

CICLO BIOLÓGICO DE PHYTOMONAS

CH-87-21

José Vitor Jankevicius<sup>1</sup>, Shiduca Itow-Jankevicius<sup>1</sup>, Lúcio A. Maeda<sup>1</sup>, Marta Campaner<sup>3</sup>, Ivete Conchon<sup>3</sup>, João B. do Carmo<sup>1</sup>, Maria Cláudia N. Dutra-Menezes<sup>1</sup>, José Roberto Menezes<sup>2</sup>, Erney P. Camargo<sup>3</sup>, Isaac Roitman<sup>4</sup>, Yara M. Traub-Csekó<sup>5</sup>, Marcelo B. Borges<sup>1</sup> & N. Moreira<sup>1</sup>

1. Depto. de Patologia Geral, CCB - Universidade de Londrina, PR ;  
2. Instituto Agrônomo do Paraná; 3. Depto. de Parasitologia, ICB USP, SP; 4. Depto. de Biologia Celular, UnB - DF; 5. Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Fiocruz - RJ.

HISTÓRICO

A descoberta de protozoários da família Trypanosomatidae parasitando vegetais ocorreu em 1909, na mesma época em que Carlos Chagas publica no Brasil suas importantes contribuições relativas ao Trypanosoma cruzi e doença de Chagas.

Esta descoberta está intimamente ligada a um outro tripanosomatídeo, o Trypanosoma evansi, agente etiológico da "surra" em equinos e bovinos que havia invadido a ilha de Maurício, no Oceano Índico e por esta razão conhecia-se muito bem a morfologia de tripanosomatídeos nesta região.

O dr. A. Lafont, major-médico das tropas coloniais francesas, era diretor do laboratório de Bacteriologia de Reduit, na ilha, e no início de 1909, estava interessado em estudar o látex de plantas lactíferas, empregadas comumente em medicina popular. A presença abundante de amido no latex o fez pensar que isto poderia originar um bom meio de cultura para microrganismos e encarregou seu assistente David de examinar o latex destas plantas, atento para a presença de microrganismos móveis

Em fins de Abril de 1909, David examina ao microscópio uma gota de latex de Euphorbia pilulifera e reconhece a presença de um protozoário alongado, de 20  $\mu\text{m}$  de comprimento por 2  $\mu\text{m}$  de largura, com um único flagelo de 11 a 15  $\mu\text{m}$  e um núcleo e cinetoplasto típicos.

Lafont, em colaboração com Dr. F. Mesnil, do Instituto Pasteur de Paris, identifica o protozoário como Leptomonas davidi n. sp., aceitando a sinonímia com o gênero Herpetomonas.

Ainda em 1909, com a publicação do trabalho de Lafont, Donovan, na Índia, confirma a infecção da E. pilulifera em Madras e sugere o nome de Phytomonas para tripanosomatídeos parasitas de vegetais.

A descrição de tripanosomatídeos em vegetais despertou grande interesse, devido à crença de que estes protozoários poderiam ter originado a "surra" ou serem talvez estágios deste parasita, pois se discutia nesta época se as formas encontradas principalmente em insetos, eram simples formas evolutivas de tripanosomas ou leishmanias ou constituíam espécies independentes.

A busca de plantas lactíferas infectadas intensifica-se rapidamente e vários pesquisadores começam a encontrar o parasita de vegetais na África, Ásia, Europa, Oceania e Américas.

Um aspecto curioso desta busca é que ela foi realizada por médicos, veterinários e outros pesquisadores ligados à protozoologia animal e somente mais de 15 anos após é que começam a surgir os primeiros trabalhos realizados por botânicos ou fitopatologistas.

Em 1915, o Dr. Luis Migone, professor de bacteriologia da Faculdade de Medicina de Assunción, Paraguai, estudando uma epidemia de "mal das cadeiras", examina o látex de uma Asclepiadaceae (Araujia angustifolia) e des

creve um parasita com 14 a 15µm de comprimento, que recebe o nome de Leptomonas elmassiani.

