 gtttctatatgtaacttctgagtaaaaccataaaataaatcaaaactttcaacaacggatc 193
          |||
Sbjct: 137 gtttctatatgtaacttctgagtaaaaccataaaataaatcaaaactttcaacaacggatc 196

Query: 194 tcttggttctggcatcgatgaagaacgcagcaaaatgcgataagtaatgtgaattgcaga 253
          |||
Sbjct: 197 tcttggttctggcatcgatgaagaacgcagcaaaatgcgataagtaatgtgaattgcaga 256

Query: 254 attcagtgaatcatcgaatctttgaacgcacattgcgccccccagatattctggcgggcat 313
          |||
Sbjct: 257 attcagtgaatcatcgaatctttgaacgcacattgcgccccccagatattctggcgggcat 316

Query: 314 gcctggttcgagcgtcatttcaaccctcaagcccagcttggtggtgggactcgcgagtcaa 373
          |||
Sbjct: 317 gcctggttcgagcgtcatttcaaccctcaagcccagcttggtggtgggactcgcgagtcaa 376

Query: 374 atcgcggtccccaattgattggcggtcacgtcgagcttccatagcgtagtagtaaaacc 433
          |||
Sbjct: 377 atcgcggtccccaattgattggcggtcacgtcgagcttccatagcgtagtagtaaaacc 436

Query: 434 ctcgttactggtaatcgtcgcggccacgccggttaaaccccaacttctgaatggtgacct 493
          |||
Sbjct: 437 ctcgttactggtaatcgtcgcggccacgccggttaaaccccaacttctgaatggtgacct 495

Query: 494 cggatcaggtaggaataaccgctgaacttaagcatatcaataagcgg 540
          |||
Sbjct: 496 cggatcaggtaggaataaccgctgaacttaagcatatcaataagcgg 542

```

O primeiro alinhamento obteve alta identidade, 99%, e dentre os 527 nt ou sítios analisados, houve apenas 3 sítios variáveis, sendo 2 espaços (marcadas em verde), podendo ser considerados “InDels” (inserção ou deleção), e 1 transição (c → t), marcada em amarelo.

Alinhamento 02: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* FOC1F (query) X *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* strain Ag149-III (subject)

```

>gi|11692814|gb|AF322076.1|AF322076
Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum strain Ag149-III;
  18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal
  transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and
  internal transcribed spacer 2, complete sequence; and
  28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length = 616

Score = 944 bits (476), Expect = 0.0
Identities = 517/527 (98%), Gaps = 4/527 (0%)
Strand = Plus / Plus

```



```

Query: 14  ggagggatcattaccgaggtttacaactcccaaaccctgtgaacataccaattgttgcc 73
          |||
Sbjct: 90  ggagggatcattaccgaggtttacaactcccaaaccctgtgaacataccaattgttgcc 148

Query: 74  tcggcggatcagcccgtcccggtaaaacgggacggcccgcagaggacccccaaactct 133
          |||
Sbjct: 149 tcggcggatcagcccgtcccggtaaaacgggacggcccgcagaggacccccaaactct 208

Query: 134 gtttctatatgtaacttctgagtaaaaccataaaataaatcaaaactttcaacaacggatc 193
          |||
Sbjct: 209 gtttctatatgtaacttctgagtaaaaccataaaataaatcaaaactttcaacaacggatc 268

Query: 194 tcttggttctggcatcgatgaagaacgcagcaaaaatgcgataagtaatgtgaattgcaga 253
          |||
Sbjct: 269 tcttggttctggcatcgatgaagaacgcagcaaaaatgcgataagtaatgtgaattgcaga 328

Query: 254 attcagtgaaatcatcgaatccttgaacgcacattgcgcccgccagtattctggcgggcat 313
          |||
Sbjct: 329 attcagtgaaatcatcgaatccttgaacgcacattgcgcccgccagtattctggcgggcat 388

Query: 314 gcctgttcgagcgtcatttcaaccctcaagcccagccttggtggtgggactcgcgagtcaa 373
          |||
Sbjct: 389 gcctgttcgagcgtcatttcaaccctcaagcccagccttggtggtgggactcgcgagtcaa 446

Query: 374 atcgcggttccccaaattgattggcgggtcacgctcgagcttccatagcgtagtagtaaaacc 433
          |||
Sbjct: 447 atcgcggttccccaaattgattggcgggtcacgctcgagcttccatagcgtagtagtaaaacc 506

Query: 434 ctcgttactggtaatcgtcgcggccacgcacgttaaaccccaacttctgaaatggtgacct 493
          |||
Sbjct: 507 ctcgttactggtaatcgtcgcggccacgcacgttaaaccccaacttctgaaatggtgacct 565

