

## CULTIVO DE ISOLADOS GEOGRÁFICOS DE *Spiroplasma kunkelii* WHITCOMB *in vitro*

ANA LUIZA M. CASTANHEIRA<sup>1</sup>, ISABEL R.P. DE SOUZA<sup>2</sup>, ELIZABETH DE OLIVEIRA<sup>2</sup>, CHARLES MARTINS DE OLIVEIRA<sup>2</sup>, EDILSON PAIVA<sup>2</sup>

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

Palavras-chave: enfezamento pálido, espiroplasma, cultivo *in vitro*, milho

### INTRODUÇÃO

O *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb é um microorganismo procarioto, sem parede celular, helicoidal e que apresenta movimentação intensa. É encontrado no floema de plantas de milho, sendo a cigarrinha, *Daulbulus maidis*, o inseto vetor desse fitopatógeno (Whitcomb & Hackett, 1989). O espiroplasma causa o enfezamento pálido, uma doença de grande potencial destrutivo, que ocasiona redução no tamanho das plantas, aparecimento de estrias cloróticas nas folhas e queda acentuada na produção de grãos (Oliveira et al., 2004).

O desenvolvimento de cultivares de milho resistentes ao enfezamento pálido é a forma mais eficaz de controlar essa doença. O conhecimento da variabilidade genética do patógeno é importante em um programa de melhoramento na seleção de genótipos resistentes. Tais estudos devem contar com isolados de espiroplasma oriundos de diferentes regiões produtoras de milho, e para isso é necessária a manutenção desses isolados. Os objetivos deste trabalho foram obter isolados geográficos de *S. kunkelii* em regiões produtoras de milho e ajustar as condições para o cultivo e a manutenção desses isolados *in vitro*.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de espiroplasma foram adquiridos em plantas de milho apresentando sintomas típicos de enfezamento pálido, cultivadas nas regiões de Dourados (MS), Itumbiara (GO), Sete Lagoas (MG) e Uberlândia (MG). Para a aquisição foram utilizadas ninfas sadias da cigarrinha *D. maidis*. As plantas selecionadas receberam sacos de confinamento, confeccionados em tecido voil. Cerca de 1.000 ninfas sadias foram colocadas em cada saco de confinamento, para se alimentarem nessas plantas durante um período de aquisição de dois dias. Após o período de aquisição do patógeno pelas ninfas, estas foram mantidas em gaiolas de criação, no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo, por um período de 28 a 30 dias, correspondente ao período latente do espiroplasma na cigarrinha. Após esse período, as cigarrinhas infectantes foram utilizadas para a transmissão do espiroplasma para plântulas sadias, de cultivar de milho pipoca susceptível. Para confirmar a infecção das plantas de milho por espiroplasma, foram utilizados *primers* específicos para espiroplasma e para fitoplasma em reações de PCR multiplex (Lee et al., 1995; Barros et al., 2001). Para o teste foi extraído DNA genômico da nervura central das folhas de milho seguindo-se o protocolo de Sanghai-Marooof et al. (1984), com modificações.

Para o cultivo *in vitro* do *S. kunkelii* foi utilizado o meio de cultura artificial LD8A3 (Lee & Davis, 1989). A parte da planta utilizada foi a nervura central, por seu grande conteúdo de células de espiroplasma no floema.

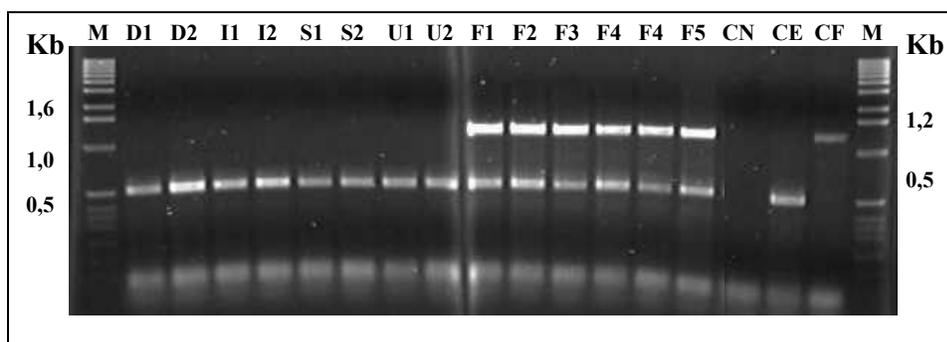
Para cada um dos isolados geográficos foram utilizadas três plantas infectadas para a extração e cultivo do fitopatógeno. Cada uma das plantas foi denominada 1, 2 e 3. No total,

para cada extração, foram obtidos 12 tubos com espiroplasma em meio de cultura, os quais foram incubados em estufa a 30 °C na ausência de luz.

Para detectar o crescimento de espiroplasma nos meios de cultura, foram utilizadas as metodologias de Western Blotting (Burnette, 1981; Purcino et al., 2004), PCR Multiplex (Lee et al., 1995; Barros et al., 2001) e observação em microscópio óptico de contraste de fase.

