

## **OCORRÊNCIA DE FITOPLASMA DO GRUPO 16SRIII EM PLANTAS DE *CITRUS SP.* COM SUPERBROTAMENTO SEVERO NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

FREITAS, D. M. S.<sup>1</sup>; SILVA, A. A.<sup>2</sup>; BASTOS, D. C.<sup>3</sup>; ECKSTEIN, B.<sup>4</sup>

### **INTRODUÇÃO**

Nosso país é um dos maiores produtores mundiais de citros. A maior parte da produção de citros se concentra em São Paulo e na região nordeste essa cultura tem grande importância econômica e social nos estados da Bahia e de Sergipe (VIDAL, 2018). O citros é uma cultura de alto potencial na região semiárida, pois o clima seco desfavorece algumas doenças, principalmente fúngicas, que acometem o citros no Brasil.

Dentre as diversas doenças do citros, temos aquelas associadas à fitoplasmas. Este patógeno pode provocar no hospedeiro sintoma de superbrotamento, amarelecimento, nanismo, vassoura de bruxa, filoidia, virescência, crescimento da parte aérea de órgãos florais, arroxamento ou avermelhamento do topo da planta e necrose do floema (MAEJIMA, 2014). Fitoplasmas são procariotos fitopatogênicos habitam o floema das plantas, não possuem parede celular e nem serem passíveis de cultivo in vitro. Pertencem à classe Mollicutes e são associados à doenças de inúmeras espécies de plantas (SEEMÜLLER et al., 1998).

### **MATERIAL E MÉTODOS**

Uma planta jovem de citros foi encontrada em Petrolina-PE, apresentando superbrotamento de ramos e subdesenvolvimento. Foram coletadas amostras de folhas e de ramos desta planta e outras duas plantas de citros próximas a ela. O DNA total foi extraído das amostras, conforme descrito no protocolo de Doyle & Doyle (1987). A análise de PCR foi realizada utilizando oligonucleotídeos iniciadores P1/P7 (SCHNEIDER et al., 1995), seguidos de R16F2n/R2 para a amplificação da região 16S do RNA ribossomal (GUNDERSEN; LEE, 1996). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. Os produtos de PCR obtidos foram submetidos ao sequenciamento. As amostras foram purificadas com kit comercial de purificação de DNA. Cerca de 50 ng de produtos de PCR de cerca de 1.2 kb foram quantificados em gel e foram enviados para sequenciamento em empresa especializada. Após o

1. Pesquisadora da Embrapa Semiárido. Email: [debora.freitas@embrapa.br](mailto:debora.freitas@embrapa.br)
2. Estagiária da Embrapa Semiárido. Email: [catiaanj92@gmail.com](mailto:catiaanj92@gmail.com)
3. Pesquisadora da Embrapa Semiárido. Email: [debora.bastos@embrapa.br](mailto:debora.bastos@embrapa.br)
4. Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Email: [barbara.eckstein@embrapa.br](mailto:barbara.eckstein@embrapa.br)

sequenciamento, foram analisadas a qualidade das sequências e montados os *contigs*, utilizando o programa *Electropherogram quality analysis* (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e submetidos ao Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). A análise filogenética do fitoplasma obtido nesse trabalho foi realizada pela construção de uma árvore filogenética desenvolvida no programa MEGA pelo método *Neighbor-Joining*, com o teste *bootstrapping* (1000 vezes).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas várias análises das amostras coletadas e, após algumas modificações, foi encontrada uma amostra positiva, que foi justamente a amostra que apresentava sintomas severos de superbrotamento. Foi obtido um fragmento de PCR de tamanho esperado para fitoplasmas, de aproximadamente 1,2 kb. O sequenciamento da região 16S rDNA amplificado revelou que o fitoplasma presente na planta de *Citrus* sp. pertence ao grupo 16SrIII, e apresentou porcentagem de identidade de quase 100% com fitoplasmas detectados em plantas de laranja doce (*Citrus sinensis*) oriundas do Estado de Minas Gerais, denominados de “*Citrus Sinensis X-disease Phytoplasma*”, pertencentes ao grupo 16SrIII, subgrupo B (16SrIII-B). Estas sequências que obtiveram maior porcentagem de identidade com o isolado de Petrolina-PE, foram encontradas em plantas que apresentavam sintomas de manchas amareladas nas folhas, semelhante à sintomatologia causada pelo HLB ou Huanglongbing (WULFF et al., 2019). A comparação da porcentagem da identidade demonstrou que, depois do subgrupo B, os fitoplasmas dos subgrupos 16SrIII-J e 16SrIII-U, nativos do Brasil, são os mais próximos, indicando que provavelmente se trata de um fitoplasma que ocorre no País. É importante observar que, a planta de citros infectada com fitoplasma apresentou durante os meses seguintes à coleta, superbrotamento extremo dos ramos após uma poda drástica e não se recuperou, acabando por ser eliminada, enquanto no trabalho de WULFF et al. (2019) não foram relatados sintomas tão severos.

