

Proliferação de Ramos em Plantas Comerciais de Bico-de-Papagaio Associada a Fitoplasma do Grupo 16SrIII

Luiz Fernando Ribeiro & Ivan Paulo Bedendo

Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ, Universidade de São Paulo, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, e-mail: ipbedend@esalq.usp.br

(Aceito para publicação em 20/07/06)

Autor para correspondência: Ivan P. Bedendo

RIBEIRO, L.F. & BEDENDO, I.P. Proliferação de ramos em plantas comerciais de bico-de-papagaio associada a fitoplasma do grupo 16SrIII. *Fitopatologia Brasileira* 31:367-371. 2006.

RESUMO

Bico-de-papagaio é uma espécie ornamental, encontrada tanto na forma de arbustos, presente em jardins residenciais e públicos, como comercializada em vasos para decoração de interiores. Com o objetivo de detectar a presença de fitoplasma em plantas mostrando sintomas de proliferação de ramos, amostras foram obtidas de plantas sintomáticas e assintomáticas cultivadas em jardins e de plantas comerciais sintomáticas envasadas. A técnica de duplo PCR, utilizando os iniciadores R16mF2/mR1 e R16F2n/R2, foi empregada para detecção do fitoplasma, a partir de DNA extraído de folhas. Fitoplasma foi detectado consistentemente em todas as amostras sintomáticas, porém não houve detecção em qualquer das amostras assintomáticas. A identificação molecular conduzida através de PCR com iniciadores específicos e por análise de RFLP revelou que o fitoplasma detectado pertence ao grupo 16SrIII. Assim, foi demonstrado que a ocorrência de proliferação de ramos em bico-de-papagaio está associada à presença de fitoplasma. Plantas superbrotaçadas apresentam um dossel mais compacto, sendo mais atrativas ao consumidor, portanto a presença do fitoplasma é considerada como benéfica para fins ornamentais e comerciais.

Palavras-chaves adicionais: mollicutes, amarelos, *Euphorbia pulcherrima*.

ABSTRACT

Shoot proliferation in commercial poinsettia plants associated with phytoplasma belonging to group 16SrIII

Poinsettia is an ornamental species found as a shrub in residential and public gardens or commercialized in pots for indoor decoration. In order to detect phytoplasma in poinsettia exhibiting shoot proliferation, samples were collected from plants with and without symptoms grown in gardens, and commercial plants cultivated in pots showing symptoms. The PCR technique using primers R16mF2/mR1 and R16F2n/R2 was employed to detect phytoplasma by using DNA extracted from fresh leaves. The results revealed that phytoplasma was consistently detected from samples with symptoms, but no phytoplasma was found in any samples without symptoms. It was thus demonstrated that poinsettia proliferation was associated with the presence of phytoplasma. Molecular identification using group-specific primer pairs and RFLP analyses revealed that the phytoplasma was a member of group 16SrIII. Plants with proliferation have shown a compact top and are more attractive to consumers; hence the presence of phytoplasma is desirable for ornamental and commercial purposes.

Additional keywords: Mollicutes, yellows, *Euphorbia pulcherrima*.

INTRODUÇÃO

A planta denominada bico-de-papagaio (*Euphorbia pulcherrima* Wild), também conhecida por poinsettia, é uma espécie ornamental encontrada sob duas formas com relação ao hábito de crescimento. Uma das formas é do tipo arbustiva, de ocorrência natural, sendo observada com frequência em jardins residenciais e logradouros públicos. Neste caso, a planta exibe ramos longos e flexuosos, com poucas brotações, resultando em uma copa esparsa, com alternância de coloração verde e vermelha de suas folhas e “flores”, podendo alcançar de dois a quatro metros de altura. Outro tipo de crescimento apresentado pela espécie é na forma herbácea, produzida e comercializada em vasos, com um vistoso dossel denso, devido à intensa proliferação de ramos curtos, visualmente muito atrativo pela exuberante

produção de “flores” vermelhas. Ressalta-se, no entanto, que as “flores”, na verdade, são folhas modificadas chamadas de brácteas (Lee *et al.*, 1997).

