

Incidência de fitoplasma associado ao dendezeiro com Amarelecimento Fatal no estado do Pará

Caroline do Amaral Souza (PIBITI/CNPq - UFRA, caroline_agro07@yahoo.com.br), Alessandra de Jesus Boari (Embrapa Amazônia Oriental, ajboari@cpatu.embrapa.br), Adila do Socorro Vidal da Costa (DTI/CNPq – Embrapa Amazônia Oriental, aca_vidal@hotmail.com), Pedro Fernando Lima Fernandes (Bolsista/EMBRAPA - UFRA, nandolima.agro@hotmail.com)

Palavras Chave: *Elaeis guineensis*, Fitoplasma, Amarelecimento Fatal.

1 - Introdução

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), palmeira de origem africana, é uma planta perene cultivada no Brasil desde o século XVII, inicialmente, na Bahia e depois no Pará, sendo este último, atualmente, o maior produtor de óleo de palma do Brasil, concentrando mais de 80% da área plantada com dendezeiros.

O óleo de dendê, que no Brasil está fortemente ligado à culinária baiana, é conhecido como *palm oil* no mercado internacional, onde ocupa o segundo lugar em volume comercializado, só perdendo para óleo de soja. É a oleaginosa cultivada de maior produtividade, chegando a produzir mais de 8 toneladas de óleo por hectare/ano. As características de planta perene, com produção distribuída durante todos os meses do ano, sem entressafas e alta produtividade, conferem a esta palmeira atributos de grande importância econômica, ecológica e social. É uma cultura agroindustrial, devendo a plantação estar sempre próxima da indústria de extração de óleo.

Como ocorre em todas as monoculturas extensivas, o cultivo do dendê também está sujeito a uma infestação acentuada de doenças e pragas, se constituindo, muitas vezes, como fator limitante à expansão das culturas. O Amarelecimento Fatal (AF) do dendezeiro é um problema de extrema importância para a economia dos países que cultivam essa oleaginosa, em particular para o Brasil, aonde vem causando perdas vultosas a partir de 1984, expandindo-se de forma avassaladora. No estado do Pará, mais de 5.000 hectares de dendezeiros foram erradicados por causa deste problema fitossanitário.

O AF se caracteriza inicialmente pelo ligeiro amarelecimento dos folíolos basais das folhas intermediárias, e mais tarde pelo aparecimento de necroses nas extremidades dos folíolos que evoluem para a seca total dessas folhas. Apesar de ser considerado o mais sério problema fitossanitário dessa palmácea no Brasil, o AF ainda tem causa desconhecida e não possui medidas de controle eficazes. Porém, a presença desses sintomas levou a suspeita da ocorrência de fitoplasma associado à doença, devido serem organismos procariotos, sem parede celular, pertencentes à classe Mollicutes, que tem por hábito se localizarem nos vasos de floema.

Com isso, este trabalho teve como objetivo detectar a presença de fitoplasma em plantas de dendezeiro em diferentes Municípios do estado do Pará por meio da técnica *Nested* RT-PCR.

2 - Material e Métodos

Para desenvolvimento da pesquisa foram utilizadas amostras de dendezeiros com e sem sintomas de AF, que foram coletadas nas agroindústrias Marborges, Denpasa, Agropalma, Dentauá e Projeto dendê-Natura, localizadas no estado do Pará, totalizando 102 amostras (Tabela I). Estas foram coletadas, catalogadas e levadas para o setor de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental.

Tabela I. Número de plantas analisadas por agroindústrias.

Agroindústrias	Nº de amostras
Marborges S/A	74
Agropalma	3
Dentauá S/A	6
DenpasaS/A	15
Projeto dendê-Natura	4
Total	102

Os ácidos nucleicos dos tecidos do dendezeiro foram extraídos como descrito por Gibbs & Mackenzie (1997). Pesaram-se 200 mg de amostras, que foram maceradas em solução de extração Wash buffer (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0, 2M NaCl) com β -mercaptoethanol, triturados em almofariz de porcelana gelado e o macerado foi colocado em microtubo. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, foi adicionado 800 μ l de CTAB (1,4M NaCl, 0,1M Tris-HCl pH 8,0, 2% CTAB), sendo a solução homogeneizada e incubada a 55°C por 30 minutos. Em seguida foram feitas duas lavagens com clorofórmio/iso-amílico (24:1) e para formação do pellet (sedimentação dos ácidos nucleicos) adicionou-se 700 μ l álcool isoamílico e 40 μ l acetato de amônia que incubados por 20 minutos no ultrafreezer. Após o descarte do isopropanol lavou-se o pellet com 1mL de etanol 70%. O pellet foi ressuspenso em 50 μ l de água ultrapura autoclavada. Este material foi armazenado em freezer -20°C.

Para detecção de fitoplasma fez-se a *Nested* RT-PCR conforme Boari et al (2010). Primeiramente fez-se o RT-PCR onde foram utilizados os pares de oligonucleotídeos (*primers*) R16mF2/R16mR1, com um volume final de 25 μ l, compreendendo 100ng de DNA, Tampão 1X, 2,8mM de MgCl₂, 0,8mM de dNTPs, 0,5 μ M de cada *primer*, 1 U de Taq. DNA Polimerase, 1U da enzima RT-AMV. A reação então foi levada ao termociclador onde se cumpriu um ciclo com as seguintes condições: 70°C por 10 minutos, 4°C por 1 minuto; 42°C por 1 hora e 30 minutos, para atuação da RT-AMV, etapa de transcrição reversa para a obtenção de cDNA a partir de

RNA. Em seguida, foram utilizados 30 ciclos, onde cada ciclo foi representado por uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 min., uma de anelamento a 55°C por 1 min. e uma extensão a 72°C por 1 min. e 30seg. (5 min. no ciclo final). O produto desta reação foi diluído em uma proporção de 1:30 em água destilada e deionizada esterilizara. Para os iniciadores R16F2n/R2, utilizou-se um programa de 35 ciclos com temperatura de anelamento de 50°C por 1 min., e as demais condições foram iguais às da PCR inicial.

