

ORGANISMOS TIPO MICOPLASMA ASSOCIADOS AO SUPERBROTAMENTO
DO PICÃO*

J. VEGA¹. A.M.R. ALMEIDA² e A.S. COSTA¹

¹Seção de Virologia, Instituto Agrônomo, Campinas, SP.

²Centro Nacional da Pesquisa da Soja, EMBRAPA, Londrina, PR.

Aceito para publicação em 13/11/80)

RESUMO

Plantas de picão (*Bidens pilosa* L.) mostrando anomalias do tipo superbrotamento precedentes do Estado do Paraná, foram estudadas por microscopia eletrônica. Foi constatada a presença de corpúsculos tipo micoplasma nos tubos crivados do floema. São observadas duas formas destes microorganismos, uma globular, grande, com diâmetro entre 350 e 900 nm e outra forma pequena, pleomorfica, com diâmetro de 150–250 nm. A ultraestrutura destes organismos é discutida em relação a outros agentes fitopatogênicos que podem ser encontrados no floema.

(Fitopatologia Brasileira 6.029-033, 1981)

ABSTRACT

A Mycoplasma-like Organism Associated With Witches' Broom Disease
of *Bidens pilosa* L.

Plants of *Bidens pilosa* L. showing a malformation of the witches' broom type were collected in the State of Paraná and studied by electron microscopy. The presence of MLO

* Trabalho parcialmente financiado pela FINEP.

within the sieve tubes of infected plants was observed. The MLO appear in two forms: large globular bodies, electron lucent with diameters between 350 and 900 nm; and small pleomorphic bodies 150–250 nm in diameter. The ultrastructure of such organisms is discussed in relation to other phytopathogenic agents that may invade the phloem.

(Fitopatologia Brasileira 6:029–033, 1981)

INTRODUÇÃO

Os organismos tipo micoplasma tem sido observados associados a numerosas moléstias do tipo amarelo e superbrotamento no Brasil (Kitajima & Costa, 1979). A grande maioria dos casos reportados corresponde à observação de microorganismos nos tubos crivados do floema e eventualmente no parênquima floemático. Especial atenção merece a observação da ultraestrutura destes microorganismos para permitir a diferenciação dos denominados organismos tipo rickettsia, que também podem aparecer nos tubos crivados do floema (Maramorosch *et al.*, 1976).

Este trabalho refere-se a observação de corpúsculos tipo micoplasma em plantas de picão, (*Bidens pilosa* L.) com sintomas típicos de superbrotamento. Esta anomalia é bastante frequente nos estandes dessa invasora na área de Londrina, Estado do Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de plantas de picão com sintomas de superbrotamento foram coletadas na área de Londrina, PR., e conservadas em saco plástico 24–48h até seu processamento para exame ao microscópio eletrônico. Frag-

mentos de folha e pecíolos foram fixados numa mistura de glutaraldeído e formaldeído, 2,5% e 4% respectivamente em tampão fosfato 0,024M, pH 6,8 (Karnovsky, 1965). No fixador foi adicionado CaCl_2 2,5 mM e MgCl_2 2,5 mM. Após 2 horas a temperatura ambiente o material foi lavado em tampão e pós-fixado em tetróxido de osmio 1% no mesmo tampão, durante 14 hs. em geladeira. Após lavado, o material foi tratado durante 2 hs. numa solução de acetato de uranila 2% em água. Finalmente os espécimens, foram desidratados em gradiente de acetona, incluídos em Araldite-Epon (Mollenhanuer, 1964), seccionados com navalha de vidro e contrastados com citrato de chumbo segundo Venable & Coggeshall (1965).