A importância econômica da espécie como ornamental vem justamente do comércio da planta em vasos, a qual é empregada na decoração de ambientes internos. A comercialização da planta envasada tem conquistado espaço de destaque dentro do mercado de ornamentais em diferentes partes do mundo, incluindo o Brasil (Lee, 2000).

A ocorrência natural de plantas de bico-de-papagaio com ramificações longas e esparsas contrastando com plantas desta mesma espécie intensamente ramificadas, despertou o interesse de pesquisadores que passaram a investigar a possível causa desta anomalia no hábito de crescimento. Possivelmente, a proliferação de ramos estaria sendo causado por um agente infeccioso, uma vez que a

anomalia podia ser transmitida por enxertia e por ocorrer a perda desta característica por tratamento pelo calor ou cultura de tecido de meristema (Dole & Wilkins, 1991; Dole *et al.*, 1993. Ruiz *et al.*, 1997). A suspeita do agente ser um vírus causador de mosaico foi abandonada no início da década de oitenta, com a demonstração da presença do vírus tanto em plantas superbrotadas como naquelas com crescimento normal (Fulton & Fulton, 1980). Em razão da sintomatologia, passou-se a investigar a possibilidade de um fitoplasma estar associado à proliferação e, em meados da década de noventa, ficou comprovado que a proliferação de ramos era causada por fitoplasma (Lee *et al.*, 1997). A identificação molecular demonstrou que o fitoplasma responsável pelo superbrotamento era um representante típico do grupo 16SrIII (Lee *et al.*, 1997). Outro estudo conduzido sobre o assunto confirmou a predominância de fitoplasma do grupo 16SrIII em plantas com intensa produção de ramos, porém revelou também a presença de fitoplasma pertencente ao grupo 16SrI (Abad *et al.*, 1997). A associação de fitoplasma com proliferação também foi demonstrada por remissão de sintomas em plantas tratadas com tetraciclina (Bradel *et al.*, 2000). A ocorrência da proliferação de ramos é altamente desejável e importante para a produção de plantas envasadas, pois esta anomalia torna as plantas mais vistosas e comercialmente mais valorizadas (Lee *et al.*, 1997).

Fitoplasmas são agentes causais de doenças de plantas, tendo sido descobertos em 1967 e denominados, na época, de organismos do tipo micoplasma ou MLOs (Doi *et al.*, 1967). A partir de 1994 passaram a ser chamados de fitoplasmas (Sears & Kirkpatrick, 1994). São classificados no grupo das bactérias, sendo organismos unicelulares, desprovidos de parede celular, habitantes de floema, transmitidos naturalmente por cigarrinhas e não cultiváveis em meio de cultura (Bedendo, 1995; Davis, 1995). No Brasil, têm sido detectados numa gama de plantas cultivadas e silvestres, principalmente através de microscopia eletrônica de transmissão (Kitajima, 1995). Mais recentemente, a técnica molecular de PCR (Polymerase Chain Reaction) tem sido empregada como rotina para demonstrar sua ocorrência em plantas suspeitas, como complemento para diagnose feita com base na sintomatologia (Davis, 1995).

A identificação molecular de fitoplasmas tem sido feita através de técnica de PCR ou de RFLP. No primeiro caso, um par de iniciadores específicos é usado na segunda reação de um PCR duplo, indicando o grupo ao qual pertence o fitoplasma (Lee *et al.*, 1994). No segundo, promove-se a digestão enzimática de produtos de PCR com algumas endonucleases e compara-se os padrões de bandas obtidos com as referências adotadas internacionalmente (Lee *et al.*, 1993). Adotando-se esta sistemática, os fitoplasmas têm sido classificados em diversos grupos e sub-grupos (Lee *et al.*, 1998), porém sem receberem, até o momento, denominação binomial latina correspondente ao gênero e espécie.

