

Diagnóstico da Pinta Verde/Definhamento Precoce do Maracujazeiro

Renata Antonioli-Luizon¹
Cristiane de Jesus Barbosa²
Francisco Ferraz Laranjeira³
Elliot Watanabe Kitajima⁴
Juliana Freitas-Astúa⁵

Maracujá (do tupi mara kuya, “fruto que se serve” ou “alimento na cuia”) é a denominação dada ao fruto produzido por plantas do gênero *Passiflora* da família *Passifloraceae*. Das cerca de 600 espécies de *Passiflora*, *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo), *P. edulis* (maracujá roxo) e *P. alata* (maracujá doce) são responsáveis por 95% da área plantada no Brasil, o maior produtor mundial da fruta com 684.376 toneladas produzidas em 2008 (IBGE, 2009). Dentre os Estados brasileiros, o destaque é a Bahia, principal produtor com 275.445 t produzidas em 2008, seguido por Espírito Santo, Sergipe, Minas Gerais e São Paulo (IBGE, 2009).

A Pinta Verde e o Definhamento Precoce do Maracujazeiro

A cultura do maracujá é afetada por inúmeras doenças, sendo a podridão do colo, a mancha bacteriana e o endurecimento dos frutos consideradas

as principais (Fischer et al., 2005). No entanto, outras enfermidades podem se tornar ainda mais importantes em situações específicas. Em 1994 foi relatada no Estado da Bahia a ocorrência de declínio na cultura do maracujazeiro, associada à necrose e morte de ramos e, finalmente, da planta. Essa doença foi inicialmente designada morte prematura do maracujazeiro e, posteriormente, definhamento precoce do maracujazeiro (DPM) (Santos Filho et al., 1997). Em 1997, Kitajima et al. (1997) observaram sintomas similares em São Paulo, porém o mais característico era a presença de manchas circulares verdes em frutos e o aparecimento de áreas verdes em folhas senescentes. Essa enfermidade, denominada pinta verde do maracujazeiro (PVM), foi associada à presença de partículas virais baciliformes no citoplasma de células infectadas e foi transmitida para plantas sadias pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Figura 1). A partir dessa caracterização inicial, o agente causal foi denominado vírus da pinta verde do maracujazeiro ou Passion fruit green spot virus (PFGSV) (Kitajima et al., 1997).

¹Bióloga, aluna de mestrado do Programa de PG em Microbiologia Agrícola, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, renataal@centrodecitricultura.br

²Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Agronomia, Pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, barbosa@cnpmf.embrapa.br

³Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, chico@cnpmf.embrapa.br

⁴Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, Professor da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP e pesquisador do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica, Piracicaba, SP, ewkitaji@esalq.usp.br

⁵Engenheira Agrônoma, Ph.D. em Fitopatologia, Pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, e do Centro APTA Citros Sylvio Moreira-IAC, juliana@cnpmf.embrapa.br

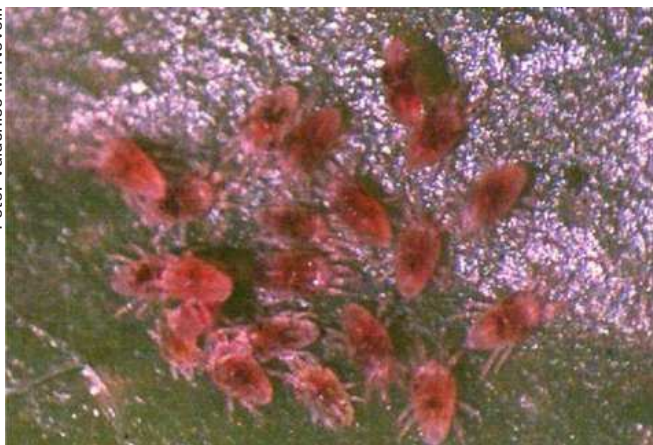


Figura 1. Aspecto de uma colônia de ácaros *Brevipalpus phoenicis*.