Query: 494 cggatcaggttaggaataaccgctgaacttaagcatatcaataagcgg 540
          |||
Sbjct: 566 cggatcaggttaggaataaccgctgaacttaagcatatcaataagcgg 612

```

O segundo alinhamento obteve identidade de 98%, e dentre os 527 nt ou sítios analisados, houve 10 sítios variáveis, sendo 4 espaços ou “InDels”, marcados em verde no alinhamento, além de 3 transições (c → t) (marcadas em amarelo) e 3 transversões (a → c, c → a, a → t), marcadas em azul.

Concluindo, foi possível efetuar o diagnóstico eletrônico da seqüência de *Foc* submetida apenas em nível de gênero, uma vez que o alinhamento com seqüências, mesmo de outras *formae speciales* e até de outras espécies de *Fusarium*, apresentou alta homologia. Conseqüentemente, a ferramenta blastn não pôde ser aplicada na diferenciação de f. spp. do complexo *F. oxysporum* analisado.

Entretanto, considerando que o número de mutações verificadas no alinhamento (dez) em *Foc* x *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foi significativo, é possível que a utilização de algoritmos mais sensíveis, como os disponíveis em programas de

reconstrução filogenética, sejam suficientes para a diferenciação dos isolados em suas respectivas f. spp.

5.9. Análise Filogenética das Regiões do DNA Ribossomal

Para avaliação filogenética das seqüências correspondentes à região ITS (ITS1 e ITS2), da subunidade 5,8S do rRNA e 28S do rDNA utilizou-se a fita derivada do iniciador *forward* (F - anverso), cuja seqüência foi modificada manualmente, a partir do eletroferograma (Apêndice 5), comparando-se com a fita complementar gerada a partir do iniciador *reverse* (R - reverso). Esta correção teve o objetivo de minimizar espaços (-) ou bases indeterminadas (N).

As seqüências foram comparadas utilizando o programa de alinhamento múltiplo, Clustal X 1.8. Um total de 897 sítios, caracteres ou nucleotídeos, incluindo espaços, foram utilizados na análise (Apêndice 7), entretanto, para construção da matriz de distância genética e, conseqüentemente, construção de dendrogramas, 470 sítios, sem espaços, foram comparados. Na avaliação do nível de informação parsimônica da região ITS, a porção do 28S rDNA não foi incluída, totalizando, assim, com os espaços, 540 sítios.

Esta avaliação é disponibilizada no programa MEGA2 (Apêndice 9), onde sítios variáveis são aqueles que contêm pelo menos dois tipos de nucleotídeos, enquanto que parsimonicamente informativos os que contêm pelo menos dois tipos de nucleotídeos, com pelo menos dois deles ocorrendo com freqüência mínima de dois.

A avaliação do alinhamento da região ITS1-5,8S rDNA-ITS2 (540 sítios) dos diferentes isolados do complexo *F. oxysporum* revelou que apenas 4,07% (22/540) deles foram filogeneticamente informativos, 1,85% (10/540) na região ITS1 e 2,04% (11/540) na região ITS2. A região ITS1 foi mais conservada que a ITS2, com 2,40% (13/540) e 12,20% (66/540) dos sítios variáveis, respectivamente. O gene 5,8S do rRNA não forneceu nenhuma informação filogenética para a análise, com apenas 0,92% (05/540) dos sítios variáveis (Apêndice 7).

Análise de bootstrap utilizando busca heurística foi efetuada com 5000 replicações, o que permitiu que grupos com freqüência superior a 50% fossem retidos, visando testar o suporte estatístico de cada ramo.

Foram efetuadas dois tipos de comparações. A primeira, incluindo apenas as seqüências produzidas neste trabalho (Apêndice 7) e uma segunda análise, incluindo seqüências de *F. oxysporum* de outras espécies, além de seu teleomorfo, *Gibberella*,

disponíveis no GenBank (Apêndices 10 e 11), visando determinar a exequibilidade da região ITS para comparações entre espécies.

Na análise incluindo apenas os isolados seqüenciados neste trabalho obteve-se um dendrograma NJ consenso (*strict consensus*) sem análise de bootstrap, utilizando-se o modelo K-2-P g. Foi observada a formação de dois grupos, um maior, incluindo 19 dos 21 isolados estudados e uma dicotomia basal, formada pelo o isolado 169D1F, obtido de tomate, seguido por 276D2F de maracujá (Fig. 20).

O primeiro grupo apresentou várias ramificações, formando vários subgrupos. O isolado 276D2F, obtido de maracujá, foi o mais divergente e apresentou menor similaridade com os outros isolados.

O primeiro grupo (SGI) foi produzido pelos isolados FOC13F (banana maçã de Joaquim Gomes), FOC17F (banana Maçã de Jacuípe) e FOC1F (banana Maçã de Porto Real do Colégio). Um segundo grupo (SGII), incluindo 193D2F (maracujá) e FOC4F (banana São Tome) foi formado e um terceiro grupo (SGIII) incluiu os isolados FOC12F (banana Maçã de Palmeira dos Índios), 211D1F e 68D1F (tomate) também apresentaram homologia.

O quarto grupo (SGIV) foi formado pelos isolados FOC16F (banana Maçã de Porto Calvo) e FOC20F (banana Maçã de Jundiá), 159DF e 213D2F, 167DF (tomate) e 135D2AF (maracujá), apesar de incluir hospedeiros diferentes de *F. oxysporum*.

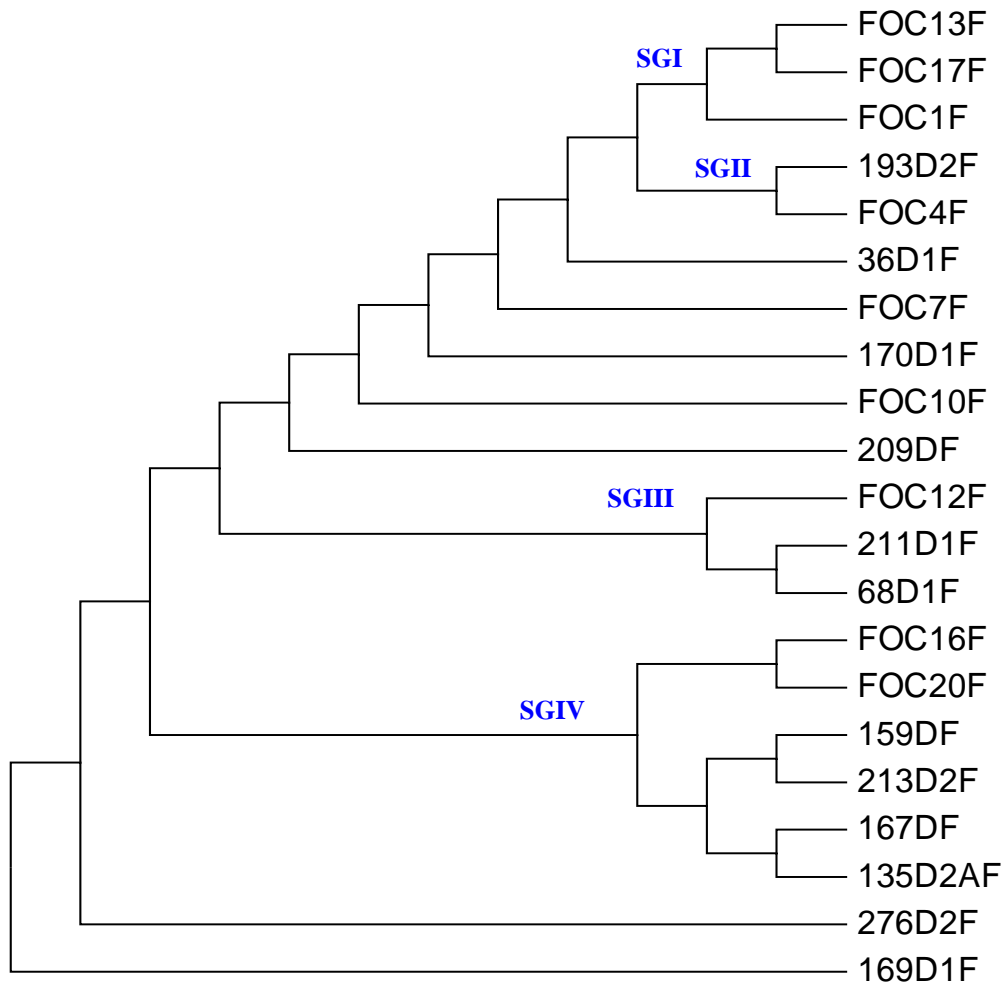


Figura 20. Dendrograma consenso construído pelo método de agrupamento NJ utilizando a distância Kimura-2-parameter (gamma) baseado nas seqüências da região ITS completa e parte do gene 28S do rDNA de 21 isolados de *F. oxysporum*. SG=subgrupo.

O dendrograma gerado a partir da análise de bootstrap manteve apenas os grupos que apresentaram suporte estatístico acima de 50% (Fig. 21). Os isolados pertencentes ao grupo GI, FOC13F (banana maçã de Joaquim Gomes) e FOC17F (banana maçã de Jacuípe) formaram um grupo monofilético em 53% das replicações, enquanto que o isolado FOC1F, sem suporte de bootstrap, colapsou.

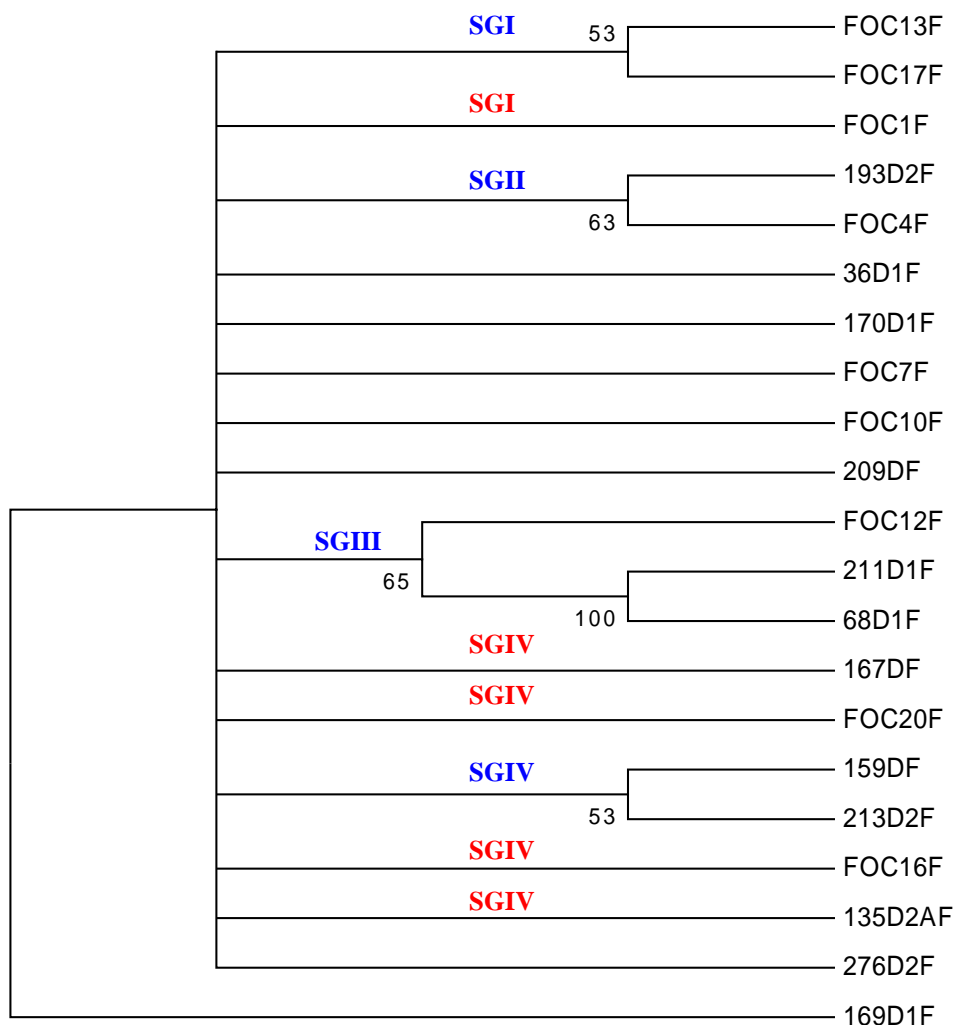


Figura 21. Dendrograma bootstrap construído pelo método de agrupamento NJ utilizando a distância Kimura-2-parameter (gamma) baseado nas seqüências da região ITS completa e parte do gene 28S do rDNA de 21 isolados de *F.oxysporum*. **SG**=subgrupo mantido, **SG**=subgrupo colapsado.

O grupo GII incluindo 193D2F, obtido de maracujá, e FOC4F, obtido de banana São Tomé de São Brás, foi mantido em 63% das replicações, o mesmo ocorrendo com o grupo GIII, onde os isolados 211D1F e 68D1F (ambos de tomate) formaram um grupo em 100% das replicações, e estes dois isolados, e FOC12F (banana Maçã de Palmeira dos Índios), estiveram juntos em 65% das replicações. Do quarto grupo, apenas os isolados 159DF e 213D2F foram mantidos com suporte de bootstrap de 53%.

O dendrograma ilustrado na Figura 22 foi obtido pelo método de agrupamento UPGMA. Nesse dendrograma observou-se a formação de vários grupos e subgrupos. O isolado 169D1F obtido de tomate foi o mais divergente. Três subgrupos principais foram observados.

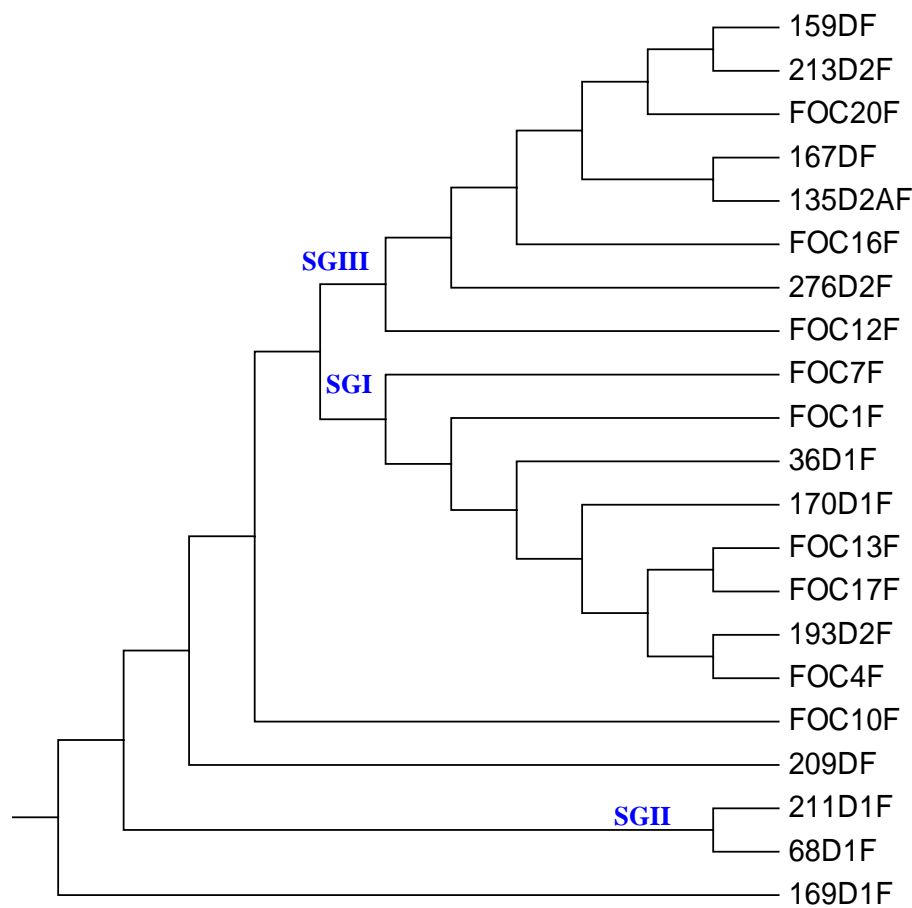


Figura 22. Dendrograma consenso construído pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a distância Kimura-2-parameter (gamma) baseado nas seqüências da região ITS completa e parte do gene 28S do rDNA de 21 isolados de *F.oxysporum*. SG=subgrupo.

O primeiro grupo, denominado SGI foi formado por FOC7F (banana prata de Feliz Deserto), FOC1F (banana maçã de Porto Real do Colégio), 170D1F (pimentão), 36D1F (tomate), FOC13F (banana maçã de Joaquim Gomes), FOC17F (banana maçã de Jacuípe), 193D2F (maracujá) e FOC4F (banana São Tomé de São Brás).

O segundo, GII, foi formado pelos isolados 211D1F e 68D1F (ambos de tomate), e o terceiro, pelos isolados 159DF e 213D2F (ambos de tomate), FOC20F (banana Maçã Jundiá), 167DF (tomate), 135D2AF (maracujá), FOC16F (banana Maçã Porto Calvo), 276D2F (maracujá) e FOC12F (banana Maçã de Palmeira dos Índios).

A análise de bootstrap revelou alto suporte estatístico para diversos subgrupos. Apesar de grande parte dos ramos que levaram ao colapso das OTUs, alguns grupos foram mantidos, como foi o caso do SGIII (Fig. 23).

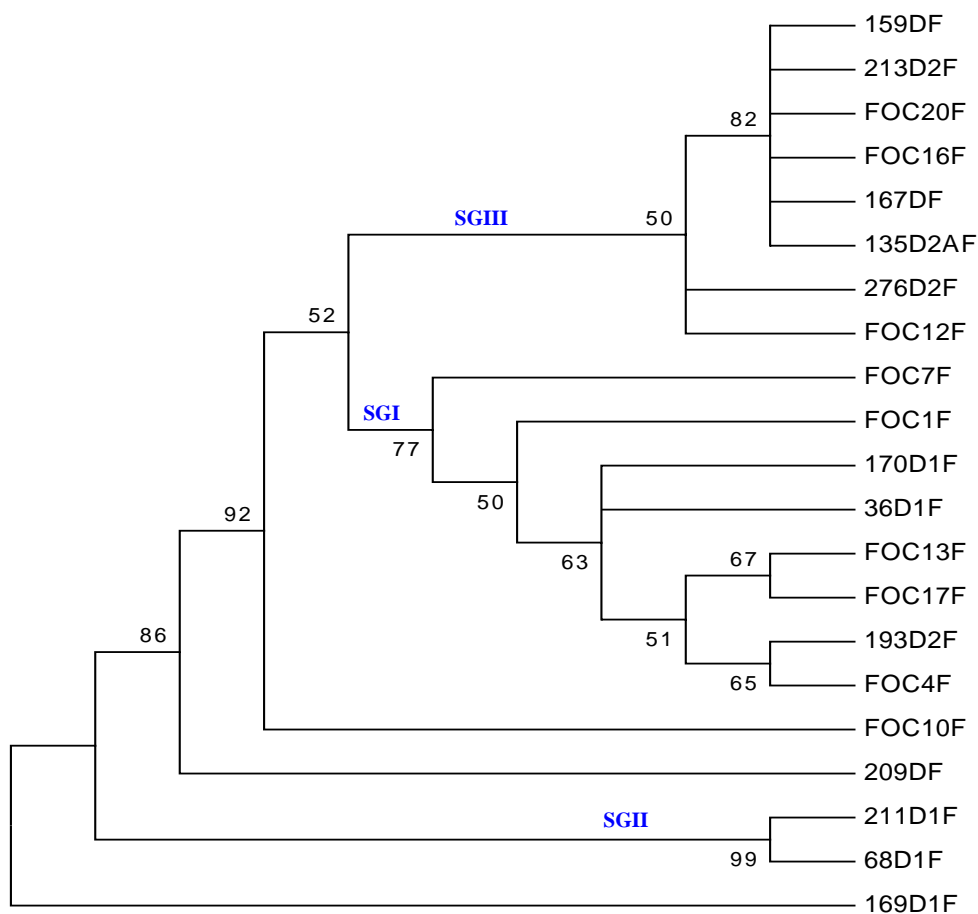


Figura 23. Dendrograma bootstrap construído pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a distância Kimura-2-parameter (gamma) baseado nas seqüências da região ITS completa e parte do gene 28S do rDNA de 21 isolados de *F. oxysporum*. SG=subgrupo.

Dentro deste subgrupo existe suporte estatístico (50%) para a separação dos isolados 276D2F e FOC12F do restante do grupo, enquanto que alto suporte (82%) para a inclusão de 159DF (tomate), 213D₂F (maracujá), FOC20F (banana maçã de Jundiá), FOC16F (banana maçã de Porto Calvo), 167DF (tomate) e 135D₂AF (maracujá) em um grupo monofilético. Por exemplo, o GI foi mantido com suporte de 77%, e dentro dele, FOC13F e FOC17F apresentaram bootstrap de 67%, enquanto que 193D₂F e FOC4F, de 65%.

Observou-se um suporte de bootstrap de 99% para o grupo (GII) formado pelos isolados 211D1F e 68D1F, ambos obtidos de tomate (Fig. 23).

Uma outra análise incluindo 18 seqüências de *formae speciales* de *Fusarium*, outras espécies, além do teleomorfo *Gibberella*, todas disponíveis no GenBank, foi efetuada (Fig. 24).

A matriz de similaridade (Apêndice 8), constatou se a distância genética entre os isolados, houve alta homologia entre eles. Por exemplo, 211DF e 68D1F (GII) apresentaram 99,94% de similaridade, enquanto que a menor foi de 99,81%, entre 169D1F, o mais basal, e 211DF, ambos *Fol* de tomate.

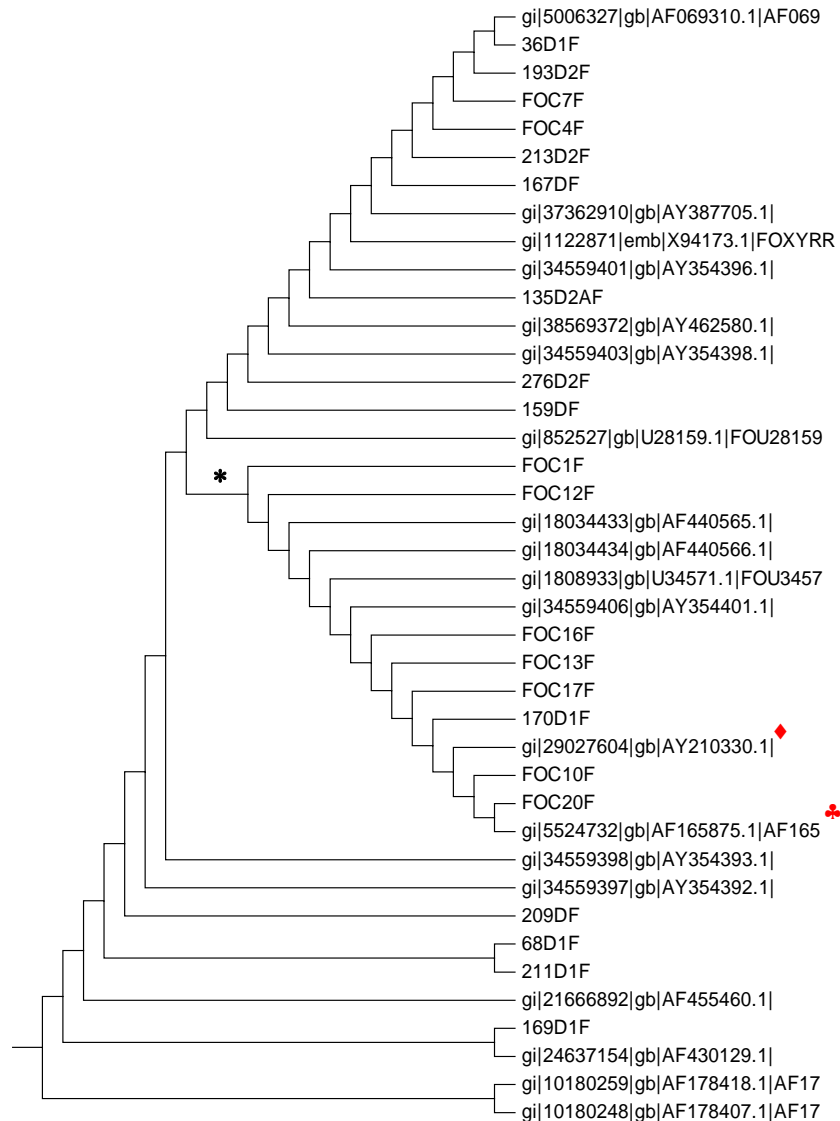


Figura 24. Dendrograma consenso construído pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a distância Kimura-2-parameter (gamma) baseado nas seqüências da região ITS completa de 21 isolados de *Fusarium oxysporum* e 18 obtidos do Genbank. Um isolado de *F.oxysporum* humano (♣) e outro associado a árvores (♦) estão destacados.

O Apêndice 11 fornece as seqüências dos isolados obtidas do GenBank, enquanto que o Apêndice 12 a matriz de distância genética das comparações entre os isolados. Utilizou-se o método de distância UPGMA, por ter apresentado melhor suporte estatístico.

Em geral, isolados de uma mesma espécie hospedeira não se agruparam com suporte estatístico, mesmo os obtidos do GenBank. Apesar de haver a formação de grupos correspondendo ao hospedeiro, geralmente não houve suporte estatístico (Fig. 25). Cerca de 353 sítios, sem espaços, foram analisados (Apêndices 10 e 12).

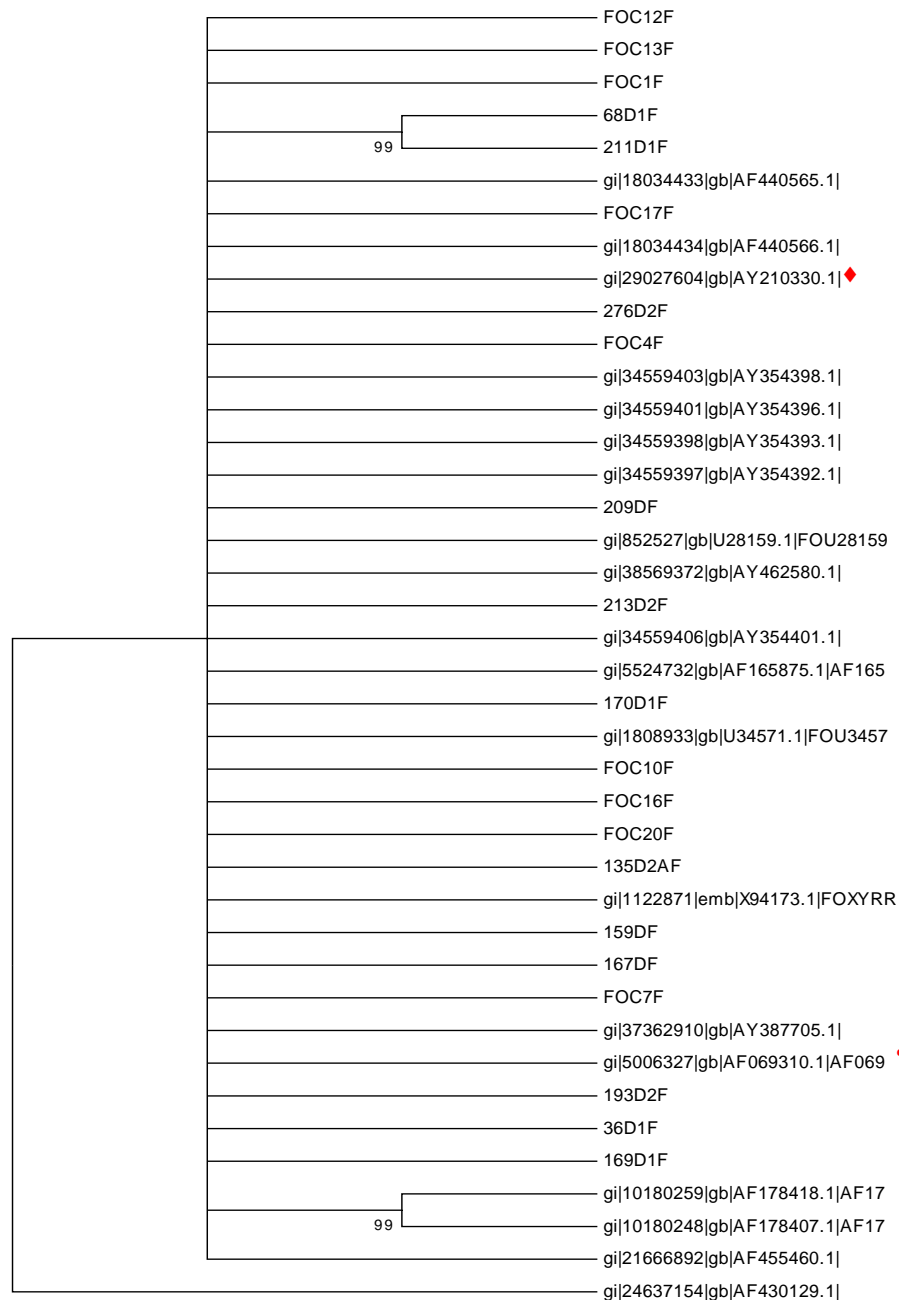


Figura 25. Dendrograma bootstrap construído pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a distância Kimura-2-parameter (gamma) baseado nas seqüências da região ITS completa de 21 isolados de *Fusarium oxysporum* e 18 obtidos do Genbank. Um isolado de *F. oxysporum* humano (♣) e outro associado a árvores (♦) estão destacados.

Por exemplo, alguns isolados de banana (FOC1F, FOC12F, FOC16F, FOC13F, FOC17F, FOC1F0 e FOC20F) fazem parte de um grande subgrupo (*) (Fig. 24), entretanto, na Figura 25 ele não foi confirmado devido ao baixo suporte estatístico. Eles também se agruparam com outros *F. oxysporum* de outros hospedeiros como tomate, associados a árvores e humanos.

Outro grande subgrupo também uniu *F. oxysporum* de cevada, tomate, maracujá, banana, cravo, como também *F. niveum*, *vasinfectum*, *lagenarium* (Fig. 25), mas de todo o grupo, apenas 68D1F e 211D1F de tomate permaneceram com suporte de 99%. Um grupo foi formado entre *F. solani* f. sp. *glycines* e *batatas*, com suporte de 99%. A Figura 25 mostra que os subgrupos originalmente obtidos (Fig. 24) não foram mantidos.

A região ITS foi bastante conservada, tendo as duas seqüências mais divergentes, (gi/21666892/gb/AF455460.1/), de *Gibberella fujikuroi* e (gi/24637154/gb/AF430129.1/) de *F. mangiferae*, apresentado similaridade de 99,78%.

O isolado humano (♣) e o saprófita associado a árvores (♦) agruparam-se com isolados de *Foc* de bananeira (Fig. 25). Entretanto, devido ao baixo suporte de bootstrap, abaixo de 50%, e homologia de 100% (Apêndice 12) a relação destes isolados com os fitopatógenos não pôde ser inferida.

Visando avaliar a especificidade da região ITS e 5,8S rDNA de *Foc* em relação às cultivares de banana, Prata, Pacovan, Maçã e São Tomé, efetuou-se uma análise filogenética incluindo apenas os isolados de *Foc* utilizando os algoritmos NJ e UPGMA (Fig. 26).

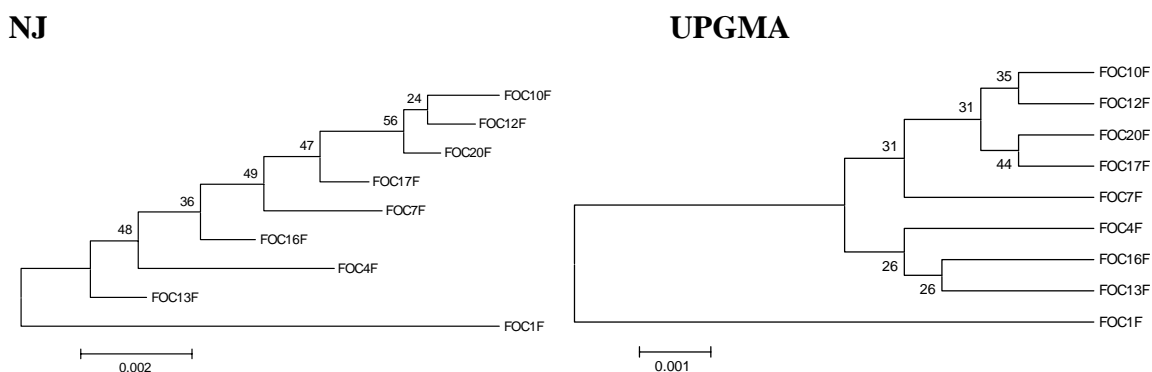


Figura 26. Dendrograma consenso construído pelos métodos de agrupamento NJ e UPGMA utilizando a distância Kimura-2-parameter (gamma) baseado nas seqüências da região ITS completa de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

Foram incluídos 633 sítios totais da região ITS1-5,8S rDNA-ITS2, incluindo espaços, e excluindo-se a porção 28S rDNA. O alinhamento múltiplo das seqüências de *Foc*, está apresentada nos Apêndices 13 e 14, enquanto que a matriz de distância genética pode ser vista no Apêndice 15. A composição média de cada nucleotídeo foi: G=22,8%, U=23,5%, C=26,6% e A=27,1%. No total, 0,95% dos sítios foram variáveis (6/633), e apenas um, na região ITS2, parsimonicamente informativo. O gene 5,8S rRNA, apesar de apresentar quatro sítios variáveis, não forneceu nenhuma informação parsimônica.

Apesar de ser detectada a formação de alguns grupos (Fig. 26), eles geralmente não corresponderam aos isolados dos cultivares de banana, e não tiveram suporte estatístico (abaixo de 50%), conseqüentemente a maioria dos ramos colapsou (Fig. 27), e relações entre os isolados não pôde ser inferida. Por exemplo, a similaridade entre os mais divergentes, FOC1F x FOC10F e FOC1F x FOC20F, foi de 99,98% (Apêndice 15).

Em geral, constatou-se que o número de informação dentro da f. sp. *cubense* foi menor que a obtida de comparações entre diferentes f. spp.

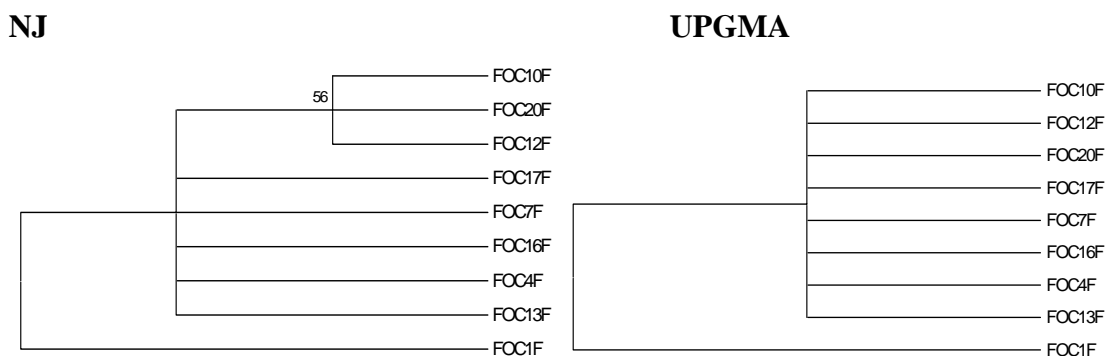


Figura 27. Dendrograma bootstrap construído pelos métodos de agrupamento NJ e UPGMA utilizando a distância Kimura-2-parameter (gamma) baseado nas seqüências da região ITS completa de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

6. DISCUSSÃO

A região IGS é considerada uma região altamente variável no genoma dos fungos filamentosos, sendo indicada em estudos de variabilidade genética entre indivíduos da mesma espécie, inclusive entre *formae speciales* (f. spp.) de uma espécie (BOEHM *et al.*, 1994; FEKETE *et al.*, 1993). A região separa os genes repetidos, que codificam as subunidades 28S, 5,8S e 18S do rRNA, e não é transcrita, apresentando maior variabilidade inter- e intraespecífica que as regiões internas transcritas, ITS1 e ITS2.