Plantas de bico-de-papagaio crescidas em jardins, com e sem proliferação de ramos, e plantas comerciais envasadas, com intensa ramificação, foram objetos desta pesquisa. O objetivo foi detectar a presença de fitoplasma em plantas portadoras desta anomalia, bem como proceder à identificação molecular do fitoplasma, determinando-se a sua classificação em um dos grupos atualmente reconhecidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de plantas

Folhas foram coletadas de plantas com proliferação de ramos, suspeitas de estarem infectadas por fitoplasma, e de plantas de aspecto arbustivo, aparentemente livres de fitoplasma. Assim, as amostras foram obtidas de: - a) cinco plantas comerciais cultivadas em vasos, mostrando intensa proliferação de ramos, encontradas em floricultura (PE1, PE2, PE3, PE4, PE5 = plantas envasadas); - b) dois arbustos com superbrotamento, provenientes de plantas envasadas que foram transplantadas para o solo, com altura entre 0,5-0,7 m, cultivados em dois diferentes jardins residenciais localizados em Piracicaba/SP (AS1 e AS2 = arbustos sintomáticos); - c) dois arbustos assintomáticos, apresentando ramos longos, copa esparsa e altura entre 2-4 m de altura, sendo um deles cultivado no parque da ESALQ e o outro em um jardim residencial em Piracicaba/SP (AA1 e AA2 = arbustos assintomáticos).

Extração de DNA e condições de PCR

O DNA empregado no teste de PCR foi extraído da região das nervuras de folhas frescas. Uma amostra de 0,2 g de tecido foliar foi imersa em nitrogênio líquido e triturada com pistilo em almofariz de porcelana. Acrescentou-se 800 µl de CTAB 1% aquecido a 65° C e agitou-se vigorosamente. O material foi incubado a 65° C por 1-2 horas, acrescentando-se, em seguida, 600 µl de clorofórmio-octanol (24:1). Após centrifugação a 12000g por 15 min., separou-se a fase aquosa e juntou-se 0,6 v de isopropanol. A mistura permaneceu por uma noite a -20° C, sendo, então, centrifugada a 12000g por 15 min. Descartou-se o isopropanol, e, após a lavagem com 300 µl de etanol 80%, secou-se e ressuspendeu-se o precipitado em 100 µl de água destilada-deionizada.

Para detecção de fitoplasma foi empregada a técnica de duplo PCR utilizando-se os pares de iniciadores ("primers") R16mF2/mR1 e R16F2n/R2 (Gundersen & Lee, 1996). O par R16mF2/mR1 foi utilizado na primeira reação, para a amplificação do fragmento correspondente ao 16SrDNA. Os iniciadores R16F2n/R2 foram empregados na reação de re-amplificação, usando-se o produto do primeiro PCR como molde, após sua diluição em água na proporção de 1:50. As condições de PCR compreenderam 35 ciclos, onde cada ciclo foi representado por uma etapa de denaturação a 94° C por 1 min., uma de anelamento a 50° C por 2 min. e uma de extensão a 72° C por 3 min. (7

min. no ciclo final), de acordo com o metodologia descrita por Lee et al. (1993). Os produtos da re-amplificação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados na forma de bandas, em transiluminador de luz ultravioleta, após a coloração com brometo de etídeo. Os padrões positivos foram representados por amostra de folha de planta de milho com enfezamento vermelho e berinjela com superbrotamento, enquanto os padrões negativos foram representados pela água e por amostra foliar de planta de milho sadia. O marcador molecular utilizado foi 1kb Ladder (Life Technologies).

Identificação molecular por PCR e RFLP

Para identificação de fitoplasma foram usados os produtos de PCR obtidos com o DNA extraído de amostras de plantas envasadas e de arbustos sintomáticos.

