



## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FITOPLASMAS ASSOCIADOS AO COURO-DE-SAPO DA MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

Taylane da Silva Araújo<sup>3</sup>, Emanuel Felipe Medeiros Abreu<sup>2</sup>, Eder Jorge de Oliveira<sup>1</sup>, Saulo Alves Santos de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pesquisador da *Embrapa Mandioca e Fruticultura*, Caixa Postal 007, 44380-000, Cruz das Almas, BA. E-mail: eder.oliveira@embrapa.br; saulo.oliveira@embrapa.br

<sup>2</sup>Analista da *Embrapa Mandioca e Fruticultura*, Caixa Postal 007, 44380-000, Cruz das Almas, BA. E-mail: emmanuel.abreu@embrapa.br

<sup>3</sup>Estudante de Bacharelado em Biologia na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 44380-000, Cruz das Almas, BA. E-mail: araujotaylane@gmail.com

### Introdução

A doença conhecida como couro-de-sapo da mandioca (*Cassava Frog Skin Disease* - CFSD) foi relatada pela primeira vez na Colômbia em 1971. No Brasil, essa doença foi constatada no Amazonas, Pará, Bahia e recentemente Rio de Janeiro. A etiologia do couro-de-sapo sempre foi atribuída a um vírus da família *Reoviridae* (dsRNA) CFSD, porém Alvarez et al. (2009) identificaram na Colômbia um fitoplasma pertencente ao grupo III relacionado a essa doença. Sob condições favoráveis a CFSD promove a redução do rendimento de raízes tuberosas podendo atingir até 100% e no teor de amido acima de 50% (Alvarez et al., 2009). Os seus sintomas característicos depreciam o valor comercial da mandioca por deixar as raízes com aspecto enrugado, com depressões na casca em forma de “sulcos” ou “lábios” que quando coalescem formam um padrão do tipo “favo de mel”, além do engrossamento da película (casca), que passa a apresentar um aspecto corticoso e de difícil desprendimento e entrecasca com tonalidade opaca.

Medidas de controle que visem o entendimento do comportamento, distribuição e etiologia do couro-de-sapo são necessárias, porém incipientes no Brasil. Neste contexto, o presente trabalho teve o objetivo de identificar e caracterizar o fitoplasma associado ao couro-de-sapo em plantas sintomáticas.

### Material e Métodos

**Material vegetal:** Vinte amostras foram coletadas em diferentes genótipos de mandioca apresentando sintomas de couro-de-sapo (CFSD). Os materiais coletados e analisados foram constituídos de raspas do câmbio vascular das hastes de acessos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca (BAG-Mandioca) da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF). O material coletado foi identificado e armazenado em ultrafreezer -80°C por dois meses até o seu uso.

**Extração do DNA total:** A extração do DNA total em que pode ser encontrado o DNA do fitoplasma foi obtida a partir de 200 mg de tecido do câmbio vascular das plantas com sintomas de CFSD. O método de extração utilizado foi de acordo com Dellarpota et al. (1983).

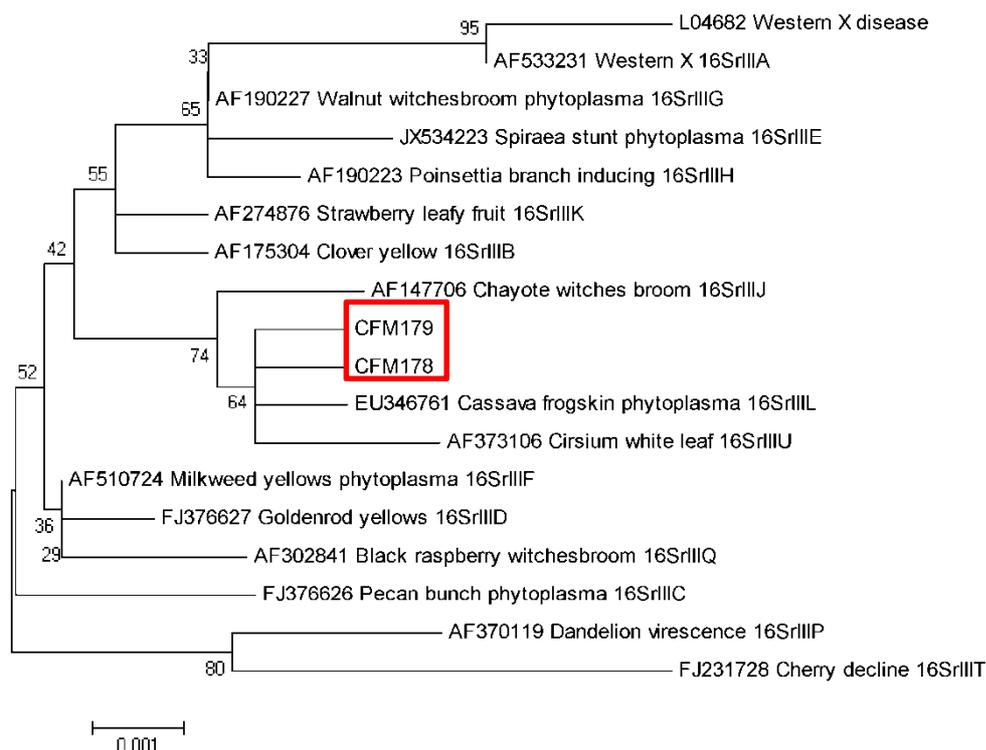
**Detecção molecular por PCR:** Após a quantificação do DNA extraído, foram realizadas as reações de Nested-PCR. Para a reação utilizou-se o primeiro par de iniciadores externos P1/P7 (Deng and Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995), e, posteriormente, o segundo par de iniciadores interno R16F2n/R2 (Gundersen and

Lee, 1996)R16R2/ R16F2. Após a reação da PCR realizou-se o diagnóstico molecular dos fragmentos amplificados com tamanhos de 800pb em gel de agarose a 1%. Os fragmentos amplificados foram excisados do gel de agarose e purificados no Kit de purificação GFX (Amersham Biosciences/GE Healthcare) seguindo o protocolo do fabricante.