Estudos posteriores evidenciaram que, de maneira similar ao PFGSV, o agente causal do DPM é um vírus baciliforme que provoca efeitos citopáticos semelhantes em células infectadas de maracujazeiro e é transmitido por ácaros do gênero *Brevipalpus*, o que sugere que duas denominações foram dadas à mesma doença. Sintomas semelhantes ao do DPM ou da PVM também foram observados em Minas Gerais, Rio de Janeiro, Sergipe, Rondônia, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pará, Maranhão e Distrito Federal (Santos Filho et al., 1997; 1999; Kitajima et al., 2003). Em todos esses locais a doença estava associada à infestação pelo ácaro *B. phoenicis*.

A importância dessa enfermidade é crescente, os prejuízos que causa são significativos, o desconhecimento de sua etiologia é grande e, até pouco tempo, os métodos para o seu diagnóstico eram imprecisos. Em função disso, o objetiva-se descrever e discutir os principais métodos para identificar o DPM/PVM, além de relatar o desenvolvimento da primeira metodologia para o diagnóstico rápido, específico e confiável da doença.

O Diagnóstico da Pinta Verde/Definhamento Precoce do Maracujazeiro

Sintomas

Tradicionalmente, as enfermidades causadas por vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTBs) têm sido diagnosticadas com base nos sintomas típicos de lesões locais cloróticas ou necróticas nos tecidos afetados e

pelos efeitos citopáticos observados em cortes ultrafinos de tecidos lesionados através de microscopia eletrônica de transmissão.

No caso da pinta verde, os frutos infectados, independentemente do grau de maturação, apresentam manchas circulares verdes (Figura 2A e 2B), que tendem a serem maiores em maracujá doce (Figura 2A). Em folhas, as lesões costumam ser mais evidentes quando estas estão senescentes e aparecem na forma de anéis concêntricos ou faixas verdes ao longo da nervura principal e secundária (Figura 2C). Há ainda intensa queda de folhas maduras, levando à diminuição da vida útil das plantas. Em ramos, as lesões necróticas são bastante evidentes (Figura 2D), podendo coalescer e resultar no anelamento do ramo e consequente morte da planta (Kitajima et al., 1997).

No entanto, apesar de extremamente úteis, sintomas não devem ser o único método de diagnóstico da enfermidade, por serem passíveis de confusão com aqueles causados por outro patógeno ou por algum agente abiótico. Devem ser utilizados sempre em combinação com outro método para a confirmação da doença. A associação entre sintomas característicos de DPM/PVM e presença de ácaros *Brevipalpus* spp. certamente sugere o diagnóstico, mas o mesmo só pode ser realizado com segurança após a reprodução dos sintomas em plantas-teste inicialmente sadias, por meio desses ácaros, o que pode demorar cerca de um a três meses.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Conforme mencionado anteriormente, exames de cortes ultrafinos de tecido infectado ao MET têm sido tradicionalmente utilizados para a detecção de vírus baciliformes transmitidos por ácaros *Brevipalpus*, tanto em maracujazeiro quanto em outras culturas (Kitajima et al., 2003). Os exames em MET consistentemente revelam a presença de partículas baciliformes medindo 50-70nm x 100-120nm em cisternas do retículo endoplasmático e viroplasma denso no citoplasma (Kitajima et al., 1997, 2003; Figura 3). No entanto, apesar de ser um teste útil, é de custo elevado e demanda equipamentos e pessoal especializado, além de muito tempo de análise das seções, inviabilizando o diagnóstico de grande número de amostras (Local et al., 2003). Além do mais, exames ao MET são úteis na detecção de um determinado patógeno, mas muitas vezes não na sua identificação.

