

Variabilidade de fitoplasmas associados ao Amarelecimento Fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) com base no gene 16S rDNA.

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

Palavras Chave: Fitoplasma, diversidade, diagnose, RFLP.

1 - Introdução

O dendezeiro (*Elaeis guineensis*) é uma palmeira de origem africana, que apresenta melhor desenvolvimento em regiões tropicais, com clima quente e úmido, precipitação elevada e bem distribuída ao longo do ano. O fruto do dendê produz dois tipos de óleo: óleo de dendê ou de palma (*palm oil*, como é conhecido no mercado internacional), extraído da parte externa do fruto, o mesocarpo; e óleo de palmiste (*palm kernel oil*), extraído da semente.

Essa cultura tem sua produção afetada por algumas doenças, mas o Amarelecimento Fatal - AF (Figura 1) tem se destacado como responsável por milhares de mortes de plantas no Brasil (BOARI, 2008). No Pará, o AF é uma ameaça ao desenvolvimento da dendeicultura, agravada pelo fato de sua causa ainda ser de origem desconhecida. Apesar de vários estudos terem sido realizados até o momento, essa doença ainda tem sua etiologia desconhecida, o que impossibilita a elaboração de medidas de controle.

O presente trabalho teve a finalidade de avaliar a que grupos pertencem os fitoplasmas associados às plantas com AF detectados pelo *Nested*-RT-PCR, por meio do teste RFLP, com base no gene 16S rDNA.

2 - Material e Métodos

O material vegetal foi coletado nas áreas de plantio das Agroindústrias MARBORGES S/A, DENPASA S/A, AGROPALMA e DENTAUÁ S/A no estado do Pará, para análise no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. Foram selecionados indivíduos adultos que apresentavam os sintomas da doença em diferentes estágios. Os vários tecidos analisados foram coletados e acondicionados em sacos plásticos.

A extração de ácidos nucleicos foi feita a partir de 150mg de tecidos frescos obtidos por plantas e o protocolo de extração utilizado foi o descrito por Gibbs e Mackenzie (1997). O precipitado foi seco e ressuspenso em 50µl de água ultra-pura.

Para a detecção de fitoplasma foi empregada a técnica de duplo PCR, precedida por uma reação de transcrição reversa (*Nested*-RT-PCR) 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. 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 GelR (Biotium). O controle positivo foi representado por amostra de DNA de planta de milho com enfezamento (Grupo I), enquanto os padrões negativos foram representados pela água e por amostra de plantas de dendê assintomáticas. O marcador utilizado foi 1kb Ladder (Invitrogen).



Figura 1. Planta de dendê com Amarelecimento Fatal.

Os fitoplasmas detectados nas amostras, foram submetidos ao duplo PCR e os produtos de amplificação conduzidos pelo par iniciadores R16mF2/R1 da primeira PCR, foram submetidos à re-amplificação utilizando os pares de iniciadores específicos para fitoplasmas R16(I)F1 (5'taa aag acc tag caa tag g 3')/R16(I)R1 (5'caa tcc gaa ctg aga ctg t 3'), R16(III)F2 (5'aag agt gga aaa act ccc 3')/R16(III)R1 (5'tcc gaa ctg aga ttg a 3') e R16(V)F1 (5'tta aaa aga ctt ctt cgg 3')/R16(V)R1 (5'ttc aat ccg tac tga gac tac c 3'), os quais permitem a identificação de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrV, respectivamente. As condições de PCR e eletroforese foram idênticas aquelas descritas para a detecção de fitoplasma.

As seqüências amplificadas pelo duplo PCR com os iniciadores universais foram analisadas através da digestão com enzimas de restrição. Uma alíquota de 3-5µl de cada produto de PCR foi digerida, separadamente, por duas endonucleases, seguindo as instruções do fabricante, durante um período de 24 horas a 36°C. As enzimas, *AluI* (AG[▼]CT) e *Tru9I* (T[▼]TA A) foram utilizadas nas análises de RFLP. Os produtos da digestão enzimática foram

separados por eletroforese em gel de agarose (4%), sendo corado com GelRED e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta.

3 - Resultados e Discussão

Com base na amplificação do fragmento genômico correspondente ao 16S rDNA, através dos iniciadores R16mF2/mR1 e re-amplificação deste fragmento pelo par R16F2n/R2, ficou demonstrada a presença de fitoplasmas em tecidos de plantas sintomáticas de dendê, apresentando bandas de aproximadamente 1,2 kb.

A amplificação de DNAs dos fitoplasmas feita através de duplo PCR com iniciadores específicos para os diferentes grupos, mostrou a ocorrência de uma banda de aproximadamente 1kb visualizada em gel de agarose, demonstrando que fitoplasmas presentes ao grupo 16SrI, estavam presentes tanto no controle positivo do milho, o qual pertence ao grupo, como nas amostras de dendê (Figura II). Seis amostras foram positivas para o 16SrI. A ausência de bandas foi constatada nos PCRs conduzidos com os iniciadores específicos para identificação de fitoplasmas dos grupos 16SrIII e 16SrV.