**Sequenciamento e caracterização molecular:** Os fragmentos purificados foram sequenciados pela empresa Macrogen (Coréia do Sul) cujos resultados foram utilizados para a caracterização molecular *in silico*. Para a caracterização dos produtos sequenciados foram utilizados os programas SeqAssem e MEGA 5.1, além do uso da ferramenta do BLAST presente no banco de dados genômicos do NCBI.

### Resultados e Discussão

Nos testes de detecção por Nested-PCR apenas três amostras apresentaram amplificação dos fragmentos esperados (BGM1212, BGM1526, BGM880R). Os resultados do sequenciamento destas amostras foi utilizado para a caracterização *in silico*, e montagem das sequências consensos de cada acesso positivo obtido na detecção molecular. Após montadas as sequências realizou-se um Blast (GenBank), e verificou-se que dos três fragmentos obtidos nos respectivos acessos, BGM1212, BGM1526, BGM880R, apenas dois acessos (BGM1212 e BGM1516) apresentaram identidade de 99% com o gene 16S rRNA de fitoplasma de mandioca (EU346761 e AY737647), descrita por Alvarez et al. (2009) infectando mandioca na Colômbia. Em relação ao fragmento amplificado e sequenciado a partir da amostra BGM880R, análises de caracterização revelaram que a sequência obtida não correspondia a um fragmento de fitoplasma de mandioca. Este apresentou uma alta similaridade com DNA de bactérias endofíticas. Os dois fragmentos caracterizados foram depositados no GenBank (No. KF019184 e KF019185) e uma árvore filogenética foi construída com os acessos de mandioca obtidos na Colômbia e acessos de outras espécies depositadas no banco de dados (Figura 1). Os resultados revelaram que as duas sequências obtidas oriundas do BAG-Mandioca foram agrupadas no mesmo ramo que o fitoplasma encontrado na Colômbia associado ao CFSD, sendo este do grupo 16SrIII, subgrupo 16SrIII-L. É importante destacar que, este estudo é o primeiro a relatar um fitoplasma associado ao couro-de-sapo da mandioca no Brasil. Desse modo, diversas evidências experimentais sugerem que o fitoplasma pode desempenhar também um importante papel na etiologia da CFSD, antes atribuída apenas ao vírus da família *Reoviridae*. As evidências encontradas abrem possibilidades para melhor compreensão da dinâmica epidemiológica dessa doença, ecologia do fitoplasma e sua interação com o hospedeiro e ao vírus associado a essa doença. Novos estudos serão realizados com a finalidade de verificar se a doença é causada por um complexo (Vírus – Fitoplasma) ou apenas a presença de um desses patógenos é suficiente para desencadear os sintomas da CFSD. Além das perspectivas apresentadas, esse trabalho pretende desenvolver um kit diagnóstico específico para a detecção dos fitoplasmas prevalentes no Brasil que infectam variedades de mandioca.



**Figura 1.** Árvore filogenética gerada pelo método de Máxima Verossimilhança a partir da sequência parcial do gene 16S rRNA. Valores de bootstrap são mostrados na base dos ramos principais. Números de acesso do GenBank estão indicados anterior a espécie de fitoplasma. Os tamanhos de ramos são indicados pela barra horizontal, correspondente a 0.001 (uma mudança de base a cada 1000 nucleotídeos).

### Conclusões

Resultados preliminares por meio da técnica de Nested-PCR do gene 16S rRNA indicam que acessos de germoplasma com sintomas típicos do couro de sapo da mandioca estão associados à presença de fitoplasma pertencentes ao grupo 16SrIII e subgrupo L.

### Referências

- ALVAREZ, E.; MEJÍA, J. F.; LLANO, G. A.; LOKE, J. B.; CALARI, A.; DUDUK, B.; BERTACCINI, A.. Characterization of a phytoplasma associated with frogskin disease in cassava. **Plant Disease**. v.93, p.1139-1145, 2009.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Report**, v.1, p.19-20, 1983.
- DENG S., HIRUKI C. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable *Mollicutes*.- **Journal of Microbiological Methods**. v.14, p.53-61, 1991.
- GUNDERSEN D. E., LEE I.-M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs.- **Phytopathologia Mediterranea**.v.35, p.144-151, 1996.-

SCHNEIDER B., SEEMÜLLER E., SMART C. D., KIRKPATRICK B. C., 1995.- Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasmalike organisms or phytoplasmas, pp. 369-380. In: **Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology**, vol. 2 (RAZIN S., TULLY J. G., Eds).- Academic Press, San Diego, CA, USA.