



ANÁLISE DE RFLP EM ISOLADOS DE *Spiroplasma kunkelii* UTILIZANDO GENE DA ESPIRALINA COMO SONDA

Castanheira, ALM¹; Carneiro, NP²; Souza, IRP²; Oliveira, CM²; Lana, UGP²; Gomes, EA²; Oliveira, E²; Jardim, SN²; Paiva, E²

¹Departamento de Genética, UFLA, Lavras, MG, ²Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

al.castanheira@uol.com.br

Palavras Chave: milho, espiroplasma, enfezamento

O enfezamento pálido (Corn stunt disease), causado por *Spiroplasma kunkelii* é uma importante doença do milho e sua incidência tem aumentado significativamente no Brasil, com expressivos danos econômicos. O espiroplasma pertence à classe Mollicutes, caracterizando-se pela ausência de parede celular, forma helicoidal e motilidade, e apresenta genoma de tamanho reduzido e baixo conteúdo de G+C. A forma helicoidal do espiroplasma está relacionada com a espiralina, sua principal proteína de membrana. Com o objetivo de verificar a existência de polimorfismo de restrição no gene da espiralina e em suas regiões flanqueadoras, realizou-se análise de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), em quatro isolados de espiroplasma mantidos em planta e provenientes das regiões de Dourados-MS, Itumbiara-GO, Sete Lagoas-MG e Uberlândia-MG. Para a obtenção da sonda de RFLP, o DNA dessas plantas infectadas foi submetido a um PCR com os primers CSSR₆ e CSSF₂, específicos para detecção de espiroplasma, os quais amplificaram um fragmento de 500 pb do gene da espiralina. Esse fragmento foi isolado de gel de agarose, utilizando-se QIAquick Gel Extraction Kit, posteriormente foi clonado, sequenciado e marcado para ser utilizado como sonda. O DNA genômico das plantas de milho infectadas com isolados de espiroplasma, confirmado por PCR com os primers específicos e por análise de sintomas típicos na planta, foi digerido com cinco enzimas de restrição – BamHI, DraI, HinfI, MseI e XmnI, e os fragmentos gerados foram separados em gel de agarose 0,8%. Posteriormente esses fragmentos foram transferidos para membrana de nylon. A membrana contendo os fragmentos de DNA foi, então, hibridizada com a sonda, e verificou-se que para cada uma das enzimas testadas, o padrão de restrição foi o mesmo para os diferentes isolados, demonstrando que tanto para o gene da espiralina quanto para as suas regiões flanqueadoras, não houve diferença no polimorfismo de comprimento dos fragmentos gerados. Isto é, não foi possível detectar variabilidade genética, o que está de acordo com a literatura, onde a análise da sequência de nucleotídeos do gene da espiralina de *S. kunkelii* tem sugerido que esta é conservada.

Apoio Financeiro: CNPq