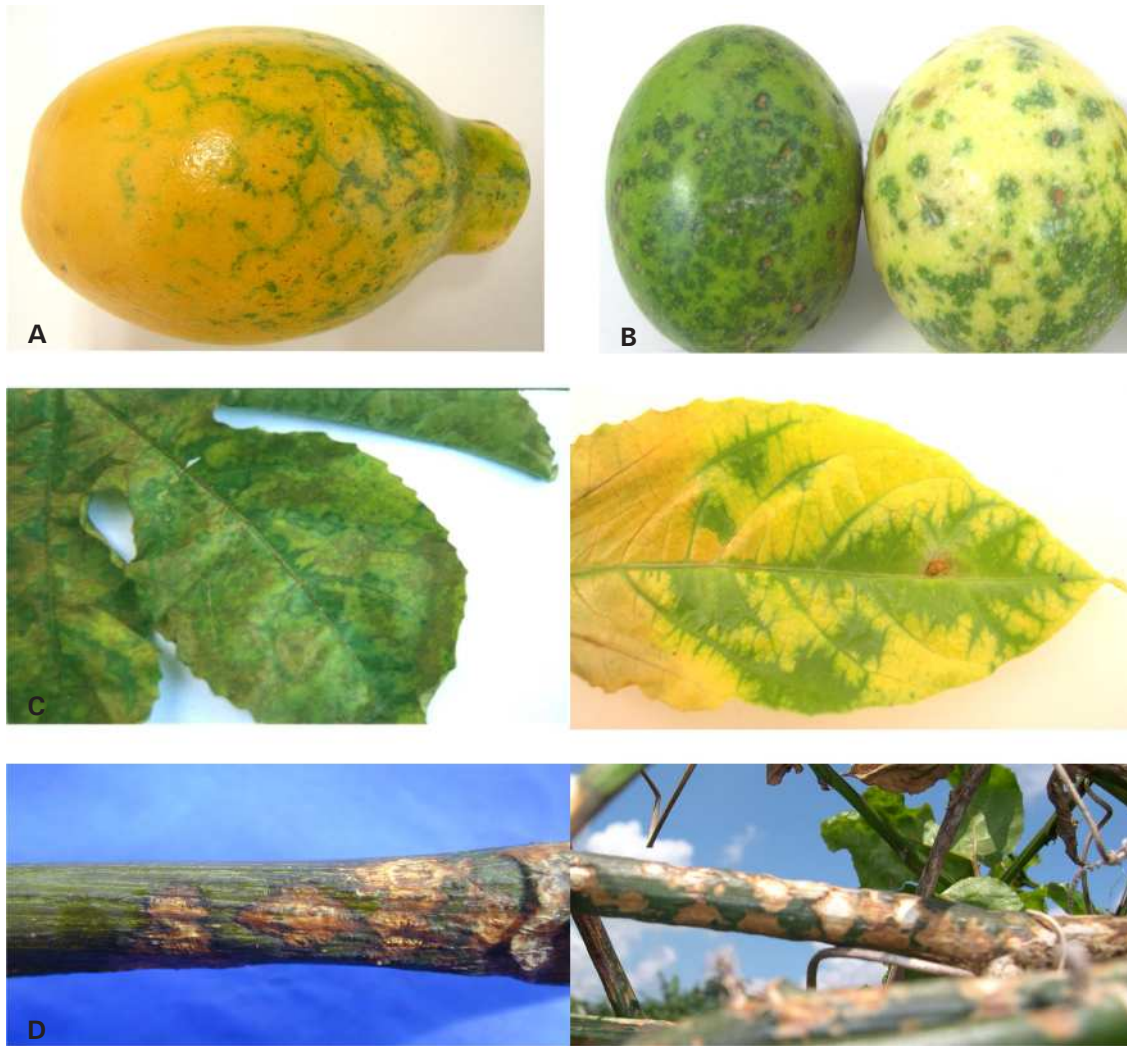


Figura 2. Sintomas de pinta verde/definhamento precoce em diferentes tecidos de maracujazeiro. **A)** fruto de maracujá doce; **B)** frutos de maracujá amarelo; **C)** folhas e **D)** ramos.

