

MICHELE GALVÃO SANT'ANA ZANOTTI

ANÁLISE DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS E DNA POLIMÓRFICO
AMPLIFICADO AO ACASO (RAPD) DE *Fusarium oxysporum*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

2003

RESUMO

ZANOTTI, Michele Galvão Sant'Ana, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2003. **Análise de elementos transponíveis e DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) de *Fusarium oxysporum*.** Professora orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Professores conselheiros: Elza Fernandes de Araújo e Everaldo Gonçalves de Barros.

A variabilidade genética de 20 isolados de *Fusarium oxysporum* não-patogênicos e patogênicos em feijoeiro foi determinada com base na distribuição do elemento transponível *impala* e com a técnica de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD). A presença de elementos transponíveis *impala* das subfamílias D e E foi determinada por experimentos de PCR empregando oligonucleotídeos específicos para cada subfamília. Foi observada a presença de representantes das duas subfamílias na maioria dos isolados, sugerindo, portanto, que *impala* é um antigo componente do genoma de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. A hibridização do DNA total de cada isolado, clivado com a enzima *EcoRI*, com um fragmento do elemento *impala* da subfamília E, mostrou uma variação nos padrões de bandas dos isolados não-patogênicos, indicando a possível atividade desses elementos. No entanto, no caso dos isolados patogênicos, foram observados padrões de bandas mais homogêneas e alguns isolados apresentaram o mesmo perfil de bandas, indicando que se trata de cópias de *impala* que possivelmente

não são mais capazes de sofrer transposição. Estas cópias inativas são excelentes marcadores genéticos. Um dos isolados patogênicos, Fus4, não apresentou cópias endógenas de *impala*, o que torna esse isolado um candidato para experimentos de mutagênese insercional usando o vetor pNI160, que apresenta o elemento *impala* ativo interrompendo o gene *niaD*. A análise dos dados de RAPD utilizando-se 16 oligonucleotídeos gerou 224 fragmentos polimórficos e 7 monomórficos. O polimorfismo observado foi compatível com o padrão de hibridização. Foram calculadas as distâncias genéticas entre os isolados e estas variaram de 8 a 76%, entre os patogênicos; de 2 a 63%, entre os não-patogênicos, e de 45 a 76%, entre patogênicos e não-patogênicos. Baseados nestas distâncias, quatro grupos foram definidos por análise de agrupamento. Dois grupos foram específicos para patogênicos, um para os não-patogênicos, e um grupo incluiu patogênicos e não-patogênicos. A distância genética observada dentro de um grupo de isolados patogênicos é compatível com os valores de distância genética que definem raças fisiológicas.

ABSTRACT

ZANOTTI, Michele Galvão Sant'Ana, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2003. **Analyze of transposable elements and random amplified polymorphic DNA (RAPD) in *Fusarium oxysporum*.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Committee members: Elza Fernandes de Araújo and Everaldo Gonçalves de Barros.

The genetic variability of twenty nonpathogenic and pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*, the causative agent of bean wilt, was analyzed based on the distribution of the transposable element *impala* and on the random amplification of polymorphic DNA (RAPD). The presence of transposable elements belonging to subfamilies D and E of *impala* was determined through PCR (polymerase chain reaction) using specific primers for each subfamily. The presence of members of the two subfamilies was observed in most of the isolates, suggesting that it is an old component in the *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* genome. Hybridization of total DNA of each isolate, digested with *EcoRI*, with *impala* fragment of subfamily E produced a highly band pattern in the nonpathogenic isolates, indicating the possible activity of these elements. On the other hand, in the case of the pathogenic isolates, the band patterns were more homogeneous and some isolates showed very similar patterns, indicating that these *impala* copies have lost their capacity to transpose. These inactive copies are suitable as genetic markers. Among the pathogenic isolates, Fus4 did not present endogenous copies of *impala* and could be used in experiments of insertional

mutagenesis with the pNI160 plasmid, that harbors the active *impala* element disrupting the *niaD* gene. The RAPD analysis using 16 primers resulted in 224 polymorphic and 7 monomorphic fragments. The genetic distances among the isolates based on the presence/absence of the RAPD bands varied between 8 and 76% within the pathogenic isolates, between 2 a 63% within the nonpathogenic isolates and 45 to 76% between the two groups. Based on these distances, four groups were defined by UPGMA analysis. Two groups were specific for pathogenics and for nonpathogenic and one group included both pathogenic and nonpathogenic isolates. The genetic distances found within the group of pathogenic isolates were compatible with values that define physiological races.