

## Variabilidade genética de *Ralstonia solanacearum* utilizando marcadores AFLP.

Demosthenes L.C.R.<sup>1</sup>, Bentes J.L.S.<sup>1</sup>, Costa Neto P.Q.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>.Universidade Federal do Amazonas.

Emails: liacristine@ufam.edu.br, jlbentes@ufam.edu.br, senaneto16@yahoo.com.br

### Resumo

*Ralstonia solanacearum* é considerada uma das mais importantes bactérias fitopatogênicas do mundo, causa a murcha bacteriana, uma doença que afeta várias espécies de plantas cultivadas, ornamentais e silvestres causando perdas econômicas. O marcador AFLP foi utilizado para analisar a variabilidade genética entre 30 isolados de *R. solanacearum* provenientes de áreas produtoras de hortaliças de quatro municípios no Estado do Amazonas. As seis melhores combinações de *primers* geraram um total de 432 *loci* polimórficos. Os dados dos perfis eletroforéticos dos marcadores AFLP foram analisados para a similaridade, variando de 47 *loci* à 103 na combinação E+AT/M+C. O coeficiente de similaridade de Jaccard estimado entre os 30 isolados avaliados variou de 0,01 à 0,98. O dendrograma gerado pelo método UPGMA separou os isolados em seis grupos com coeficiente de correlação cofenética no valor de  $r = 0,98$ . O marcador AFLP foi eficaz em analisar a variabilidade genética entre indivíduos de *R. solanacearum*.

**Palavras-chave:** murcha bacteriana, pimentão, marcador AFLP

### Introdução

A bactéria *R. solanacearum* é uma espécie heterogênea, que apresenta grande diversidade fenotípica e genotípica, refletindo numa ampla variedade de hospedeiros, agressividade e adaptação aos diferentes climas, influenciada pelo genótipo do hospedeiro, *habitat* natural e práticas agrícolas utilizadas (Castillo e Greenberg, 2007). *R. solanacearum* é tradicionalmente classificada em raças e em biovars (Hayward, 1994). No entanto, em virtude da heterogeneidade da espécie os cientistas sugerem um

novo conceito, que não se trata de uma espécie, mas sim de um complexo de espécies, definido como um conjunto de espécies fortemente relacionadas (Fegan e Prior, 2005). Fegan e Prior (2005), analisaram a sequência espaçadora intergênica (ITS) 16S-23S e propuseram uma nova classificação hierárquica na qual, a diversidade existente na espécie foi subdividida em quatro níveis taxonômicos: espécie, filotipo, sequevar e clone. Os filotipos são determinados por PCR-Multiplex, de acordo com as variações de tamanho da sequência na região ITS, existindo quatro filotipos identificados: filotipo I (estirpes da Ásia); filotipo II (Américas); filotipo III (África); e filotipo IV (Indonésia, Austrália, Japão e Filipinas). No filotipo II está a estirpe mais conhecida como *R. solanacearum* raça 3 biovar 2 que ataca várias solanáceas, incluindo tomate, pimentão e batata (Castillo e Greenberg 2007). Cada filotipo é subdividido em grupos menores denominados sequevares, que se refere a uma sequência altamente conservada dentro da região sequenciada do gene da endoglucanase (*egl*). Já os clones são identificados por técnicas como AFLP que permitem identificar diferenças genéticas em outras áreas do genoma.

O objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade genética de isolados de *R. solanacearum* utilizando marcadores AFLP, para obter informações que sirvam de subsídio para o estabelecimento de medidas de manejo da murcha bacteriana no Amazonas.

### **Material e métodos**

Foram utilizados 30 isolados de *R. solanacearum* provenientes da coleta de plantas com sintomas de murcha bacteriana dos municípios de Iranduba, Manacapuru, Manaus e Presidente Figueiredo do Estado do Amazonas. Caules de plantas com sintomas foram levados ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas, onde foi feito o isolamento da bactéria, testes bioquímicos de identificação da espécie e de patogenicidade.

O DNA genômico de cada um dos isolados obtidos foi extraído conforme metodologia descrita por Rosa (2008), com modificações e a quantificação foi realizada em gel de agarose 0,8% por comparações visuais de sua fluorescência com aquelas de padrões de massa molecular conhecida de DNA do fago lambda nas concentrações de 50 e 100 ng.µL<sup>-1</sup>, utilizando o corante *gel red* (Uniscience) para coloração das amostras, que foram diluídas em água ultra-pura, padronizadas a uma concentração de 10 ng.µL<sup>-1</sup> e armazenadas à - 20 °C até o uso.