## RESULTADOS

De cada uma das plantas originalmente infectadas pelos diferentes isolados, aquelas que apresentaram sintomas tiveram folhas coletadas para a realização do PCR multiplex, a fim de confirmar a presença do espiroplasma. Os resultados são apresentados na **Figura 1**. As plantas submetidas à inoculação que manifestaram sintomas típicos de enfezamento pálido apresentaram resultado positivo para infecção apenas com o espiroplasma.



**FIGURA 1.** Resultado da análise de PCR Multiplex para detecção de *Spiroplasma kunkelii* em plantas de milho sintomáticas para enfezamento pálido. M = Marcador molecular Ladder 1Kb; D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; E = Espiroplasma F = Fitoplasma; CN = Controle Negativo; CE = Controle Espiroplasma; CF = Controle Fitoplasma. Banda de 1,2 Kbp = Fitoplasma; Banda de 0,5 Kbp = Espiroplasma. Números diferentes indicam plantas diferentes para cada isolado.

O período médio para crescimento do espiroplasma *in vitro* foi de aproximadamente 20 semanas. Os isolados de Sete Lagoas apresentaram um crescimento ligeiramente mais rápido, tendo sido observada grande população de espiroplasmas na 17ª semana (**Tabela 1**).

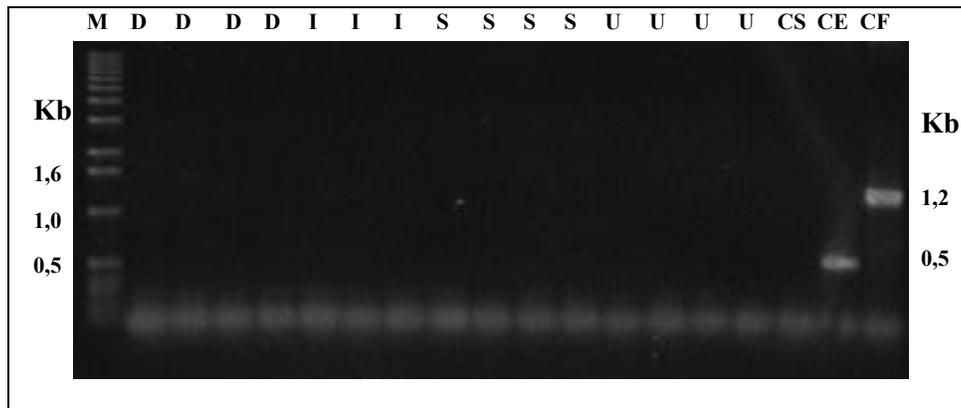
**TABELA 1.** Período de tempo, em dias, necessário ao crescimento dos diferentes isolados de espiroplasma em meio de cultura. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia. Números diferentes indicam plantas fonte diferentes.

PERÍODO DE CRESCIMENTO			
ISOLADO	DIAS	ISOLADO	DIAS
D1	140	S1	126
D2	140	S2	126
D3	147	S3	126
I1	154	U1	147
I2	147	U2	147
I3	147	U3	147

Não foi possível fazer a quantificação precisa dos espiroplasmas em meio de cultura. O uso de Câmara de Neubauer também não foi possível, pois para essa análise é utilizada

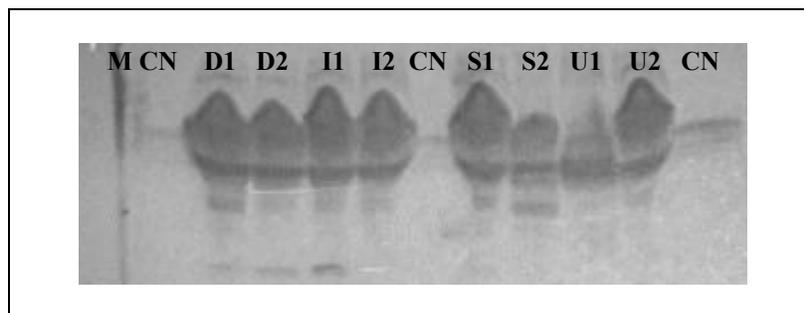
magnificação de 400X no microscópio de contraste de fase, e a observação do espiroplasma somente é possível com magnificação de 1.000X.

Os resultados da reação de PCR multiplex para detecção de espiroplasma em meio de cultivo encontram-se na Figura 2. Apenas os controles positivos para espiroplasma e fitoplasma foram amplificados.

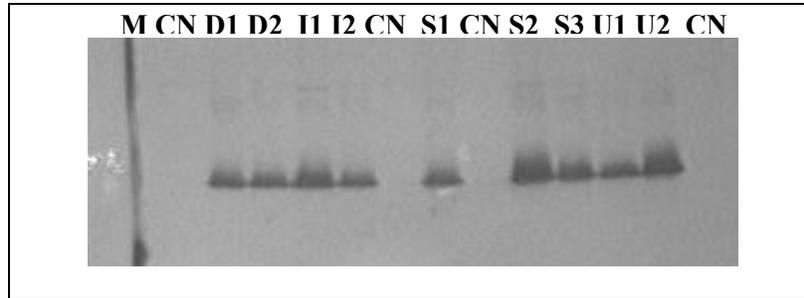


**FIGURA 2.** Resultado da análise de PCR multiplex para detecção de *Spiroplasma kunkelii* em meio de cultivo. M = Padrão de peso molecular; D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; CS = Controle Planta Sadia; CE = Controle Espiroplasma; CF = Controle Fitoplasma.

