

Diversidade Genética de Isolados Geográficos de *Spiroplasma kunkelii*

ANA LUIZA M. CASTANHEIRA¹, ISABEL R.P. DE SOUZA², ELIZABETH DE OLIVEIRA², NEWTON P. CARNEIRO², DEA A. M. NETO², EDILSON PAIVA²

¹Universidade de Cuiabá 78010-480 Cuiabá/MT; ²Embrapa Milho e Sorgo, CP. 151, 35701-970, Sete Lagoas/MG; analuiza@unic.br

Palavras-chave: Enfezamento pálido, espiroplasma, cultivo in vitro, marcador molecular, AFLP, milho

INTRODUÇÃO

O enfezamento pálido do milho, causado por *Spiroplasma kunkelii* é uma doença severa que provoca grandes danos à cultura e tem afetado áreas de plantio do milho em diversas regiões do Brasil (Oliveira et al., 2003). Para o controle do enfezamento pálido, o método mais eficaz é a utilização de cultivares de milho resistentes. Para desenvolver uma cultivar resistente são necessárias diversas ações, entre as quais a obtenção de informações acerca do patógeno, incluindo informações sobre a variabilidade genética (Souza et al., 2004).

Marcadores moleculares são ferramentas poderosas em estudos de variabilidade genética, pois permitem uma ampla cobertura do genoma do organismo em estudo, gerando um grande número de informações. O AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) é uma técnica eficaz para análise de diversidade genética, pois gera um grande número de informações e é muito precisa (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Graças a essas características, tem sido amplamente utilizada em estudos envolvendo organismos com genomas muito diferentes em complexidade, como humanos, plantas, fungos e bactérias (Bensch e Åkesson, 2005).

Este trabalho teve, como objetivo, avaliar a diversidade genética de isolados geográficos de espiroplasma utilizando marcadores moleculares do tipo AFLP.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram extraídos DNAs de quatro isolados de espiroplasma, identificados pelas letras D, I, S e U, obtidos nas localidades de Dourados, Itumbiara, Sete Lagoas e Uberlândia, respectivamente. Foram utilizados três cultivos *in vitro* de isolados por região, perfazendo um total de 12 amostras. O DNA foi extraído de acordo com protocolo proposto por Carneiro et al. (2003). Para a confirmação de que o DNA extraído dos meios de cultura era de espiroplasma, realizou-se o teste de PCR para detecção do mesmo (Barros et al., 2001).

Etapas da técnica de AFLP, empregando-se os *kits* e protocolos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA): Etapa 1: As amostras de DNA genômico foram diluídas para a concentração de 25 ng/μl e submetidas às enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI*. Etapa 2: Ligação dos adaptadores e diluição das amostras na proporção de 1:10. Etapa 3: Pré-amplificação utilizando-se o par de *primers* E-0 e M-0. Após a amplificação as amostras foram diluídas na proporção de 1:50. Etapa 4: reação de amplificação seletiva com a utilização de pares de *primers*. Etapa 5: Eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração do gel com solução de prata de acordo com o protocolo de Creste et al. (2001).

A análise dos marcadores AFLP foi feita com base em matriz de dados binários, e a estimativa de similaridade genética entre cada par de isolados de espiroplasma foi determinada pelo coeficiente de Jaccard. As estimativas de similaridades genéticas foram

obtidas com a utilização do programa NTSyspc 2.02k (Rohlf, 1998) empregando-se o método da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA). O índice de eficiência da técnica de AFLP (ET_{AFLP}) foi calculado conforme Pejic et al. (1998) utilizando-se o programa GQMol (Cruz & Schuster, 2004). A distância genética de Nei e identidade de Nei, foram estimadas pelo programa PopGene versão 1.31 (Yeh, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA extraído dos diferentes isolados apresentou boa qualidade e concentrações adequadas para a técnica de AFLP. O resultado do PCR multiplex mostrou que os materiais foram positivos para espiroplasma, através da amplificação do gene da espiralina (**Figura 1**).

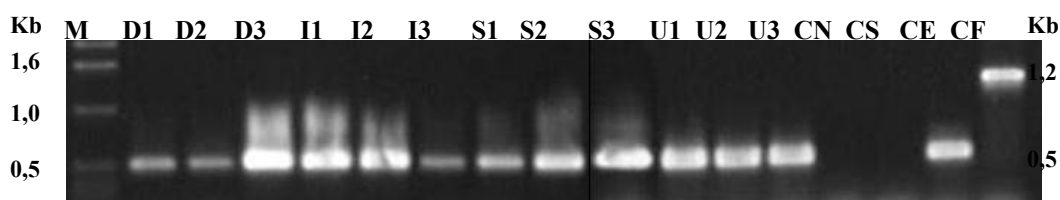


FIGURA 1. Resultado do teste de PCR multiplex para detecção do gene da espiralina em DNAs extraídos dos meios de cultivo de espiroplasma. M = Marcador molecular; D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; CN = Controle Negativo; CS = Planta Sadia; CE = Controle Espiroplasma (0,5 Kb); CF = Controle Fitoplasma (1,2 Kb). Números diferentes indicam DNAs de diferentes isolados provenientes de uma mesma região.