Após a análise dos RFLPs da região IGS utilizando as enzimas *Bgl*II, *Sal*I e *Sma*I, observou-se polifilia. A análise filogenética da região ITS, por outro lado, revelou que isolados específicos de alguns hospedeiros, como por exemplo, f. sp. *cubense*, estão mais proximamente relacionados a isolados de outros hospedeiros, como f. sp. *lycopersici*, do que entre si.

A digestão com todas as três enzimas sugeriu a formação de quatro haplotipos (A-D). A maioria dos isolados cuja região IGS foi digerida por *Bgl*II apresentou haplotipo B, independente da f. spp., enquanto que com *Sal*I, com exceção de FOC1, 213D2F e 170D1F, todos os demais apresentaram o mesmo padrão de bandas, com um sítio de restrição.

A análise com a *Sma*I revelou que o padrão de bandas dos isolados de diferentes cultivares de banana obtidos de diferentes regiões do Estado foi idêntico, apresentando um único sítio de restrição. Entretanto, o mesmo padrão foi observado para um isolado de tomate, 36DF, que constitui o haplotipo B. Para todas as enzimas testadas não houve relação entre os haplotipos gerados e especificidade ao hospedeiro ou f. spp.

De acordo com Bentley *et al.* (1995), alguns estudos suportam a hipótese de que não existe correlação entre perfil RAPD e especificidade de isolados de *Foc* com determinada cultivar de banana, isto é, com raças, mas sim com VCGs. Entretanto, respostas obtidas com a região IGS têm sido diferentes para cada população do complexo *F. oxysporum* avaliada.

Por exemplo, Appel e Gordon (1995) estudaram a variação intraespecífica dentro de populações de *F. oxysporum*, através da análise RFLP da região IGS do rDNA. Eles trabalharam com 56 isolados de diferentes hospedeiros. As enzimas de restrição utilizadas foram *Eco*RI, *Sau*3A, *Cfo*I, e *Ava*II. Os autores concluíram que a região IGS mais variável foi observada entre isolados de *F. oxysporum* não patogênicos.

Edel *et al.* (1995) estudaram 60 linhagens de *F. oxysporum* através de três métodos moleculares para detectar a presença de polimorfismo intraespecífico. Concluíram que o método RFLP de DNA total mostrou-se mais sensível e foi capaz de detectar 40 variantes dentro das 60 amostras, enquanto que a análise dos RFLPs da região IGS indicou o relacionamento genético entre as linhagens. As enzimas utilizadas pelos autores foram *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *MboI*, *MspI*, *RsaI*, *XhoI* e *ScrFI*.

Fernandez *et al.* (1994) realizaram a caracterização molecular das raças A, 3 e 4, de 52 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* através da análise de RFLPs do rDNA, mtDNA e VCGs. Dez VCGs foram obtidos, enquanto que isolados de raças diferentes não tiveram o mesmo VCG, além de que isolados da raça A apresentaram maior polimorfismo em relação às outras. O relacionamento genético entre os isolados mostrou que o local de restrição dos loci avaliados foi diferente e que não houve correlação entre raças e padrões RFLPs.

Uma sonda (P449) com um fragmento de 3,38 kb produzido de um isolado de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, foi usada por Bridge *et al.* (1995) para determinar perfis RFLPs de mtDNA em 28 isolados de *F. oxysporum* de vários hospedeiros e localidades. A sonda mostrou polimorfismo dentro das diferentes f. spp.

Análise de RFLP, efetuada por Koenig *et al.* (1997) sugere que isolados da f. sp. *cubense* podem estar mais proximamente relacionados a outras f. spp., como *lycopersici*, do que deles próprios. Os autores questionaram, em seu artigo, a separação do complexo *F.oxysporum* em f. spp. O mesmo foi observado neste trabalho, onde cladogramas gerados da análise de RAPD, RFLPs e sequenciamento das regiões ITS1, ITS2, 5,8S rDNA e parte do 28S rDNA não foram congruentes com a separação da população analisada em f. spp.

A alta taxa de polimorfismo genético em *F. oxysporum* já havia sido relatada em estudos morfológicos e culturais com o fungo (SNYDER e HANSEN, 1940). Os dados genéticos de RAPDs aqui apresentados sugerem que esta diversidade não está relacionada com o hospedeiro ou localização geográfica e que o complexo apresenta alta variabilidade.

RAPD tem sido utilizado efetivamente como marcador genético visando detecção de polimorfismos em *F. oxysporum* (BENTLEY *et al.*, 1995; GHERBAWY, 1999; MOSTAFA *et al.*, 2002). A vantagem de se utilizar o método é que ele geralmente busca por loci em todo o genoma, enquanto que genealogia de genes examina a evolução de seqüências em genes nucleares, daí a diferença de variabilidade entre isolados de *F. oxysporum* utilizando diferentes regiões do genoma.

Neste trabalho, RAPD foi um marcador eficiente para acessar diversidade genética da população de *F. oxysporum* avaliada, entretanto, relação entre padrões de bandas e f. sp. não pôde ser confirmada. A relação filogenética e a variação genética avaliadas entre 18 isolados de *F. oxysporum* desta pesquisa, através do marcador RAPD, sugeriu que o fungo é formado por espécies filogenéticas distintas. A análise fenética gerou dois grupos, com suporte de 100% de bootstrap. Entretanto, foi constatada uma grande variabilidade genética na população estudada, como também pelos baixos valores de bootstrap, mesmo entre aqueles provenientes do mesmo hospedeiro. Um número maior de isolados representativos de cada f. sp. seria necessário para comprovar este resultado.

Dados obtidos por O'Donnell *et al.* (1998), mostraram que houve variação na distribuição do número de cromossomos de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, que foi de nove a 14. Estas diferenças poderiam, em parte, explicar a alta variabilidade genética dentro da população do complexo *F. oxysporum* analisada no presente estudo.

Bentley *et al.* (1995) também não encontraram correlação entre o método RAPD e especificidade de isolados de *Foc* a determinada cultivar.

Entretanto, esta variabilidade, mesmo a partir de RAPDs, é diferente para várias f. spp. de *F. oxysporum*. Por exemplo, Vakalounakis e Fragkiadakis (1999) concluíram, através de RAPD, que a f. sp. *cucumerinum* e a f. sp. *niveum* são polifiléticos, enquanto que a f. sp. *radicis-cucumerinum* e a f. sp. *melonis* são monofiléticos. Já Mostafa *et al.* (2002) conseguiram, através do método, distinguir isolados altamente dos fracamente patogênicos de *F. oxysporum* obtidos de grão-de-bico.

Não foi encontrada uma única banda que fosse comum a todos os isolados de *F. oxysporum* estudados neste trabalho, e conseqüentemente pudesse ser considerada um marcador da espécie. Adicionalmente, isolados de f. spp. diferentes compartilharam bandas de mesmo peso molecular. Entretanto, isolados de cada f. sp. tenderam a se agrupar (Figs. 12 e 13).

Quanto às unidades do DNA ribossômico (rDNA), apresentam peculiaridades que permitem a detecção de patógenos a nível de espécie e formas intraespecíficas. Além de serem altamente estáveis, apresentam regiões do genoma conservadas e variáveis (HIBBETT, 1992), ocorrem em múltiplas cópias, isto é, até 200 por genoma haplóide (BRUNS *et al.*, 1991) e são arranjadas em unidades de repetição, cada uma contendo genes da subunidade menor (18S e 5,8S) e da subunidade maior (28S).

Análise de seqüências do rDNA tem sido amplamente aplicada em estudos taxonômicos e na inferência de relações filogenéticas de fungos (HIBBETT, 1992). As regiões conservadas têm sido utilizadas em comparações entre espécies, enquanto que as variáveis, como por exemplo, as regiões ITS1 e ITS2, têm sido empregadas na diferenciação de espécies intimamente relacionadas (ABD-ELSALAM *et al.*, 2003) e relação genética entre espécies e isolados de uma mesma espécie (WHITE *et al.*, 1990; O'DONNELL, 1992).

Cerca de 13 sítios (2,40%) na região ITS1 foram variáveis, enquanto que apenas 1,85%, parsimonicamente informativos. Já a região ITS2 apresentou 66 sítios variáveis (12,20%), com 2,04% dos sítios parsimonicamente informativos. O gene 5,8S rDNA foi o mais conservado, com 5 sítios variáveis (0,92%) e nenhum parsimonicamente informativo.

Em seguida, as seqüências alinhadas foram transferidas para a versão 2.1 do programa de filogenia molecular, MEGA2 (KUMAR *et al.*, 2001).

Os dados obtidos corroboram aqueles resultantes das pesquisas de O'Donnell *et al.* (1998), os quais utilizaram regiões mais conservadas que a ITS e não obtiveram suporte para a separação de *F. oxysporum* em f. spp., mesmo utilizando regiões mais variáveis, como o mtDNA e o gene EF-1 α . Adicionalmente, foi constatado pelos autores que o gene EF-1 α apresenta 95% do sinal derivado de introns, portanto menos conservado e geneticamente informativo que o mtDNA, sugerindo que o complexo *F. oxysporum* é monofilético, embora, muitas f. spp. são polifiléticas. Isso indica que a patogenicidade ao hospedeiro evoluiu convergentemente e põe em questão o sistema denominado *forma specialis*, como ocorre em *F.o. cubense*, *F.o. melonis* e *F. o. lycopersici*, todos polifiléticos. Os autores observaram que isolados da f. sp. *lycopersici* se agruparam com f. spp. *melonis*, *batatas*, *passiflorae*, *erythroxyti* e até com *F. oxysporum* obtido de infecções humanas.

Os autores concluíram que muitos isolados da f. sp. *cubense* são mais proximamente relacionados a outras f. spp. de outros hospedeiros ou até de *F. oxysporum* saprófitas de solo do que deles mesmos.

Moricca *et al.* (1995) constataram que os genes 5,8S rDNA de *Fusarium sambucinum* e *F. oxysporum* são 100% homólogos, demonstrando o seu alto nível de conservação. Entretanto, observaram variação na região ITS de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, a qual não havia sido detectada através de RFLPs, enquanto que a seqüência da mesma região de *F. proliferatum* e *F. fujikuroi* foram idênticas (Waalwijk *et al.*, 1996).

Outras comparações, incluindo uma amostragem mais representativa das diferentes f. spp. e outros genes com diferentes níveis de conservação deveriam ser efetuadas visando identificar o mecanismo genético de especificidade ao hospedeiro que determina f. pp. no complexo *F. oxysporum*, que segundo Baayen *et al.* (2000), ainda é desconhecido. A região ITS em fungos evoluiu rapidamente, por isso, pode conter variação nas seqüências de nucleotídeos suficiente para constatar relacionamento entre espécies (WHITE *et al.*, 1990; SAMUELS e SEIFERT, 1995).

Grupos múltiplos, independentes das diversas *formae speciales* de *F. oxysporum* analisadas neste trabalho foram geradas pela análise da região ITS e 5,8S rDNA.

Baseado nas seqüências obtidas através do sequenciamento da região ITS e 5,8S do rDNA dos 21 isolados de *F. oxysporum*, foram construídos dendrogramas visando detectar similaridade entre os isolados. Apesar da região utilizada neste trabalho ser mais conservada que as utilizadas por O'Donnell *et al.* (1998), os dados foram congruentes. Isolados de diferentes *formae speciales*, inclusive de um isolado patogênico a humanos (gi|5524732|gb|AF165875.1|AF165875) que se agrupou com o isolado de *Foc*, FOC 20F, no dendrograma consenso (Fig. 24), ainda que sem suporte estatístico de bootstrap (Fig. 25), apareceram agrupados nos diferentes dendrogramas, inclusive naqueles que incluem seqüências de *F. oxysporum* obtidas do GenBank (banco de dados da Internet) (Apêndice 11).

A Fig. 25 revelou que, mesmo quando se efetuou comparação das seqüências dos genes dos isolados desta pesquisa e com aqueles obtidos do GenBank, as seqüências foram pouco variáveis e a relação entre os isolados não pôde ser determinada, o mesmo ocorrendo quando foi construído um dendrograma apenas dos 19 isolados do GenBank (dados não demonstrados).

Outros marcadores, como RFLPs têm sido utilizados por O'Donnell (1992) para avaliar a região ITS. Relações genéticas entre isolados de *Fusarium* foram inferidas a partir das variações existentes em suas seqüências e também de mapas RFLPs resultado da digestão diferencial da região ITS. Entretanto, o autor concluiu que a região ITS não está sempre associada com os sítios de restrição e não foi detectada por mapeamento dos RFLPs.

Isolados das f. spp. incluídas na análise não formaram grupos exclusivos, assim como constatado na pesquisa de O'Donnell *et al.* (1998) em relação às f. spp. *cubense*, *melonis*, *lycopersici* e *radicis-lycopersici*.

Baayen *et al.* (2000) observaram que raças de uma f. sp., podem ter origens independentes, com patogenicidade e virulência evoluindo mais que uma vez através de mutações, transposições ou disseminação para organismos distantemente relacionados através de parassexualidade ou transferência horizontal de genes. Os autores concluíram que em contraste com o que é assumido, *formae speciales* no complexo *F. oxysporum* não é monofilético.

Neste estudo, grupos de patogenicidade (f. sp.) não puderam ser distinguidos pelos métodos utilizados. Os padrões do marcador RAPD comprovaram a heterogeneidade das populações estudadas, sugerindo que possivelmente rearranjos aconteceram no genoma por inteiro, devido, por exemplo, a processos parassexuais ou transferência horizontal de fragmentos de DNA.

Oliveira e Costa (2002) realizaram testes de patogenicidade com 17 isolados de *Fusarium solani* obtidos de soja e feijoeiro, utilizando a técnica denominada ARDRA para analisar a região ITS1 – 5,8S rDNA – ITS2, amplificada com os iniciadores ITS5 e ITS4. Os padrões de bandas gerados pela digestão com a enzima *Hae* III permitiram diferenciar três grupos entre os isolados de *F. solani*, sendo um grupo específico para isolados de *F. solani* f. sp. *phaseoli*, com 100% de similaridade entre os isolados. Entre os isolados de *F. solani* f. sp. *glycines*, observam-se a existência de dois padrões distintos de restrição concluindo-se que a técnica apresenta potencial para utilização como um marcador para diferenciação entre as f. spp. *phaseoli* e *glycines*, dentro do complexo *Fusarium solani*.

Tan e Nielssen (2003) analisaram seqüências de rDNA da região ITS para determinar o relacionamento genético em espécies de *Fusarium* que causam doenças em cereais e algumas espécies associadas com doenças de plantas em geral. O relacionamento genético foi examinado através da distância e o algoritmo de parsimônia das seqüências da região ITS. Os autores observaram um agrupamento dessas espécies de *Fusarium* com *F. sambucinum*, *F. venenatum* e *F. poae*. Esse grupo foi definido pela presença do gene *tri5*. Um outro cluster foi encontrado entre os isolados *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. torulosum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* e *F. solani*, que não apresentavam o gene.