Os resultados do Western Blotting encontram-se nas **Figuras 3 e 4**. As amostras de extrato de folhas infectadas por espiroplasma e as amostras coletadas de meios de cultivo foram positivas para a presença do espiroplasma.



**FIGURA 3.** Resultados do Western Blotting para detecção de espiroplasma em meios de cultivo. M = Marcador; D= Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; CN = Controle Negativo. Números diferentes indicam meios de cultura diferentes.



**FIGURA 4.** Resultados do Western Blotting para detecção de espiroplasma em extratos de folhas infectadas com o fitopatógeno. M = Marcador; D= Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; CN = Controle Negativo. Números diferentes indicam plantas diferentes.

## DISCUSSÃO

O processo de extração do espiroplasma para cultivo *in vitro*, foi todo realizado em câmara de fluxo laminar com materiais estéreis. As primeiras tentativas de extração foram feitas em câmara onde ocorria manipulação de *Escherichia coli*. Uma vez que o meio LD8A3 (Lee & Davis, 1989) é extremamente rico, é fácil a ocorrência de contaminação. Quando as extrações passaram a ser realizadas em câmara de fluxo laminar, exclusiva para esses isolamentos, os problemas com contaminações maciças dos meios de cultivo foram sanados.

A manipulação excessiva dos meios de cultura, para acompanhamento do crescimento do espiroplasma também contribuiu para o processo de contaminação, e uma estratégia para evitar que isso ocorra é o uso de duplicatas, mantendo um tubo lacrado e utilizando o outro para recolhimento das alíquotas de meio para análise.

O crescimento do espiroplasma em meio de cultivo levou, em média, 20 semanas para a obtenção de uma quantidade de espiroplasmas suficiente para a extração de DNA. Uma explicação, para este período longo, seria o fato de que esses isolados tropicais nunca haviam sido cultivados *in vitro*. É possível que o tempo para crescimento possa ser reduzido à medida que cada isolado seja sucessivamente multiplicado *in vitro*, selecionando na população do patógeno as variantes mais adaptadas ao meio de cultura.

É provável que o crescimento *in vitro* do isolado de espiroplasma de Sete Lagoas, em relação aos isolados geográficos de outras localidades, tenha ocorrido mais rápido devido ao fato de que esse isolado está sendo mantido *in vivo* sucessivamente em apenas uma cultivar de milho, usando sempre a mesma população de cigarrinhas, proporcionando maior homogeneidade ao isolado.

A análise de PCR multiplex para detecção de espiroplasma em meio de cultivo foi negativa para todas as amostras, exceto para os controles positivos. Uma possível explicação para esse resultado é o fato de ter sido utilizado meio de cultura com espiroplasma, e não o DNA do patógeno, e também algum componente do meio de cultura possa ter inibido a reação de PCR. Além disto, os meios tinham apenas 10 semanas, é provável que a quantidade de espiroplasmas no meio ainda fosse pequena.

A técnica de Western Blotting foi eficaz na detecção do espiroplasma em meio de cultivo com 11 semanas. Essa técnica pode, ser empregada para análises dos meios de cultivo, a fim de determinar se está havendo crescimento do espiroplasma, mesmo que a quantidade de células no meio de cultura seja pequena. Os anticorpos anti-espiroplasma reconhecem os

antígenos presentes na membrana celular, permitindo a detecção de células intactas ou rompidas.

## LITERATURA CITADA

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.

BURNETTE, W. N. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 112, p. 195-203, 1981.

LEE, I. M.; BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; GUNDERSEN, D. E. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 6, p. 728-735, June 1995.

LEE, I. M.; DAVIS, R. E. Serum-free media for cultivation of spiroplasma. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 35, n. 12, p. 1092-1099, Dec. 1989.

OLIVEIRA, E.; DUARTE, A. P.; CARVALHO, R. V. de; OLIVEIRA, A. C. de. Molicutes e vírus na cultura do milho no Brasil: caracterização e fatores que afetam sua incidência. In: Oliveira, E.; Oliveira, C. M. (eds) **Doenças em milho. Molicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília, DF, 2004. p. 17-34.

PURCINO, A. A. C.; PINTO, A.C.; SOUZA, I.R.P.; OLIVEIRA, C.M.; OLIVEIRA, E. Detecção de molicutes por testes sorológicos. In: Oliveira, E.; Oliveira (eds), C. M. **Doenças em milho. Molicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília, DF, 2004. p. 17-34.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 81, n. 24, p. 8014-8019, Dec. 1984.