

Variabilidade Genética de Fitoplasma e de Spiroplasma Isolados de Milho

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

GOMES, E.A., JARDIM, S.N., BRITTO, W.M.A, OLIVEIRA, E., SILVA, R.A. e GUIMARÃES, C.T.

Embrapa Milho e Sorgo, CP 151 Sete Lagoas MG 35701-970 eliane@cnpms.embrapa.br

Palavras-chave: Fitoplasma, *Spiroplasma kunkelii*, 16SrRNA, espiralina, seqüenciamento

Introdução

Enfezamento vermelho (*maize bushy stunt*) e enfezamento pálido (*corn stunt*) são duas importantes doenças de milho (*Zea mays* L.), cuja incidência tem aumentado recentemente em países da América Central e América do Sul, incluindo o Brasil (Bedendo et al., 2000; Oliveira et al., 1998). Dois diferentes microrganismos da classe *Mollicutes*, colonizadores do floema, são os responsáveis por essas doenças. Um fitoplasma não cultivável em meio de cultura é o provável agente do enfezamento pálido, enquanto que o causador do enfezamento vermelho é o *Spiroplasma kunkelii*, um microrganismo caracterizado pela forma helicoidal, motilidade e crescimento em meio de cultura. Os fitoplasmas e espiroplasmas são microrganismos que se caracterizam pela ausência de parede celular e reduzido tamanho do genoma, com um baixo conteúdo C+G (Kuske e Kirkpatrick, 1992).

Tradicionalmente, mollicutes fitopatogênicos são diferenciados com base em propriedades biológicas, como sintomas de doenças em plantas, classe de hospedeiros e especificidade do inseto vetor (Liefing et al., 1996). Além da observação dos sintomas, vários métodos de detecção do patógeno têm sido utilizados no diagnóstico dos enfezamentos na cultura do milho. Dentre eles se destacam métodos sorológicos, utilizando anticorpos monoclonais e policlonais (Chen e Jiang, 1988; Hsu et al., 1990), métodos moleculares, incluindo hibridação de ácidos nucleicos utilizando fragmentos de DNA clonados ao acaso como sondas (Kison et al., 1994) e amplificação de genes da subunidade 16S rDNA (Gundersen et al., 1996). A utilização das técnicas moleculares acarretou um progresso substancial na diferenciação e classificação dos fitoplasmas e de espiroplasmas, causadores dos enfezamentos.

Em 1991, Deng e Hiruki utilizaram oligonucleotídeos iniciadores derivados de seqüências de rRNA de mollicutes para amplificação seletiva de genes da subunidade 16S do rRNA a partir de extratos de fitoplasma. Rapidamente, a técnica de PCR usando conjuntos específicos de iniciadores de rRNA de fitoplasma ficou conhecida como o melhor método para a detecção e diagnóstico de doenças relacionadas a fitoplasmas (Gundersen et al., 1996; Marcone et al., 1997). O uso de iniciadores específicos para detecção e identificação de *S. kunkelii* foi descrito, pela primeira vez, por Barros et al. (2001). Esses iniciadores amplificam regiões específicas do gene da

espiralina, principal proteína de membrana dos espiroplasmas, cuja sequência de nucleotídeos está depositada no GenBank. Essa proteína possui regiões variáveis e conservadas, o que possibilita o desenho de iniciadores específicos para detecção e identificação de outras espécies de *Spiroplasma* do grupo I. Os iniciadores obtidos amplificam DNA de *S. kunkelii*, gerando um fragmento de 500 pares de bases, e não amplificam DNA de fitoplasma ou de outras espécies de *Spiroplasma* testadas. A disponibilidade de técnicas específicas e sensíveis de detecção do agente causal do enfezamento pálido pode facilitar o estudo da ecologia do patógeno, assim como sua influência na incidência e transmissão dos enfezamentos em milho e outras espécies cultivadas (Barros et al., 2001).

Nesse trabalho, foi analisada a variabilidade genética de diferentes isolados de fitoplasma e de *S. kunkelii*, coletados em plantas de milho em diferentes regiões produtoras do Brasil. Todos os fragmentos sequenciados foram amplificados por PCR utilizando iniciadores específicos para as regiões de interesse. Em fitoplasma foi sequenciado o gene 16S rRNA e em *S. kunkelii* o gene que codifica a espiralina.