Mishra *et al.* (2003) desenvolveram uma técnica de PCR rápida e segura para identificação de espécies patogênicas de *Fusarium*. A técnica se baseia numa reação de PCR utilizando iniciadores fluorescentes, e seqüências da região ITS do rDNA, o que permitiu a identificação de cinco espécies de *Fusarium* patogênicas e toxigênicas. As

espécies incluem *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* e *F. sambucinum*.

As comparações efetuadas entre os isolados de *Foc* revelaram a presença de seis sítios variáveis, dos 633 incluídos na análise, incluindo os espaços (gaps). Destes, apenas um foi parsimonicamente informativo, encontrado na região ITS2, uma transição de uma citosina por uma timina (Apêndice 13). O isolado FOC1F foi o que apresentou o maior número de mutações (duas tranversões e duas transições) em relação aos demais, e nos dendrogramas das Figs. 26 e 27, foi o mais basal. Outros que apresentaram mutações, FOC12F, seguido de FOC20F e FOC10F foram os mais divergentes em relação aos restantes, que se agruparam nos dendrogramas (Fig. 26 e 27) e foram responsáveis por quatro Indels (inserção-deleção).

Os resultados obtidos para os isolados *Foc* são congruentes com aqueles obtidos por Silva-Hanlin (1999), do sequenciamento da região ITS e 5,8S do rDNA, e apesar do número maior de sítios variáveis obtidos neste trabalho, (6 contra apenas 1), o mesmo não foi suficiente para determinar relações de *Foc* com as diferentes cultivares de banana. É possível que, com um número maior de isolados representativos de cada cultivar, a análise tenha uma maior resolução. Portanto, regiões mais variáveis como mtDNA ou EF-1 α , utilizado por O'Donnell *et al.* (1998), e outros genes como o *tri5* (TAN e NIESSEN, 2003) poderiam ser avaliadas.

Portanto, houve congruência entre os dados obtidos nesta pesquisa de diferentes níveis de conservação do gene ou método biomolecular, IGS (RFLP), RAPD e ITS (sequenciamento de DNA). As f. spp. incluídas no estudo pertencem a linhagens clonais múltiplas, sugerindo origens independentes.

7. CONCLUSÕES

- a) Houve concordância entre os dados obtidos de diferentes níveis de conservação do gene através dos métodos: IGS (RFLP), RAPD e ITS (sequenciamento de DNA);
- b) RAPD é um método eficaz para detectar variação genética dentro do complexo *F. oxysporum*, apesar de não ter sido um marcador eficiente para f. spp.;
- c) A alta diversidade genética obtida por RAPD não está relacionada com o hospedeiro;
- d) A análise dos RFLPs da região IGS revelaram que membros de algumas f. spp., estão mais proximamente relacionados a isolados de outras f. spp. do que entre si, com base nas enzimas testadas e no tipo de digestão;
- e) Para todas as enzimas testadas, não houve relação entre os haplotipos gerados pelos RFLPs da região IGS e especificidade ao hospedeiro (f. spp.);
- f) O diagnóstico eletrônico com blastn não pode ser aplicado para identificação de f. spp. de *F. oxysporum*, e sim de espécies do gênero;
- g) A região ITS do rDNA, apesar da pouca variabilidade, pode ser utilizada como marcador filogenético para relações dentro do complexo *F. oxysporum*; embora não apresente informação suficiente para comparações entre f. sp.;
- h) A região ITS2 foi mais variável e parsimonicamente informativa que a ITS1, enquanto que o gene que codifica a subunidade 5,8S do rRNA não apresentou nenhum sítio parsimonicamente informativo;
- i) A análise filogenética das f. spp. incluídas no estudo possivelmente estão formadas por linhagens clonais múltiplas, sugerindo origens independentes, provavelmente devido ao acúmulo de mutações.

8. REFERÊNCIAS

- ABBASI, P.A.; MILLER, S.A.; MEULIA, T.; HOITINK, H.A.J, KIM, J.M. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes by using molecular markers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.12, p.5421-5426. 1999.
- ABD-ELSALAM, K.A.; ALIN, I.N.; ABDEL-SATAR, M.A.; KHALIL, M.S.; VERREET, J.A. PCR Identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 82-85. 2003.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 3. ed. New York: Academic Press, Inc. 1988.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4. ed. Estados Unidos: J.W. & Sons, Inc. 1996.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", **Nucleic Acids Res.**, v, 25, p.3389-3402. 1997.
- ALVES, E.J.; SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.L. Cultivation of bananas and plantains in Brazil and needs for improvement. p.44-49. In: **Banana and Plantain Breeding Strategies**. Coord. Persley, G.J. & De Langhe, E.A. Aciar Proceedings 21. Australia. 1986.
- ALZATE-MARIN, A.L.; BAÍA, G.S.; FALEIRO, F.G.; CARVALHO, G.A.; PAULA JR., T.J.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Análise da diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões do Brasil por marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.85-88. 1997.
- ANDERSON, C.; SOLOMONS, G.L. Primary metabolism and biomass production from *Fusarium*. In: The Applied Mycology of *Fusarium*. M.O. Moss & J.E. Smith, eds. Cambridge University Press. 1984.
- APPEL D.J.; GORDON T.R. Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. **Exp. Mycol.**, v. 19, p.120-128. 1995.
- APPEL, D.J.; GORDON, T.R. Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. **Mol. Plant. Microbe Interact.**, v. 9, p.125-138. 1996.
- ARIKAN, S.; LOZANO-CHIU, M.; PAETZNICK, V.; NAGIA, S.; REX, J. Activity of amphotericin, itraconazole and voriconazole against *Aspergillus* and *Fusarium*, abstr. J-19. In: Program and abstracts of the 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C. 1998.
- ARMSTRONG, G.M.; ARMSTRONG, J.K. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases, p. 391-399. In P.E. Nelson, T.A. Toussoun, and R. Cook (ed.). **Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy**. The Pennsylvania State University Press, University Park. 1981.
- ASSIGBETSE, K.B.; FERNANDEZ, D.; DUBOIS, M.P.; GEIGER, J.P. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, p.622-626. 1994.
- AVELANGE, I. **Recherche d'un outil de caractérisation visant à construire une classification phylogénétique l'ensemble des souches de l'espèce *Fusarium oxysporum***. Thèse de doctorat. Université Paris XI, Orsay, France. 1994.
- AVISE, J.C. Gene trees and organismal histories: A phylogenetic approach to population biology. **Evolution**, v. 43, p.1192-1208. 1989.

- AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. New York: Chapman & Hall, Inc. 1994.
- BACHMANN, K. Molecular markers in plant ecology. **New Phytol.**, v. 126, p.403-418. 1994.
- BAAYEN, R.P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P.J.M.; CIGELNIK, E.; KROON, L.P.N.M.; ROEBROECK, E.J.A.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. **Ecology and Population Biology**, v. 90, n. 8, p. 891-900. 2000.
- BENTLEY, S.; PEGG K.G.; DALE, J.L. Optimization of RAPD-PCR fingerprinting to analyse genetic variation within populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. **J. Phytopathology**, v. 142, p. 64-78. 1994.
- BENTLEY, S.; PEGG, K.G.; DALE, J.L. Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, n. 11, p. 1378-1384. 1995.
- BOEHM, E.W.A.; PLOETZ, R.C.; KISTLER, H.C. Statistical analysis of karyotype variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. **Molec. Pl.-Micr. Interact.**, v. 7, p.196-207. 1994.
- BOOTH, C. **The Genus Fusarium**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 1971.
- BRIDGE P.D.; HOPKINSON L.A.; RUTHERFORD M.A. Rapid mitochondrial probes for analysis of polymorphisms in *Fusarium oxysporum* special forms. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 21, p.198-201. 1995.
- BRUNS, T. D.; FOGEL, R.; WHITE, T. J.; Palmer, J. D. Accelerated evolution of a false-truffle from a mushroom ancestor. **Nature**, v. 339, p.140-142. 1989.
- BRUNS, T. D.; WHITE, T.J.; TAYLOR, J.W. Fungal molecular systematics. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 22, p. 525-564. 1991.
- BULAT, S.A.; MIRONENKO, N.V.; ZHOLKEVICH, L.G. Genetic structure of soil populations of the fungus *Fusarium oxysporum* Schlechtend. : Fr.: molecular reidentification of the species and genetic differentiation of isolates using polymerase chain reaction with universal primers (UP-PCR). **Genetika**, v. 31, p. 315-323. 1995.
- CAI, G.; GALE, L. R.; SCHNEIDER, R.W.; KISTLER, H.C.; DAVIS, R.M. ELIAS, K.S.; MIYAO, E.M. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. **Phytopathology**, v. 93, p. 1014-1022.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. **Mycologia**, v. 85, p. 415-427. 1993.
- CHEN, L.; TIAN, X.; YANG, B. A study on the inhibition of rat myocardium glutathione peroxidase and glutathione reductase by moniliformin. **Mycopathologica**, v. 110, p.119. 1990.
- CHEN, W. Restriction fragment length polymorphisms in enzymatically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Pythium* species. **Phytopathology**, v. 82, p.1467-1472. 1992.
- CROWHURST, R.N.; HAWTHORNE, B.T.; RIKKERINK, E.H.; TEMPLETON, M.D. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplified polymorphic DNA. **Curr. Genet.**, v. 20, p.391-396. 1991.
- DESJARDINS, A.E. *Gibberella* from A (venaceae) to Z (eae). **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 41, p.177-198. 2003.
- DOVER, G. A. Molecular drive: A cohesive mode of species evolution. **Nature**, v. 299, p.111-117. 1982.

- DOVER, G. A. DNA turnover and the molecular clock. **J. Mol. Evol.**, v. 26, p.47-58. 1987.
- DOVER, G. A. Linkage disequilibrium and molecular drive in the rDNA gene family. **Genetics**, v.122, p.249-252. 1989.
- EDEL, V.; STEINBERG, C.; AVELANGE, I.; LAGUERRE, G.; ALABOUVETTE, C. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. **Phytopathology**, v.85, n.5, p.579-585. 1995.
- EDEL, V.; STEINBERG, C.; AVELANGE, I.; GAUTHERON, N.; ALABOUVETTE, C. genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 36, p.61-71. 2001.
- FEKETE, C.; NAGY, R.; DEBETS, A.J.M.; HORNOK, L. Electrophoretic karyotypes and gene mapping in eight species of the *Fusarium* sections *Arthrosporiella* and *Sporotrichiella*. **Curr. Genet.**, v. 24, p.500-504. 1993.
- FERNANDEZ D.; ASSIGBESE K.; DUBOIS M.P.; GEIGER J.P. Molecular characterization of races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p.4039-4046.1994.
- FUNGARO, M.H.P., VIEIRA, M.L.C.; PIZZARANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.22, p.389-392, 1996.
- GHERBAWY, Y.A.M.H. RAPD profile analysis of isolates belonging to different formae speciales of *Fusarium oxysporum*. **Cytologia**, v. 62, p. 269-276. 1999.
- GERLACH, W.; NIRENBERG, H.I. **The genus *Fusarium* – A pictorial atlas**. Mitt. Biol. Bundesanst. Land Forstwirtschaft. Berlin Dahlem 209. 1982.
- GIBAS, J; JAMBECK, P. **Desenvolvendo Bioinformática: ferramentas de software para aplicações em biologia**. Tradução: Cristina de Amorim Machado. Rio de Janeiro: Campus, 2001.
- GRAHAM, G. C.; MEYERS, P.; HENRY, R.J. A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. **BioTechniques**, v. 16, p.48-50. 1994.
- GRAJAL-MARTIN, M.J.; SIMON, C.J.; MUEHLBAUER, F.J. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. **Phytopathology**, v. 83, p.612-614. 1993.
- GUADET, J.; JULIEN, J.; LAFAY, J. F.; BRYGOO, Y. Phylogeny of some *Fusarium* species determined by large-subunit rRNA sequence comparisons. **Mol. Biol. Evol.**, v. 6, p.227-242. 1989.
- GUÉHO, E.; KURTZMAN, C. P.; PETERSON, S. W. Phylogenetic relationships among species of *Sterigmatomyces* and *Fellomyces* as determined from partial rRNA sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 40, p. 60-65. 1990.
- GUTELL, R. R.; FOX, G. E. Compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format. **Nucleic Acids Res.**, v.16, p.175-270. 1988.
- HANCOCK, J. M.; DOVER, G. A. Compensatory slippage in the evolution of ribosomal RNA genes. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p.5949-5955. 1991.
- HASSOUNA, N., MICHOT, B., and BACHELLERIE, J. –P. The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. **Nucl. Acids Res.** 12:3563-3583. 1984.

HATSCH, D.; PHALIP, V.; JELTSCH, J.M. Use of genes encoding cellobiohydrolase-C and topoisomerase II as targets for phylogenetic analysis and identification of *Fusarium*. **Res. Microbiol.**, v.155, p.290-296. 2004.

HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 8.ed. CAB International: Oxon, UK. 1995.

HENNEQUIN C.; ABACHIN E.; SYMOENS F.; LAVARDE V.; REBOUX G.; NOLARD N.; BERCHE P. Identification of *Fusarium* species involved in human infections by 28S rRNA gene sequencing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p.3586-3589. 1999.

HIBBETT, D.S. Ribosomal RNA and fungal systematics. **Trans. Mycol. Soc.**, v. 33, p. 533-556. 1992.

JEGER, M.J.; EDEN-GREEN, S.; THRESH, J.M.; JOHANSON, A., WALLER, J.M.; BROWN, A.E. Banana diseases. In: S. Gowen (Ed.). **Bananas and Plantains**. Chapman & hall, UK, 1995. p. 173-176.

JOFFE, A.Z. *Fusarium* species: **Their Biology and Toxicology**. John Willey & Sons, New York, 588p. 1986.

KELLY, A.; ALCALÁ-JIMENEZ, A.R.; BAINBRIDGE, B.W.; HEALE, J.B.; PÉREZ-ARTÉZ, E.; JIMENÉZ-DÍAZ. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. **Phytopathology**, v. 84, p. 1293-1298. 1994.

KOENING, R.L.; PLOETZ, R.C.; KISTLER, H.C. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* consists of small number of divergent and globally distributed clonal lineages. **Phytopathology**, v. 87, p. 915-923. 1997.

KUMAR, S.; TAMURA, M.; NEI. MEGA2: **Molecular Evolutionary Genetic Analysis**, version 1.81. The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania. 2001.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*, and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. **Yeast**, v. 7, p.61-72. 1991.

LAKE, J. A. Determining evolutionary distances from highly diverged nucleic acid sequences: Operator metrics. **J. Mol. Evol.**, v. 26, p.59-73. 1987.

LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Phylogeny of five fungus-like protist *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Mol. Biol. Evol.**, v. 9, p.636-653. 1992.