Em 1927, Aragão, trabalhando no Instituto Oswaldo Cruz, descreve no Brasil um parasita de uma euforbiácea de interesse econômico, a mandioca (Manihot palmata) a quem dá o nome de Leptomonas francai.

Em 1930, Stahel, um médico holandês trabalhando no Suriname, descreve a Leptomonas leptovasorum nos vasos condutores de seiva do café (Coffea libérica) com os sintomas da necrose do floema do café e isto representa a descoberta da primeira infecção por flagelados de plantas não lactíferas e também a primeira associada a uma fitopatologia bem definida.

Apesar da importância econômica do achado, pois todos os cafezais do Suriname foram dizimados pela necrose do floema do café, esta infecção não teve a menor repercussão e ainda hoje é desconhecida pela maioria dos agrônomos, pois não é citada em livros textos de Fitopatologia.

Em 1957, Gibbs descreve na África, um tripanosomatídeo parasita exclusivo dos frutos do tomate (Lycopersicon esculentum) a quem dá o nome de Leptomonas serpens.

Foi apenas em 1976, com os trabalhos de microscopia eletrônica de Parthasarathy et al para a visualização de micoplasma, imputado como agente etiológico de uma doença fatal ("lethal yellowing" ou "hartrot") do coqueiro (Cocos nucifera) no Suriname, quando se demonstrou a presença de organismos flagelados nas placas crivadas de plantas doentes, mas não nas sadias, que estes protozoários despertaram o interesse dos agrônomos e começou a se demonstrar o seu papel patogênico em outras doenças vegetais como a "marchitez sorpressiva" do dendê (Elaeis guineensis).

O protozoário em ambos os casos é supostamente o mesmo e recebeu o nome de Phytomonas staheli.

A partir desta época, os trabalhos com Phytomonas se intensificaram e o interesse nesta protozoologia vegetal tem aumentado constantemente.

## O CICLO BIOLÓGICO

Em 1977, iniciamos em Londrina-Pr, a observação de Phytomonas em plantas lactíferas, começando pela Euphorbia pilulifera estudada por Lafont.

Esta planta é muito difundida pelo estado do Paraná, pois pelo seu caráter ruderal, é frequentemente encontrada nos campos cultivados, onde é considerada erva daninha.

A incidência de plantas parasitadas é alta e geralmente a infecção é maciça, com a aparência de uma cultura pura de protozoários.

As tentativas de cultivo "in vitro" foram infrutíferas e passamos a observar os insetos vetores desta parasitose. O número de insetos que frequentam plantas lactíferas é grande, chegando a 9 ordens, 47 famílias e 67 espécies em Asclepias syriaca (Schechter & Bickley, 1959) e aparentemente, o latex tóxico confere uma proteção ecológica para os insetos contra a predação por vertebrados.

O vetor mais importante de P. davidi em E. pilulifera e E. prostata é o Pachibrachius bilobata scutellatus, abundante na região, apresentando intenso parasitismo do trato digestivo e da glândula salivar.

Os insetos que se alimentam em plantas lactíferas não são exclusivos, alimentando-se também em outras plantas. Seguindo-se estes insetos na natureza, observou-

se Phthias picta e Nezara viridula alimentando-se em tomate (Lycopersicum sculentum), que constatou-se estar infectado com protozoários flagelados. Estes protozoários desenvolveram-se em meio difásico, assim como os provenientes do trato digestivo e da glândula salivar dos insetos coletados nestas plantas.

A manutenção de tomateiros e de colônias de insetos em condições de laboratório foi possível e através de inoculação via seringa das formas de cultura, foi possível obter a infecção experimental, conseguindo-se preencher pela primeira vez as condições do Postulado de Koch para Phytomonas.

Nesta mesma linha, foi possível obter infecção experimental em várias condições, como ilustrado na figura abaixo.