As condições de AFLP foram utilizadas seguindo os procedimentos propostos por Vos *et al.* (1995). Foram realizadas reações de digestão do DNA com a combinação das enzimas de restrição *EcoRI/MseI*, em seguida a ligação dos adaptadores, seguido das reações de pré-amplificação utilizando 6 conjuntos de iniciadores complementares às seqüências dos sítios das enzimas de restrição com um nucleotídeo seletivo e por último as reações de amplificação seletiva onde foram testadas 25 combinações de *primers*. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% realizada no sistema de eletroforese Sequi-Gen GT sob potência constante de 50 W por três horas. O padrão de bandas apresentado nos géis foi analisado visualmente, quantificando a presença de bandas entre 50 a 450 pb. *Locos* polimórficos foram analisados para presença/ausência de banda, representados por 1 e 0, respectivamente. Os dados binários foram submetidos à análise de variância pelo programa Genes (Cruz 2006). A similaridade genética entre os genótipos foi analisada através do coeficiente de Jaccard (Jaccard 1901). A matriz de similaridade foi analisada através do método UPGMA – *Unweightes Pair-group Method with Arithmetic Average*. A consistência das ramificações do dendrograma foi verificada por meio da amostragem repetitiva de dados com 1000 repetições, utilizando o programa Genes (Cruz 2006).

### **Resultados e discussão**

Os testes realizados para a identificação bioquímica dos isolados produziram os resultados esperados para *R. solanacearum*. A análise dos marcadores AFLP obtidos identificou que das 24 combinações de *primers* testadas, variando de 1 a 3 nucleotídeos combinados, seis foram selecionadas por terem gerado um perfil de bandas satisfatório com boa intensidade e quantidade de *loci* polimórficos identificados, evidenciando o alto nível de polimorfismo dos isolados analisados. As seis combinações de *primers* utilizadas apresentaram um total de 433 bandas sendo cinco monomórficas e 428 polimórficas, variando de 47 *loci* na combinação E+AAC/M+CAC até 103 na combinação E+AT/M+C. A variação genética entre os isolados estimada através do coeficiente de similaridade de Jaccard variou de 0,01 à 0,98. Os isolados mais relacionados entre si, MAO31 e PRESFIG33 apresentaram coeficiente de similaridade genética de 0,98.

A partir da matriz de similaridade foi gerado o dendrograma obtido pelo método UPGMA sendo possível separar os isolados em seis grupos. No grupo I estão os isolados MAO31, PRESFIG33, MAO30, MAO26, IRAND27, MAO28, MANAC19,

IRAND20, IRAND13, MANAC14, MANAC9, IRAND11, IRAND6, MANAC15, IRAND3, MAO29, o valor de *bootstrap* de 100% confirma a estabilidade desta ramificação.

No grupo II ficaram os isolados MANAC8 e MANAC16, com valor de *bootstrap* de 100%, demonstrando que está ramificação é consistente, aparecendo sempre que as análises foram efetuadas pelo programa. O grupo III foi formado pelos isolados IRAND10, IRAND12, IRAND1, MANAC2 e PRESFIG35. O grupo IV foi representado pelos isolados IRAND17, MAO34, IRAND21 e MANAC24. Os grupos V e VI foram formados por apenas um isolado cada um IRAND4 e MANAC23, respectivamente, que permaneceram isolados dos demais grupos.

O coeficiente de correlação cofenética, valor calculado entre a matriz de dados binários e o dendrograma gerado, representa a confiabilidade dos dados e apresentou valor de  $r = 0,98$ , confirmando a robustez do dendrograma obtido.

A utilização de testes bioquímicos se baseia em características metabólicas e a habilidade em utilizar certos substratos, produção ou redução de substâncias, temperatura ótima de crescimento, reações específicas a certos corantes entre outros. Kelman (1954) avaliou a característica de isolados de *R. solanacearum* em vários tipos de meios e relatou que colônias normais quando em meio contendo tetrazólio, as colônias normais são fluídas brancas com o centro rosado, enquanto colônias avirulentas são completamente vermelhas. Os resultados obtidos concordam como os obtidos por Lemessa e Zeller (2007) que utilizaram testes bioquímicos clássicos para a identificação e caracterização de isolados de *R. solanacearum*.