LI, W.; GRAUR, D. **Fundamentals of Molecular Evolution**. Massachusetts, Sinauer Assoc. Inc. 1991.

LIDDEL, C.M. Introduction: Recent Advances in *Fusarium* Systematics. **Annual Meeting of the American Phytopathological Society**. 1991.

LOGRIECO, A; VESONDER, R. F.; PETERSON, S. W.; BOTTALICO, A. Reexamination of the taxonomic disposition and deoxynivalenol production by *Fusarium nivale* NRRL 3289. **Mycologia**, v. 83, p. 367-370. 1991.

MAJER, D.; MITHEN, R.; LEWIS, B. G.; VOS, P.; OLIVER, R.P. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. **Mycol. Res.** v.100, p.1107-1111. 1996.

MANULIS, S.; KOGAN, N.; REUVEN, M.; BEN-YEPHET, Y. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. **Phytopathology** St. Paul, v.84, n.1, p.98-101,1993

MARASAS, W.H.O.; NELSON, P.E.; TOUSSON, T.A. **Toxicogenic *Fusarium* species: Identity and Micotoxicology**. Pennsylvania State University Press. 1984.

- MENEZES, M; SILVA-HANLIN, D.M.W. **Guia Prático para Fungos Fitopatogênicos**. Recife: Imprensa Universitária-UFRPE. 1997.
- MISHRA P.K.; FOX R.T.; CULHAM A. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 28, p.329-332. 2003.
- MORICCA, S.; RAGAZZI, A.; KASUGA, T.; MITCHELSON, K.R. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton tissue by polymerase chain reaction. **Plant Pathol.**, v. 47, p. 486-494. 1998.
- MOSTAFA, M.; REZA, Z.M.; OMID, J. JAVAD, H. M. Use of RAPD, enzyme activity, staining, and colony size to differentiate phytopathogenic *Fusarium oxysporum* isolates from Iran. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 299-303. 2002.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F.A.. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Meth. Enzymol.**, v. 155, p.335-350. 1987.
- MUTHUMEENAKSHI, S.; BROWN, A E.; MILLS, P. R. Genetic comparison of aggressive weed mould strains of *Trichoderma harzianum* from mushroom compost in North America and the British Isles. **Mycological Research**, Cambridge, v. 4, p.385-390, 1998.
- NAMIKI, F.; SHIOMI, T.; KAYAMURA, T.; TSUGE, T. Characterization of the formae speciales of *Fusarium oxysporum* causing wilts of cucurbits by DNA fingerprinting with nuclear repetitive DNA sequences. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p.2684-2691. 1994.
- NELSON, A.J; ELIAS, K.S.; ARÉVALO, G.E.; DARLINGTON, L.C.; BAILEY, B.A. Genetic characterization by RAPD analysis of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythoxyli* associated with an emerging epidemic in Peru. **Phytopathology**, St Paul, v.87, p.1220-1225. 1997.
- NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; COOK, R.J. **Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy** (Pennsylvania State University Press). 457p. 1981.
- O'DONNELL, K. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). **Curr. Genet.**, v. 22, p. 213-220. 1992.
- O'DONNELL, K.; GRAY, L. E. Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 8, p.709-716. 1995.
- O'DONNELL, K.; KISTLER, H.C.; TACKE, B.K., CASPER, H.H. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97:7905-7910. 2000.
- O'DONNELL, K.; KISTLER, H.C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R.C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p.2044-2049. 1998.
- OLIVEIRA, V.C. de; COSTA, J.L. da S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p.631-634. 2002.
- OUELLET, T.; SEIFFERT, K.A. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD e PCR amplification. **Phytopathology**, v. 83, p.1003-1007. 1993.
- PAAVANEM-HUHTALA, S.; AVIKAINEM, H.; YLI-MATTILA, T. Development of strain-specific primers for a strain of *Glioc/adium catenulatum* used in biological control. **European Journal Plant Pathological**, Dordrecht, v. 106, n.2, p. 187-198, 2000.
- PETERSON, S.W. Phylogenetic Analysis of *Fusarium* species using ribosomal RNA sequence comparisons. **The American Phytopathological Society**, v. 81, p.1051-1054. 1991.

- RAMALHO NETO, C.E. Genome variability and population analysis in *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Inglaterra, 231 f. Dissertação (Ph.D.). London University. 1995.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Vol. 1, 2, 3. Estados Unidos: Cold Spring Harbour Laboratory Press. 1989.
- SAMUELS, G.J.; SEIFERT, K.A.. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 33, p.37-67. 1995.
- SANCHE, S.; A. FOTHERGILL; RINALDI. M. **Interspecies variation of the susceptibility of *Fusarium* species to Schering 56592 in vitro**, abstr. E66, 125p. In: Program and abstracts of the 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1997.
- SEIFERT, K.A.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. A critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous Ascomycetes and ascomycetous anamorphs. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. S760-S767. 1995.
- SEPERACK, P.; SLATKIN, M.; ARNHEIM, N. Linkage disequilibrium in human ribosomal genes: Implications for multigene family evolution. **Genetics**, v.119, p.943-949. 1988.
- SPATAFORA, J.W.; BLACKWELL, M. Cladistic analysis of partial ssrDNA sequences among unitunicate perithecial ascomycetes and its implications on the evolution of centrum development. In: D.L. Hawksworth (Ed.). **Ascomycetes Systematics: Problems and Perspectives in the Nineties**. Plenum Press, New York, 1994. p. 233-241.
- SILVA, D.M.W. **Phylogenetic relationships of the Phyllachorales and related fungi**. Estados Unidos, 1996. 124 f. Dissertação (Ph.D). The University of Georgia.
- SILVA-HANLIN, D.M.W.; MENEZES, M.; HANLIN, R.T.; RAMALHO-NETO, C.E. Ribosomal DNA sequencing data reveals low genetic variability among *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p.534-539, 1999.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. W.H. freeman & Co: San Francisco. 1973.
- SWENSEN, S.M. **Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD): Methods and analysis**. Workshop booklet. San Diego, CA. 33p. 1995.
- SNYDER, W.C.; HANSEN, H.N. The species concept in *Fusarium*. **American Journal of Botany**, v. 27, p. 64-67. 1940.
- TAN M.K.; NIESSEN L.M. Analysis of rDNA ITS sequences to determine genetic relationships among, and provide a basis for simplified diagnosis of *Fusarium* species causing crown rot and head blight of cereals. **Mycol. Res.**, v. 107, p. 811-821. 2003.
- TAUTZ, D., TRICK, M., and DOVER, G. A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. **Nature**, v. 322, p. 652-656. 1986.
- TAUTZ, D.; TAUTZ, C.; WEBB, D.; DOVER, G. A. Evolutionary divergence of promoters and spacers in the rDNA family of four *Drosophila* species. **J. Mol. Biol.**, v.195, p.525-542. 1987.
- TEHLER, A. Cladistic analysis in ascomycetes syatematics: theory and practice. In: D.L. Hawksworth (ed.). **Ascomycetes Systematics:Problems and Perspectives in the Nineties**. Academic Press, New York. 1994.
- THOMAS, V.; RUTHERFORD, M.A.; BRIDGE, P.D. Molecular differentiation of two races of *Fusarium oxysporum* special form *cubense*. **Letters in Applied Microbiology**, v.18, p.193-196. 1994.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882. 1997.

TORRES, R.A.; GANAL, M.; HEMLEBEN, V. GC balance in the internal transcribed spacers ITS1 and ITS2 of nuclear ribosomal RNA genes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 30, p. 170-181. 1990.

VAKALOUNAKIS, D.L.; FRAGKIADAKIS, G.A. Genetic differentiation of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by pathogeny, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. **Phytopathology**, v. 89, p. 161-168. 1999.

VILARINHOS, A.D.; PAULA J.R., T.J.; BARROS, E.G.; MOUREIRA, M.A. Characterization of races of *Colletotrichum lindemuthianum* by the random amplified polymorphic DNA technique. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.194-198. 1995.

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **J. Bacteriol.**, v. 172, p.4238-4246. 1990.

WALLWIJK, C.; BAAYEN, R.P.; DE KONING, J.R.A.; GAMS, S.W. Ribosomal DNA analyses challenge the status of *Fusarium* sections *Liseola* and *Elegans*. **Sydowia**, v. 48, p. 90-104. 1996.

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

WHITE, T.J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H.A. The polymerase chain reaction. **Trends Genet.**, v. 5, p. 185-188. 1989.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (Ed.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, New York, 1990. p. 315-322.

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

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.**, v. 51, p. 221-271. 1987.

WOLLENWEBER, H.W.; REINKING, O.A. **Die Fusarien – Ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung**. Paul Parey, Berlin. 1935.

WOO, S.L.; ZOINE, A; DEL SORBO, G.; LORITO, M.; NANNI, B., SCALA, F.; NOVIELLO, C. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races and RAPD. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, p. 966-973. 1996.

WOUTD, L. P.; NEUVEL, A; SIKKEMA, A; VAN GRINSEN, M. Q.J.M.; MILLIANO, W. A. J.; CAMPBELL, C.L.; LESLIE, J. F. Genetic variation in *Fusarium oxysporum* from cyclamen. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, p.1348-1355. 1995.

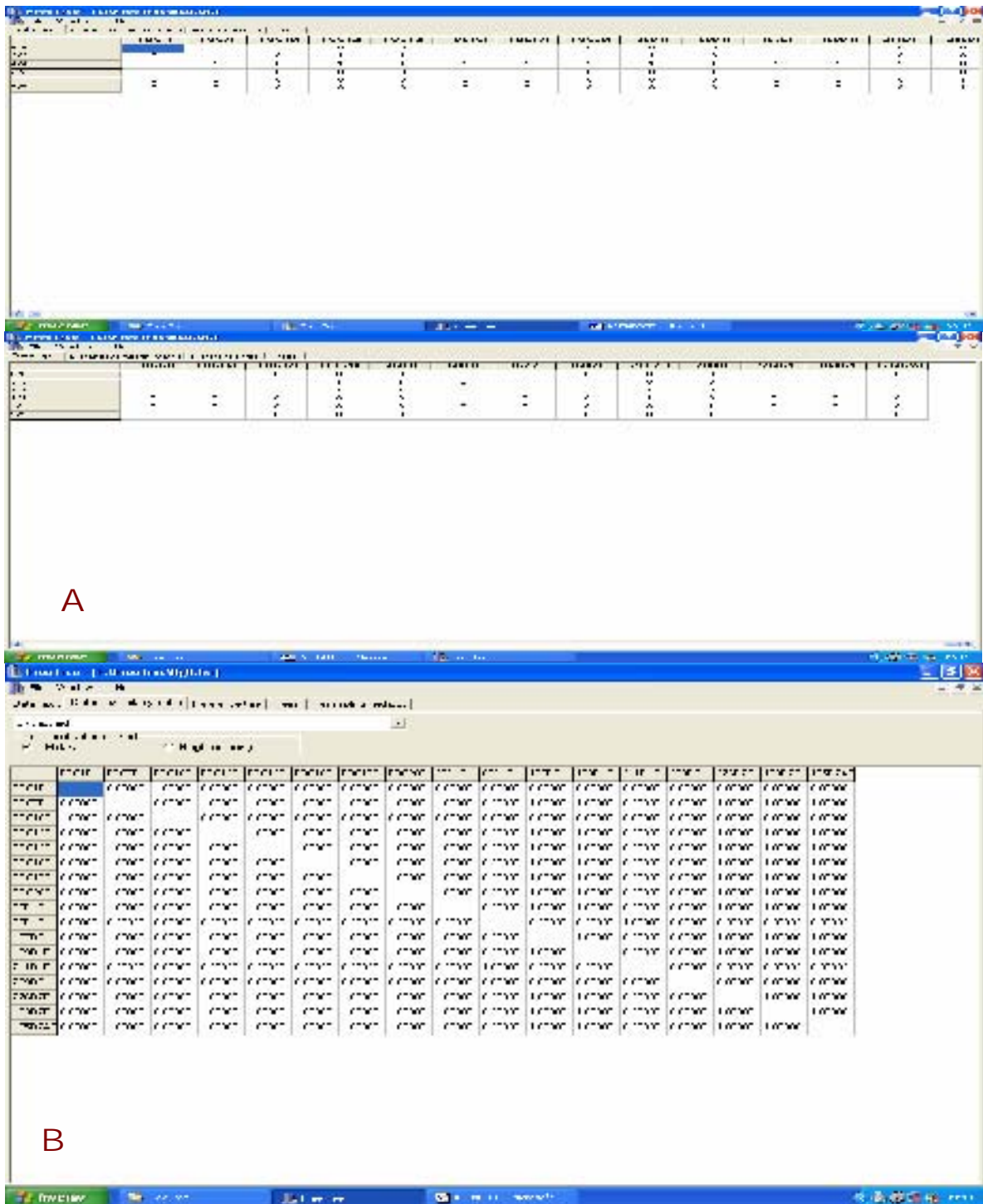
WRIGHT, G.F.K.; GUEST, D.I.; WIMALAJEEWA, D.L.S.; VAN HEESWIJCK, R. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation in Australia based on pathogenicity, vegetative compatibility and random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. **European Journal Plant Pathology**, v.102, p.451-457. 1996.

ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, M.P. et al. **Biologia Molecular Básica**. ed. 3. Porto Alegre: Mercado Aberto. 2003.

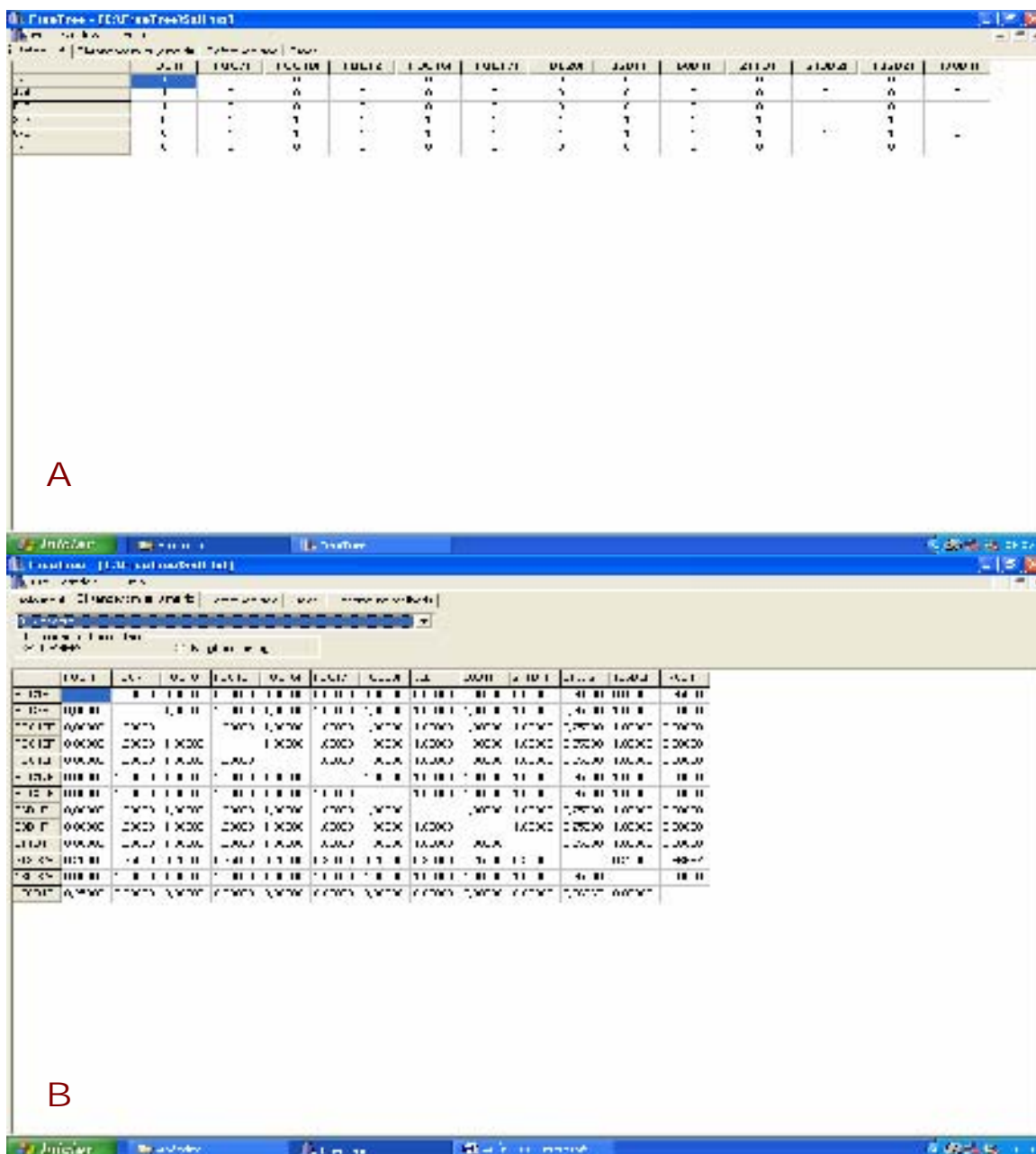
ZHANG, H.; LI, J. Toxicological mechanism of moniliformin. **Weishengwu Xuebo**, v. 29, p. 93. 1989.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. A. Matriz binária dos RFLPs da região IGS de *Fusarium oxysporum* produzidos pela enzima *Bgl*II e B. Matriz de similaridade genética entre os isolados gerada pelo coeficiente de Jaccard utilizando algoritmo UPGMA através do programa FreeTree.



APÊNDICE 2. A. Matriz binária dos RFLPs da região IGS de *Fusarium oxysporum* produzidos pela enzima *SalI* e B. Matriz de similaridade genética entre os isolados gerada pelo coeficiente de Jaccard utilizando algoritmo UPGMA através do programa FreeTree.



APÊNDICE 3. A. Matriz binária dos RFLPs da região IGS de *Fusarium oxysporum* produzidos pela enzima *Sma*I e B. Matriz de similaridade genética entre os isolados gerada pelo coeficiente de Jaccard utilizando algoritmo UPGMA através do programa FreeTree.

A

	F001	F002	F003	F004	F005	F006	F007	F008	F009	F010
00	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
01	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
02	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
03	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
04	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
05	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
06	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
07	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
08	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
09	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

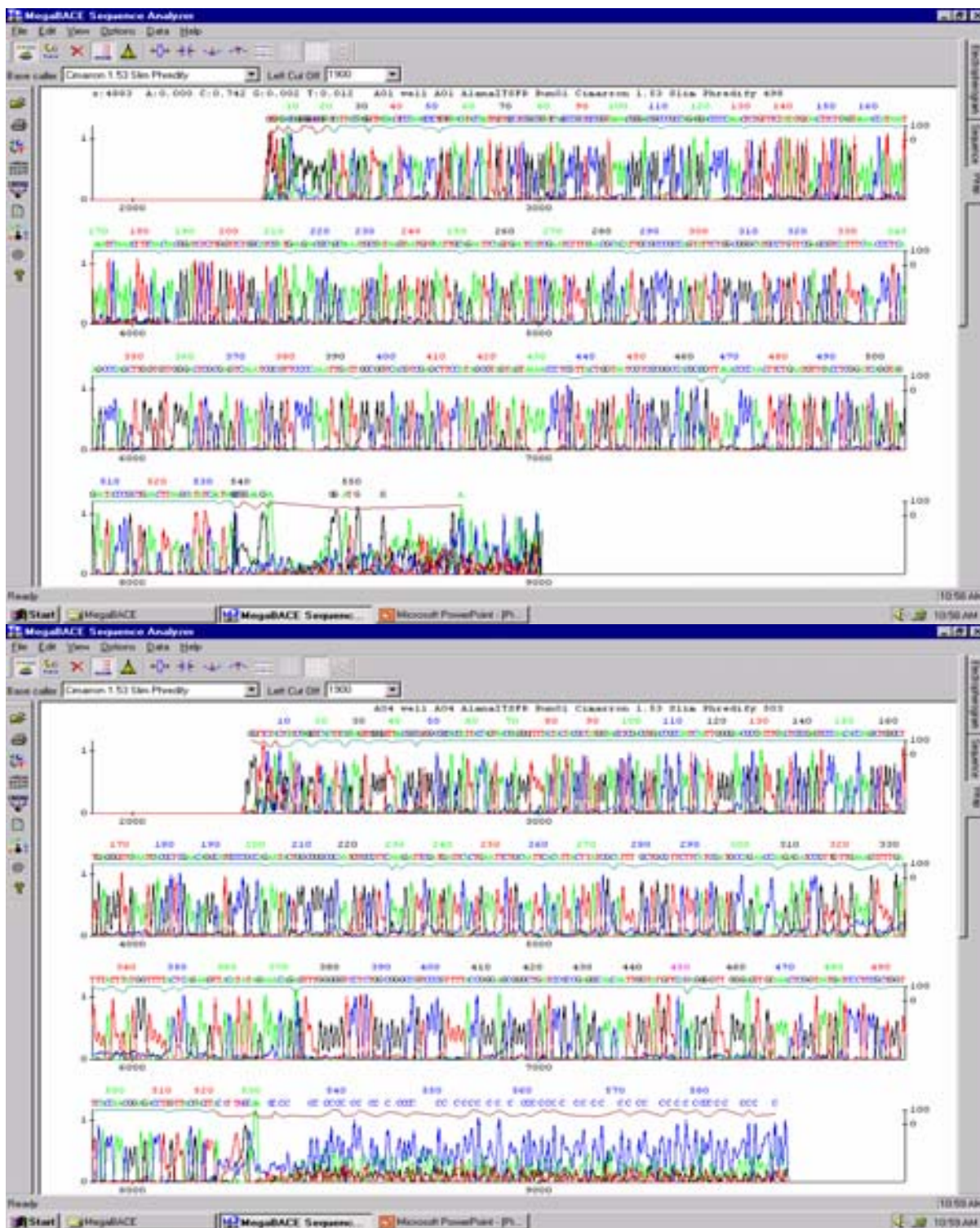
B

	00	01	02	03	04	05	06	07	08	09
00	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
01	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
02	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
03	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
04	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
05	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
06	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000
07	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000
08	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
09	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000

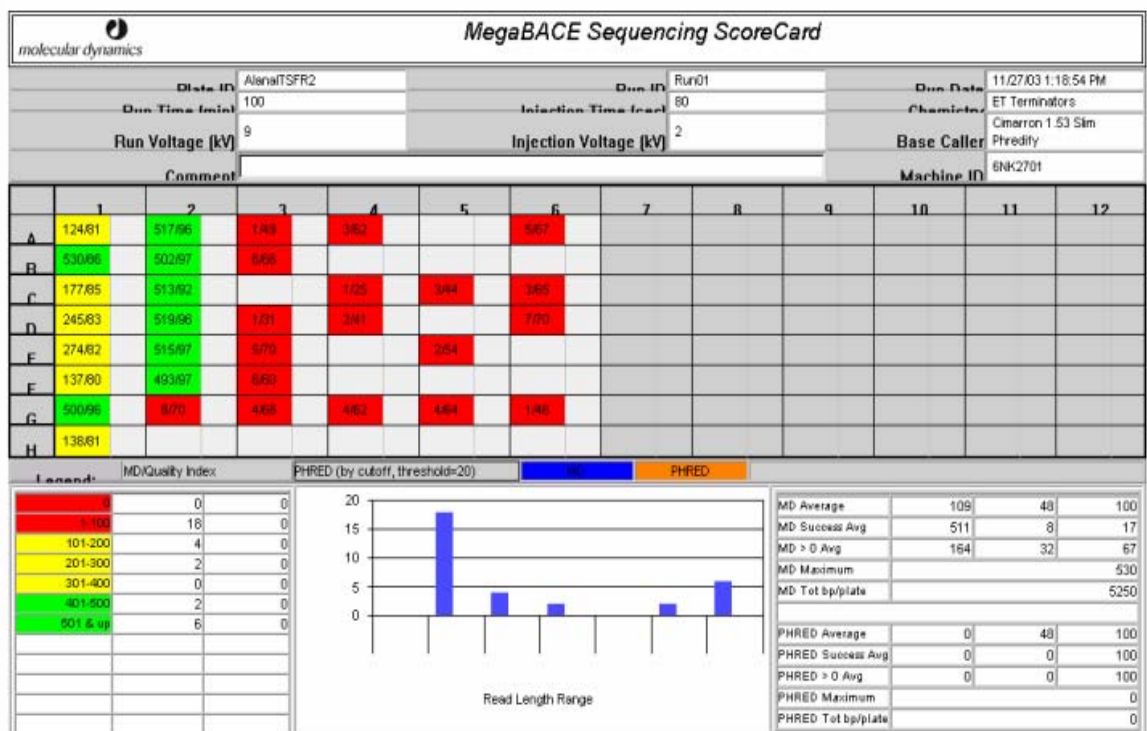
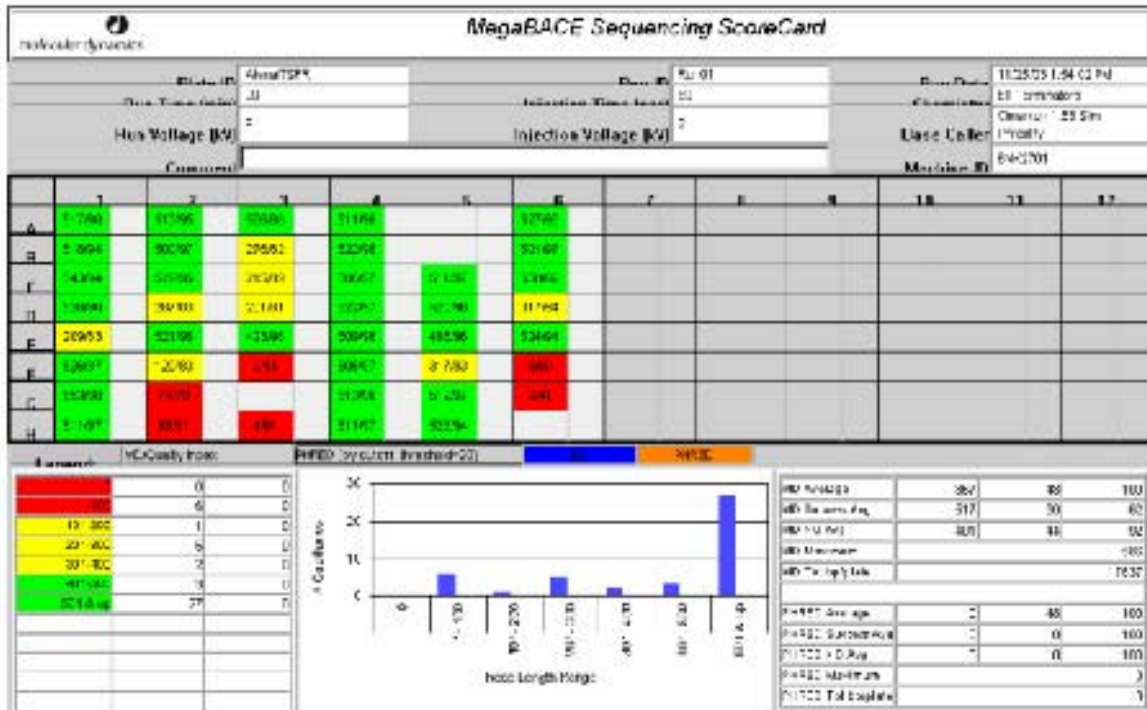
APÊNDICE 4. Matriz de similaridade genética estimada pelo coeficiente de Jaccard e algoritmo UPGMA para os 18 isolados analisados, gerada pelo programa FreeTree.

	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118
101	1.0000																	
102	0.1111	1.0000																
103	0.0000	0.0000	1.0000															
104	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000														
105	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000													
106	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000												
107	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000											
108	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000										
109	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000									
110	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000								
111	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000							
112	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000						
113	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000					
114	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000				
115	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000			
116	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000		
117	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	
118	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000

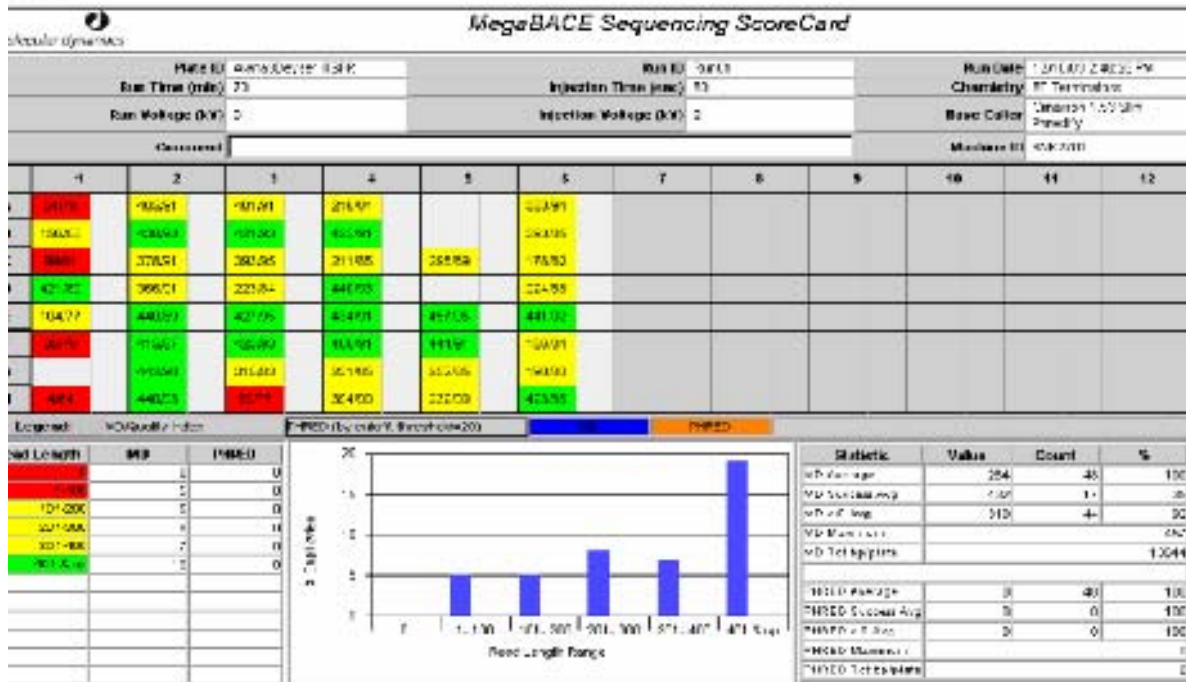
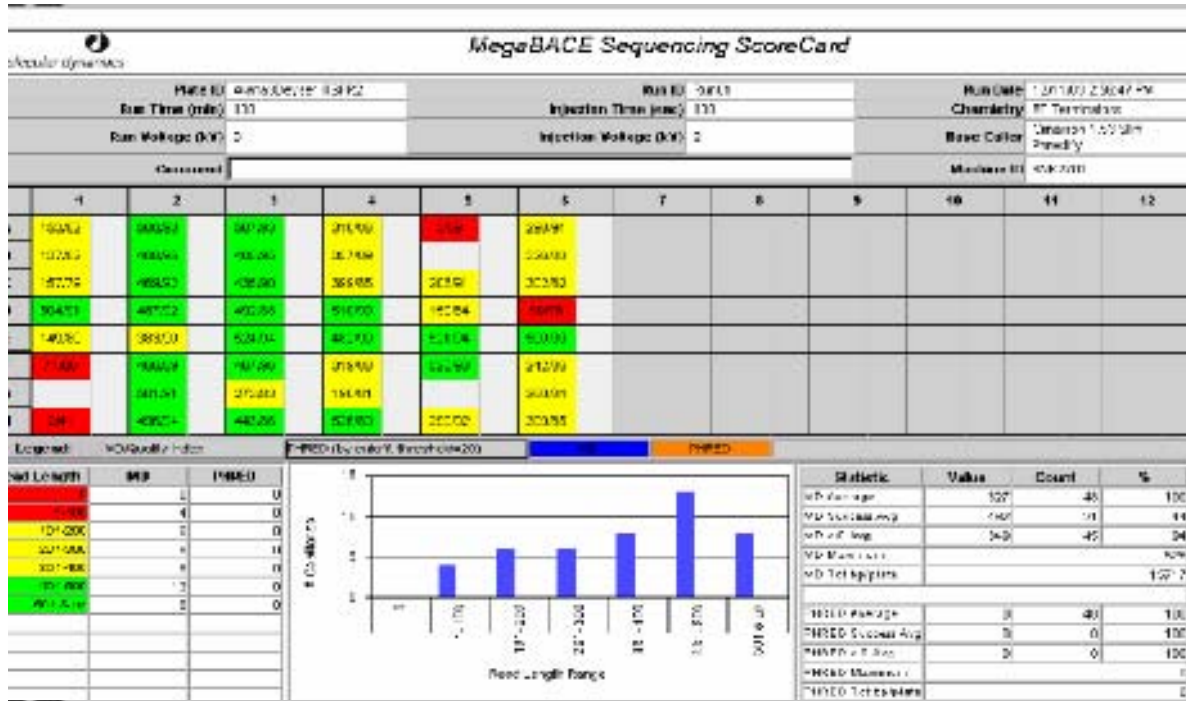
APÊNDICE 5. Eletroferogramas selecionados dentre os 41 obtidos do alinhamento das seqüências das regiões ITS1, gene 5,8S rRNA, ITS2 completas e porção do gene 28S rRNA dos isolados de *Fusarium oxysporum*, destacando, em diferentes cores, picos correspondentes a cada nucleotídeo, obtidos pelo programa MegaBACE Sequence Analyser.



APÊNDICE 6. *Outputs* mostrando a eficiência do sequenciamento das regiões ITS1, gene 5,8S rRNA, ITS2 completas dos isolados de *Fusarium oxysporum*, destacando, em verde, seqüências acima de 400 nt, obtidos pelo programa MegaBACE Sequencing ScoreCard.



APÊNDICE 6 – Continua...



APÊNDICE 7. Alinhamento múltiplo das sequências de *Fusarium oxysporum*, obtidas nesta pesquisa, através do programa CLUSTAL X (1.81). Estão representadas as regiões ITS1, gene 5,8S rRNA, ITS2 completas e porção do gene 28S rRNA. Sítios idênticos estão representados por (*) e parsimonicamente informativos por (♦).

ITS1→

