

Primeiro relato de superbrotamento da mandioca em Santa Catarina, Brasil

Luiz Augusto M. Peruch¹ e Eduardo Chumbinho de Andrade²

Resumo – Plantas de mandioca doentes, com sintomas de amarelecimento, redução de tamanho e superbrotamento foram verificadas no litoral sul catarinense. O objetivo deste trabalho foi identificar o agente causal da doença. Quatro amostras de plantas doentes foram analisadas por *nested PCR* em laboratório, confirmando a presença de um fitoplasma. A incidência da doença foi constatada de forma localizada em uma lavoura comercial e recomendou-se a eliminação das plantas doentes como método de controle. Este trabalho é o primeiro relato do superbrotamento da mandioca no estado de Santa Catarina.

Termos para indexação: *Manihot esculenta*; fitoplasma; detecção.

First report of cassava witch's broom disease in Santa Catarina, Brazil

Abstract – Diseased cassava plants with yellowing symptoms, size reduction, overbudding and roots without commercial value were found on the south coast of Santa Catarina, Brazil. The objective of this study was to identify the causal agent associated with the symptoms of the disease. Four samples of diseased plants were analyzed by nested PCR in the laboratory, confirming the presence of a phytoplasma. The incidence of the disease was low and localized in a small plot of a farm and elimination of diseased plants was recommended as a method of control. This work is the first report of cassava witch broom in Santa Catarina.

Index Terms: *Manihot esculenta*; Phytoplasma; plant disease.

A mandioca (*Manihot esculenta*), apesar de ser considerada uma cultura rústica, pode ser acometida por pragas e doenças que geram perdas na produtividade e qualidade de seus produtos. No estado de Santa Catarina, tem-se verificado bacteriose, viroses e manchas foliares fúngicas como as doenças mais frequentes (PERUCH et al., 2013). Entretanto, existem doenças não registradas no território nacional que merecem atenção por seu potencial de dano, como o mosaico africano da mandioca. Recentemente, ocorreram relatos na mídia internacional sobre graves perdas causadas pela incidência de doenças na mandioca no Continente Africano (FAUL, 2013). Esse fato denota a necessidade de esforços na identificação e no manejo dos problemas fitossanitários da cultura.

As doenças sistêmicas têm especial importância em razão da propagação vegetativa da mandioca. Entre as doenças sistêmicas da cultura destacam-se as viroses e as bacterioses. O mosaico comum da mandioca (CsCMV, *cassava common mosaic virus*), mosaico das ner-

vuras (CVMV, *cassava vein mosaic virus*) e o mosaico africano (ACMV, *African cassava mosaic virus*) são as três viroses citadas com maior frequência em vários países (MASSOLA & BENDENDO, 2005). Em relação aos procariotos, destacam-se o sapeco (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) e o superbrotamento (fitoplasma).

Os fitoplasmas são microrganismos procariotos desprovidos de parede celular, com somente uma membrana envolvendo o citoplasma, que podem colonizar o floema das plantas (AGRIOS, 1998). Os fitoplasmas estão classificados no super-reino Prokaryota, Domínio Bacteria, Classe Mollicutes e, atualmente, sendo designados pelo táxon "Candidatus Phytoplasma" (HOGENHOUT et al., 2008). Registros do superbrotamento da mandioca existem em vários estados brasileiros, sendo considerado problemático apenas em determinadas regiões (MASSOLA & BENDENDO, 2005). Segundo Meissner & Velame (2006), as perdas provocadas pela doença podem chegar a 70% da produção, e a redução em 80% do teor de fécula em cultivares

suscetíveis. Considerando que a diagnose correta é o primeiro passo para o controle eficiente de doenças, este trabalho objetivou realizar o primeiro relato do superbrotamento da mandioca no estado de Santa Catarina.

Amostras de plantas do cultivar Olho Junto com sintomas de superbrotamento de uma lavoura situada em Sombrio, cidade do litoral sul catarinense, foram enviadas ao laboratório de fitopatologia da Epagri/Estação Experimental de Urussanga. Após a descrição dos sintomas, quatro amostras foram enviadas para análise no Laboratório de Virologia Vegetal da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Posteriormente, foi realizada uma inspeção na lavoura e os sintomas da doença foram descritos.