Destes experimentos se conclui que existem pelo menos 2 vetores (P. picta e N. viridula) para a Phytomonas serpens em tomate, que se infectam via digestiva e transmitem através da saliva e que ambos se infectam, independentemente do vetor inicial.

Um outro fato que chama a atenção é o parasitismo apenas de tomates maduros. Os vegetais apresentam defesas contra a invasão de microrganismos baseados em substâncias químicas (fitoalexinas) e receptores de superfície.

Quando são adicionados às culturas de Phytomonas serpens extratos de caule, folhas, flores ou frutos verdes de tomate, ocorre uma paralização imediata das formas de cultura, o que não ocorre com extratos de tomate maduro.

Provavelmente o protozoário é sensível à ação de fitoalexinas (tomatina ou tomatidina), que estão reduzidas ou ausentes no fruto maduro (Roddick, 1979), pois a putrefação do fruto por microrganismos favorece a

germinação das sementes.

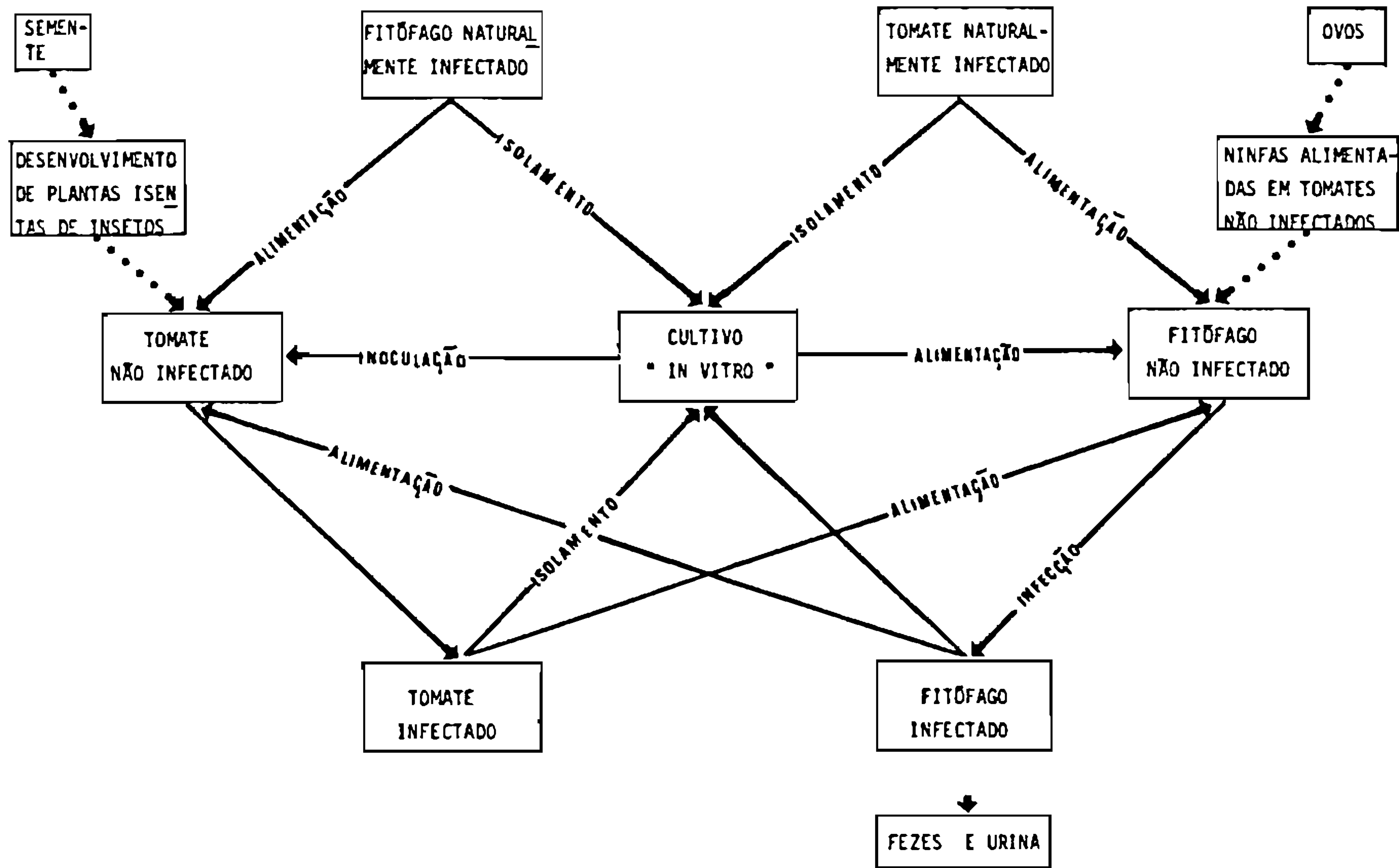
Aparentemente, Phytomonas adotaram uma estratégia de parasitismo pela ocupação de um compartimento restrito no vegetal em que eles tem condições de sobreviver, como frutos, vasos lactíferos ou vasos condutores, utilizando insetos fitófagos que entram em contato direto com estes compartimentos para a sua transmissão.