A análise filogenética demonstrou que o fitoplasma presente na planta de *Citrus* sp. de Petrolina está no mesmo ramo que estão incluídos fitoplasmas do grupo 16SrIII, e está mais próximo daqueles detectados em plantas de *Citrus sinensis*, incluindo os isolados 78049, 78001e 77900 que pertencem ao grupo 16SrIII, subgrupo B e mais distante de outros fitoplasmas brasileiros que representam os subgrupos 16SrIII-J e 16SrIII-U em concordância com a análise de identidade da sequência (Figural).

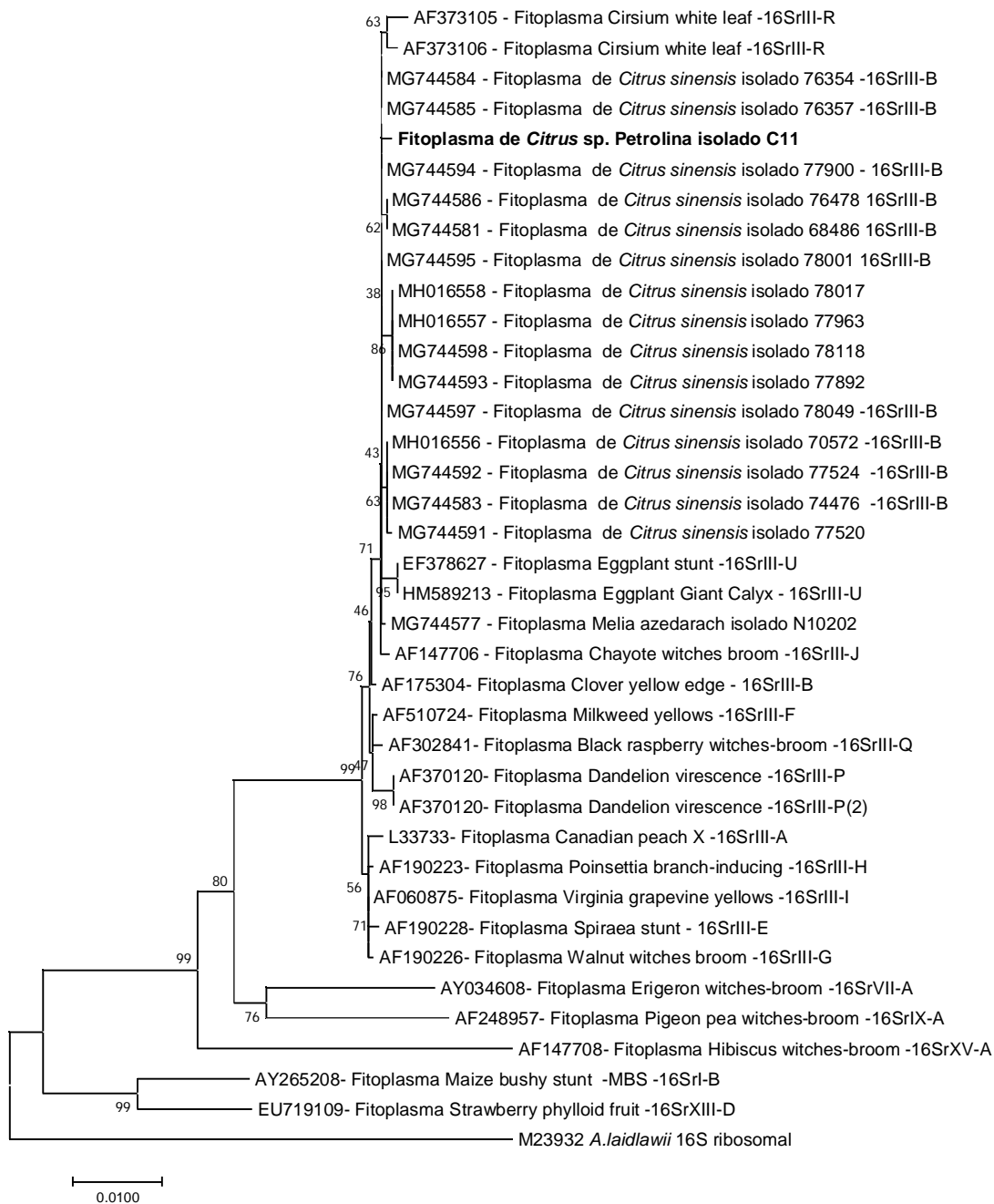


Figura 1. Árvore filogenética baseada nas sequências da região 16S rDNA do fitoplasma encontrado em *Citrus* sp. em Petrolina e de fitoplasmas pertencentes a diferentes 16Sr grupos existentes no Brasil e representantes de subgrupos dentro do grupo 16SrIII. O número de acesso das sequências no GenBank estão no início da descrição de cada fitoplasma.

Além da detecção em plantas de *Citrus sinensis* em Minas Gerais, fitoplasmas do subgrupo 16SrIII, particularmente do subgrupo B, são encontrados em vários outros hospedeiros no Brasil (MONTANO et al., 2011).

Fitoplasmas são bactérias difíceis de serem eliminadas das plantas afetadas, sendo necessário muitas vezes a eliminação da planta doente, por esse motivo, medidas de controle deste patógeno

incluem primeiramente o uso de telados para a produção de mudas cítricas em ambiente livre de insetos, o que já é feito nas mudas certificadas, que devem sempre ser utilizadas na implantação de qualquer pomar de citros e o manejo de insetos do tipo cigarrinha em áreas de produção.

