

Variabilidade genética de fitoplasma em populações de milho

Newton P. Carneiro¹, Eliane A. Gomes¹, Isabel R. P de Souza¹, Andrea A. Carneiro¹, Fabiana Guzmás², Elizabeth de Oliveira¹ e Luis Conci².

¹Embrapa Milho e Sorgo, e-mail: newtonc@cpmms.embrapa.br; ²INTA Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal Argentina

INTRODUÇÃO

A expansão da cultura do milho em meados da década de 80, para épocas não tradicionais de cultivo, ocasionou um aumento na incidência de doenças. Dentre estas, o enfezamento vermelho, que tem ocorrido de forma freqüente, comprometendo a produção de grãos. Os sintomas mais característicos dessa doença são o avermelhamento foliar acompanhado pela redução na altura da planta, perfilhamento basal e axilar, espigas extranumerárias e colmos afinados. No milho, essa doença é causada pelo fitoplasma, o qual coloniza o floema da planta, sendo a cigarrinha, *Daulbulus maidis*, o inseto vetor desse fitopatógeno. Até o momento, não foi desenvolvido um meio de cultura para o cultivo *in vitro* do fitoplasma, o que dificulta o estudo deste microorganismo. Tradicionalmente, doenças causadas por fitoplasma têm sido identificadas através dos sintomas induzidos na planta hospedeira. A utilização de técnicas da biologia molecular tem contribuído para a identificação e classificação preliminares de fitoplasma. Dessa forma, vários destes têm atingido a posição de *Candidatus status* (Lee et al., 2000; IRPCM 2004), o que indica um estado taxonômico provisório em nível de espécie (Seemuller et al., 2002). Pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de sintomas na planta hospedeira. Entretanto, por meio de diferentes técnicas da biologia molecular, organismos não cultiváveis têm sido sequenciados (Liefting e Kirkpatrick, 2003; Melamed et al., 2003; Garcia-Chapa et al., 2004). Em 2004 (Oshima et al., 2004) e em 2005 (<http://www.oardc.ohio-state.edu/phytoplasma/genome.htm>) foram publicados os dois primeiros sequenciamentos de genomas completos de fitoplasmas. Esses resultados impulsionaram um grande avanço sobre os requerimentos nutricionais e a filogenia desse microorganismo. Através da técnica de PCR, empregando-se primers específicos, tem sido possível detectar uma grande variedade de fitoplasmas (Davis e Prince, 1994; Goodwin et al., 1994). O desenvolvimento de cultivares de milho resistentes ao enfezamento vermelho é a forma mais eficaz de controle da doença. E o conhecimento da variabilidade genética do patógeno é importante em um programa de melhoramento na seleção de genótipos resistentes. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar molecularmente e avaliar a diversidade genética de fitoplasmas do milho, do Brasil e da Argentina, utilizando-se os *primers* universais P3 e P7.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras e extração de DNA

Folhas de milho com sintomas de enfezamento vermelho foram coletadas de 10 plantas de diferentes regiões produtoras de milho: Sete Lagoas-MG e Capão Bonito-SP (CB157 e CB158) no Brasil e Villa del Rosário-Córdoba (VRC7282), Chaco (Chaco6829), Tucumán (Tucuman6851; Tucuman9462; Tucuman6677; Tucuman6843) e Villa Trinidad-Santa Fé (VTSF7082) na Argentina. As folhas foram imersas em nitrogênio líquido e

posteriormente armazenadas a -80°C . O DNA total das folhas sintomáticas foi extraído segundo o protocolo de Doyle e Doyle (1991).

Reação de PCR

O par de *primers* universais P3 (5'-GGATGGATCACCTCCTT-3') e P7 (5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'), descrito por Schneider et al., 1995 foram utilizados para amplificar a seqüência parcial do gene 16S rRNA, o espaçador intergênico 16S-23S, do gene do tRNA-Ile e a seqüência parcial do gene 23S rRNA (**Figura 1**). O volume final, 50 μL , da reação de amplificação continha 20 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; 2 mM MgCl_2 ; 0,1 mM de cada dNTP; 1 U de *Taq* DNA polimerase e 50 ng DNA. As amostras foram amplificadas no termocilador PTC-200 (MJ Research, USA), programado para 94°C por 1 min, seguido de 40 ciclos (94°C , 1 min; 50°C , 1 min, 72°C , 1 min 30 s) e uma extensão final de 7 min a 72°C . Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1.5% usando tampão TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0). Os géis foram corados com brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e os fragmentos visualizados sob luz ultra-violeta e as imagens capturadas em um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene, USA).