Talvez a dificuldade de cultivo "in vitro" não seja exclusivamente nutricional e pode ocorrer que na extração do parasita da planta (por ex., de vasos lactíferos), ele entre em contato com componentes da própria planta que inviabilizam seu desenvolvimento posterior, o mesmo ocorrendo com as tentativas sem sucesso de infecção experimental da planta via seringa.

Continuando com os trabalhos de rastrear os insetos fitófagos, foi constatada a infecção de feijão (Phaseolus vulgaris) e soja (Glycine max), restrita aos grãos e a infecção de sementes por protozoários, registrada pela primeira vez na Fitopatologia, pode estar associada a perdas na produção de grãos, atribuída atualmente à simples picada do inseto vetor.

Agora com um número maior de culturas "in vitro" de Phytomonas, estão surgindo problemas taxonômicos que os conceitos clássicos de Parasitologia não consideravam. Os aspectos morfológicos e de especificidade de hospedeiro já não são suficientes para uma taxonomia racional e os caracteres bioquímicos esbarram num círculo vicioso, pois as linhagens de referência são classificadas por critérios parasitológicos, que já sabemos serem falhos.

Em Londrina, estamos tentando testes sorológicos e bioquímicos para distinguir as amostras, bem como enzimas de restrição adequadas para um esquizodema pois



as enzimas usuais, nas condições estabelecidas para outros tripanosomatídeos não originaram fragmentos e até o momento, apenas a enzima Rsa conseguiu clivar o K-DNA gerando fragmentos.

APOIO FINANCEIRO: CNPq, CPG (Coordenadoria de Pesquisa da Univ. de Londrina) e COMCITEC (Conselho de Ciência e Tecnologia do Pr).

### REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, H. B. (1927) Sur un flagellé du latex de Manihot palmata Phytomonas francai n.sp. C.R.Soc. Biol. 97: 1077-1080.
- BENSUADE, M. (1925) Flagellates in plants: a review of foreign literature. Phytopathology 15:273-281.
- BEZERRA, J. L., RESENDE, M. L. & OLIVEIRA, D. P. (1987) Ocorrência da murcha de Phytomonas em Palmeira Real (Roystonea regia H. B. K. Cook) na Bahia. Summa Phytopathologica 13 : 6
- BROWER, L. P. (1969) Ecological chemistry. Scientific American 220:22-29
- CAMARGO, E. P., SILVA, S., ROITMAN, I., DE SOUZA, W., JANKEVICIUS, J. V. & DOLLET, M. (1987) Enzymes of ornithine-arginine metabolism in trypanosomatids of the genus Phytomonas. J. Protozool 34(4):439-441.
- DOLLET, M. GIANOTTI, M. & OLAGNIER, M. (1977) Observation de protozoaires flagellés dans les tubes criblés de palmiers à huile malades. Comptes Rendus Hebdomadaire Séanc. Acad. Sci. 284: 643-645