Para investigar a presença de fitoplasma relacionado com os sintomas, o DNA total foi extraído a partir de 0,5g de tecido foliar sintomático pelo método descrito por Doyle & Doyle (1978). O DNA total extraído foi quantificado, e a concentração ajustada para 10ng μl^{-1} com auxílio de um espectrofotômetro (NanoVue Plus, GE Healthcare). A de-

Recebido em 20/11/2014. Aceito para publicação em 26/5/2015.

¹ Engenheiro-agrônomo, Dr., Epagri / Estação experimental de Urussanga, Rod. SC-446, Km 19, C.P. 49, 88840-000 Urussanga, SC, fone: (48) 3465-1933, e-mail: lamperuch@epagri.sc.gov.br.

² Engenheiro-agrônomo, Dr., Embrapa Mandioca e Fruticultura, e-mail: eduardo.andrade@embrapa.br.

tecção do microrganismo foi feita por *nested PCR*, tendo como alvo o gene de 16S rDNA. A primeira reacção de PCR foi feita para um volume final de 50µl contendo os seguintes componentes: 50ng de DNA, 5µl do tampão da PCR (200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500mM KCl), 3µl de MgCl₂ 25mM, 1µl da mistura de dNTPs a 2,5mM cada um, 0,5µl (1U) da *Taq* Platinum DNA polimerase (Invitrogen), e 0,5µM dos iniciadores específicos P1/Tint (SMART et al., 1996).

As amplificações foram conduzidas no termociclador PCR System 9600 thermocycler (Applied Biosystems) com o seguinte programa: desnaturaçãoinicial (94°C/3min), seguida de 35 ciclos (desnaturaçãoinicial: 94°C/45s; anelamento dos *primers*: 55°C/45s e extensãoinicial: 72°C/2min). Uma aliquota da primeira reacção foi diluída a 1/50, e 2µl foram utilizados em uma segunda reacção de PCR, contendo os iniciadores R16F2n/R16R2 (LEE et al., 1995), utilizando as mesmas condições de amplificação anterior. Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% com tempo de corrida de 80 minutos, sendo corados por brometo de etídio. Os resultados foram visualizados sobre luz UV em fotodocumentador (Kodak Gel Logic 212Pro).

A sintomatologia da doença no campo pode ser descrita da seguinte maneira: plantas com crescimento reduzido, folhas amareladas e brotaçãoinicial excessiva de hastes das plantas (Figuras 1A e 1B). As plantas apresentavam raízes pequenas e sem valor comercial. Os sintomas observados são compatíveis com a descrição da doença na literatura (MASSOLA & BENDENDO, 2005).

A aplicação do *nested PCR* possibilitou a amplificação de um fragmento de DNA do tamanho esperado (1,2kb) apenas nas amostras sintomáticas (Figura 2, linhas 4 a 6), e na amostra utilizada como controle positivo na reacção (Figura 2, linha 3). Não foi observada amplificação nas amostras sem DNA nem na amostra de planta sadia (Figura 2, linhas 1 e 2 respectivamente). Esse resultado confirma a presença de um fitoplasma nas amostras analisadas, porém não foi possível realizar sua classificação. Segundo Lee (1998), os fitoplasmas são classificados em 18 grupos pelas análises de RFLP (*restriction fragment*▶



Figura 1. (A) Plantas de mandioca com sintomas de superbrotamento (primeiro plano) contrastando com plantas saudias (segundo plano); (B) planta com sintoma de amarelcimento e superbrotamento

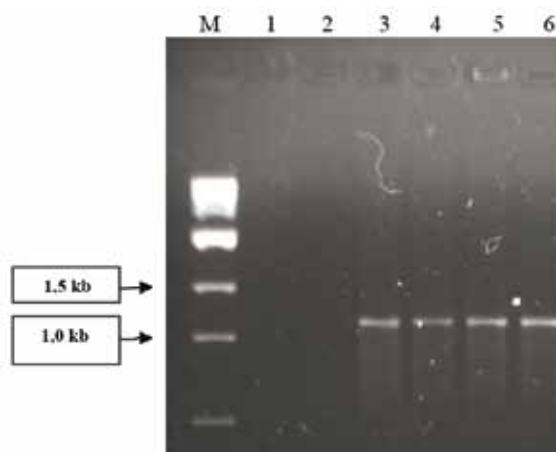


Figura 2. Detecção de fitoplasma por *nested PCR*. Linha 1: água; linha 2: planta sadia; linha 3: controle positivo; linhas 4 a 6: amostras sintomáticas; M: marcador 1kb (Ludwig)

length polymorfism). Especificamente no Brasil, os fitoplasmas identificados na mandioca estão no grupo 16SrIII, muito embora fitoplasma dos grupos 16SrI e 16SrII já foram detectados em mandioca em outros países (AROCHA et al., 2009).