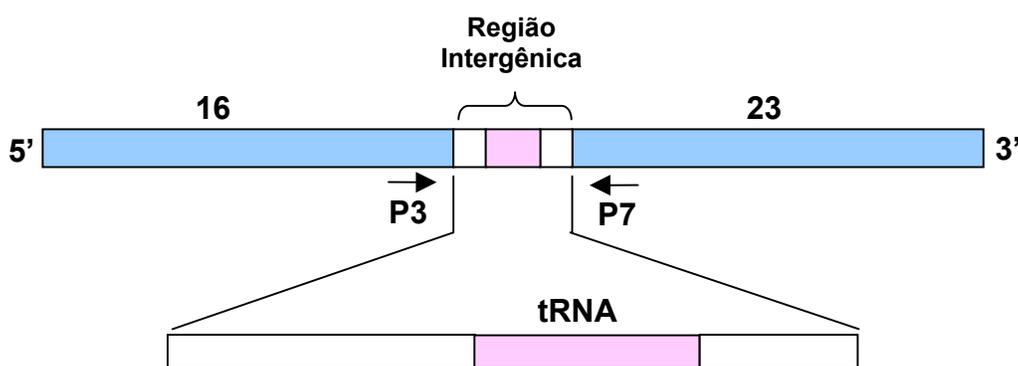


Figura 1 – Diagrama representando o operon rDNA incluindo o 16S e 23S rDNA e a região intergênica. As setas indicam a posição dos *primers* P3 e P7 (modificado de Smart et al., 1996).

Seqüenciamento do DNA

Os produtos da amplificação por PCR foram eluídos do gel de agarose e purificados utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction kit de acordo com a recomendação do fabricante (Qiagen, Alemanha). Os fragmentos purificados foram clonados no vetor TOPO TA (Invitrogen, Brasil) e utilizados para transformar células de *Escherichia coli* competentes. Foram feitas as extrações de plasmídeos de 8 colônias de cada transformação contendo insertos que foram seqüenciados utilizando os *primers* P1 e P7 e o kit *Big Dye Terminator v. 3.1* (Applied Biosystems). O seqüenciamento automático das amostras foi realizado no ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, USA).

Análise das seqüências de DNA

As seqüências foram editadas retirando-se as regiões do vetor, comparações foram realizadas entre as seqüências de uma mesma amostra e entre amostras. Estas comparações foram realizadas empregando-se o programa Clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw/) e o método da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA) utilizando o programa Mega 3.1

(www.megasoftware.net/). Para a obtenção da fita consenso de cada localidade foi utilizado o programa SeqMan 3.57 (E.I. DuPont Demours & Co).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação da região intergênica 16S-23S do rDNA, com os primers P3 e P7, resultou em um fragmento de 321 pares de bases (pb) de cada um dos isolados analisados (**Figura 2**). Para a caracterização molecular da diversidade genética dos fitoplasmas, provenientes de amostras de milho de um mesmo local e de diferentes regiões do Brasil e da Argentina, os fragmentos amplificados foram clonados e seqüenciados. Foram obtidas 80 seqüências de DNA correspondendo a 8 clones de cada uma das 10 diferentes localidades de coleta de folhas de milho com sintomas de enfezamento.

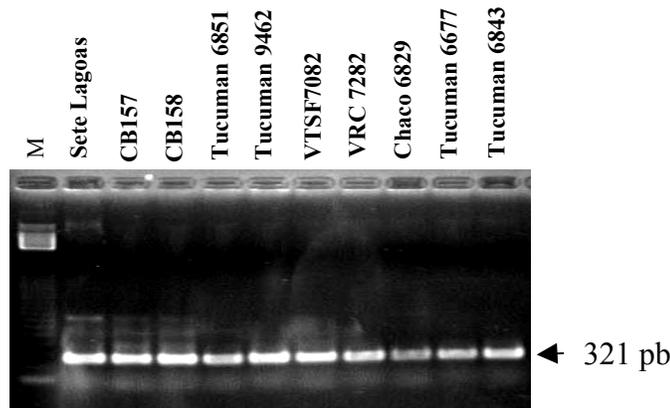


Figura 2 – Gel de agarose 1,5% contendo os fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando os primers P3 e P7 da região intergênica 16S e 23S rDNA de fitoplasma de 10 amostras de plantas contendo sintomas de fitoplasma de diferentes localidades. M = marcador 100 pb.

As seqüências, de uma mesma amostra de um mesmo local, foram agrupadas para a obtenção da fita consenso (**Figura 3**). Considerando-se todas as amostras, dentre os 321 nucleotídeos da seqüência amplificada, em apenas três posições detectou-se alguma diferença.