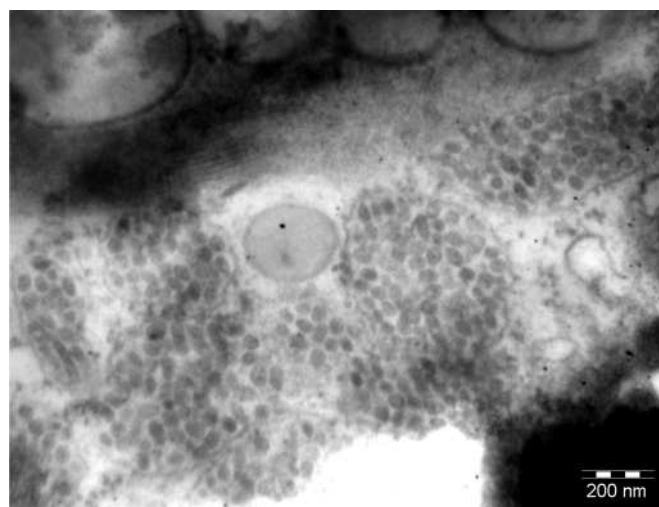


Figura 3. Micrografia de secções ultrafinas de tecido de maracujazeiro com lesões de pinta verde do maracujazeiro evidenciando partículas baciliformes contidas em cisternas do retículo endoplasmático.

Detecção molecular por meio de RT-PCR

Em função da demanda por um método de diagnóstico para o DPM/PVM que fosse específico, rápido, eficiente e confiável, foi recentemente desenvolvido um método de diagnóstico molecular baseado na reação em cadeia da polimerase após a transcrição reversa (RT-PCR), que detecta especificamente o vírus das amostras. Por meio desse teste, foi possível também determinar que, conforme suspeitado, pinta verde e definhamento precoce são duas denominações para a mesma enfermidade, uma vez que o teste funciona para a detecção dos dois agentes causais enquanto não detecta outros vírus associados à cultura, como os vírus do mosaico do

pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) e do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* passiflora strain (CABMV) (Antonioli-Luizon et al., 2009).

O desenvolvimento desse método se deu a partir do seqüenciamento parcial do genoma do PFGSV (isolado de Limeira, SP) e desenho de iniciadores (primers) específicos para duas regiões do genoma viral (Antonioli-Luizon, Kitajima e Freitas-Astúa, *dados não mostrados*). Esses iniciadores foram validados para cerca de 30 amostras de maracujazeiro doce ou azedo provenientes dos Estados de São Paulo e da Bahia e do Distrito Federal. Um exemplo do resultado obtido em RT-PCR pode ser observado na Figura 4.

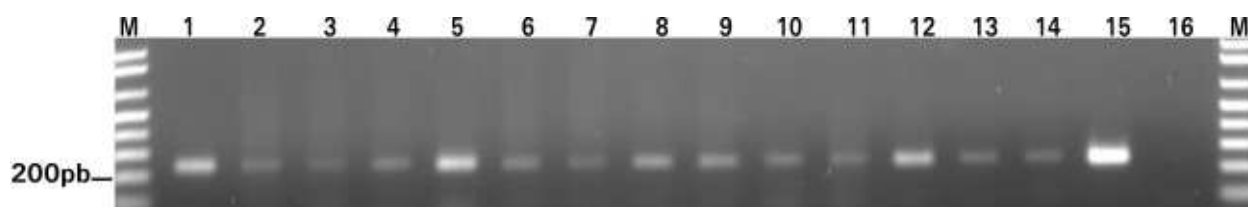


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da RT-PCR, usando os iniciadores específicos para o a região codificadora da proteína de movimento do PFGSV. **M** – Marcador molecular 1kbp DNA Ladder Plus (Invitrogen); **1 a 15** - amostras de maracujazeiro de diferentes localidades de São Paulo, Bahia e Distrito Federal, exibindo sintomas de pinta verde/ definhamento precoce do maracujazeiro; **16** – amostra sadia de maracujazeiro.