Material e Métodos

O DNA utilizado nas reações de PCR foi extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento pálido e enfezamento vermelho, coletadas nas seguintes regiões produtoras de milho: Assis (SP), Santa Helena (GO), Sete Lagoas (MG) e Dourados (MS). Foram analisados 11 isolados de espiroplasma e 14 de fitoplasma (Tabela 1). Os pares de iniciadores CSSF2 e CSSR6 (Barros et al., 2001) foram utilizados para amplificação de um fragmento do gene da espiralina de *S. kunkelii* e os pares de iniciadores R16R2 e R16F2 (Lee et al., 1993) foram utilizados para amplificação de uma região do 16S rDNA de fitoplasma. Os produtos de PCR de espiroplasma e fitoplasma foram purificados com o kit "QIAquick Gel Extraction" (Qiagen, Hilden, Alemanha) e sequenciados utilizando os iniciadores mencionados anteriormente. As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit "Big Dye Terminator" v. 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com recomendações dos fabricantes e analisadas no sequenciador ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

As sequências de DNA obtidas de espiroplasma e fitoplasma foram analisadas pelo programa BLAST (Altschul et al., 1997) e alinhadas pelo método de CLUSTAL W 1.6 (Thompson et al., 1994) e pelo módulo MegAlign do programa DNASTar (Lasergene, Madison, WI). As sequências foram comparadas com o GenBank Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e agrupadas em uma árvore consenso utilizando o módulo MegAlign do programa DNASTar (Lasergene, Madison, WI).

Resultados e Discussão

A amplificação do gene da espiralina de *S. kunkelii* com os iniciadores CSSF2 e CSSR6 resultou em um fragmento de aproximadamente 500 pares de bases para todos os isolados analisados (Figura 1). A análise da sequência de nucleotídeos desse fragmento pelo programa BLAST resultou em uma homologia de 98% com a sequência do gene da espiralina de *S. kunkelii* depositado no GenBank, acesso número U57659.

O alinhamento das sequências de nucleotídeos dos 11 isolados pelo método

CLUSTAL mostrou que a homologia entre elas foi de 100%. Essas seqüências foram alinhadas com a seqüência do gene da espiralina de outras espécies de *Spiroplasma* descritas na literatura (Foissac et al., 1997). A homologia entre as diferentes espécies variou de 76,9 a 88,1%. A comparação dos resultados mostrou que os isolados de *S. kunkelii* possuem 76,9% de homologia com *S. citri*, 78,9% com *S. melliferum* e 88,1% com *S. phoeniceum*. Baseados nos dados de homologia entre as seqüências das diferentes espécies e entre os isolados de *S. kunkelii* foi construída uma árvore consenso, onde os isolados de *S. kunkelii* ficaram agrupados e separados das demais espécies de *Spiroplasma* (Figura 2), como seria esperado.

Resultados semelhantes de homologia entre espiralinas de diferentes espécies de *Spiroplasma* foram publicadas por Foissac et al. (1997), que amplificaram um fragmento de PCR contendo 1.021 nucleotídeos, derivado do gene da espiralina de *S. kunkelii* e observaram que havia 78% de homologia com a seqüência do gene de *S. citri*. Do mesmo modo, a seqüência de nucleotídeos da espiralina de *S. phoeniceum* e de *S. citri* apresentavam 80% de homologia.

A amplificação por PCR do DNA dos isolados de fitoplasma com os iniciadores R16F2 e R16R2 resultou em um fragmento de 1.200 pares de bases (Figura 1), cujas seqüências de 16S rDNA foram idênticas para os 14 isolados. A análise pelo programa BLAST resultou em homologia com as seqüências de 16S rDNA de fitoplasma depositadas no GenBank. De forma semelhante, Bedendo et al. (2000) estudaram seqüências do gene de proteínas ribossomais de isolados de fitoplasma coletados em plantas de milho no Brasil. A análise do padrão de RFLP desses genes amplificados indicou que os fitoplasmas causadores de doenças no milho no Brasil eram indistinguíveis um do outro por esta técnica.