Foram obtidos 448 alelos polimórficos com as 10 combinações de *primers* utilizadas. Na **Tabela 1** estão representadas as combinações de *primers*, a amplitude em pares de bases (pb) dos fragmentos obtidos e o número de fragmentos polimórficos para cada conjunto de *primers*. A porcentagem de bandas polimórficas foi relativamente baixa, na ordem de 26,6%. Algumas combinações de *primers* mostraram-se mais eficientes na detecção de polimorfismo, como o caso de *EcoRI-G + MseI-A* e *EcoRI-C + MseI-C*, que apresentaram, respectivamente, 44,7% e 37,1% de bandas polimórficas.

No dendrograma apresentado na **Figura 2** verifica-se que a menor similaridade genética, 0,83, ocorre entre os isolados de Uberlândia e o grupo formado pelos isolados de Dourados, Itumbiara e Sete Lagoas, isto representa uma distância genética de apenas 0,15 entre estes grupos. Os isolados de Itumbiara e de Sete Lagoas formam um grupo com similaridade genética de 0,96 e entre este grupo e os isolados de Dourados a similaridade é de 0,93.

TABELA 1. Combinações de *primers* utilizados na técnica de AFLP, número total de fragmentos e número de fragmentos polimórficos encontrados.

Combinação de <i>primers</i>	Amplitude alélica (pb)	Nº. de fragmentos		
		Total	Polim.	%
<i>EcoRI</i> -A + <i>MseI</i> - A	151 - 467	19	6	31,6
<i>EcoRI</i> -A + <i>MseI</i> - C	81 - 486	28	8	28,6
<i>EcoRI</i> -C + <i>MseI</i> - A	56 - 486	74	17	23,0
<i>EcoRI</i> -C + <i>MseI</i> - C	84 - 479	62	23	37,1
<i>EcoRI</i> -C + <i>MseI</i> - G	133 - 482	35	3	8,6
<i>EcoRI</i> -C + <i>MseI</i> - T	75 - 442	51	15	29,4
<i>EcoRI</i> -G + <i>MseI</i> - 0	96 - 490	62	21	33,9
<i>EcoRI</i> -G + <i>MseI</i> - A	119 - 496	47	21	44,7
<i>EcoRI</i> -G + <i>MseI</i> - C	120 - 475	55	5	9,1
<i>EcoRI</i> -G + <i>MseI</i> - G	152 - 436	15	0	0
Total	56 - 496	448	119	
Média	106,7 - 473,9	44,8	11,9	26,6

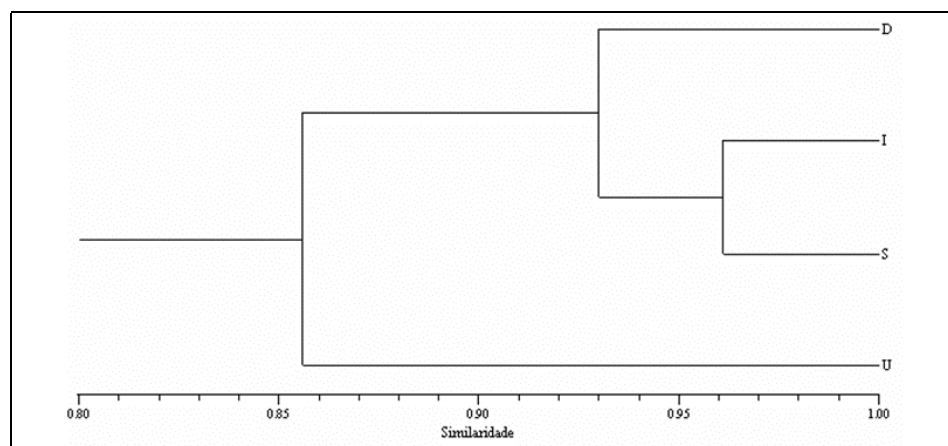


FIGURA 2: Dendrograma das similaridades genéticas entre isolados geográficos de *S. kunkelii* utilizando o método de agrupamento UPGMA. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia.

O resultado da estimativa do índice de eficiência da técnica de AFLP está representado na **Figura 3**. Essa estimativa foi obtida por meio de simulações utilizando matrizes de distância calculadas pelo índice de Jaccard, com base em um número crescente de marcadores AFLP, para determinar a confiabilidade e a precisão do agrupamento produzido (Pejic et al., 1998). O resultado da simulação mostra que, a partir de 46 bandas polimórficas, a correlação foi superior a 0,90 e o desvio padrão foi inferior a 0,10. Esses resultados indicam que 46 bandas polimórficas é um número ótimo para discriminar a variabilidade genética entre os isolados de espiroplasma.

