

USO DE MARCADORES RAPD NO ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Ralstonia solanacearum* DO ESTADO DO AMAZONAS

Solange de Mello Véras - FUA
Luisa S. Semem Martins - UFRPE
Luadir Gasparotto - Embrapa Amazônia Ocidental
Ana Fabíola da S. Coelho - IDAM
Arlena M. Guimarães Gato - DFA/AM
Alberto Villarinhos - Embrapa Mandioca e Fruticultura

INTRODUÇÃO

O moko da bananeira, causado por *Ralstonia solanacearum* raça 2, é a principal doença dos bananais implantados em ecossistema de várzea e, mais recentemente, também em ecossistema de terra-firme, cuja alta incidência atinge 35% das touceiras, num total de, aproximadamente, trezentas mil touceiras.

A bactéria *R. solanacearum* representa um grupo heterogêneo de patógeno, que tem sido subdividido em raças segundo a gama de hospedeiros e biovars, baseados na sua capacidade de utilização de carbono (HAYWORD, 1991).

Várias pesquisas, utilizando técnicas de marcadores moleculares, têm sido desenvolvidas com este complexo grupo de bactéria fitopatogênica, como as de COOK *et al.* (1980), GILLINGS *et al.* (1993) e SMITH *et al.* (1995). Entretanto, especificamente com a raça 2, que ataca a bananeira, as informações são incipientes.

OBJETIVO

Identificação da variabilidade genética de seis isolados de *R. solanacearum* raça 2 oriundos de áreas de produção do Amazonas, através da técnica de marcadores RAPD.

MATERIAL E MÉTODOS

- Local de realização da pesquisa:

Laboratórios de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Ocidental e de biologia molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Foram utilizados, como fonte de DNA genômico, seis isolados de *R. solanacearum* raça 2; oriundos de áreas produtoras do Amazonas (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Ralstonia solanacearum* raça 2 obtidos de bananeiras em diferentes localidades do Amazonas.

Isolado	Cultivar	Órgão	Localidade
01	Prata	Fruto	Pres. Figueiredo
02	Prata	Fruto	Codajás
03	Prata	Pseudocaule	Manacapuru
04	Prata	Pseudocaule	Irاندuba
05	Pacovan	Pseudocaule	Manacapuru
06	Maçã	Rizoma	Manacapuru

- Extração do DNA, realizada segundo protocolo de AUSUBEL *et al.* (1987) modificado:
- . Cultivo dos isolados em meio BD mais extrato de levedura por um dia;
- . Centrifugação de 1,5 ml da suspensão de cada isolado a 14.000 rpm por dez minutos;
- . Descarte do sobrenadante, ressuspensão dos 'pellets' em 567 ml de tampão TE, 30 ml de SDS a 10%, 3 ml de proteinase K e incubação a 37°C por 1,5 hora;
- . Adição de 100 ml de NaCl 5M e 80 ml de CTAB/NaCl, homogeneização e incubação a 65 °C por 90 minutos;
- . Adição de 780 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), homogeneização e centrifugação por cinco minutos;
- . Remoção do sobrenadante e adição de igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), homogeneização e centrifugação por cinco minutos;
- . Remoção do sobrenadante, adição de 0,6 do volume de isopropanol, incubação a -70°C por 20 minutos e centrifugação por 25 minutos;
- . Lavagem do DNA com um ml de etanol a 70%, centrifugação por dez minutos e descarte do sobrenadante;
- . Ressuspensão do 'pellet' em tampão TE por uma hora.
- . Reações de Amplificação e Separação dos Fragmentos

As reações apresentaram volumes finais de 25µl, contendo Tris - HCl 10 mM (pH 8,3) KCl 50 mM, Mg Cl₂ 4,0 mM, os desoxinucleotídeos dATP, dCTP, dGTP e dTTP sem mM, 1,5 unidades de Taq polimerase e 0,4 mM do 'primer'. Os 'primers' usados foram OPAB 2, OPAB 4, OPAB 5, OPAB 6, OPAE 2, OPAE 9, OPAE 10, OPAE 12, OPAE 13, OPAE 15, OPAE 17, OPAE 18, OPM 5, OPT 6, OPT 7 e OPS 3. Os produtos de amplificação foram analisados em géis de agarose 1,2 %, contendo 10mg/ml de brometo de etídio, imerso em tampão TBE.

