

Detecção molecular de fitoplasma em diferentes tecidos de dendezeiro com Amarelecimento Fatal(*Elaeis guineensis* Jacq.)

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

Palavras Chave: *Elaeis guineensis* Jacq., mollicutes, diagnose.

1 - Introdução

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma palmeira originária da Costa Ocidental da África (Golfo da Guiné), que foi introduzida nos estados do Pará e Bahia no início dos anos 60 e adaptou-se bem ao clima tropical úmido desses estados. A cultura do dendê destaca-se entre as demais espécies oleaginosas por sua alta capacidade de produção de óleo por unidade de área, tendo como principais produtos os óleos de palma e de palmiste.

Uma doença, denominada de amarelecimento fatal (AF), de etiologia desconhecida, tem sido observada em lavouras do estado do Pará. A doença tem causado sérios danos à cultura nos últimos anos. A sintomatologia apresentada pelas plantas afetadas tem sido caracterizada pelo amarelecimento dos folíolos basais das folhas intermediárias, e pelo aparecimento de necroses nas extremidades dos folíolos que evoluem para a seca total dessas folhas. A presença desses sintomas levou a suspeita da ocorrência de fitoplasma associado à doença e sua presença foi comprovada por Brioso et al. (2003) por meio de *Nested*-PCR.

Os fitoplasmas são procariotos sem parede celular, pertencentes à classe Mollicutes, que habitam os vasos de floema e naturalmente são transmitidos por cigarrinhas. Atualmente, PCR constitui o método mais sensível para detecção de fitoplasmas.

Desse modo, este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de fitoplasma associado ao AF em diferentes tecidos da planta, por meio da técnica *Nested* RT-PCR.

2 - Material e Métodos

Foram coletadas 03 plantas com sintomas do Amarelecimento Fatal (Figura 1) na fase inicial (nota 03), intermediária (nota 05) e avançada (nota 07) na MARBORGES Agroindústria S/A, localizada no município de Moju-PA, onde avaliam a evolução dos sintomas, com base em um sistema de notas de 0 a 10, em que zero indica uma planta aparentemente sadia e dez, uma aparentemente morta. As amostras compreenderam 11 tecidos de cada planta que foram avaliados para a detecção de fitoplasma, sendo a análise feita em duplicata por meio do *nested* RT-PCR. (Tabela 1).

A extração de ácidos nucleicos foi feita a partir de 150mg de tecidos frescos e o protocolo de extração utilizado foi o descrito por Gibbs e Mackenzie (1997).

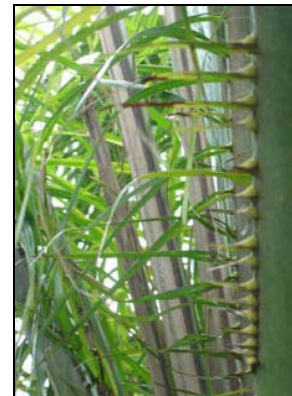


Figura 1. Amarelecimento e necrose da ponta do folíolo para base da nervura da folha.

Para a detecção de fitoplasma foi empregada a técnica de duplo PCR, precedida por uma reação de transcrição reversa para a obtenção de cDNA a partir de RNA (*Nested* RT-PCR), utilizando os pares de iniciadores universais R16mF2/R1 e R16F2n/R2. O par R16mF2/R1 foi utilizado na PCR inicial; para a amplificação do fragmento correspondente ao 16S rDNA. Os iniciadores R16F2n/R2 foram empregados na reação de re-amplificação, usando-se o produto da PCR inicial como molde, após sua diluição em água destilada-deionizada na proporção de 1:30, objetivando a amplificação de um produto de aproximadamente 1,2kb.

As condições de RT-PCR compreenderam 1 ciclo representado por 3 etapas: 70°C, 10 min.; 4°C, 1 min.; 42°C, 1 hora e 30 min. Seguidos por 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). 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. Os produtos gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, visualizados na forma de bandas, em transiluminador de luz ultravioleta, após coloração com GelRed (Biotium). O controle positivo foi representado por amostra de planta de milho com enfezamento, enquanto os padrões negativos foram representados pela água e por amostra de plantas de dendê assintomáticas. O marcador utilizado foi 1kb Ladder (Invitrogen).

3 - Resultados e Discussão

Com base na amplificação do 16S rDNA, empregado-se os iniciadores R16mF2/R1 e R16F2n/R2, constatou-se a ocorrência de fitoplasma nas três plantas de dendê (*Elaeis guineensis* Jacq). Estas amplificações, obtidas pelo uso da *Nested* RT-PCR, foram visualizadas na forma de bandas de aproximadamente 1,2kb a partir de ácidos nucléicos extraídos das amostras de tecidos originários de plantas com o sintoma do Amarelecimento fatal (AF). Também foi observada banda de 1,2kb para amostra de milho com enfezamento usada como controle positivo e nenhuma amplificação ocorreu para os padrões negativos representados pela água e por DNA total extraído de planta de dendê assintomática (Figura II).