```

FOC12F      -----AACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
211D1F      -----GTTGTTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
68D1F      -----AGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
FOC13F      -----GGAGACAGGGGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
193D2F      -----AGGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
FOC17F      -----GGGGGACAGGGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
36D1F      -----GGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
170D1F      -----GGTGA--CAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCC--TGTG
FOC4F      ----NGATNTATGACGGGGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
FOC7F      ---NNGATTTATAC--AGGGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
FOC10F      ----CGGTGGTGA-CAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
209DF      -TCTCCGTTGGTGAACAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
FOC16F      -----TGAGACGGGGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
159DF      -----CAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
FOC20F      -----GGACAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
213D2F      -----TGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
276D2F      -TCTCCGTTGTGAACCA-CGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
167DF      -----GGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
135D2AF     TCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
FOC1F      ----GTGTAGACGAGGGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
169D1F      -----TTGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCCCTGTG
                *****

```

```

FOC12F      ♦♦♦♦♦
211D1F      ♦♦♦♦♦
68D1F      ♦♦♦♦♦
FOC13F      ♦♦♦♦♦
193D2F      ♦♦♦♦♦
FOC17F      ♦♦♦♦♦
36D1F      ♦♦♦♦♦
170D1F      ♦♦♦♦♦
FOC4F      ♦♦♦♦♦
FOC7F      ♦♦♦♦♦
FOC10F      ♦♦♦♦♦
209DF      ♦♦♦♦♦
FOC16F      ♦♦♦♦♦
159DF      ♦♦♦♦♦
FOC20F      ♦♦♦♦♦
213D2F      ♦♦♦♦♦
276D2F      ♦♦♦♦♦
167DF      ♦♦♦♦♦
135D2AF     ♦♦♦♦♦
FOC1F      ♦♦♦♦♦
169D1F      ♦♦♦♦♦
                *****

```

```

FOC12F      ♦ CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
211D1F      CCGAGGACCC-TAAACTCTGTTTTTA-GTGGAACTTCTGAGTAAAACAA-CAA-TAAATC
68D1F      CCGAGGACCCTAAACTCTGTTTTTA-GTGGAACTTCTGAGTAAAACAA-CAA-TAAATC
FOC13F      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
193D2F      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
FOC17F      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
36D1F      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
170D1F      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
FOC4F      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
FOC7F      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
FOC10F      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
209DF      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
FOC16F      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
159DF      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
FOC20F      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
213D2F      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
276D2F      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
167DF      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
135D2AF     CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
FOC1F      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC
169D1F      CAGAGGACCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC TCTGAGTAAAACCA-TAAATAAATC

```



```

167DF          CGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCAC---AGC
135D2AF       CGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCAC---AGC
FOC1F         CGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCC---AGC
169D1F       CGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCTCGGGT
*****
FOC12F        TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTT-----CGCGTT-----CCCCAAATGATT
211D1F        TTGGTGTTGGGACTCG-----CGGT--AACCCGCGTT-----CCCCAAATCGATT
68D1F         TTGGTGTTGGGACTCG-----CGGT--AACCCGCGTT-----CCCCAAATCGATT
FOC13F        TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTT--AATTCGCGTT-----CCCCAAATGATT
193D2F        TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTT--AATTCGCGTT-----CCTCAAATGATT
FOC17F        TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTT--AATTCGCGTT-----CCCCAAATGATT
36D1F         TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTT--AATTCGCGTT-----CCTCAAATGATT
170D1F        TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTT--AATTCGCGTT-----CCCCAAATGATT
FOC4F         TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTT--AATTCGCGTT-----CCTCAAATGATT
FOC7F         TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTT--AATTCGCGTT-----CCTCAAATGATT
FOC10F        TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTT--AATTCGCGTT-----CCCCAAATGATT
209DF        TTGGTGTTGGGACTCG-----CAGTCCAAATCGCGTT-----CCCCAA--TTGATT
FOC16F        TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTT--AATTCGCGTT-----CCCCAAATGATT
159DF        TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTT--AATTCGCGTT-----CCTCAAATGATT
FOC20F        TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTT--AATTCGCGTT-----CCCCAAATGATT
213D2F        TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTT--AATTCGCGTT-----CCTCAAATGATT
276D2F        TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTT--AATTCGCGTTA---CCTCAAATGATT
167DF        TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTT--AATTCGCGTT-----CCTCAAATGATT
135D2AF      TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTT--AATTCGCGTT-----CCTCAAATGATT
FOC1F        TTGGTGTTGGGACTCG-----CGTC--AAATCGCGTT-----CCCCAAATGATT
169D1F      TTGGTGTTGGGACTCGCGCGAGCCCTTTCCTGGNNTAATGCTCTGGCCCGCAATCTAGT
*****
FOC12F        --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
211D1F        --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAATCAT-----ACACCT
68D1F         --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAATCAT-----ACACCT
FOC13F        --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
193D2F        --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
FOC17F        --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
36D1F         --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
170D1F        --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
FOC4F         --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
FOC7F         --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
FOC10F        --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
209DF        --GGCGG---TCACC--ATCGAGCT--NCCATAGCGTAGTAGTAAA-----C-CCT
FOC16F        --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
159DF        --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
FOC20F        --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
213D2F        --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
276D2F        --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
167DF        --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
135D2AF      --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
FOC1F        --GGCGG---TCAC---GTCGAGCT--TCCATAGCGTAGTAGTAAA-----AC-CCT
169D1F      TGGGCAGGTCTTCGCTGGCCAAGCTATACCAATANAGCTGTAGTNAATAAAAAATCCCC
*** *   ** *   * ** *   * ** *   * ** *   *
FOC12F        CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
211D1F        CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
68D1F         CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
FOC13F        CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
193D2F        CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
FOC17F        CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
36D1F         CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
170D1F        CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
FOC4F         CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
FOC7F         CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
FOC10F        CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
209DF        CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAA--CCCCAACTTC--GA-----TG
FOC16F        CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
159DF        CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
FOC20F        CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
213D2F        CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
276D2F        CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCACTTCTGCAA-----TG
167DF        CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
135D2AF      CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
FOC1F        CGTTACTGG-TAATCGT--CGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA-----TG
169D1F      TACGGCGAACTAAGTGTAAACGCGGGC-CGCGCCCAATGCCAGTCTCAGAAAACCCCCG
*   *** ** ***** * ** *   * ** *   *

```

28S→

FOC12F T---ACCTCGATCGTGATCATGAGTTTGTGCAATTACCCCGTCTTNGAACATTTAAGGCA
 211D1F TTG-ACCTCG-----GATCAGTAGTTGTGAA--TACCC--GCTTGNAACTATTAGGCAT
 68D1F TTG-ACCTCG-----GATCAGG---TAGGAA--TACCC---GCTGAAC--TTAAGCAT
 FOC13F TTG-ACCTCG-----GATC---AGGTAGGAA---TACCCGCTGAAC-TTAAGC-ATATCA
 193D2F TTG-ACCTCG-----GATC---AGGTAGGAA---TACCCGCTGAACATTAAGC-ATATCA
 FOC17F TTG-ACCTCG-----GATC---AGGTAGGAA---TACCCGCTGAAC-TTAAGC-ATATCA
 36D1F TTG-ACCTCG-----GATC---AGGTNGAAA-----CCC CGGGAAC-TTGA-C-ATATCA
 170D1F TTG-ACCTCG-----GATC---AGGTAGGAA---TACCCGCTGAAC-TTAAGC-ATATCA
 FOC4F TTG-ACCTCG-----GATC---AGGTAGGAA---TACCCGCTGAAC-TTAAGC-ATATCA
 FOC7F TTG-ACCTCG-----GATC---CAGGTAAGGAAT-TACCCGTGGAAC-TTAAGCCATTTC
 FOC10F T-T-GACCTC-----GGAT--CAGGTAGGAA---TACCCGCT-GA-ACTTAAGCATATCA
 209DF T-G-ACCTC-----NGTC--CGGTTATAC---CANATGNT-AATATTCCACAATGTAA
 FOC16F TTG-ACCTCG-----GAT---CAGGTTGGA-TA---CCCGTCTGGAA----CTTAAGCA-
 159DF TTG-ACCTCG-----GAT---CAGGTTGGAATA---CCCGTCTGAGAG--CCTTNAGCAA
 FOC20F TTG-ACCTCG-----GAT---CAGGTAGGAATA---CCCG-CTGAA-----CTTAAGCA-
 213D2F TTG-ACCTCG-----GAT---CAGGTTGGAATA---CCCGTCTGA-----ACTTAAGCA-
 276D2F TTGGACCTCG-----GATT--CAGGTGGAATA-ANCCCGTCTTGGAAACATTTAGGCA-
 167DF TTG-ACCTCG-----GAT---CAGGTAGGAATA---CCCG--CTGAA-----CTTAAGGCA-
 135D2AF TTG-ACCTCG-----GAT---CAGGTAGGAATA---CCCGTCTGGAAA-CTTTAAGGCAA
 FOC1F TTG-ACCTCG-----GAT---CAGGTAGGAA---TACCCGCTGAAC--TTAAGCATATCA
 169D1F CGAAATTTTCTTGGAAACATTGTATGGAACAC---CCCTTCGGGAATTCACGTTGGCTT

FOC12F ATACTCAAGTAAGTCGGGGACGCGGNAA-----CCGGGAAAAGGTTACACCGGGANTT
 211D1F ATCCGGTTAAAAGNCCGGGAAGGGNGGAAAAANANGGAAAAANAGGCTAAACAAAGCGGG
 68D1F AT-CAATAGGGGGGGGGAA-----
 FOC13F AT-AGGGGGGGGGAA---CCCCCCCCACCCACAC-CCCC-CCCCACCACACCCCCCCCCC
 193D2F AT-ACGGGGCGGAAANCCCTCCACTCCTCC-NCTC-CNTCCCCCTTCCCCCTCCNC
 FOC17F AT-A-GCGGGGAAAGCCGNATGCCGCACACAC-ACCC-CACCC-----
 36D1F ATGAGNCGGGCGGAAACCCACACACACACAA-ACACACAAANAACCANNACACCCAC
 170D1F ATAGGGGGGGGGNA-----
 FOC4F ATAAGCGGAGGAAAAACACACCAAAACAAAA-CAAAAA-----
 FOC7F ATAGCGGGGAGAA-----
 FOC10F ATAGGGGGGGAA-----
 209DF ATGCACANCCNCCTTTTTGCGCGCGACGTNAG-TTGTAGTCCGCCGTACCTTTAGGGC
 FOC16F -TATCA--TAAGCG--GGAGGAAANGA--AAG-TACCA--GGGATTGCCCTT--GTTAC
 159DF -TATCAAGTTAAGCGCAGGACANNAGGATCAGC-TAACACGGGAGTTGCCCTTGNNTAC
 FOC20F -TATCAA--TAACGG--GAGGAAANGA-----AACACAGGGATTGCCCTT--GTTAC
 213D2F -TATC--AATAGCGGAGGAAAGAAAG-----TAACAGGGA--TTGCCCTTNT-ACGAT
 276D2F -TATCAAGTAGCGGGNAGGGACAAGAAG-AGC-TAACAGGGAATTCGCCCTTT--GTTAC
 167DF -TATCAATG-----GGGGGGGGAA-----
 135D2AF TTATCAAAGTACACGCGGGANGGAAAAGGGAT-AGNNGCCACACCACGCGGCCATTAT
 FOC1F ATAAGCGGGAAGAAGGATGGA-----
 169D1F ATGCGGAATATTAGCCCCGTGTCTGTTGACACCTTTTANGGGACCAATTACTTCCNNGT
 *

FOC12F GGACNTNGTTACCGAACTTATCTTTGCNACAAA-----
 211D1F GAATTTTTGGCCCCCTTCTGTCTTTACGACTTTACTNTTTTTTNGTNCACAAACAAAT
 68D1F -----
 FOC13F C-----
 193D2F CCTCCTCTCTCACCNCCCCCTCCTCCCCCNCCGCACCCCTNCCCACCCCCCTCCCC
 FOC17F -----
 36D1F ACCACCCACACCCNCACCCACCCCCCCCCACCCACCCACCAACACCC-----
 170D1F -----
 FOC4F -----
 FOC7F -----
 FOC10F -----
 209DF GAACNTCTTGACTGGAAGNACATCATTAGTGTACTTACTCGGAGGGCAGGACACAAACC
 FOC16F GACTTTT--TTGCAA-----
 159DF GACTTTNATTTGCANAATCACGNCGGACGGCCGAAACGTATGCCACGACTCCTTCGACG
 FOC20F CGANTTAACTTGCAACCCCCCCCCC-----
 213D2F A-----
 276D2F GACTTAATTTTAACAACA-----
 167DF -----
 135D2AF GACCAATGGAACCGGAATTTCCACNGCGC-----
 FOC1F -----
 169D1F TCAAACCGGAGGACGGGACCACATGGAATGACCTAAAACAAGGGGAAGTTTGGCACCC

FOC12F -----
 211D1F GGTTAACAGAGACACNGTGGNCCACGACACATGATNAGAAACGAACGTAACCCGCCACAT
 68D1F -----
 FOC13F -----
 193D2F ACCCCCTCANCCGNCNCCCCATCCCCCACCCCCCCCCCCCTCCCCCCCCCCCCC
 FOC17F -----

36D1F -----
 170D1F -----
 FOC4F -----
 FOC7F -----
 FOC10F -----
 209DF TTTACCCCGGCAAGACCCTGGAAGCGAAACAGAAATTTTCCAGCCGACAAGGAAGATATTA
 FOC16F -----
 159DF NGCATTTCATTGAAC-----
 FOC20F -----
 213D2F -----
 276D2F -----
 167DF -----
 135D2AF -----
 FOC1F -----
 169D1F CTATTATTACCGGACCCTTTTAAGTTTGCNACCAACACNGCTGANATCTCANCAACACAT

FOC12F -----
 211D1F TAGAGAC-----
 68D1F -----
 FOC13F -----
 193D2F CCCCCC-----
 FOC17F -----
 36D1F -----
 170D1F -----
 FOC4F -----
 FOC7F -----
 FOC10F -----
 209DF ANATTGTTCCCGTGTGTTCCGGGAATTTTCATTAAACGGCCCATCCACTCCCTTAGATACA
 FOC16F -----
 159DF -----
 FOC20F -----
 213D2F -----
 276D2F -----
 167DF -----
 135D2AF -----
 FOC1F -----
 169D1F CATCTGAGATCATCACAGCGTGGGCAGCCACTCGGGAGNCGGACGATGTGTCACACTTTT

FOC12F -----
 211D1F -----
 68D1F -----
 FOC13F -----
 193D2F -----
 FOC17F -----
 36D1F -----
 170D1F -----
 FOC4F -----
 FOC7F -----
 FOC10F -----
 209DF GGACAAACACTCTCTTNGCACCAACACTTTTCTACGGGGGACAAACACCTGGAGGCG
 FOC16F -----
 159DF -----
 FOC20F -----
 213D2F -----
 276D2F -----
 167DF -----
 135D2AF -----
 FOC1F -----
 169D1F GAG-----

APÊNDICE 8. Matriz de distância genética das regiões ITS1, gene 5,8S rRNA, ITS2 completas e região 28S rDNA parcial dos isolados de *Fusarium oxysporum*, obtida pelo programa MEGA2.

Title : Sequencias - Alana2.aln
 No. of Taxa : 21
 Gaps/Missing data : Complete Deletion
 Codon Positions : Noncoding
 Distance method : Nucleotide: Kimura 2-parameter (Gamma) [Pairwise distances]
 No. of Sites : 470
 d : Estimate

- [1] #FOC12F
- [2] #211D1F
- [3] #68D1F
- [4] #FOC13F
- [5] #193D2F
- [6] #FOC17F
- [7] #36D1F
- [8] #170D1F
- [9] #FOC4F
- [10] #FOC7F
- [11] #FOC10F
- [12] #209DF
- [13] #FOC16F
- [14] #159DF
- [15] #FOC20F
- [16] #213D2F
- [17] #276D2F
- [18] #167DF
- [19] #135D2AF
- [20] #FOC1F
- [21] #169D1F

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21]	
[1]																						
[2]	0.04																					
[3]	0.05	0.02																				
[4]	0.02	0.06	0.06																			
[5]	0.02	0.06	0.06	0.00																		
[6]	0.02	0.06	0.06	0.00	0.00																	
[7]	0.02	0.06	0.06	0.01	0.00	0.01																
[8]	0.02	0.06	0.06	0.00	0.01	0.00	0.01															
[9]	0.02	0.06	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01														
[10]	0.03	0.06	0.06	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01													
[11]	0.04	0.08	0.07	0.02	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.02												
[12]	0.05	0.08	0.07	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05											
[13]	0.02	0.05	0.05	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.05									
[14]	0.02	0.05	0.05	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.05	0.01							
[15]	0.02	0.05	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.04	0.00	0.00						
[16]	0.02	0.05	0.05	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.05	0.01	0.00	0.00					
[17]	0.03	0.06	0.06	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.05	0.06	0.02	0.02	0.02	0.02					
[18]	0.02	0.05	0.05	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.05	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02			
[19]	0.02	0.05	0.05	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.05	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00		
[20]	0.03	0.07	0.06	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.03	0.05	0.02	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03	
[21]	0.15	0.19	0.19	0.16	0.16	0.16	0.15	0.15	0.16	0.16	0.15	0.18	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15

APÊNDICE 9. Parte selecionada do alinhamento das seqüências das regiões ITS1, gene 5,8S rRNA, ITS2 completas e porção do gene 28S rRNA dos isolados de *Fusarium oxysporum*, destacando, em amarelo, os sítios parsimonicamente informativos obtidos pelo programa MEGA2.

The screenshot displays the MEGA2 Sequence Data Explorer interface. The main window shows a multiple sequence alignment of DNA sequences. The sequences are listed on the left, including identifiers like M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16, M17, M18, M19, M20, M21, M22, M23, M24, M25, M26, M27, M28, M29, M30, M31, M32, M33, M34, M35, M36, M37, M38, M39, M40, M41, M42, M43, M44, M45, M46, M47, M48, M49, M50, M51, M52, M53, M54, M55, M56, M57, M58, M59, M60, M61, M62, M63, M64, M65, M66, M67, M68, M69, M70, M71, M72, M73, M74, M75, M76, M77, M78, M79, M80, M81, M82, M83, M84, M85, M86, M87, M88, M89, M90, M91, M92, M93, M94, M95, M96, M97, M98, M99, M100. The alignment is shown in a grid format with columns representing positions and rows representing different sequences. Several columns are highlighted in yellow, indicating parsimonically informative sites. The window title is 'Sequence Data Explorer' and it shows standard Windows interface elements like taskbar and window controls.

APÊNDICE 10. Alinhamento múltiplo das sequências de *Fusarium oxysporum*, obtidas neste trabalho e selecionadas do GenBank (NCBI), através do programa CLUSTAL X (1.81). Estão representadas as regiões ITS1, gene 5,8S rRNA, ITS2 completas e porção do gene 28S rRNA. Sítios idênticos estão representados por (*).