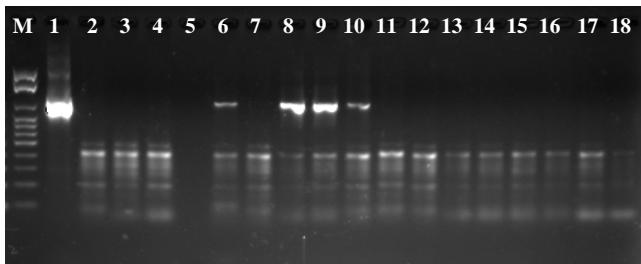


Figura II Amplificação do 16S rDNA com o iniciador específico R16(I)R1/R16(I)F1. Coluna M, marcador 1kb; 1 controle positivo (milho); 2, 3 e 4, controles negativos; coluna 5, água; 6,8,9,10, amostras positivas.

Na análise de RFLP a partir do *Nested-RT-PCR* PCR, conduzida com as enzimas de restrição *AluI* e *Tru9I*, mostrou mais de 5 padrões de restrição. Apenas uma amostra apresentou padrão de restrição com o grupo 16SrI de acordo com o controle positivo, fitoplasma do enfezamento do milho (Figura III e IV).

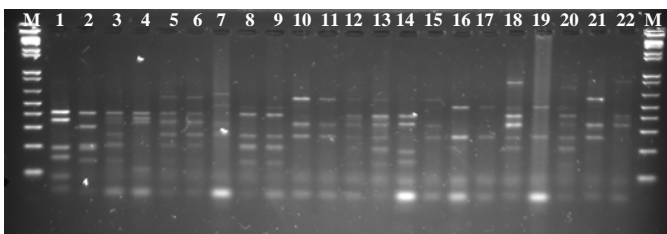


Figura III. Análise de RFLP do gene 16S rDNA de fitoplasma detectados em plantas de dendê utilizando a enzima *AluI*. M, marcador 1kb; 1 controle positivo (milho); 2 a 22 amostras de dendê.

Os padrões de restrição apresentados pelos fitoplasmas presentes nas amostras (Figura III e IV), sugerem uma grande diversidade de fitoplasma presentes nas amostras de dendê, fazendo-se necessários outros testes como o sequenciamento dos fragmentos de DNA para a identificação dos grupos de fitoplasmas.

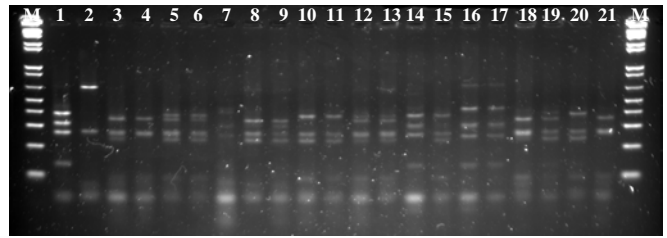


Figura IV. Análise de RFLP do gene 16S rDNA de fitoplasma detectados em plantas de dendê utilizando a enzima *Tru9I*. Coluna M, marcador de tamanho 1kb; coluna 1 controle positivo (milho); colunas 2 a 22 amostras de dendê.

Através de aplicações de técnicas moleculares como RFLP, PCR específico e sequenciamento, tem sido possível demonstrar a ocorrência de distintos fitoplasmas numa mesma espécie vegetal ou determinar a presença de fitoplasmas similares em espécies vegetais diversas (Lee et al.2000).

Os resultados obtidos pela *Nested-RT-PCR* específica permitiram demonstrar que, com base na análise do 16S rDNA, existe similaridade genética entre os fitoplasmas do enfezamento do milho e nas amostras de dendê analisadas com a doença amarelecimento fatal em algumas amostras. Entretanto, há a necessidade de realizar testes como sequenciamento para identificação dos grupos de fitoplasma detectados neste trabalho. Mas a enxertia, que se encontra em andamento, para a reprodução dos sintomas do AF, é atualmente teste que comprovará se esta doença é ou não de origem biótica e comprovará definitivamente, se os fitoplasmas é a causa do AF.

4 - Agradecimentos

À Embrapa, CNPq e FINEP pelo apoio financeiro e bolsas. E à Marborges S/A pelo apoio na coleta das amostras.

5 - Bibliografia

- ¹ Boari, A. de J. Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis*) no Brasil. ISSN 1517-2201, Documento 348, Novembro, **2008**.
- ² Brioso, P. S. T.; Montano, H. G.; Trindade, D. R.; Poltronieri, L. S.; Barcelos, E.; Veiga, A. S.; Furlan Júnior, J. Fitoplasma do grupo 16S rRNA I associado ao amarelecimento fatal de *Elaeis guineensis*. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, 26., 2003, Araras,SP. Resumos... Araras, SP: [S.n.], **2003**. 1 CD-ROM.
- ³ Gibbs, A.; Mackenzie, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by Rt-PCR. *Journal of virology methods*, v. 63, p. 9-16, **1997**
- ⁴ Lee, I.M.; Davis, R.E.; Gundersen-Rindal, D.E. Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, Palos Altos, v.54, n.1, p.221-255, **2000**.