No presente trabalho foi verificado que o seqüenciamento da região do 16S rDNA de fitoplasmas e do gene da espiralina de espiroplasmas não permitiu a detecção de variabilidade genética entre isolados desses organismos coletados em diferentes regiões do Brasil. No entanto, outros autores também não conseguiram diferenciar isolados de fitoplasmas brasileiros utilizando-se outras técnicas moleculares, como análise dos genes das proteínas ribossomais (Bedendo et al., 2000). Também não foi encontrado nenhum trabalho envolvendo a caracterização molecular de isolados de uma mesma espécie de espiroplasmas. Assim, pode ser levantada uma hipótese da existência de um baixo nível de variabilidade genética entre isolados de uma mesma espécie de fitoplasma e espiroplasma, mesmo sendo esses coletados dentro de uma ampla área geográfica e sob diferentes condições edafo-climáticas. Por outro lado, tais genes podem ter sido conservados dentro das espécies estudadas, havendo a necessidade de se avaliar outras regiões genômicas que explorem melhor variabilidade genética, aumentando a probabilidade de detecção de polimorfismo entre isolados de uma mesma espécie.

Literatura Citada

- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. e Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- Barros, T.S.L.; Davis, R.E.; Resende, R.O. e Dally, E.L. Design of a polimerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. **Plant Disease**, v. 85, p. 475-480, 2001.

- Bedendo, I.P.; Davis, R.E. e Dally, E.L. Detection and identification of the maize bushy stunt phytoplasma in corn plants in Brazil using PCR and RFLP. **International Journal of Pest Management**, v. 46, p. 73-76, 2000.
- Chen, T. A. e X. F. Jiang. Monoclonal antibodies against the maize bushy stunt agent. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 6-11, 1988.
- Deng, S. e Hiruki, C. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable *Mollicutes*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 14, p. 53-61, 1991.
- Foissac, X.; Joseph, M.B. e Saillard, C. Sequence analysis of *Spiroplasma phoeniceum* and *Spiroplasma kunkelii* spiralin genes and comparison with other spiralin genes. **Current Microbiology**, v. 35, p. 240-243.
- Gundersen, D.E.; Lee, I-M.; Schaff, D.A.; Harrison, N.A.; Chang, C.J.; Davis, R.E. e Kingsbury, D.T. Genomic diversity and differentiation among fitotoplasma strains in the 16S rRNA groups I (aster yellows and related fitotoplasmas) and III (X-disease and related fitotoplasmas). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 64-75, 1996.
- Hsu, H.T.; Lee, I-M.; Davis, R.E. e Wang, Y.C. Immunization for generation of hybridoma antibodies specifically reacting with plants infected with a mycoplasma-like organism (MLO) and their use in detection of MLO antigens. **Phytopathology**, v. 80, p. 946-950, 1990.
- Kison, H.; Schneider, B. e Seemüller, E. Restriction fragment length polymorphism within the apple proliferation mycoplasma-like organism. **Journal of Phytopathology**, v. 141, p. 395-401, 1994.
- Kuske, C.R. e Kirkpatrick, B.C. Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasma-like organism and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 226-233, 1992.
- Lee, I-M.; Hammond, R.W.; Davis, R.E. e Gundersen, D.E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. **Phytopathology**, v. 83, p. 834-842, 1993.
- Liefting, L.W.; Andersen, M.T.; Beever, R.E.; Gardner, R.C. e Forster, R.L.S. Sequence Heterogeneity in the Two 16S rRNA Genes of *Phormium* Yellow Leaf Phytoplasma. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3133-3139, 1996.
- Marcone, C.; Ragozzino, A. e Seemüller, E. Detection and identification of fitotoplasmas in yellow-diseased weeds in Italy. **Plant Pathology**, v. 46, p. 530-537, 1997.
- Oliveira, E.; Waquil, J.M.; Fernandes, F.T.; Paiva, E.; Resende, R.O. e Kitajima, E.W. "Enfezamento pálido" e "enfezamento vermelho" na cultura do milho no Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 45-47, 1998.
- Thompson, J.D.; Diggins, D.G. e Gibson, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