A análise AFLP dos isolados de *R. solanacearum* foi efetiva em detectar a variabilidade genética deste complexo, observada pelo grande número de ramificações detectadas no dendrograma. A análise obtida pelos *primers* selecionados mostrou que aqueles que continham as bases seletivas A, C e T foram mais efetivas do que as outras combinações, pois apresentaram perfis eletroforéticos mais informativos quanto à diversidade entre os isolados estudados, ou seja, as combinações de *primers* com a presença dessas bases apresentou maior número de bandas.

Em estudo utilizando marcadores AFLP, Kositrana *et al.* (2002) avaliaram a diversidade genética de *R. solanacearum* isolados de diversos hospedeiros na Malásia e Tailândia e encontraram um nível de similaridade de 30% entre as estirpes desses países. Os autores verificaram ainda a separação em três grupos que foram correlatos às biovars das estirpes, diferente do resultado que foi obtido com os isolados do presente

estudo, onde não foi possível correlacionar os grupos com as biovars das estirpes utilizadas, possivelmente por se tratarem todos os isolados obtidos de solanáceas e apenas dois biovars.

A análise dos coeficientes de similaridade gerados permitiu verificar que a variabilidade genética observada entre os isolados foram causadas pelo perfil genético de cada isolado e não pela procedência dele ou hospedeiro, uma vez que a maior diversidade foi encontrada entre os isolados, formando grupos com isolados de diferentes procedências. Resultado semelhante foi obtido por Jeong *et al.* (2007) que analisaram a variabilidade genética de 125 isolados de *R. solanacearum*, sendo 109 oriundos de províncias da Coreia e 16 de outras localidades do mundo através de marcadores moleculares AFLP. Obtiveram 110 bandas polimórficas e obtiveram um dendrograma com a formação de dois grupos, no qual o primeiro grupo conseguiu agrupar todos os isolados originários da Coreia e do Japão, enquanto no segundo grupo ficaram agrupados os isolados dos países restantes. O estudo não permitiu correlacionar a variabilidade genética com a origem geográfica do isolado, do hospedeiro ou biovar. Algumas inconsistências também foram detectadas quando somente as biovars foram consideradas na análise, agrupando conjuntamente isolados de raças e biovars diferentes. O único grupo consistente foi o que agrupou todos os isolados da raça 3 biovar 2.

A análise dos coeficientes de similaridade gerados permitiu verificar que a variabilidade genética observada entre os isolados foram causadas principalmente pelo perfil genético de cada isolado e não pela procedência dele ou hospedeiro, uma vez que a maior diversidade foi encontrada entre os isolados sendo formado grupos com diferentes procedências.

### **Conclusão**

O marcador AFLP distinguiu a variabilidade genética existente entre os isolados de *R. solanacearum* utilizando seis combinações de primers com a formação de seis grupos.

### **Referências**

Castillo JA, Greenberg JT (2007) Evolutionary Dynamics of *Ralstonia solanacearum*. Applied and Environmental Microbiology: 1225-1238.

Creste S, Tulmann neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*: 19: 299-306.

Cruz CD (2006) *Program Genes: multivariate analysis and simulation*. UFV, Viçosa, MG.

Fegan M, Prior P (2005) How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? In Allen C, Prior P, Hayward AC, eds. *Bacterial wilt: The Disease and the Ralstonia solanacearum* Species Complex. Saint Paul, MN, USA. APS Press.

Hayward A.C (1994) Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In Hayward AC, Hartman GL, Eds.. *Bacterial wilt: The disease and its causative agente Pseudomonas solanacearum*. Wallingford. CAB.

Jeong Y, Kim J, Kang Y, Lee S, Hwang I (2007) Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*, *Plant disease* 91: 1277-1287.

Kelman A (1954). The relationship of patogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44: 693-695.

Kositrana K, Julapark C, Frederick RD, Schadd NW (2002) Genetic variability of *Ralstonia solanacearum* strains from pepper (*Capsicum annum*) in Thailand and their genetic relationship to strains from other hosts, *Thai Journal of Agricultural Science* 35: 415-426.

Lemessa F, Zeller W (2007) Isolation and characterisation of *Ralstonia solanacearum* strains from *Solanaceae* crops in Ethiopia, *Journal of Basic Microbiology* 47: 40–49.

Rosa DD (2008) Método rápido de extração de DNA de bactérias, *Summa Phytopathologica* 34: 259-261.

Vos PR, Hogers M, Bleeker M, Van De Lee Reijans T, Hornes M, Fritjers A, Pot, J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids research* 23: 4407-4414.