- Análise dos Produtos Polimórficos

Realizada através dos dados de similaridade genética expresso em frações, segundo o Índice de Jaccard.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados relativos aos graus de similaridade genética dos 6 isolados de *R. solanacearum* segundo o Índice de Jaccard apresentam frações de fragmentos de DNA. Considerando os 22 marcadores genéticos entre os materiais, verifica-se que os isolados mais próximos entre si foram: ISO 2 e 5, ISO 1 e 4 e, ISO 5 e 6, sendo os isolados mais distantes ISO 3 e 6 (Tabela 2).

De acordo com o dendrograma da Figura 1, uma distância genética média de 57% pode distinguir três grupos geneticamente próximos: 1.º grupo ISO 1 e 4; 2.º grupo ISO 3 e 3.º grupo ISO 2, ISO 5 e 6. Há evidências de que a proximidade entre os grupos esteja relacionada ao local de obtenção das amostras.

Os resultados foram significativos para a análise do grau de similaridade entre os isolados, evidenciando uma considerável proximidade entre si. É provável que essa proximidade esteja relacionada com o local de obtenção das amostras. Dessa forma, HARTUNG *et al.* (1988), ao analisarem, pela técnica PCR, 28 strains de *Pseudomonas solanacearum* isolados de tomate e batata e de diferentes regiões geográficas, encontraram seis grupos distintos de seqüências genéticas e alta correlação entre o grau de similaridade local de coleta das amostras.

Tabela 2 - Matriz de similaridade genética entre os isolados de *Ralstonia solanacearum* a partir dos padrões de bandas de DNA por RAPD dos 'primers' OPAE 13, OPM 5 e OPT 7.

Isolados	ISO 1	ISO 2	ISO 3	ISO 4	ISO 5	ISO 6
ISO 1	1,000					
ISO 2	0,500	1,000				
ISO 3	0,545	0,500	1,000			
ISO 4	0,818	0,591	0,636	1,000		
ISO 5	0,455	0,773	0,364	0,455	1,000	
ISO 6	0,500	0,636	0,500	0,500	0,773	1,000

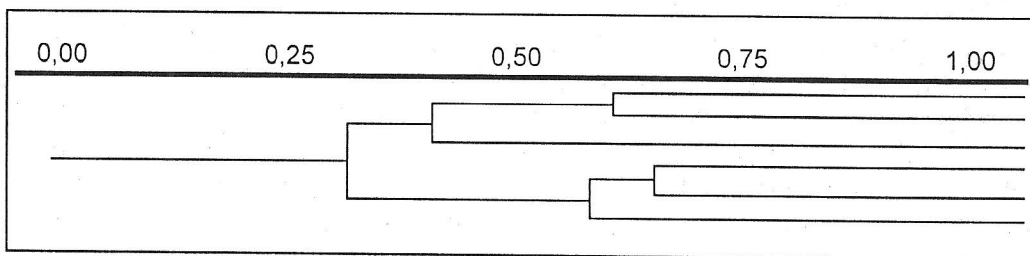


Figura 1 - Dendrograma da matriz de similaridade genética obtida pelo método UPGMA a partir dos isolados de *Ralstonia solanacearum*.

LITERATURA CITADA

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., Et al. **Current protocols in molecular biology**. Greene Publishing Associates - Wiley Interscience, New York, N. Y., 1991.

COOK, D., BARLOW, E., SEQUEIRA, L. **Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms that specific virulence and hypersensitive response**. Mol. Plant. Microbe Interact, 1989. 2: 113-121.

GILLINGS, M., FAHY, P., DAVIES, C. **Restriction analyses of an amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum***. Lett. Appl. Microbiol., 1993. 17: 44-48.

HARTUNG, F., WERNER, R. et al. **Highly specific PCR diagnosis to determine *Pseudomonas solanacearum* strains of different geographical origins**. Theoret. Appl. Genet., 1988. 96: 797-802.

HAYWORD, A.C. **Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum***. Annu. Rev. Phytopatol., 1991. 29: 65-87.

SMITH, J.J., OFFORD, L.C. et al. **Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenia**. Appl. Environ. Microbiol., 1995., 61: 4263-4268.