```

68D1F -----AGCGGAGGGAT
211D1F -----GTTGTTGAACCAGCGGAGGGAT
FOC12F -----AACCAGCGGAGGGAT
gi | 18034433 | gb | AF440565.1 | -----
gi | 18034434 | gb | AF440566.1 | -----
276D2F -----TCTCCGTTG-TGAACCA-CGGAGGGAT
gi | 34559398 | gb | AY354393.1 | -----CGTTGGTGAACCAGCGGAGGGAT
209DF -----TCTCCGTTGGTGAAC-AGCGGAGGGAT
gi | 34559397 | gb | AY354392.1 | -----CGTTGGTGAACCAGCGGAGGGAT
gi | 34559403 | gb | AY354398.1 | -----CGTTGGTGAACCAGCGGAGGGAT
gi | 38569372 | gb | AY462580.1 | AGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGAT
gi | 1808933 | gb | U34571.1 | FOU3457 -----TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGAT
135D2AF -----TCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGAT
gi | 34559401 | gb | AY354396.1 | -----CGTTGGTGAACCAGCGGAGGGAT
gi | 34559406 | gb | AY354401.1 | -----CGTTGGTGAACCAGCGGAGGGAT
gi | 1122871 | emb | X94173.1 | FOXYRR -----TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGAT
159DF -----CAGCGGAGGGAT
gi | 37362910 | gb | AY387705.1 | -----
FOC16F -----TGAGACGGGGGAGGGAT
167DF -----GGAACCAGCGGAGGGAT
213D2F -----TGAACCAGCGGAGGGAT
FOC4F -----NGATNTATGACGGGGGAGGGAT
FOC7F -----NNGATTTATAC--AGGGGAGGGAT
gi | 852527 | gb | U28159.1 | FOU28159 -----
193D2F -----AGGGGAGGGAT
gi | 5006327 | gb | AF069310.1 | AF069 -----
FOC13F -----GGAGACAGGGGGAGGGAT
FOC17F -----GGGGACAGGGGAGGGAT
170D1F -----GGTGACAGCGGAGGGAT
36D1F -----GGTGAACCAGCGGAGGGAT
gi | 29027604 | gb | AY210330.1 | -----
FOC10F -----CGGTGGTGACAGCGGAGGGAT
FOC20F -----GGACAGCGGAGGGAT
gi | 5524732 | gb | AF165875.1 | AF165 -----
FOC1F -----GTGTAGACGAGGGGGAGGGAT
gi | 10180259 | gb | AF178418.1 | AF17 -----TCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGAT
gi | 10180248 | gb | AF178407.1 | AF17 -----TCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGAT
gi | 21666892 | gb | AF455460.1 | -----AAAAGTCGTAACAAGGTCCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGAT
169D1F -----TTGTGAACCAGCGGAGGGAT
gi | 24637154 | gb | AF430129.1 | -----CGCGGAGGGAT

```

ITS1→

```

68D1F CATTACCGAGTT-TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACCTA-TACGT
211D1F CATTACCGAGTT-TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACCTA-TACGT
FOC12F CATTACCGAGTT-TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACCTA-TACGT
gi | 18034433 | gb | AF440565.1 | -----CCGAGTT-TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
gi | 18034434 | gb | AF440566.1 | -----CCGAGTT-TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
276D2F CATTACCGAGTT-TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
gi | 34559398 | gb | AY354393.1 | -----TGCAACTCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
209DF CATTACCGAGTT-TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-ATTGT
gi | 34559397 | gb | AY354392.1 | -----TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
gi | 34559403 | gb | AY354398.1 | -----TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
gi | 38569372 | gb | AY462580.1 | -----TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
gi | 1808933 | gb | U34571.1 | FOU3457 -----TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
135D2AF CATTACCGAGTT-TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
gi | 34559401 | gb | AY354396.1 | -----TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
gi | 34559406 | gb | AY354401.1 | -----TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
gi | 1122871 | emb | X94173.1 | FOXYRR -----TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
159DF -----CTCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
gi | 37362910 | gb | AY387705.1 | -----TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
FOC16F CATTACCGAGTT-TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
167DF CATTACCGAGTT-TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
213D2F CATTACCGAGTT-TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
FOC4F CATTACCGAGTT-TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
FOC7F CATTACCGAGTT-TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
gi | 852527 | gb | U28159.1 | FOU28159 -----CCGAGTT-TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
193D2F CATTACCGAGTT-TACAAC TCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT
gi | 5006327 | gb | AF069310.1 | AF069 -----AATCCCAA ACCCTGTGAACATACC-A-CTTGT

```


gi | 1122871 | emb | X94173.1 | FOXYRR
159DF
gi | 37362910 | gb | AY387705.1 |
FOC16F
167DF
213D2F
FOC4F
FOC7F
gi | 852527 | gb | U28159.1 | FOU28159
193D2F
gi | 5006327 | gb | AF069310.1 | AF069
FOC13F
FOC17F
170D1F
36D1F
gi | 29027604 | gb | AY210330.1 |
FOC10F
FOC20F
gi | 5524732 | gb | AF165875.1 | AF165
FOC1F
gi | 10180259 | gb | AF178418.1 | AF17
gi | 10180248 | gb | AF178407.1 | AF17
gi | 21666892 | gb | AF455460.1 |
169D1F
gi | 24637154 | gb | AF430129.1 |

68D1F
211D1F
FOC12F
gi | 18034433 | gb | AF440565.1 |
gi | 18034434 | gb | AF440566.1 |
276D2F
gi | 34559398 | gb | AY354393.1 |
209DF
gi | 34559397 | gb | AY354392.1 |
gi | 34559403 | gb | AY354398.1 |
gi | 38569372 | gb | AY462580.1 |
gi | 1808933 | gb | U34571.1 | FOU3457
135D2AF
gi | 34559401 | gb | AY354396.1 |
gi | 34559406 | gb | AY354401.1 |
gi | 1122871 | emb | X94173.1 | FOXYRR
159DF
gi | 37362910 | gb | AY387705.1 |
FOC16F
167DF
213D2F
FOC4F
FOC7F
gi | 852527 | gb | U28159.1 | FOU28159
193D2F
gi | 5006327 | gb | AF069310.1 | AF069
FOC13F
FOC17F
170D1F
36D1F
gi | 29027604 | gb | AY210330.1 |
FOC10F
FOC20F
gi | 5524732 | gb | AF165875.1 | AF165
FOC1F
gi | 10180259 | gb | AF178418.1 | AF17
gi | 10180248 | gb | AF178407.1 | AF17
gi | 21666892 | gb | AF455460.1 |
169D1F
gi | 24637154 | gb | AF430129.1 |

68D1F
211D1F
FOC12F
gi | 18034433 | gb | AF440565.1 |
gi | 18034434 | gb | AF440566.1 |
276D2F

ATATCAATAAGCGGAGGA-----
AGCAATATCA--AGTTAAGCGACGGACANNAGGATCAGCTAACACGGGAG

AGCA-TATCA----TAAGCG--GGAGGAAANGA--AAGTACCA--GGGA
AGGCATATCA--A-TGGGGGGGGGAA-----
AG-CATATCA--A-TAGCGGGAGGAAAGAAAGTAAACAGGGATTGCCTTNT
ATATCAATAAGCGGAGGAAAAACACACCAAAAAACAAAAACAAAA-----
ATTTTCATAGCGGGAGGAA-----

ATATCAAT-ACGGGGGCGGAAANCCCCCTCCACTCCTCCNCTC-CNTCCC
ATATCAAT-AAGCGGAGGAA-----
ATATCAAT-AGGGGGGGGAAACCCCCCCCCACCCACACCCCCCCC-CCACCA
ATATCAAT-A-GCGGGGAAAGCCGNATGCCGCACACACACCC-CACCC-
ATATCAAT-AGGGGGGGGGNA-----
ATATCAATGAGNGGGCGGAAACCCACACACACACAAACACACAAANA

ATATCAAT--AGGGGGGGAA-----
ATATCAATAACGGGAGGAAANGAAACACAGGGATTGCCCNTGTTACCGA

ATATCAATAAGCGGGAAGAAGGATGGA-----

ATGGAACACCCCTTCGGGAATTCACGTGGCTTATGCGGAACTATTAGCC

GCTAAACAAAGCGGGGAATTTTGGCCCCCTTCTGTCTTTACGACTTTA
TTACACCGGGGANTTGGACNTNGTTACCGAACTTATCTTTGCNACAAA-

TAACA--GGGAATTCGCCCTTTGTGTAC-GACTTAATTTTAAACAACA---

CCGTACCTTTAGGGCGAACNTCTTGACTGGAAGNACATCATTAGTGTAC

ACCACGCGGCCATTATGACCAATGGAACCGGAATTTCCACNCGCGC----

TTGCCCTTGNTTACGACTTTNATTTGCANAAATCACGNCGGACGGCCGA

TTGCCCTT--GTTACGACTTTT--TTGCAAA-----

ACGATA-----

CCCTTCCCCCTCCNCCCTCCTCTCTCACNCCCCCTCCCTCCCCCNCC

CACCCCCCCCCC-----

ACCANNACACCCACACCACCCACACCCNACCCCAACCCCCCCCCACCCCA

NTTAACTTGCAACCCCCCCCCC-----

CCGTGTCTGTTGACACCTTTTANGGACCAATTACTTCNNGTTCAAACG

CTNTTTTTTGNGTNCACAAACAAATGGTTAACAGACACNGTGGNCCAC

gi 34559398 gb AY354393.1	-----
209DF	TTACTCGGAGGGCAGGACACAAACCTTTACCCCGGCAAGACCCTGGAAGC
gi 34559397 gb AY354392.1	-----
gi 34559403 gb AY354398.1	-----
gi 38569372 gb AY462580.1	-----
gi 1808933 gb U34571.1 FOU3457	-----
135D2AF	-----
gi 34559401 gb AY354396.1	-----
gi 34559406 gb AY354401.1	-----
gi 1122871 emb X94173.1 FOXYRR	-----
159DF	AACGTATGCCACGACTCCTTCGACGNGCATTTCATTGAAC-----
gi 37362910 gb AY387705.1	-----
FOC16F	-----
167DF	-----
213D2F	-----
FOC4F	-----
FOC7F	-----
gi 852527 gb U28159.1 FOU28159	-----
193D2F	CGCACCCCTNCCCACCCCTCCCCACCCCTCANCCCGNCNCCCCCATC
gi 5006327 gb AF069310.1 AF069	-----
FOC13F	-----
FOC17F	-----
170D1F	-----
36D1F	CCCACCAACACCC-----
gi 29027604 gb AY210330.1	-----
FOC10F	-----
FOC20F	-----
gi 5524732 gb AF165875.1 AF165	-----
FOC1F	-----
gi 10180259 gb AF178418.1 AF17	-----
gi 10180248 gb AF178407.1 AF17	-----
gi 21666892 gb AF455460.1	-----
169D1F	CGGAGGACGGGCACCACATGGAATGACCTAAACAAGGGGAAGTTTGGCA
gi 24637154 gb AF430129.1	-----
68D1F	-----
211D1F	GACACATGATNAGAAACGAACGTAACCCGCCACATTAGAGAC-----
FOC12F	-----
gi 18034433 gb AF440565.1	-----
gi 18034434 gb AF440566.1	-----
276D2F	-----
gi 34559398 gb AY354393.1	-----
209DF	GAAACAGAATTTTCCAGCCGACAAGGAAGATATTAANATTGTTCCCGTGT
gi 34559397 gb AY354392.1	-----
gi 34559403 gb AY354398.1	-----
gi 38569372 gb AY462580.1	-----
gi 1808933 gb U34571.1 FOU3457	-----
135D2AF	-----
gi 34559401 gb AY354396.1	-----
gi 34559406 gb AY354401.1	-----
gi 1122871 emb X94173.1 FOXYRR	-----
159DF	-----
gi 37362910 gb AY387705.1	-----
FOC16F	-----
167DF	-----
213D2F	-----
FOC4F	-----
FOC7F	-----
gi 852527 gb U28159.1 FOU28159	-----
193D2F	CCCCACCCCCCCCCCTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC-----
gi 5006327 gb AF069310.1 AF069	-----
FOC13F	-----
FOC17F	-----
170D1F	-----
36D1F	-----
gi 29027604 gb AY210330.1	-----
FOC10F	-----
FOC20F	-----
gi 5524732 gb AF165875.1 AF165	-----
FOC1F	-----
gi 10180259 gb AF178418.1 AF17	-----
gi 10180248 gb AF178407.1 AF17	-----
gi 21666892 gb AF455460.1	-----
169D1F	CCCCTATTATTACCGACCCTTTTAAGTTTGCNACCAACACNGCTGANAT

```

gi | 24637154 | gb | AF430129.1 | -----
68D1F -----
211D1F -----
FOC12F -----
gi | 18034433 | gb | AF440565.1 | -----
gi | 18034434 | gb | AF440566.1 | -----
276D2F -----
gi | 34559398 | gb | AY354393.1 | -----
209DF -----
gi | 34559397 | gb | AY354392.1 | -----
gi | 34559403 | gb | AY354398.1 | -----
gi | 38569372 | gb | AY462580.1 | -----
gi | 1808933 | gb | U34571.1 | FOU3457 -----
135D2AF -----
gi | 34559401 | gb | AY354396.1 | -----
gi | 34559406 | gb | AY354401.1 | -----
gi | 1122871 | emb | X94173.1 | FOXYRR -----
159DF -----
gi | 37362910 | gb | AY387705.1 | -----
FOC16F -----
167DF -----
213D2F -----
FOC4F -----
FOC7F -----
gi | 852527 | gb | U28159.1 | FOU28159 -----
193D2F -----
gi | 5006327 | gb | AF069310.1 | AF069 -----
FOC13F -----
FOC17F -----
170D1F -----
36D1F -----
gi | 29027604 | gb | AY210330.1 | -----
FOC10F -----
FOC20F -----
gi | 5524732 | gb | AF165875.1 | AF165 -----
FOC1F -----
gi | 10180259 | gb | AF178418.1 | AF17 -----
gi | 10180248 | gb | AF178407.1 | AF17 -----
gi | 21666892 | gb | AF455460.1 | -----
169D1F -----
gi | 24637154 | gb | AF430129.1 | -----
CTCANCAACACATCATCTGAGATCATCACAGCGTGGGCAGCCACTCGGGA

```

```

68D1F -----
211D1F -----
FOC12F -----
gi | 18034433 | gb | AF440565.1 | -----
gi | 18034434 | gb | AF440566.1 | -----
276D2F -----
gi | 34559398 | gb | AY354393.1 | -----
209DF -----
gi | 34559397 | gb | AY354392.1 | -----
gi | 34559403 | gb | AY354398.1 | -----
gi | 38569372 | gb | AY462580.1 | -----
gi | 1808933 | gb | U34571.1 | FOU3457 -----
135D2AF -----
gi | 34559401 | gb | AY354396.1 | -----
gi | 34559406 | gb | AY354401.1 | -----
gi | 1122871 | emb | X94173.1 | FOXYRR -----
159DF -----
gi | 37362910 | gb | AY387705.1 | -----
FOC16F -----
167DF -----
213D2F -----
FOC4F -----
FOC7F -----
gi | 852527 | gb | U28159.1 | FOU28159 -----
193D2F -----
gi | 5006327 | gb | AF069310.1 | AF069 -----
FOC13F -----
FOC17F -----
170D1F -----
36D1F -----
AACACTCTCTTNGCACCAACACTTTTCTACGGGGGACAAACACTGGAGG

```

```

gi | 29027604 | gb | AY210330.1 | -----
FOC10F -----
FOC20F -----
gi | 5524732 | gb | AF165875.1 | AF165 -----
FOC1F -----
gi | 10180259 | gb | AF178418.1 | AF17 -----
gi | 10180248 | gb | AF178407.1 | AF17 -----
gi | 21666892 | gb | AF455460.1 | -----
169D1F -----
gi | 24637154 | gb | AF430129.1 | -----
GNCGGACGATGTGTCTACTTTGAG-----

```