Considerações Finais

Por se tratar de uma doença relativamente nova do maracujazeiro e ainda pouco conhecida por produtores e técnicos, maior cuidado deve ser tomado no diagnóstico do DPM/PVM a fim de se evitar a entrada do patógeno em novas áreas de cultivo. Por outro lado, uma vez corretamente identificada a enfermidade, seu manejo pode ser obtido por meio do controle do ácaro vetor.

Com o desenvolvimento do primeiro método confiável, rápido e específico para a diagnose da pinta verde do maracujazeiro, não apenas há mais segurança no diagnóstico, como foi possível mostrar, inequivocamente, que essa enfermidade é causada pelo mesmo agente etiológico do definhamento precoce do maracujazeiro, confirmando as suspeitas anteriores.

Referências Bibliográficas

ANTONIOLI-LUIZON, R.; FREITAS-ÁSTUA, J.; REZENDE, J. A. M.; MACHADO, M. A.; KITAJIMA, E. W. Detecção específica do vírus da pinta verde do maracujazeiro por RT-PCR. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 34, ago. 2009. Suplemento. Edição dos Resumos do XLII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Rio de Janeiro, ago. 2009. Suplemento. Resumo 907.

FISCHER, I. H.; KIMATI, H.; REZENDE, J. A. M. Doenças do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.) Manual de fitopatologia. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2 Doenças de plantas cultivadas. p.467-474.

Sistema IBGE de Recuperação Automática SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 18 out. 2009.

KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A. M.; RODRIGUES, J. C. V.; CHIAVEGATO, L. G.; PIZA JÚNIOR, C. T.; MOROZINI, W. Green spot of passion fruit, a possible viral disease associated with infestation by the mite *Brevipalpus phoenicis*. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 22, n. 4, p. 555-559, dez. 1997.

KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A.; RODRIGUES, J. C. Passion fruit green spot virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuiplapidae) on passion fruit in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, Netherlands, v.30 n. 1-3, p. 225-231, 2003.

LOCALI, E. C.; FREITAS-ASTUA, J.; SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; ASTUA-MONGE, G.; ANTONIOLI, R.; KITAJIMA, E. W.; MACHADO, M. A. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to the citrus production in the Americas. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 1317-1321, 2003.

SANTOS FILHO, H. P.; LIMA, A. de A.; BORGES, A. L.; FANCELLI, M.; NORONHA, A. C. da S.; TRINDADE, A. V.; CASTRO NETO, M. T. de; BARBOSA, C. de J.; COSTA, D. da C.; ALMEIDA, O. A. de A.; CALDAS, R. C. **Fatores químicos e biológicos do solo associados ao definhamento precoce do maracujazeiro**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 1997. 4 p.. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Pesquisa em andamento, 47).

SANTOS FILHO, H. P.; LIMA, A. A.; BARBOSA, C. J.; BORGES, A. L.; NORONHA, A. C. S.; CALDAS, R. C.; CHAGAS, C. M.; MYAY, T. **Definhamento precoce do maracujazeiro**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1999. 5 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Comunicado técnico, 60).

Comunicado Técnico, 132

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical

Endereço: Rua Embrapa, s/n, Caixa Postal 07, 44380-000, Cruz das Almas - Bahia

Fone: (75) 3312-8000

Fax: (75) 3312-8097

E-mail: sac@cnpmf.embrapa.br

1ª edição

(2009): on-line

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: Aldo Vilar Trindade.

Secretária: Maria da Conceição P. Borba dos Santos.

Membros: Abelson da Silva Gesteira, Ana Lúcia Borges, Antonio Alberto Rocha Oliveira, Carlos Alberto da Silva Ledo, Davi Theodoro Junghans, Eliseth de Souza Viana, Léa Ângela Assis Cunha, Marilene Fancelli.

Expediente

Supervisão editorial: Ana Lúcia Borges.

Revisão de texto: Antonio Alberto Rocha Oliveira e Hermes Peixoto Santos Filho.

Revisão gramatical: Valdíque Martins Medina.

Tratamento das ilustrações: Maria da Conceição Borba.

Editoração eletrônica: Maria da Conceição Borba.