Para análise dos resultados utilizou-se a eletroforese em gel de agarose 1%, visualizados em forma de bandas, onde foram observadas em transiluminador de luz ultravioleta, após coloração com GelRed. O controle positivo utilizado foi amostra de DNA de planta de milho com enfezamento, enquanto os padrões negativos foram representados pela água e por amostras de plantas de dendê assintomáticas provenientes de sementes (dendê Tenera). O marcador utilizado foi 1Kb Ladder (Invitrogen).

3 - Resultados e Discussão

A amplificação do 16S rDNA em *Nested* RT-PCR, com o uso dos *primers* universais, revelou a constante presença de fitoplasma em plantas de dendê que exibiam sintomas de amarelecimento fatal. Fragmentos de DNA de aproximadamente, 1,2kb foram amplificados, respectivamente, pelos pares de *primers* R16mF2/R1 e R16F2n/R2 e visualizados em forma de bandas em géis de agarose. As amplificações de 1,2kb também foram obtidas a partir do DNA de planta de milho infectado por fitoplasma e usadas como controle positivo, e não foram detectadas no controle negativo planta sadia Tenera proveniente da Embrapa Amazônia Ocidental - Amazonas (Figura I).

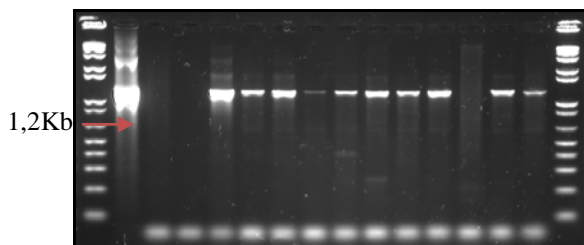


Figura I. Perfil eletroforético da detecção de fitoplasma em amostras sintomáticas de dendê por meio do *nested* RT-PCR conduzido com os *primers* R16mF2/R1 e R16F2n/R2. M, marcador de tamanho 1Kb Ladder; 1, controle positivo (milho); 2, controle negativo (planta sadia de dendê); 3, controle branco (água); 4 a 13, amostras de plantas sintomáticas de dendê, 14 planta assintomática de dendê.

No total de 102 plantas analisadas no estado do Pará, para a detecção de fitoplasmas, 79 foram plantas sintomáticas, 23 plantas assintomáticas (Tabela II). A presença de fitoplasma foi detectada em um total de 39 plantas de dendê, sendo 37 plantas com sintomas e 02 amostras sem sintomas, utilizando ácidos nucleicos extraídos de várias partes da planta.

Segundo Briosso, 2007 foram analisadas um total de 200 plantas, onde, 100 foram plantas com sintomas e 100 sem sintomas, detectando a presença de fitoplasma em

cinco plantas, sendo três amostras com sintomas e duas sem sintomas (comunicação pessoal, 2007).

No presente estudo, dentre as plantas sintomáticas, obtivemos 42 plantas que não foi detectado fitoplasma. Entretanto, este resultado pode estar relacionado com os vários tecidos analisados de cada planta; ou seja; os fatores responsáveis pelo falso negativo nas reações de amplificação podem ser devido à baixa concentração e/ou distribuição irregular de fitoplasmas nos tecidos, justificando, possivelmente, a não detecção de fitoplasmas em plantas com sintomas. Em 21 plantas assintomáticas, foi detectado fitoplasmas em duas amostras, assim, pode-se inferir que a infecção do dendezeiro poderia estar no estágio inicial.

Tabela II Relação de plantas de dendê amostradas no visando à detecção de fitoplasmas associados ao Amarelecimento Fatal.

Característica	Quant.	Procedência
Plantas sintomáticas	79	Benevides, Tomé-açu e Moju-PA
Plantas assintomáticas	23	Benevides e Moju-PA
Planta Sadia	03	Manaus-AM
Total	105	-

O fato de se ter detectado o fitoplasma em dendezeiro com AF por meio do *Nested*-PCR não se pode confirmá-lo como agente causal desta doença sem antes reproduzir o AF em mudas de dendê pela enxertia que se encontra em andamento na Embrapa Amazônia Oriental.

4 - Agradecimentos

À Embrapa, CNPq e FINEP pelo apoio financeiro e bolsas, e à Marborges S/A pelo apoio nos trabalhos de coleta de amostras e informações sobre o AF.

5 - Bibliografia

- ¹ Bastos, T.X.; Müller, A.; Pacheco, N. A.; Sampaio, S.M. N.; Assad, E.D.; Marques, A. S. Zoneamento de riscos climáticos para a cultura do dendezeiro no Estado do Pará. Rev. Bras. Agrometeorologia, v.9, n.3, (nº especial: zoneamento agrícola), p.564-570, 2001.
- ² Boari, A.J.; Costa, A.S.V.; Souza, C.A.; Bonfim, K. Transcrição reversa associado ao *Nested*-PCR para detecção de fitoplasma em dendezeiro com Amarelecimento Fatal. Anais de II Semana de Inovação e Criatividade Científica na Embrapa. 2010. CD room.
- ³ Müller, A.A.; Alves R.M. A dendeicultura na Amazônia brasileira. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1997. 44p. (documentos, 91).
- ⁴ Venturier, A.; Fernandes, W.R; Boari, A.J.; Vasconcelos, M.A. Relação entre ocorrência do amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) e variáveis ambientais no Estado do Pará.