- DOLLET, M. (1984) Plant diseases caused by flagellate protozoa (Phytomonas) Ann. Rev. Phytopathol., 22:115-132.
- DONOVAN, C. (1909) Kala-Azar in Madras, specially with regard to its connection with the dog and the bug (Conorhinus) Lancet, 177:1495-96
- GIBBS, A. J. (1957) Leptomonas serpens n. sp., parasitic in the digestive tract and salivary glands of Nezara viridula (Pentatomidae) and in the sap of Solanum lycopersicum (tomato) and other plants. Parasitol. 47:297-303.
- HARVEY, R.B. & LEE, S.B. (1943) Flagellates of lactiferous plants. Plant. Physiol. 18:633-655.
- ITOW-JANKEVICIUS, S., JANKEVICIUS, J.V., DUTRA-MENEZES, M.C.N. & MENEZES, J.R. (1987) Presence of protozoa of the genus Phytomonas in Leguminous crops. Braz. Phytopathol. 12(2):152
- JANKEVICIUS, J.V., ITOW-JANKEVICIUS, S., DUTRA-MENEZES, M.C.N. Menezes, J.R., JURCA, M., REZENDE, M.I. & PANIZZI, A.R. (1987) Trypanosomatid "in vitro" culture of digestive tract and salivary gland from Nezara viridula. Braz. Phytopathol. 12(2):153
- JANKEVICIUS, J.V., ITOW-JANKEVICIUS, S., CAMARGO, E.P., CAMPANER, M. CONCHON, I. & MAEDA, L.A. (1985) Tripanosomatídeos em glandulas salivares de hemipteros. XII Reunião An. Doença de Chagas, pg. 160.
- JANKEVICIUS, J.V., ITOW-JANKEVICIUS, S. BRANDÃO, M. & MOREIRA, N. (1982) Tripanosomatídeo do gênero Phytomonas em Londrina-Paraná. IX Reunião An. Doença de Chagas, pg. 124.

- LAFONT, A. (1909) Sur la presence d'une parasite de la classe des flagellés dans le latex de l'Euphorbia pilulifera. Compt. Rend. Soc. Biol. 66:1011-13.
- MCGHEE, R.B. & MCGHEE, A.H. (1979) Biology and structure of Phytomonas staheli sp.n. a trypanosomatid located in sieve tubes of coconut and oil palms. J. Protozool. 26:348-351
- MIGONE, L.E. (1916) Un nouveau flagellé des plantes: Leptomonas elmassiani. Bull. Soc. Path. Exot. 9:356-359
- PARTHASARATHY, M.V.; van SLOBBE, W.G. & SOUDANT, C. (1976) Trypanosomatid flagellate in the phloem of diseased coconut palms. Science 192 :1346-1348
- RODDICK, J.G. (1979) Distribution of steroidal glycoal-kaloid in cells of Solanum and Lycopersicon. In: Hawkes, J.G.; Lester, R.N. & Skelding, A.D. (Ed.) The Biology and Taxonomy of the Solanaceae. Linnean Society Symposium Series number 7. London.
- SCHECHTER, R.B. & BICKLEY, W.E. (1959) Insects associated with milkweed. Proc. Entomol. Soc. Wash. 61(6):248
- STAHEL, G. (1931) Zur kenntnis der siebröhrenkrankheit (Phloemnekrose) des kaffeebaumes in Surinam. I-Mikroskopische untersuchungen und infektionsversuche. Phytopathol. Z. 4:65-82
- WENION, C.M. (1926) Protozoology. A manual for medical men, veterinarians and zoologists. Bailière, Tindall & Cox, London