



Evidência molecular da ocorrência de fitoplasma associado ao superbrotamento do maracujazeiro em cinco estados brasileiros

Luiz F.C. Ribeiro, Eliane G. Silva & Ivan P. Bedendo

Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ, Universidade de São Paulo, Cx. Postal 09, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil

Autor para correspondência: Ivan P. Bedendo, e-mail: ipbedend@esalq.usp.br

RESUMO

Fitoplasmas são procariotos sem parede celular e habitantes de floema, associados a doenças que ocorrem em diversas espécies cultivadas. O maracujazeiro é uma espécie tipicamente tropical, bastante explorada no território brasileiro. Dentre os fatores que podem trazer danos à cultura estão as doenças e, entre elas, o superbrotamento. A doença tem sido registrada somente no Brasil e, não raro, pode causar danos relevantes e se constituir em fator limitante da produção. É uma doença associada a fitoplasma e foi descrita pela primeira vez nos estados do Rio de Janeiro e Pernambuco, na década de oitenta. Nos anos de 2005 e 2006, plantas sintomáticas originárias de algumas áreas dos estados de São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro, Sergipe e Bahia foram analisadas, suspeitas de estarem infectadas por fitoplasma. A amplificação de um fragmento de DNA de 1,2kb, obtida por “nested” PCR com os primers 16mF2/mR1 e 16F2n/R2, revelou a presença de fitoplasma nos tecidos das plantas sintomáticas amostradas em todas as regiões. A detecção molecular do agente permitiu confirmar a diagnose feita com base nos sintomas; demonstrar a associação constante entre planta doente e fitoplasma, complementando trabalhos anteriores baseados em microscopia eletrônica; além de evidenciar, atualmente, a presença deste agente nos estados da Bahia, Paraná, Rio de Janeiro, Sergipe e São Paulo.

Palavras-chave: *Passiflora edulis f. flavicarpa*, mollicutes, diagnose.

ABSTRACT

Molecular evidence of phytoplasma associated with witches' broom on passion fruit in five Brazilian States

Phytoplasmas are cell wall-less prokaryotes and phloem-inhabitants associated with diseases that affect several crops. Passion fruit is a tropical plant species cultivated in various Brazilian regions. Diseases are among the factors that may cause damage to this crop, and witches' broom is a very important one. This disease, associated with a phytoplasma, has been reported only in Brazil, where it was described in Rio de Janeiro and Pernambuco States at the beginning of the 1980's. In 2005-2006, symptomatic plants suspected of phytoplasma infection were sampled in areas located in São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro, Sergipe and Bahia. Amplification of DNA fragments of 1.2kb from nested PCR primed by the pairs 16mF2/mR1 and 16F2n/R2 revealed the presence of phytoplasma in the tissue of plants from all sampled regions. Molecular detection of the agent allowed confirmation of the diagnosis based on the symptomatology; demonstrated the strong association between diseased plants and a phytoplasma, confirming previous investigations based on electron microscopy; and revealed the present occurrence of the agent in the States of Bahia, Paraná, Rio de Janeiro, Sergipe, and São Paulo.

Keywords: *Passiflora edulis f. flavicarpa*, Mollicutes, diagnosis.

O maracujazeiro (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) é uma planta originária das regiões tropicais da América, abrangendo diversas espécies cujos frutos são utilizados para consumo humano. As espécies mais cultivadas no Brasil e no mundo são o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), maracujá-roxo (*Passiflora edulis*) e maracujá-doce (*Passiflora alata*). O maracujá-amarelo é responsável por mais de 95% da produção brasileira de maracujá, sendo principalmente processado para o preparo de suco, enquanto o maracujá-doce é destinado para o mercado de fruta fresca, devido a sua baixa acidez.

O Brasil é o maior produtor mundial, apresentando uma produção de 467 mil toneladas em uma área de

aproximadamente 33 mil hectares. A Bahia, atualmente, é o principal estado produtor da fruta, com cerca de 77 mil toneladas, seguido por São Paulo com 58 mil toneladas, Sergipe, com 33 mil toneladas e Minas Gerais, com 25 mil toneladas (Agrianual, 2006). A cultura do maracujá é de condução relativamente fácil, apesar de necessitar de um investimento para sua implantação. O pequeno produtor encontra nesta cultura a base de sustentação de sua família e de sua propriedade, pois a produção pode ser comercializada durante o ano inteiro. Dessa maneira, a cultura do maracujá tem desempenhado uma função social importante, garantindo um nível de emprego razoável no campo e na indústria.