Na identificação por PCR, os produtos de PCR resultantes da amplificação pelo par de iniciadores R16mF2/R1 foram diluídos 1:50 em água destilada-deionizada e re-amplificados pelos iniciadores R16(III)F2/R1 (Lee *et al.*, 1994), específicos para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrIII. O DNA obtido de plantas de berinjela portadoras de um fitoplasma do grupo 16SrIII foi usado como padrão positivo. As condições de PCR foram idênticas àquelas descritas anteriormente. O padrão de peso molecular utilizado foi 1kb ladder.

A identificação de fitoplasma também foi feita por RFLP, com base nos perfis eletroforéticos obtidos pela digestão enzimática dos produtos amplificados pelo duplo PCR, conduzido com os iniciadores R16mF2/mR1 e R16F2n/R2. Fragmentos de DNA de 1,2 kb foram submetidos à digestão pelas endonucleases *AluI*, *KpnI*, *HhaI*, *HpaII*, *MseI*, *RsaI* e *SauIII*A, de acordo com a recomendação dos fabricantes. Os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 4,5%, corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de ultra-violeta. O marcador molecular foi Φ X174RFHaeIII. O perfil eletroforético obtido para cada enzima foi comparado aos padrões relatados na literatura (Lee *et al.*, 1998), visando determinar a classificação do fitoplasma em um dos grupos atualmente adotados para taxonomia desses patógenos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na amplificação do 16SrDNA, empregando-se os iniciadores R16mF2/mR1 e R16F2n/R2 em PCR duplo, constatou-se a ocorrência de fitoplasma nas amostras de bico-de-papagaio que apresentavam proliferação de ramos, ou seja, plantas envasadas (PE) e arbustos sintomáticos (AS). A presença de fitoplasma foi evidenciada pela visualização de bandas de aproximadamente 1,2 kb no gel de agarose, após a condução do processo de eletroforese (Figura 1). Estas bandas correspondiam a bandas padrões para amplificações feitas com o referido par de iniciadores (Gundersen & Lee, 1996). Amostras originárias de arbustos sem proliferação de

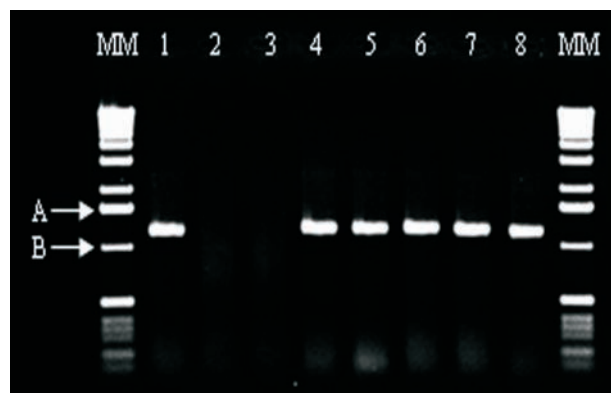


FIG. 1 - Gel de agarose mostrando bandas correspondentes à presença de fitoplasma em amostras sintomáticas de bico-de-papagaio (PE e AS) e ausência de bandas para amostras assintomáticas (AA). Colunas da esquerda p/ direita: 1- Marcador molecular 1kb Ladder (MM), 2- Padrão positivo – milho (Mi), 3- Padrão negativo – água (Ag), 4- Arbusto assintomático (AA1), 5- Arbusto sintomático (AS1), 6- Arbusto sintomático (AS2), 7- Planta sintomática envasada (PE1), 8- Planta sintomática envasada (PE2), 9- Padrão positivo – berinjela (BE), 14- Marcador Molecular 1kb Ladder (MM).

ramos (AA) não apresentaram bandas no gel, confirmando a ausência de fitoplasma nas mesmas. A presença de banda para o padrão positivo e sua ausência para o padrão negativo, demonstraram a validade do teste de duplo PCR. Repetidos testes confirmaram os resultados.