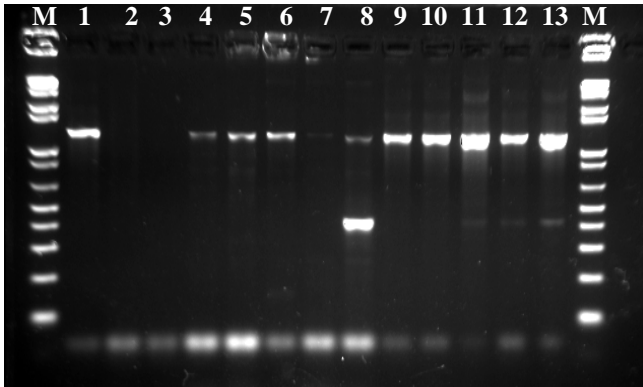


Figura II. Perfil eletroforético da detecção de fitoplasma em dendezeiros com AF. M, marcador de tamanho 1Kb Ladder; 1, controle positivo (milho); 2, controle negativo (planta sadia de dendê); 3, controle branco (água); 4 a 13, amostras de plantas sintomáticas de dendê.

Dentre os 11 tecidos (meristema, inflorescência, base da folha, pecíolo, folíolo, flor, pedúnculo, estipe, nervura, estipe dura e nervura principal) analisados, destacam-se as regiões estipe dura e nervura principal, como sendo as melhores regiões para a detecção do patógeno, pois teve resultado positivo para as três plantas amostradas (Tabela I). Outro fator importante observado é que por serem regiões de fácil coleta não se faz necessário o uso de amostragens destrutivas.

Tabela I. Detecção de fitoplasma em plantas de dendê em diferentes tecidos por meio do *Nested* RT-PCR conduzido com os iniciadores R16mF2/R1 e R16F2n/R2.

Plantas	Nota	Tecidos/PCR(+)	(%) *
A1 L.127 Pl. 12	03	Estipe dura, pedúnculo, folíolo, nervura e nervura principal.	36
A1 L.127 Pl. 08	05	Estipe dura, meristema, pedúnculo, pecíolo, flor, nervura e nervura principal.	50
A1 L.127 Pl. 10	07	Estipe dura e nervura principal.	14
Total	-	14	100

* Percentagem de tecidos positivos na detecção de fitoplasma.

A presença de fitoplasmas foi detectada em 50% das amostras de tecidos da planta A1 L.127 Pl. 08 Nota 05, em 36% da planta A1 L.127 Pl. 12 Nota 03 e 14% da A1 L.127 Pl. 10 Nota 07. Mostrando assim, que os materiais nos estágio intermediário da doença podem ser considerados os mais propícios para a detecção de fitoplasma. No entanto, em alguns tecidos não ocorreu amplificação, mesmo que a técnica *nested* RT-PCR seja considerada sensível e ainda assim, utilizando-se duplicatas das amostras, não é rara a ocorrência de resultados negativos para tecidos de plantas que exibem sintomas típicos de infecção por fitoplasmas. Os fatores responsáveis pelo falso negativo nas reações de amplificação podem estar relacionados à baixa concentração e/ou distribuição irregular de fitoplasmas nos tecidos, justificando, possivelmente, a não detecção de fitoplasmas em alguns tecidos de plantas com sintomas.

Os resultados aqui obtidos foram similares àqueles registrados em outro trabalho de mesma natureza (Alvarez e Claroz, 2002), o qual demonstrou a associação constante entre fitoplasma e plantas de dendê com sintomas do PC (*Podriccion del Cogollo*). Entretanto, segundo Boari (2008) não se pode afirmar que este microrganismo é o agente causal do amarelecimento fatal sem antes reproduzir os sintomas de AF em mudas sadias de dendezeiro por meio da enxertia.

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

- Alvarez, E.; Claroz J. L.; caracterización molecular y clasificación de fitoplasmas asociados con La palma de aceite. Congreso Nacional de Fitopatología. ASCOLFI, Bogotá, 3-6 July, 2002.
- Boari, A. de J. Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis*) no Brasil. ISSN 1517-2201, Documento 348, Novembro, 2008.
- Brioso, P. S. T.; Montano, H. G. Fitoplasma do grupo 16SrRNA I associado ao amarelecimento fatal de *Elaeis guineensis*. In: XXVI Congresso Paulista de Fitopatologia, Araras, SP. Summa Phytopathologia, v. 29. p. 81. 2003.
- Souza, R. L. R.; Veiga, A. S.; Ramos, E. J. A. Amarelecimento fatal do dendezeiro: identificação prática. Belém, PA: Denpasa, 2000. 27 p.