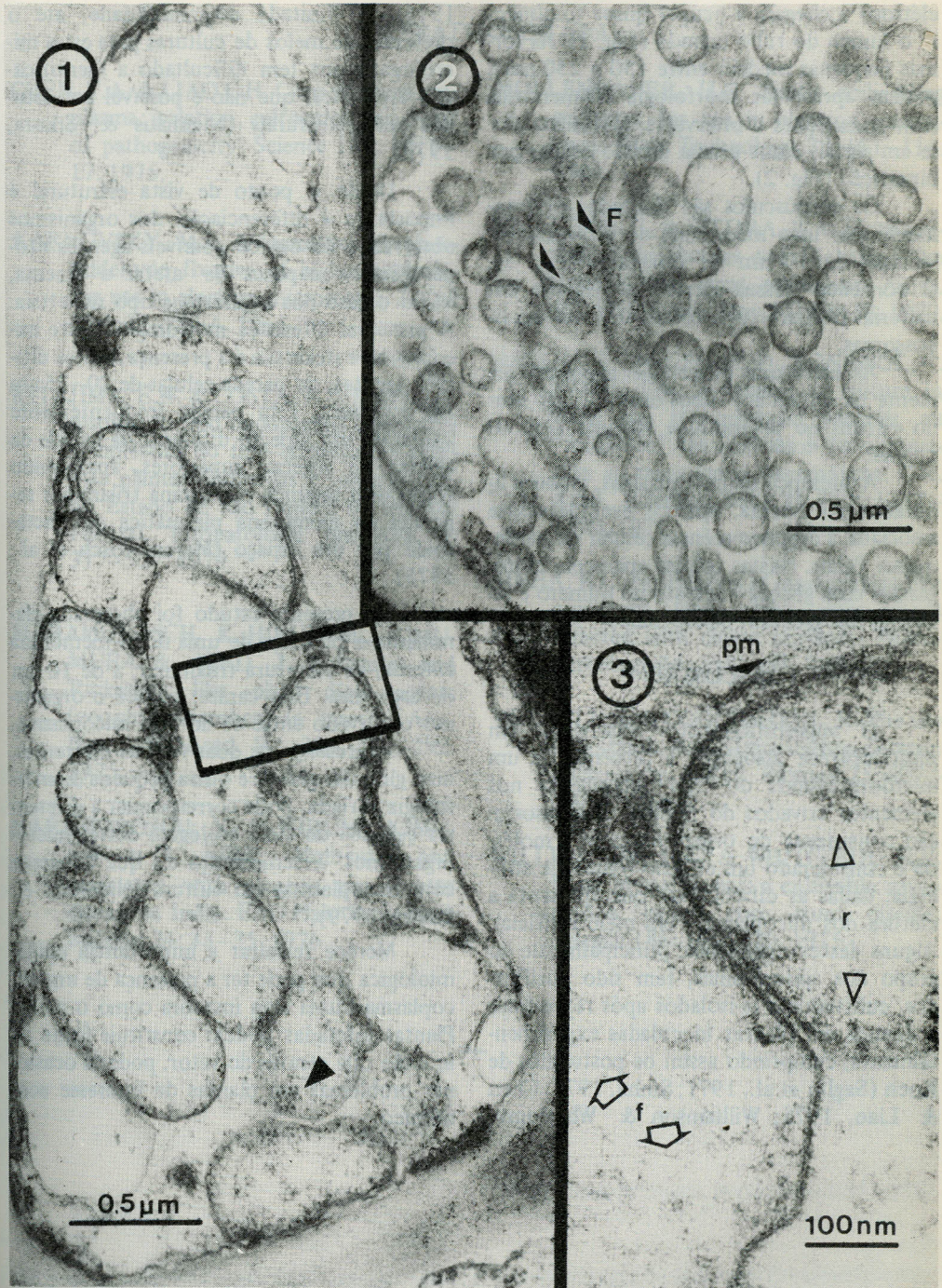
RESULTADOS

O exame ao microscópio eletrônico revelou a presença nos tubos crivados de organismos tipo micoplasmas. Estes organismos não aparecem na totalidade dos tubos crivados, mas sua presença é consistente e sempre associada aos mesmos tecidos. Duas formas diferentes foram observadas: formas globulares grandes e corpos pequenos pleomórficos. As formas globulares grandes medem 350–900 nm de diâmetro, são transparentes aos

Fig. 1. Corte transversal de um tubo crivado mostrando seu lumen quase totalmente ocupado por micoplasmas do tipo globular grande. A seta indica o conteúdo semelhante a ribossomas e a região delimitada pelo retângulo corresponde à figura 3.

Fig. 2. Micoplasmas do tipo pleomórfico pequeno, de forma esferoidal em sua maior parte. Aparecem algumas formas filamentosas (F) ou em aparente divisão (setas).

Fig. 3. Detalhe mostrando a maior aumento a estrutura trilaminar da membrana externa dos micoplasmas e o conteúdo de material fibrilar (f) e ribossomas (r). pm = plasmalema do elemento do tubo crivado.



elétrons e chegam a ocupar quase totalmente o lumen do tubo crivado (Fig. 1). As formas pequenas medem entre 150 e 250 nm e podem apresentar morfologia filamentosas com constrictões a intervalos, assemelhando-se em alguns casos a uma divisão celular por bipartição (Fig. 2).

Os corpúsculos são limitados externamente por uma membrana de estrutura trilaminar de 10 nm de espessura (Fig. 3). O conteúdo dessas estruturas consiste em material fibrilar e partículas que lembram ribossomas.