```

68D1F --
211D1F --
FOC12F --
gi | 18034433 | gb | AF440565.1 | --
gi | 18034434 | gb | AF440566.1 | --
276D2F --
gi | 34559398 | gb | AY354393.1 | --
209DF -- CG
gi | 34559397 | gb | AY354392.1 | --
gi | 34559403 | gb | AY354398.1 | --
gi | 38569372 | gb | AY462580.1 | --
gi | 1808933 | gb | U34571.1 | FOU3457 --
135D2AF --
gi | 34559401 | gb | AY354396.1 | --
gi | 34559406 | gb | AY354401.1 | --
gi | 1122871 | emb | X94173.1 | FOXYRR --
159DF --
gi | 37362910 | gb | AY387705.1 | --
FOC16F --
167DF --
213D2F --
FOC4F --
FOC7F --
gi | 852527 | gb | U28159.1 | FOU28159 --
193D2F --
gi | 5006327 | gb | AF069310.1 | AF069 --
FOC13F --
FOC17F --
170D1F --
36D1F --
gi | 29027604 | gb | AY210330.1 | --
FOC10F --
FOC20F --
gi | 5524732 | gb | AF165875.1 | AF165 --
FOC1F --
gi | 10180259 | gb | AF178418.1 | AF17 --
gi | 10180248 | gb | AF178407.1 | AF17 --
gi | 21666892 | gb | AF455460.1 | --
169D1F --
gi | 24637154 | gb | AF430129.1 | --

```

APÊNDICE 11. Sequências de *Fusarium*, no formato Fasta obtidas do GenBank (NCBI) e incluídas na análise filogenética.

>gi|38569372|gb|AY462580.1| *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum isolate PA3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
AGGAAGTAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGATCATTACCGAGTTTACAACCT
CCAAACCCCTGTGAACATACCACCTTGTGCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCC
GCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCTTC
AACACCGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCG
AGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCTCAAATTGATT
GGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCG
TTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCA

>gi|37362910|gb|AY387705.1| *Fusarium oxysporum* isolate ML-5-2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence
CTCCCAAACCCCTGTGAACATACCACCTTGTGCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGG
CCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCT
TTCAACAACGGATCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG
CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGT
TCGAGCGTCAATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCTCAAATTG
ATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACG
CCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGT

>gi|18034433|gb|AF440565.1| *Fusarium oxysporum* isolate tomato SMC21 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence
CCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCACCTTGTGCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGT
AAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAA
TAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTGCCAGTATTCTGGC
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCG
TTCCCAAATGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATC
GTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATG

>gi|18034434|gb|AF440566.1| *Fusarium oxysporum* isolate tomato W848A internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence
CCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCACCTTGTGCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGT
AAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAA
TAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTGCCAGTATTCTGGC
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCG
TTCCCAAATGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATC
GTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATG

>gi|34559406|gb|AY354401.1| *Fusarium oxysporum* f. sp. radialis-lycopersici 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
CGTTGGTGAACCAGCGGAGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCACCTTGT
TGCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCT
ATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC
GATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAAGTAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGC
TTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCCAAATGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGT
AGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACC
TCGGAGCAGGT

>gi|34559398|gb|AY354393.1| *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
CGTTGGTGAACCAGCGGAGGATCATTACCGAGTTTGAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCACCTTGT
TGCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCT
ATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC
GATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAAGTAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGC
TTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCCAAATGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGT
AGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACC
TCGGAACAGGT

>gi|21666892|gb|AF455460.1| Gibberella fujikuroi isolate wb355 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

AAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACC
CCTGTGAACATACCAATTGTTGCCCTCGCGGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAG
GACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCTTCAACAACG
GATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGCATGCCTGTTGAGCGTCA
TTTCAACCTCAAGCCCGGGTGGTGGTGGGGATCGGCGAGCCCTTGGCGCAAGCCGGCCCGGAAAT
CTAGTGGCGGTCTCGCTGAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAAAACCTCGCAACTGGTACCGGGCGCGGCC
AAGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA

>gi|24637154|gb|AF430129.1| Fusarium mangiferae strain MRC7035 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

GCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCAATTGTTGCCCTCGCGGGAT
CAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAAACCTGTTTCTATATGTAACCTTCT
GAGTAAAACCATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
GCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC
CGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCAATTTCAACCTCAAGCCCGGGTGGTGGTGG
GGATCGGCGAGCCCTTGGCGCAAGCCGGCCCGGAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGT
A

>gi|10180259|gb|AF178418.1|AF178418 Fusarium solani f. sp. glycines strain NRRL22823 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

TCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATACAACCTCCAAACCCCTGTGAACTTACCT
ATAACGTTGCTTCGCGGGGAAACCGACGGCCCGTAAAGACGGGCGCCCGCCAGAGGACCCCTAACT
CTTGTATATCCTGTTTCTCTGAGTACAACAAGCAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACCGGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTTAGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTACAACCCCTC
AGGCCCGGGGCTGGTGGTGGGGATCGGTCGGGAGCCCTCCGGGGCACACGCCGTCCCCAAATTCAGT
GCGGTCTCGCTCAGCCTTCCATTGCGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAAGGGCGCGGCCACGCGC
TAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA

>gi|10180248|gb|AF178407.1|AF178407 Fusarium solani f. sp. batatas strain NRRL22400 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

TCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATACAACCTCATCAACCTGTGAACATACCCA
AACGTTGCTTCGCGGGGAAACCGACGGCCCTGAAACGATGGGCGCCCGCCAGAGGACCCCTATCTCT
GTTTTTATATAGTGTATCTCTGAGTAAACCAAGCAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCATTACAACCCCTCA
GGCCCCGGGCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAGCCCGCGGGCACACGCCGTCCCCAAATACAGTGG
CGGTCGGCGCAGCTTCCATTGCGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAAGGGCGCGGCCACGCGC
AAAACCCCAACTTTTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA

>gi|1122871|emb|X94173.1|FOXRYRNA Fusarium oxysporum carnation 18S rRNA gene (partial), 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), internal transcribed spacer 1 (ITS1) and internal transcribed spacer 2 (ITS2)

TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCACTT
GTTGCCCTCGCGGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTT
CTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
TCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCATTACAACCTCAAGCACA
GCTTGGTGGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAATGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGC
GTAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCCGCGCCACGCGGTTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGA
CCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

>gi|34559403|gb|AY354398.1| Fusarium oxysporum f. sp. lagenariae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

CGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCACTTGT
TGCCCTCGCGGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCT
ATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
GATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCATTACAACCTCAAGCAGC
TTGGTGGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAATGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGT
AGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCCGCGCCACGCGGTTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACC
TCGGTGCAGGT

>gi|34559401|gb|AY354396.1| *Fusarium oxysporum* f. *niveum* strain Fon 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
CGTTGGTGAACCAGCGGAGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCTTGT
TGCCTCGGCGGATCAGCCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCAGAGACCCCTAAACTCTGTTTCT
ATATGTAACCTTCTGAGTAAACCATAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC
GATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGC
TTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCTCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGT
AGTAGTAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACCGCTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACC
TCGGATCAGGT

>gi|34559397|gb|AY354392.1| *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
CGTTGGTGAACCAGCGGAGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCTTGT
TGCCTCGGCGGATCAGCCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCAGAGACCCCTAAACTCTGTTTCT
ATATGTAGCTTCTGAGTAAACCATAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC
GATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGC
TTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCTCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGT
AGTAGTAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACCGCTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACC
TCGGACCAGGT

>gi|5524732|gb|AF165875.1|AF165875 *Fusarium oxysporum* human internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
CCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCTTGTGCTCGGCGGATCAGCCCCGCTCCCGGT
AAAACGGGACGGCCCGCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAACCATAAA
TAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTGCCAGTATTCTGGC
GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCG
TTCCCAAATGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAACCCCTCGTTACTGGTAATC
GTCGCGGCCACCGCTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTG

>gi|5006327|gb|AF069310.1|AF069310 *Fusarium oxysporum* barley internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
AACTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCTTGTGCTCGGCGGATCAGCCCCGCTCCCGGTAAAACGGGAC
GGCCCGCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAACCATAAAATAAATCAA
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAA
TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCC
TGTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCTCCAAA
TTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCC
ACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATA
TCAATAAGCGGAGGAA

>gi|1808933|gb|U34571.1|FOU34571 *Fusarium oxysporum* NRRL 13307 internal transcribed spacer RNA
TCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCTT
GTTGCCCTCGGCGGATCAGCCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTT
CTATATGTAACCTTCTGAGTAAACCATAAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA
TCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCACATTGCGCCTGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACA
GCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCCAAATGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGC
GTAGTAGTAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACCGCTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTG
CCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAAC

>gi|852527|gb|U28159.1|FOU28159 *Fusarium oxysporum* strain DAOM 213391 internal transcribed spacer region ITS1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer region ITS2. includes the 5.8S gene
CCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCTTGTGCTCGGCGGATCAGCCCCGCTCCCGGT
AAAACGGGACGGCCCGCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAACCATAAA
TAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCTGCCAGTATTCTGGCG
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGT
TCCTCAAATGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTGTAAACCCCTCGTTACTGGTAATCG
TCGCGGCCACCGCTTAAACCCCAACTTCTGAATG

>gi|29027604|gb|AY210330.1| *Fusarium oxysporum* associated trees internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2; complete sequence and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
ATACCGAGTTTCAACTCCCAAACCCCTGTGAACATACCCTTGTGCTCGGCGGATCAGCCCCGCTCCCG
GTAAAACGGGACGGCCCGCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAACCATA

AATAAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCGCCAGTATTCTGG
CGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGC
GTTCCCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCTCGTTACTGGTAAT
CGTCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGAGAA

APÊNDICE 12. Matriz de distância genética das regiões ITS1, gene 5,8S rRNA, ITS2 completas e região 28S rDNA parcial dos isolados de *Fusarium oxysporum*, obtidas neste trabalho e selecionadas do GenBank (NCBI) através do programa MEGA2.

MATRIZ COM INTERNET

Title: : Sequencias - Alana2comInternet.aln

Description

No. of Taxa : 40

Gaps/Missing data : Complete Deletion

Codon Positions : Noncoding

Distance method : Nucleotide: Kimura 2-parameter (Gamma) [Pairwise distances]

No. of Sites : 353

d : Estimate

```
[ 1] #68D1F
[ 2] #211D1F
[ 3] #FOC12F
[ 4] #gi|18034433|gb|AF440565.1|
[ 5] #gi|18034434|gb|AF440566.1|
[ 6] #276D2F
[ 7] #gi|34559398|gb|AY354393.1|
[ 8] #209DF
[ 9] #gi|34559397|gb|AY354392.1|
[10] #gi|34559403|gb|AY354398.1|
[11] #gi|38569372|gb|AY462580.1|
[12] #gi|1808933|gb|U34571.1|FOU3457
[13] #135D2AF
[14] #gi|34559401|gb|AY354396.1|
[15] #gi|34559406|gb|AY354401.1|
[16] #gi|1122871|emb|X94173.1|FOXYRR
[17] #159DF
[18] #gi|37362910|gb|AY387705.1|
[19] #FOC16F
[20] #167DF
[21] #213D2F
[22] #FOC4F
[23] #FOC7F
[24] #gi|852527|gb|U28159.1|FOU28159
[25] #193D2F
[26] #gi|5006327|gb|AF069310.1|AF069
[27] #FOC13F
[28] #FOC17F
[29] #170D1F
[30] #36D1F
[31] #gi|29027604|gb|AY210330.1|
[32] #FOC10F
[33] #FOC20F
[34] #gi|5524732|gb|AF165875.1|AF165
[35] #FOC1F
[36] #gi|10180259|gb|AF178418.1|AF17
[37] #gi|10180248|gb|AF178407.1|AF17
[38] #gi|21666892|gb|AF455460.1|
[39] #169D1F
[40] #gi|24637154|gb|AF430129.1|
```

APÊNDICE 12. Continua...

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40		
1	1																																									
2		1																																								
3			1																																							
4				1																																						
5					1																																					
6						1																																				
7							1																																			
8								1																																		
9									1																																	
10										1																																
11											1																															
12												1																														
13													1																													
14														1																												
15															1																											
16																1																										
17																	1																									
18																		1																								
19																			1																							
20																				1																						
21																					1																					
22																						1																				
23																							1																			
24																								1																		
25																									1																	
26																										1																
27																											1															
28																												1														
29																													1													
30																														1												
31																															1											
32																																1										
33																																	1									
34																																		1								
35																																			1							
36																																										
37																																										
38																																										
39																																										
40																																										

APÊNDICE 13. Alinhamento múltiplo das sequências de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, obtidas neste trabalho, através do programa CLUSTAL X (1.81). Estão representadas as regiões ITS1, gene 5,8S rRNA, ITS2 completas e porção do gene 28S rRNA. Sítios idênticos estão representados por (*), variáveis pelas cores azuis e amarelas, e pasimonicamente informativos por (♦).

		ITS1 →
FOC16F	-----TGAGACGGGGG-AGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACA	
FOC20F	-----GGACAGCGG-AGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACA	
FOC1F	-GTGTAGACGAGGGGG-AGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACA	
FOC13F	-----GGAGACAGGGGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACA	
FOC17F	----GGGGACAGGGG-AGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACA	
FOC10F	-CGGTGGTGACAGCGG-AGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACA	
FOC4F	NGATNTATGACGGGGGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACA	
FOC7F	NNGATTTATACAGGGG-AGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACA	
FOC12F	-----AACCAGCGG-AGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACA	
		* * * *
FOC16F	TACCACTTGTGGCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAAACGGGACGGCCCGCCAGAG	
FOC20F	TACCACTTGTGGCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAAACGGGACGGCCCGCCAGAG	
FOC1F	TACCACTTGTGGCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAAACGGGACGGCCCGCCAGAG	
FOC13F	TACCACTTGTGGCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAAACGGGACGGCCCGCCAGAG	
FOC17F	TACCACTTGTGGCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAAACGGGACGGCCCGCCAGAG	
FOC10F	TACCACTTGTGGCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAAACGGGACGGCCCGCCAGAG	
FOC4F	TACCACTTGTGGCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAAACGGGACGGCCCGCCAGAG	
FOC7F	TACCACTTGTGGCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAAACGGGACGGCCCGCCAGAG	
FOC12F	TACCACTTGTGTT-CCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAAACGGGACGGCCCGCCAGAG	

		→ 5.8S rDNA
FOC16F	GACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCT	
FOC20F	GACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCT	
FOC1F	GACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCT	
FOC13F	GACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCT	
FOC17F	GACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCT	
FOC10F	GACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCT	
FOC4F	GACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCT	
FOC7F	GACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCT	
FOC12F	GACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCT	

FOC16F	TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTA	
FOC20F	TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTA	
FOC1F	TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTA	
FOC13F	TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTA	
FOC17F	TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTA	
FOC10F	TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTA	
FOC4F	TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTA	
FOC7F	TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTA	
FOC12F	TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTA	

FOC16F	ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA-TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG	
FOC20F	ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCACTCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG	
FOC1F	ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA-TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG	
FOC13F	ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA-TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG	
FOC17F	ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA-TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG	
FOC10F	ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCACTCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG	
FOC4F	ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA-TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG	
FOC7F	ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA-TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG	
FOC12F	ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCACTCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG	

		ITS2 →
FOC16F	TATTCTGGCGGGCATGCGCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCA CAGCTTGGTGTG	
FOC20F	TATTCTGGCGGGCATGCGCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCA CAGCTTGGTGTG	
FOC1F	TATTCTGGCGGGCATGCGCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCA CAGCTTGGTGTG	
FOC13F	TATTCTGGCGGGCATGCGCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCA CAGCTTGGTGTG	
FOC17F	TATTCTGGCGGGCATGCGCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCA CAGCTTGGTGTG	
FOC10F	TATTCTGGCGGGCATGCGCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCA CAGCTTGGTGTG	
FOC4F	TATTCTGGCGGGCATGCGCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCA CAGCTTGGTGTG	
FOC7F	TATTCTGGCGGGCATGCGCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCA CAGCTTGGTGTG	
FOC12F	TATTCTGGCGGGCATGCGCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCA CAGCTTGGTGTG	

FOC16F GGACTCGCGTTAAATTCGCGTTCCCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCG
 FOC20F GGACTCGCGTTAAATTCGCGTTCCCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCG
 FOC1F GGACTCGCGTTAAATTCGCGTTCCCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCG
 FOC13F GGACTCGCGTTAAATTCGCGTTCCCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCG
 FOC17F GGACTCGCGTTAAATTCGCGTTCCCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCG
 FOC10F GGACTCGCGTTAAATTCGCGTTCCCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCG
 FOC4F GGACTCGCGTTAAATTCGCGTTCCCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCG
 FOC7F GGACTCGCGTTAAATTCGCGTTCCCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCG
 FOC12F GGACTCGCGT---TCGCGTTCCCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCG

FOC16F TAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCT
 FOC20F TAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCT
 FOC1F TAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCT
 FOC13F TAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCT
 FOC17F TAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCT
 FOC10F TAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCT
 FOC4F TAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCT
 FOC7F TAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCT
 FOC12F TAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCT

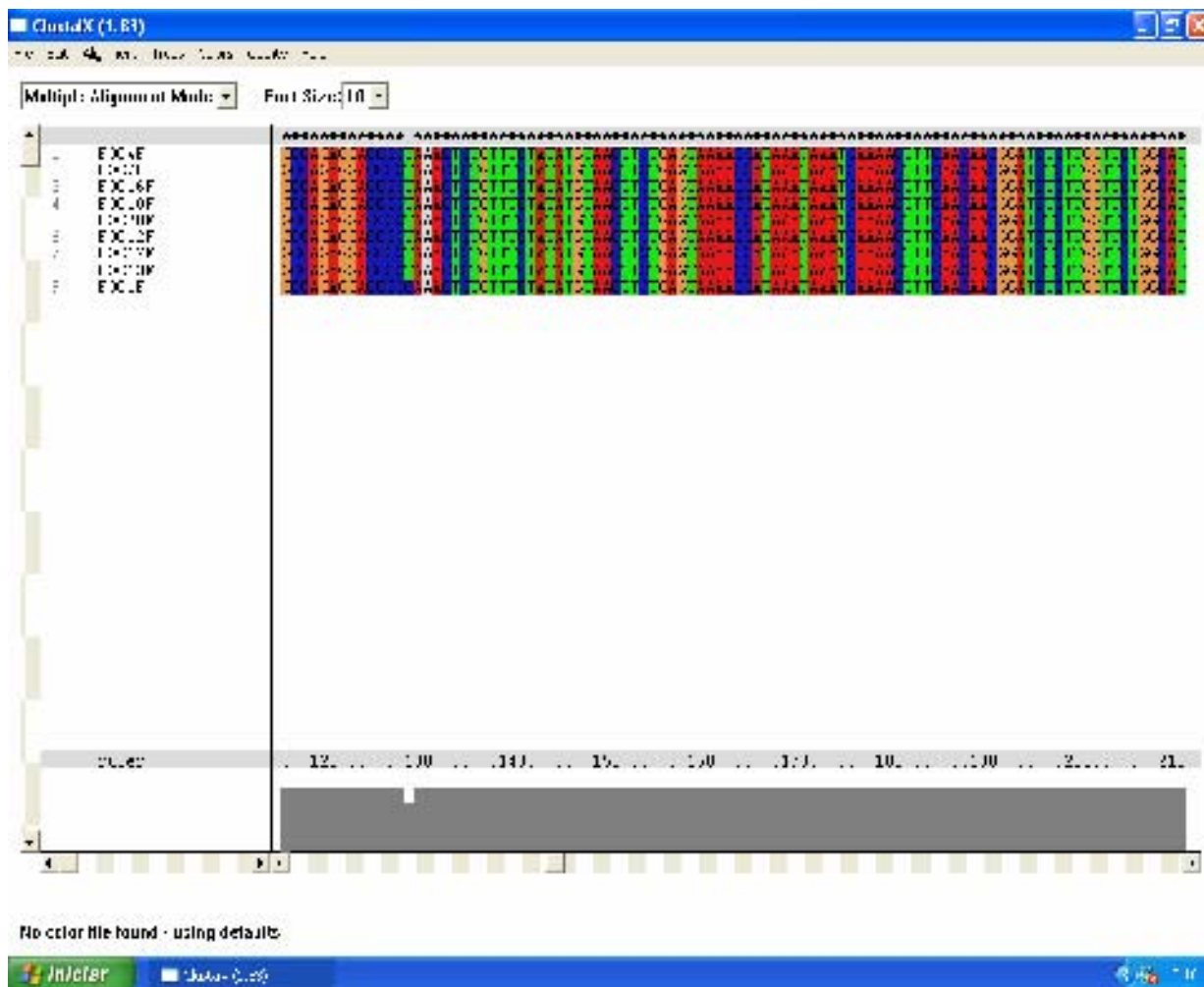
28S rDNA →

FOC16F GAATGTTGACCTCG-----GATC---AGGTG-GA---TACCCG--TCTGGAAGCTT---A
 FOC20F GAATGTTGACCTCG-----GATC---AGGTAG-GAA--TACCCG--CT--GAACTT---A
 FOC1F GAATGTTGACCTCG-----GATC---AGGTAG-GAA--TACCCG--CT--GAACTT---A
 FOC13F GAATGTTGACCTCG-----GATC---AGGTAG-GAA--TACCCG--CT--GAACTT---A
 FOC17F GAATGTTGACCTCG-----GATC---AGGTAG-GAA--TACCCG--CT--GAACTT---A
 FOC10F GAATGTTGACCTCG-----GATC---AGGTAG-GAA--TACCCG--CT--GAACTT---A
 FOC4F GAATGTTGACCTCG-----GATC---AGGTAG-GAA--TACCCG--CT--GAACTT---A
 FOC7F GAATGTTGACCTCG-----GATC---AGGTAG-GAA--TACCCG--CT--GAACTT---A
 FOC12F GAATGT--ACCTCGATCGTGATCATGAGTTGTGCAATTACCCCGTCTTNGAACATTTAA

FOC16F AGC-ATATCATAAG-CGGGAGGAAANGAAAGTACCAGGGATTGCCCTTGTACGACTTT-
 FOC20F AGC-ATATCAATAA-CGGGAGGAAANGAAACAC-AGGGATTGCCCNTGTACCGANTTA
 FOC1F AGC-ATATCAATAAGCGGGAAGAAGGATGGA-----
 FOC13F AGC-ATATCAATAGGGGGGGAAACCC---CCCCACCCACACCCCCCCACCCACACC
 FOC17F AGC-ATATCAATAGGGGGGGAAAGCCGNATGCCGCACACACACCCACCC-----
 FOC10F AGC-ATATCAATAGGGGGGGAA-----
 FOC4F AGC-ATATCAATAAGCGGAGGAAAAAACACACAAAAACAAAAACAAAA-----
 FOC7F AGCCATTTTCATAG-CGGGAGGAA-----
 FOC12F GGCAATACTCAAGTAAGTCGGGGACGCGGNAACGGGAAAAGGTTACACCGGGGANTTG
 ** ** *

FOC16F -TTTGCAA-----
 FOC20F ACTTGCAACCCCCCCCC-----
 FOC1F -----
 FOC13F CCCCCCCC-----
 FOC17F -----
 FOC10F -----
 FOC4F -----
 FOC7F -----
 FOC12F GACCNTNGTTACCGAACTTATCTTTGCNACAAA

APÊNDICE 14 – Parte selecionada do alinhamento das seqüências das regiões ITS1, gene 5,8S rRNA, ITS2 completas dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, destacando, em diferentes cores, os sítios homólogos correspondentes a cada nucleotídeo, obtidos pelo programa CLUSTAL X 1.83).



APÊNDICE 15 – Matriz de distância genética das regiões ITS1, gene 5,8S rRNA, ITS2 completas dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, obtida pelo programa MEGA2.

Title: Sequencias - Alana2SOFOCcut28S.aln

Description

No. of Taxa : 9

Gaps/Missing data : Complete Deletion

Codon Positions : Noncoding

Distance method : Nucleotide: Kimura 2-parameter (Gamma) [Pairwise distances]

No. of Sites : 469

d : Estimate

[1] #FOC4F
[2] #FOC7F
[3] #FOC16F
[4] #FOC10F
[5] #FOC20F
[6] #FOC12F
[7] #FOC17F
[8] #FOC13F
[9] #FOC1F

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
[1]									
[2]	0.006								
[3]	0.006	0.004							
[4]	0.011	0.006	0.006						
[5]	0.009	0.006	0.006	0.002					
[6]	0.011	0.004	0.004	0.002	0.002				
[7]	0.006	0.004	0.004	0.004	0.002	0.004			
[8]	0.004	0.009	0.004	0.009	0.006	0.009	0.004		
[9]	0.015	0.015	0.011	0.017	0.017	0.015	0.015	0.011	