	20		66	227	231
CB158	GTGCGCCCTT	AGTTCCTTTG	ATTTTT-AACAATAY	
Tucuman9462
Tucuman6843T...
Tucuman6677T...
SeteLagoasT...
VTSF70821T...T
VRC7282-...T
Chaco6829T...T
Tucuman6851T...C
CB157	S.....T...C

Figura 3 – Seqüências consenso da região intergênica 16S-23S do rDNA de isolados de Fitoplasma de 10 localidades diferentes do Brasil e da Argentina mostrando apenas as diferenças. Y = C ou T (pirimidina), S= G ou C

Considerando-se as oito seqüências obtidas, de uma mesma amostra de um mesmo local, verificou-se que existe uma variabilidade genética, entretanto, muito pequena (**Tabela 1**). As maiores distâncias foram dentro da amostra de Capão Bonito157 (Brasil), variando de 0,0320 a 0,04613 enquanto que as menores distâncias foram apresentadas pela amostra de Tucuman6677 (Argentina), variando de 0,000 a 0,00313. Os resultados da Figura 1 e Tabela 3 demonstram que as seqüências de fitoplasma de regiões do Brasil e da Argentina são muito semelhantes. Em um trabalho semelhante utilizando os primers R16R2 e R16F2 que amplifica uma região dentro do gene 16S, Gomes et al, (2004) verificaram uma menor variabilidade das seqüências entre isolados de diferentes regiões do Brasil confirmando a alta conservação dentro da região 16S. A utilização dos primers P3 e P7, que amplificam a região intergênica 16S e 23S, tem mostrado trazer maior informação das estirpes utilizadas. Nesse trabalho foi demonstradas diferenças dentro da mesma localidade assim como entre localidades e também foi verificado (dados não mostrados) de que não existe relação entre distribuição geográfica e a diversidade dos isolados.

Tabela 1 – Distância genética das seqüências de uma mesma amostra de um mesmo local.

Amostra	Menor distância genética	Maior distância genética
Sete Lagoas	0.0000	0.01906
Capão Bonito157	0.0320	0.04613
Capão Bonito158	0.0063	0.02229
Tucuman6851	0.0038	0.02721
Tucuman9462	0.0000	0.00314
VTS7982	0.0000	0.00314
VRC7282	0.0037	0.01870
Chaco6829	0.0000	0.00911
Tucuman6677	0.0000	0.00313
Tucuman6843	0.0000	0.00651

LITERATURA CITADA

Davis , R. E. Prince. J. P., 1994. Molecular diagnosis of mycoplasma-like organism (MLOs) in plants: a review. *Appl. Bioche. Biotech.* 48, 23-26.

Doi, Y. et al. (1967) Mycoplasma- or PLT group-like organisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 33, 259–266

Garcia-Chapa, M. et al. (2004) PCR-mediated whole genome amplification of phytoplasmas. *J. Microbiol. Methods* 56, 231–242.

Gomes, E.A, Jardim, S.N., Guimarães, C. T., Souza, I.R.P. e Oliveira, E. 2004. Genetic variabilidade od Brazilian phytoplasma e spiroplasma isolated from maize plants. *Pesq. Agropec. Bras.* 39(1):61-65.

Goodwin, P. H., Xue, B.G., Kuske, C.R., Sears, M. K. 1994. Amplification of plasmid DNA to detect plnat pathogenic mycoplasma-like organism. *Ann. Appl. Biol.* 124:27-36.

IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group et al. (2004) ‘Candidatus Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1243–1255.

Lee, I., Davis, R E.,1 e Gundersen-Rindal, D. E. PHYTOPLASMA: Phytopathogenic Mollicutes *Annu. Rev. Microbiol.* 2000. 54:221–55

Liefting, L.W. and Kirkpatrick, B.C. (2003) Cosmid cloning and sample sequencing of the genome of the uncultivable mollicute, Western X-disease phytoplasma, using DNA purified by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 203–211.

Melamed, S. et al. (2003) Identification and characterization of phytoplasmal genes, employing a novel method of isolating phytoplasmal genomic DNA. *J. Bacteriol.* 185, 6513–6521.

Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung HY, Wei W, Suzuki S, Arashida R, Nakata D, Miyata S, Ugaki M, Namba S. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat Genet.* 2004 Jan;36(1):27-9. Epub 2003 Dec 7.

Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K.-H., Seemuller, E., and Kirkpatrick, B. C.. Phytoplasma-Specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region *Applied and Environmental Microbiology*, 1996 (62) 2988–2993

Seemuller, E. et al. (2002) Mycoplasmas of plant and insects. In *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas* (Razin, S. and Herrmann, R., eds), pp. 91–116, Kluwer Academic.