Vários fatores ligados à produção podem afetar

negativamente a cultura do maracujazeiro como, por exemplo, as doenças. Diversos patógenos afetam o maracujazeiro no Brasil, entre eles os fitoplasmas (Pio Ribeiro & Mariano, 1997). Estes agentes foram relatados em associação com uma doença conhecida como superbrotamento, registrada pela primeira vez no início da década de oitenta em plantios realizados no município de Araruama/RJ e na região metropolitana de Recife PE (Kitajima, 1981). Os fitoplasmas foram observados com o auxílio de microscópio eletrônico de transmissão, na forma de corpúsculos pleomórficos nos elementos de tubo crivados de tecidos de plantas que exibiam sintomas de clorose generalizada, superbrotamento de ramos, folhas de tamanho reduzido e cálice gigante, entre outros. O superbrotamento foi registrado somente no Brasil e juntamente com uma doença viral conhecida por endurecimento dos frutos tem sido considerado como responsável pelo baixo rendimento da cultura e pelo abandono de áreas de plantio no estado de Pernambuco (Pio-Ribeiro & Mariano, 1997).

No período de 2005-2006, amostras de plantas de maracujá-amarelo suspeitas de estarem infectadas por fitoplasma, provenientes de algumas áreas dos estados de São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro, Sergipe e Bahia, foram analisadas. Os sintomas apresentados pelas plantas se expressavam por clorose foliar de intensidade variável, proliferação de pequenos ramos na região dos nós, encurtamento de internódios, redução no tamanho de folhas, flores com cálice aumentado, e queda anormal de flores e frutos, formando um quadro típico da doença denominada superbrotamento. O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de demonstrar a presença de fitoplasma nestas amostras, através do uso da técnica molecular de “nested” PCR, visando confirmar a diagnose feita com base na sintomatologia.

As plantas sintomáticas de maracujá amarelo foram originárias das seguintes localidades: Piracicaba/SP (2 amostras), Vera Cruz/ SP (4 amostras), Jaú/ SP (3 amostras), Adamantina/SP (4 amostras), Santana do Itararé/PR (5 amostras), Araruama/RJ (6 amostras), Aracajú/SE (3 amostras) e da região do Recôncavo Baiano/BA (4 amostras). Plantas de maracujá sadias, originárias de sementes, serviram como controle negativo, enquanto amostras de plantas de chuchu (*Sechium edule*) e de milho (*Zea mays*), infectadas pelos fitoplasmas do superbrotamento e do enfezamento, respectivamente, foram usadas como controles positivos. Para cada amostra analisada foram usados 2g de tecido fresco composto de folhas e ramos novos. A extração de DNA total para ser usado como molde nas reações de PCR foi feita de acordo com os procedimentos descritos na literatura (Lee *et al.*, 1993). A amplificação foi conduzida por “nested” PCR, usando-se os oligonucleotídeos (“primers”) R16mF2/mR1 (Gundersen & Lee, 1996) na primeira reação. Os produtos amplificados foram diluídos em água na proporção de 1:50 e usados como molde nas reações de re-amplificação, conduzidas com os oligonucleotídeos R16F2n/R2 (Gundersen & Lee, 1996). As reações de PCR

foram preparadas segundo metodologia descrita na literatura (Lee *et al.*, 1993) e continham 19,0 µL de água deionizada-destilada; 0,5 µL de cada nucleotídeo - solução a 20 pmol/µL- (dCTP, dATP, dGTP, dTTP); 2,5 µL de tampão PCR; 0,15 µL de Amplitaq 5U/µL (Invitrogen); 1,0 µL de DNA total extraído da planta (25ng/µL). Todas as reações de PCR foram processadas em aparelho termociclador programado para 35 ciclos, sendo que cada ciclo compreendeu uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 3 minutos. Uma etapa inicial de 1 minuto a 94°C e uma final a 72°C por 7 minutos foram também utilizadas (Lee *et al.*, 1993). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e, após coloração com brometo de etídeo, foi feita a visualização em transiluminador de luz ultravioleta. O marcador molecular foi 1kb *ladder* (Life Technologies).