A análise dos produtos de PCR permitiu associar a proliferação de ramos com a presença de fitoplasma, pois a detecção ocorreu justamente nas amostras colhidas de arbustos que apresentavam ramificações mais curtas e relativamente mais numerosas e naquelas obtidas de plantas envasadas que mostravam intensa ramificação. A detecção de fitoplasma nos tecidos vegetais complementou a diagnose feita com base na expressão de sintomas pelas plantas, confirmando a associação entre agente e doença, de acordo com Davis (1995). Por outro lado, plantas arbustivas de ramos longos e de dossel aberto não revelaram a presença de fitoplasma em seus tecidos. Os resultados aqui obtidos foram idênticos àqueles registrados em outros trabalhos de mesma natureza (Lee, *et al.*, 1997; Abad *et al.*, 1997), os quais demonstraram a associação constante entre fitoplasma e plantas de bico-de-papagaio com sintoma de proliferação de ramos.

A identificação molecular por PCR, feita através dos iniciadores específicos R16(III)F2/R1, demonstrou a ocorrência de um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrIII (Figura 2). Esta constatação foi feita pela visualização de bandas de aproximadamente 0,8kb no gel de agarose, bandas estas típicas de fitoplasma deste grupo, segundo os padrões pré-estabelecidos na literatura (Lee *et al.*, 1994). Banda de 0,8kb também foi revelada para amostra de berinjela usada como padrão positivo, confirmando o resultado de PCR para a classificação do fitoplasma detectado em material amostrado de bico-de-papagaio.

As análises de RFLP demonstraram, para as

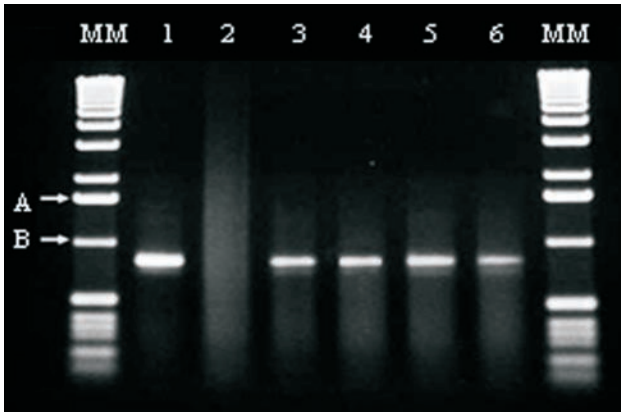


FIG. 2 - Amplificação do 16S rDNA do fitoplasma detectado em plantas sintomáticas de bico-de-papagaio, com iniciadores específicos R16(III)F2/R1. Colunas da esquerda p/ direita: 1- Marcador molecular 1kb Ladder (MM), 2- Padrão positivo – berinjela (Be), 3- Padrão negativo – milho (Mi), 4- - Arbusto sintomático (AS1), 5- Arbusto sintomático (AS2), 6- Planta sintomática envasada (PE1), 7- Planta sintomática envasada (PE2), 8- Marcador Molecular 1kbLadder (MM).

enzimas de restrição utilizadas, que o fitoplasma presente em plantas de bico-de-papagaio apresentou padrões de bandas típicos dos fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII (Lee *et al.*, 1998). Os fitoplasmas provenientes de cada uma das três plantas amostradas exibiram padrões de bandas idênticos entre si, considerando cada uma das enzimas de restrição, confirmando que o fitoplasma associado aos sintomas exibidos pelas plantas amostradas é um membro do grupo 16SrIII (Figura 3). Trabalhos conduzidos fora do Brasil também apontaram para um fitoplasma do grupo 16SrIII associado a plantas de bico-de-papagaio mostrando os mesmos sintomas de

proliferação (Lee *et al.*, 1997). Além dos perfis obtidos para as diversas enzimas terem sido típicos de fitoplasma do grupo 16SrIII, a constatação de que a enzima *KpnI* não promoveu a digestão do produto amplificado pelo PCR é uma comprovação de que o fitoplasma encontrado em plantas de bico-de-papagaio cultivadas no Brasil pertence ao grupo 16Sr III. Nenhuma evidência ocorreu que revelasse a presença de fitoplasma do grupo 16SrI, mesmo em baixa frequência, como encontrado no trabalho de Abad e colaboradores (1997).