### CONCLUSÕES

Fitoplasma do grupo 16SrIII, próximo do fitoplasmas do subgrupo 16SrIII-B associados à plantas de *Citrus sinensis* (Laranja doce) em Minas Gerais, foi encontrado em Pernambuco em *Citrus sp.* severamente doente.

### REFERÊNCIAS

- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid isolation DNA procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochemical Bulletin*, Irvine, v. 19, p. 11- 15, 1987.
- GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pair. *Phytopathologia Mediterranea*, Firenze, v.35, p.144-151, 1996.
- MAEJIMA, K., OSHIMA, K. & NAMBA, S. Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *Journal of General Plant Pathology*, Bari, v. 80, p. 210, 2014.
- MONTANO, H.G.; CUNHA JUNIOR, J.O.; PIMENTEL, J.P. Phytoplasmas in Brazil: na update. *Bulletin of Insectology (Supplement)*, Bologna, v. 64, p. 251-252, 2011.
- SCHNEIDER, B., SEEMÜLLER, E., SMART, C. D. & KIRKPATRICK, B. C. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. IN: RAZIN, S.; TULLY, J.G. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, v. 2, New York: Academic Press. 1995. p. 369–380.
- SEEMÜLLER, E.; MARCONE, C.; LAUER, U.; RAGOZZINO, A; GÖSCHL, M. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*, Pisa, v. 80, p. 3-26. 1998.
- WULFF, N.A.; FASSINI, C.G.; MARQUES, V. V.; MARTINS, E.C.; COLETTI, D.A.B.; TEIXEIRA, D.C.; SANCHES, M. M.; BOVÉ, J.M. Molecular Characterization and Detection of 16SrIII Group Phytoplasma Associated with Huanglongbing Symptoms. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 109, n. 3, p. 366-374, 2019.
- VIDAL, M.F. Citricultura na área de atuação do BNB. *Caderno Setorial ETENE*, Fortaleza, Ano 3, n.41, 2018.