A aplicação de “nested” PCR permitiu a detecção de fitoplasma em todas as plantas sintomáticas naturalmente infectadas, coletadas nas diferentes localidades. A presença de fitoplasma foi evidenciada pela visualização de bandas, correspondentes a fragmentos de DNA de aproximadamente 1,2kb, típicas para fitoplasmas quando se utiliza os referidos oligonucleotídeos (Figura 1). Os resultados foram consistentemente confirmados para cada uma das amostras analisadas, através de três alíquotas do DNA total extraído de cada amostra e usadas como molde em reações de PCR conduzidas individualmente. Amplificações foram também obtidas para os padrões positivos representados pelo DNA extraído de plantas de chuchu e de milho. Não houve amplificação para o padrão negativo representado pelo DNA extraído de planta sadia.



FIG. 1 - Detecção de fitoplasma em amostras de folhas e ramos novos de plantas sintomáticas de maracujá amarelo coletadas em diversas localidades. Na figura se encontra uma amostra representativa de cada localidade. As bandas correspondem a fragmentos de 1,2kb amplificados a partir do 16S rDNA do fitoplasma, através de “nested” PCR, conduzido com os pares de oligonucleotídeos 16mF2/mR1 e 16F2n/R2. Colunas: M – Marcador molecular 1kb *ladder*; Ch – Controle positivo: amostra de chuchu com fitoplasma do superbrotamento; Ms – Amostra de planta de maracujá sadia; Colunas de 1 a 8: amostras de plantas sintomáticas de maracujá: 1 – Piracicaba/SP; 2 – Jaú/SP; 3 – Adamantina/SP; 4 – Vera Cruz/SP; 5 – Santana do Itararé/PR; 6 – Araruama/RJ; 7 – Aracajú/SE; 8 – Recôncavo Baiano/BA, Mi – Controle positivo: amostra de milho com fitoplasma do enfezamento; M – Marcador molecular 1kb *ladder*.

Relatos anteriores sobre a ocorrência de fitoplasma em associação com plantas de maracujazeiro que exibiam sintomas de superbrotamento foram feitos, no início das décadas de 1980 e 1990, com base na observação de corpúsculos pleomórficos nos elementos de floema, revelados pela microscopia eletrônica (Kitajima, 1981; Chagas & Moraes de Oliveira, 1987; Costa *et al.*, 1983; Lima Neto *et al.*, 1993). O presente trabalho complementa aqueles anteriores e confirma uma associação constante entre os sintomas de superbrotamento do maracujazeiro e a presença de fitoplasma. Além disto, evidencia, na atualidade, a presença freqüente do fitoplasma em cultivos implantados em diferentes locais do estado de São Paulo, bem como em algumas áreas de diversos estados brasileiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrianual (2006) Anuário estatístico do Brasil. São Paulo SP. FNP Consultoria & Comércio.
- Chagas CM, Moraes de Oliveira J (1987) Ocorrência do superbrotamento do maracujá no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 12:29. (Resumo)
- Costa AF, Kitajima EW, Shimada HK, Carvalho MG, Couto FA (1993) Superbrotamento do maracujazeiro associado a organismo do tipo micoplasma em Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira* 18(Supl.):328.
- Gundersen DE, Lee IM (1996) Ultrasensitive detection of phytoplasma by nested-PCR assays using two universal primers pairs. *Phytopatologia Mediterrânea* 35:144-151.
- Kitajima EW (1981) O irizado do chuchuzeiro e o superbrotamento do maracujá: duas enfermidades associadas a microorganismos do tipo micoplasma constatadas nos Estados do Rio de Janeiro e Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira* 6:115-122.
- Lee IM, Hammond RW, Davis RE (1993) Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:834-842.
- Lima Neto VC, Lima MLRZC, Maranhão TC (1983) Superbrotamento do maracujazeiro associado a microorganismos do tipo micoplasma em cultura do Município de Morretes PR. *Revista do Setor de Ciências Agrárias (Curitiba)* 5:83-86.
- Pio-Ribeiro G, Mariano RLR (1997) Doenças do maracujazeiro. In: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM (Eds.) *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 3. Ed. São Paulo SP. Agronômica Ceres. pp. 525-534.

*Recebido 23 Janeiro 2008 - Aceito 25 Junho 2008 - TPP 8007
Editor Associado: F. Murilo Zerbini*