O mecanismo envolvido na presença ou ausência de proliferação de brotos tem relação com a dominância apical de gemas (Lee *et al.*, 1997). Assim, o superbrotamento de plantas refletiria uma fraca dominância apical, enquanto plantas com ausência de superbrotamento apresentariam forte dominância apical. As modificações morfológicas observadas em plantas de diversas espécies infectadas por fitoplasmas podem ser atribuídas ao desbalanço hormonal provocado pelo patógeno, pois, desde há muito tempo, pesquisas têm indicado alterações nos níveis de auxina, citocinina, ácido indol acético e ácido giberélico (Chang & Lee, 1995; Golino *et al.*, 1988; Davey *et al.*, 1981).

Os resultados obtidos neste trabalho, evidenciando a associação de um fitoplasma do grupo 16SrIII com a proliferação de ramos em bico de papagaio se constitui no primeiro registro sobre a ocorrência desta anomalia no Brasil, concordando com outros resultados de pesquisa de mesma natureza (Lee *et al.*, 1997; Abad *et al.*, 1997). É possível que a doença tenha sido introduzida juntamente com material vegetal, uma vez que a planta comercial é obtida por propagação vegetativa. A anomalia de proliferação de ramos induzida pelo fitoplasma é altamente desejável (Lee, 2000), pois torna as plantas mais vistosas e atrativas, aumentando seu valor comercial.