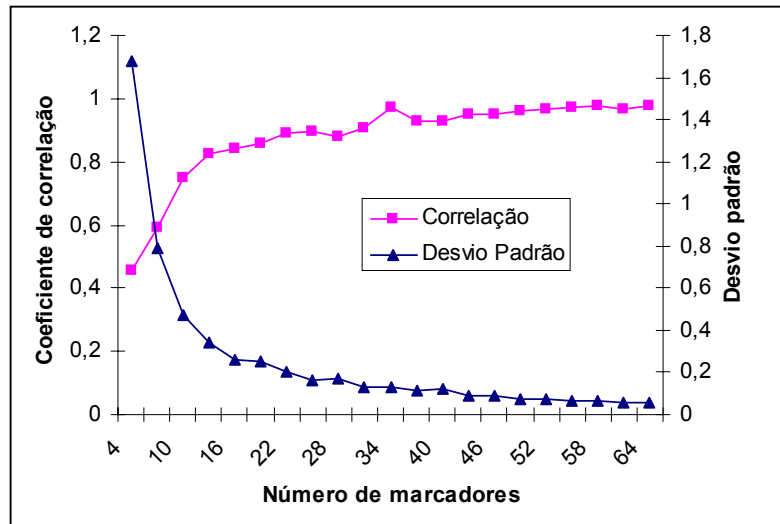


FIGURA 3. Desvio padrão da matriz de similaridade obtido por simulações de número de marcadores AFLP para os isolados de espiroplasma.

Os resultados da identidade genética de Nei e a distância genética de Nei encontram-se na **Tabela 2**. Os valores de identidade genética de Nei (I) variaram de 0,9272 a 0,9727, respectivamente, entre os isolados de Itumbiara e de Uberlândia e os isolados de Dourados e de Itumbiara. Os valores para distância genética de Nei (D) foram de 0,0277 a 0,0756, respectivamente para os isolados de Dourados e de Itumbiara e os isolados de Itumbiara e de Uberlândia. A identidade de Nei encontrada para cada par de isolados foi semelhante para todos, em média 0,95. Uma vez que esse índice varia de 0 a 1, esse resultado indica que os isolados de espiroplasma possuem freqüências alélicas muito semelhantes. A distância genética de Nei (D) foi, em média, de 0,05 (**Tabela 2**), o que indica 5 substituições, em média, a cada 100 marcadores. Esse resultado confirma a semelhança nas freqüências alélicas dos isolados. Oliveira (2000) relatou que sete populações de cigarrinhas *D. maidis* coletadas na região Centro-Sul do Brasil, apresentaram índice de similaridade superior a 0,7, sugerindo a existência de intenso fluxo gênico entre estas populações, mediado pela capacidade dessa espécie de migrar a longas distâncias. Uma vez que existe a interação entre o vetor e o patógeno, é provável que a homogeneidade entre populações de cigarrinha esteja contribuindo para manter uma menor variabilidade genética entre isolados de espiroplasma.

TABELA 2. Identidade genética de Nei e distância genética de Nei para os isolados de espiroplasma. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia.

Isolados	D	I	S	U
D	--	0,9727	0,9642	0,9278
I	0,0277	--	0,9717	0,9272
S	0,0365	0,0287	--	0,9379
U	0,0749	0,0756	0,0641	--

* Identidade genética de Nei: acima da diagonal

* Distância genética de Nei: abaixo da diagonal

Referências Bibliográficas

- BARROS, T. S. L.; DAVIS, R. E.; RESENDE, R. O. Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma *Spiroplasma kunkelii*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 5, p. 475-480, May 2001.
- BENSCH, S.; ÅKENSON, M. Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 2899-2914, Sept. 2005.
- CARNEIRO, N. P.; CASTANHEIRA, A. L. M.; SOUZA, I. R. P.; OLIVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, E.; LANA, U. G. P.; PAIVA, E. **Extração de DNA de *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb cultivado *in vitro***. Sete Lagoas: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa em Milho e Sorgo, 2003. (Circular Técnica 34.)
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, n. 19, p. 229-306, 2001.
- CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **GQMOL – Aplicativo computacional para análise de dados moleculares e suas associações com caracteres quantitativos**. Versão 2004. 2. 1. Viçosa: UFV, 2004.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- OLIVEIRA, C. M. **Variação genética entre e dentro de populações e mecanismos de sobrevivência na entressafra da cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera, Cicadellidae)**. 2000. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O.; GIMÉNEZ-PECCI, M. L. P.; LAGUNA, I. G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Ocorrência e perdas causadas por mollicutes e vírus na cultura do milho safrinha no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 19-25, jan. 2003.
- PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; KOZUMPLICK, V.; CASTIGLIONI, P.; TARMINO, G.; MOTTO, M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPSs, SSRs and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 8, p. 1248-1255, Dec. 1998
- ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2. 02k**. New York, 1998.
- SOUZA, I. R. P.; SCHUELTER, A. R.; GUIMARÃES, C. T. Genética da resistência a doenças, com ênfase na virose mosaico-comum do Milho. In: Oliveira, E. e Oliveira, C. M. **Doenças em milho. Mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília, DF, 2004. p. 227-252.
- YEH, F. C. PopGene version 1. 31. **Microsoft window- based freeware for population genetics analysis**. Alberta: University of Alberta. Department of Renewable Resources, 1999.