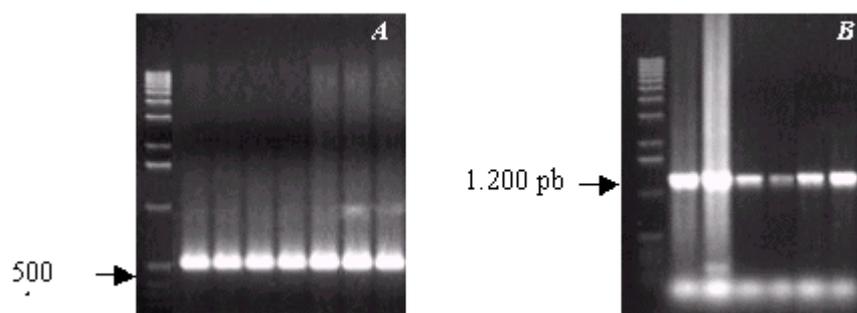


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose de fragmentos amplificados por PCR do gene da espiralina de isolados de espiroplasma (A) e da região 16S rDNA dos isolados de fitoplasma (B).

Tabela 1. Isolados de fitoplasma e espiroplasma e os respectivos locais de coleta nas regiões produtoras de milho no Brasil

Microrganismo	Isolado	Local de coleta
Espiroplasma	102	Assis (SP)
Espiroplasma	166	Assis (SP)
Espiroplasma	173	Assis (SP)
Espiroplasma	65	Santa Helena (GO)
Espiroplasma	67	Santa Helena (GO)
Espiroplasma	198	Santa Helena (GO)
Espiroplasma	24B	Sete Lagoas (MG)
Espiroplasma	4	Dourados (MS)
Espiroplasma	6	Dourados (MS)
Espiroplasma	9	Dourados (MS)
Espiroplasma	18	Dourados (MS)
Fitoplasma	18	Assis (SP)
Fitoplasma	22	Assis (SP)
Fitoplasma	91	Assis (SP)
Fitoplasma	99	Assis (SP)
Fitoplasma	78	Capão Bonito (SP)
Fitoplasma	82	Capão Bonito (SP)
Fitoplasma	153	Capão Bonito (SP)
Fitoplasma	157	Capão Bonito (SP)
Fitoplasma	235	Jardinópolis (SP)
Fitoplasma	24	Sete Lagoas (MG)
Fitoplasma	5B	Sete Lagoas (MG)
Fitoplasma	8B	Sete Lagoas (MG)
Fitoplasma	10B	Sete Lagoas (MG)
Fitoplasma	2	Dourados (MS)

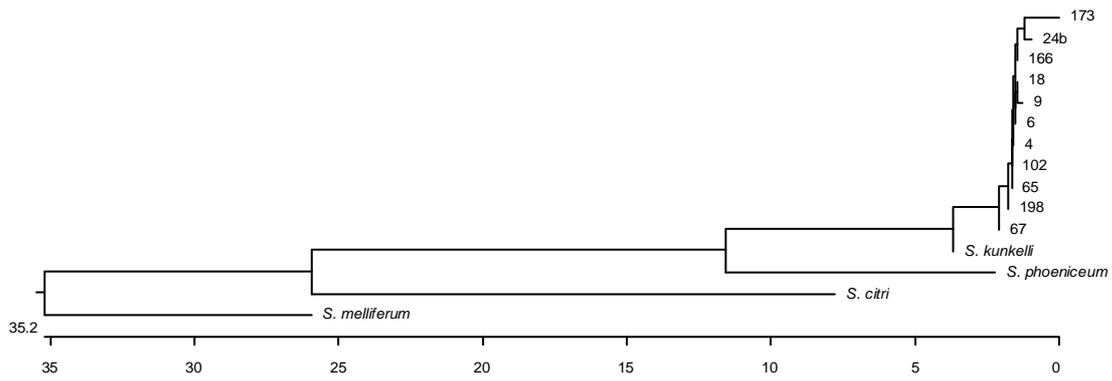


Figura 2. Árvore filogenética baseada na seqüência do gene da espiralina de isolados de *S. kunkelii* listados na Tabela 1 e das demais espécies de *Spiroplasma* descritas por Foissac et al. (1997), utilizando as seqüências depositadas no GenBank.