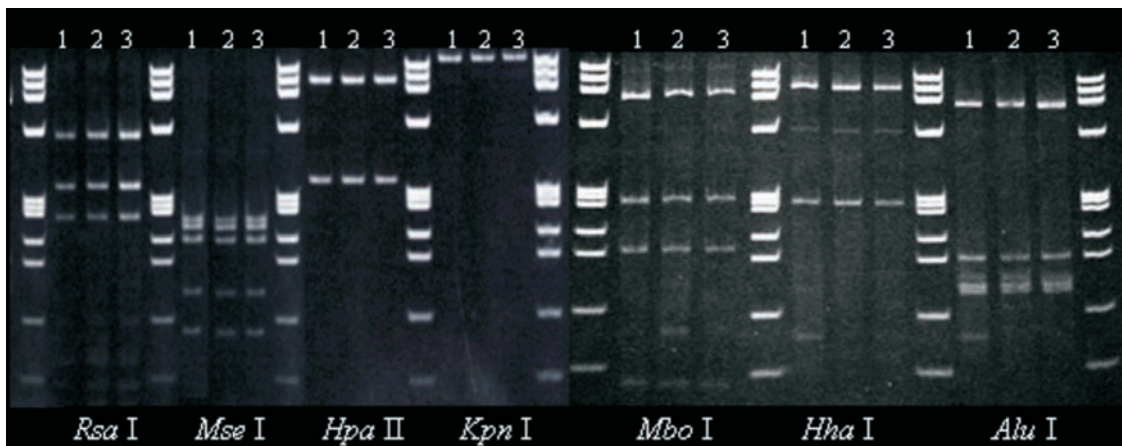


FIG. 3 - Análise de RFLP do 16S rDNA, amplificado pelos iniciadores R16mF2/mR1 e R16F2n/R2 em PCR duplo referente a fitoplasma presente em uma amostra sintomática de arbusto (AS1) e duas amostras sintomáticas de plantas envasadas (PE1 e PE2). As digestões foram conduzidas com as enzimas *RsaI*, *MseI*, *Hpa II* e *Kpn I* (Gel esquerdo) e *MboI*, *HhaI* e *AluI* (Gel direito). Marcador molecular: PhiX 174RF *HaeIII*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, J.A., RANDALL, C. & MOYER, J.W. Genomic diversity and molecular characterization of poinsettia phytoplasma. *Phytopathology* 87:S1. 1997.
- BEDENDO, I.P. Micoplasmas e espiroplasmas. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H., Amorim, L. (Ed.) *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo. Editora Agronômica Ceres. 1995. pp. 202-210.
- BRADEL, B.G., PREIL, W. & JESKE, H. Remission of the free-branching pattern of *Euphorbia pulcherrima* by tetracycline treatment. *Journal of Phytopathology* 148:587-590. 2000.
- CHANG, C.J. & LEE, I.L. Pathogenesis and host specificity in plant disease. In: Sing, U.S.; Rudia, P.S.; Kohomoto, K. (Ed.) *Histopathological, Genetic and Molecular Bases*. New York. Pergamon Press. 1995. pp. 237-246.
- DAVEY, J.E.; VAN STADEN, J. & DE LEEUW, G.T. Endogenous cytokinin levels and development of flower virescence in *Catharanthus roseus* infected with micoplasmas. *Physiological Plant Pathology* 19:93. 1981.
- DAVIS, R.E. Fitoplasmas: fitopatógenos procarióticos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodes. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 3:1-27. 1995.
- DOI, Y., TERANAKA, M., YORA, K. & ASUYAMA, H. Mycoplasma or PLT-like organisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows and *Paulownia* witches' broom. *Annual Phytopathology Society of Japan* 33:259-266. 1967.
- DOLE, J.M. & WILKINS, H.F. Vegetative and reproductive characteristics of poinsettia altered by a graft-transmissible agent. *Journal American of Society Horticultural Science* 116:307-311. 1991.
- DOLE, J.M., WILKINS, H.F. & DESBOROUGH, S.L. Investigation on the nature of a graft-transmissible agent in poinsettia. *Canadian Journal of Botany* 71:1097-1101. 1993.
- FULTON, R.W. & FULTON, J.L. Characterization of a tylo-like virus common in poinsettia. *Phytopathology* 70:321-324. 1980.
- GOLINO, D., OLDFIELD, G.N. & GUMPF, D.J. Induction of flowering through infection by beet leafhopper transmitted virescence agent. *Phytopathology* 78:285. 1988.
- GUNDERSEN, D.E. & LEE, I.M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pair. *Phytopathologia Mediterranea* 35:144-151. 1996.
- KITAJIMA, E.W. Enfermidades de plantas associadas a organismos do tipo micoplasma. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 2:153-74. 1995.
- LEE I.M. Phytoplasma casts a magic spell that turns the fair poinsettia into a Christmas showpiece. *Plant Health Progress APSnet Online Resources*, p.1-7, 2000.
- LEE, I.M., HAMMOND, R.W., DAVIS, R.E. & GUNDERSEN, D.E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:834-842. 1993.
- LEE, I.M., GUNDERSEN, D.E., HAMMOND, R.W. & DAVIS, R.E. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology* 84:559-566. 1994.
- LEE, I.M., KLOPMEYER, M., BARTOSZYK, I.M., GUNDERSEN-RINDAL, D.E., CHOU, T., THOMSON, K.L. & EISENREICH, R. Phytoplasma induced free-branching in commercial poinsettia cultivars. *Nature Biotechnology* 15:178-182. 1997.
- LEE, I.M., GUNDERSEN-RINDAL, D.E., DAVIS, R.E. & BARTOSZYK, I. M. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal Systematic Bacteriology* 48:1153-1169. 1998.
- RUIZ, S.G., DOLE, J.M., KAHN, B.A., RICHARDSON, P.E. & LEDFORD, J. Correlation of poinsettia graft union development with transmission of the free-branching characteristic. *Scientia Horticulturae* 69:135-143. 1997.
- SEARS, B.B. & KIRKPATRICK, B.C. Unveiling the evolutionary relationships of plant pathogenic mycoplasma-like organisms. *ASM News* 60:307-312. 1994.