As estruturas observadas aparecem somente no lumen dos tubos crivados, não sendo visíveis no parênquima vascular nem no xilema.

A presença de micoplasmas, embora limitados ao floema, aparece eventualmente associada à degenerescência celular no parênquima foliar. Nestas células aparecem cloroplastos com grande aumento no número e tamanho dos glóbulos osmiofílicos.

DISCUSSÃO

O superbrotamento observado em picão aparece associado à presença de um microorganismo do tipo micoplasma nos elementos crivados do floema. Esta associação consistente do organismo com a moléstia é considerado um critério básico de etiologia, dadas as dificuldades que apresenta a cultura dos micoplasmas em meio artificial. Alguns destes organismos, principalmente do grupo dos spiroplasmata, tem sido purificados, cultivados e re-isolados após reproduzir a doença em plantas inoculadas experimentalmente, cumprindo assim os postulados de Koch (Saglio et al., 1971; Sinha, 1974; Chen & Liao, 1975; Williamson & Whitcomb,

1975). A limitada disponibilidade, até o presente, de meios de culturas para estes microorganismos tem dificultado a identificação específica, que não é possível por estudos ultraestruturais (Nienhaus & Sikora, 1979).

Desde o ponto de vista estrutural é importante a diferenciação dos organismos observados de outros possíveis agentes fitopatogênicos capazes de afetar o floema, como o caso dos organismos tipo rickettsia. A principal diferença morfológica entre micoplasma e rickettsia é a presença, nestes últimos agentes, de parede celular de 20–25 nm em espessura. Esta parede frequentemente apresenta um aspecto diferente da parede de células de vegetais superiores, aparecendo como uma segunda membrana trilaminar separada da membrana plasmática do bacteroide por um espaço (Maramorosch et al., 1975).

No presente estudo foi observada claramente a presença de uma única membrana externa, de estrutura trilaminar, a de 10 nm de espessura. Este caráter coloca o organismo observado entre os do tipo micoplasma.

A presença de duas formas diferentes, uma globular grande e outra pequena de morfologia variada, pode corresponder a diferentes estágios do ciclo biológico destes microorganismos, à semelhança do que acontece com micoplasmas em cultura (Nienhaus & Sikora, 1979).

Merece ressaltar a importância epidemiológica que pode ter a presença de um micoplasma numa erva invasora como o picão. Plantas infetadas podem constituir fonte de inóculo que através do vetor, poderia ocasionar problemas em plantas de interesse econômico.

LITERATURA CITADA

- CHEN, T.A. & LIAO C.H. Corn stunt spiroplasma: isolation, cultivation and proof of pathogenicity. *Science* 188: 1015-17. 1975.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 137 A. 1965.
- KITAJIMA, E.W. & COSTA. A.S. Microorganismos do tipo micoplasma associados a moléstias do tipo amarelo em algumas plantas cultivadas e ornamentais, no Estado de São Paulo e do Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira*. 4: 317-327. 1979.
- MARAMOROSCH, K, HIRUMI H., KIMURA & BIRD J. Mollicutes and Rickettsia like plant diase agents (zoophytomicrobes) in insects. *Ann. New York Acad. Sci.* 226: 276-292. 1975.
- MARAMOROSCH, K, HIRUMI, KIMURA & J. BIRD. Mollicutes and associated with pigeon pea rosette disease in India. *FAO Plant Protection Bulletin* 24: 33-35. 1976.
- MOLLENHAUER, H.H. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. *Stain Technology* 39: 111-114. 1964.
- NIENHAUS, F., & SIKORA. R.A. Mycoplasmas, Spiroplasmas and Rickettsia-like organisms as plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathology* 17: 37-58. 1979.
- SAGLIO. P. LAFLECHE, D., BONISSOL, C. BOVÉ, J.M. Isolement et culture in vitro des mycoplasmes associés au "stubborn" des agrumes et leur observation au microscope électronique. *C.R. Acad. Sciences Serie D* 272: 1387-1390, 1971.
- SINHA, R.C. Purification of mycoplasma-like organisms from china aster plants affected with clover phyllody. *Phytopathology* 64: 1156-58. 1974.
- VENABLE, J. & COGGESHALL. R. The use of a simple lead citrate stain in electron microscopy. *J. Cell. Biology* 25: 407-408. 1965.
- WILLIAMSON, D.L. & WHITCOMB. R.F. Plant Mycoplasmas: a cultivable spiroplasma causes corn stunt disease. *Science* 188: 1018-20. 1975.