No Brasil existem pelo menos três variantes da doença conhecida como superbrotamento da mandioca, mas não se sabe se as variações são causadas por fitoplasmas diferentes ou biótipos do patógeno (MASSOLA & BEDENDO, 2005). Registros da doença já existem em muitas regiões produtoras de mandioca no Brasil (MEISSNER FILHO & VELAME, 2006), mas não havia sido identificada sua ocorrência em Santa Catarina. Deve-se ressaltar que a disseminação desse patógeno não deve ocorrer por insetos nem por transmissão mecânica com ferramentas contaminadas. A forma de propagação da doença ocorre pelo plantio de manivas infectadas (MASSOLA & BEDENDO, 2005; MEISSNER FILHO & VELAME, 2006).

As formas de controle recomendadas para o superbrotamento estão baseadas na destruição das plantas doentes, na seleção de material sadio para futuros plantios e no uso de genótipos resistentes (Salamanda, Tianguá, Ubu-jara e Ibiapaba) (FUKUDA, 2006). Muito embora as plantas doentes tenham sido eliminadas, é importante continuar monitorando a doença no Estado a fim de diminuir futuras perdas provocadas pela moléstia.

Referências

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**, 4.ed., San Diego: Academic Press, 1997, p.592-594.

AROCHA, Y.; PINOL, P.; ALMEIDA, R.; QUINONES, M.; ZAYAS, M.; VARELLA, M.; MARELLO, Y.; BOA, Y.; LUCAS, Y. First report of *Phytoplasma* affecting organoponic crops in central and eastern Cuba. **Plant Pathology**, Palo Alto, v.58, p.793, 2009a.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Irvine, v.19, p.11-15, 1987.

FAUL, M. **Scientist**: cassava disease spreading at an alarming rate. Associated Press, 2013. Disponível em: <<http://www.ap.org/>>. Acesso em: 10 out. 2013.

FUKUDA, C. Doenças e seu controle. In: SOUZA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P. et al. (Eds.). **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMP, 2006. p.672-697.

HOGENHOUT, S.A.; OSHIMA, K.; AMMAR, E.-D.; KAKIZAWA, S.; KINGDOM, H.; NAMBA, S. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plant and insects. **Molecular Plant Pathology**, Londres, v.9, p.403-423, 2008.

LEE, I.M.; BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; GUNDERSEN, D.E. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. **Phytopathology**,

Palo Alto, v.85, p.728-735, 1995.

LEE, I.M.; GUNDERSEN, D.E.; DAVIS, R.D.; BARTOZIKS, I.M. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16 SrDNA and ribosomal protein gene sequences. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.48, p.1153-1169, 1998.

MASSOLA, N.S.; BEDENDO, I.P. Doenças da mandioca. In: KIMATI, H; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.449-456.

MEISSNER FILHO, P.E.; VELAME, K.V.C. Víruses. In: SOUZA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P. et al. (Eds.). **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMP, 2006. p.698-707.

PERUCH, L.A.M.; NEUBERT, E.O.; MORETO, A.L.; PEREIRA, E.F. Intensidade das doenças da mandioca em cultivos comerciais no estado de Santa Catarina. In: Congresso Brasileiro de Mandioca, 15. 2013, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Mandioca. 2013.

SMART, C.D.; SCHNEIDER, B.; BLOMQUIST, C.L.; GUERRA, L.J.; HARRISON, N. A.; AHRENS, U.; LORENZ, K.H.; SEEMULLER, E.; KIRKPATRICK, B.C. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.2988-2993, 1996. ■



VOCÊ SABIA que a Epagri/GMC produz, por ano, mais de 250 programas de rádio veiculados em mais de 140 emissoras?

