

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Identificação molecular de fitoplasmas associados ao amarelo da abobrinha-
de-moita e à filodia de frutos do morangueiro**

Luciano de Aquino Melo

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de Concentração:
Fitopatologia**

**Piracicaba
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Luciano de Aquino Melo
Engenheiro Agrônomo

**Identificação molecular de fitoplasmas associados ao amarelo da abobrinha-de-moita e à
filodia de frutos do morangueiro**

Orientador:
Prof. Dr. **IVAN PAULO BEDENDO**

**Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Agronomia. Área de
Concentração: Fitopatologia**

**Piracicaba
2008**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Melo, Luciano de Aquino

Identificação molecular de fitoplasmas associados ao amarelo da abobrinha-de-moita e à filodia de frutos de morangueiro / Luciano de Aquino Melo - - Piracicaba, 2008.
88 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Abobrinha 2. Filogenia 3. Fitoplasmas - técnicas moleculares 4. Morango
5. Superbrotamento I. Título

CDD 635.62
M528i

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

À todos aqueles, que mesmo de forma tímida, contribuíram para minha formação.

OFEREÇO.

"Ouço e esqueço
Vejo e recordo
Faço e compreendo."

Confúcio (551 - 479 a.C.)

A minha namorada, Joana
Aos meus pais, Francisco e Maria Lúcia
Aos meus irmãos, Francisco Júnior e Melrilene,
E aos meus sobrinhos Ana Clara e Samuel.
Pelo amor, confiança e por serem meu porto seguro de todas as horas.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À DEUS *et al.* por terem me concedido à oportunidade de concluir mais uma etapa na minha recente carreira profissional.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo, pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos transmitidos, pela confiança e incentivo e pelo agradável convívio durante esse período.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao pesquisador Dr. Valdir Atsushi Yuki, do Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, pelo fornecimento do material de abobrinha utilizado nesta dissertação.

Aos pesquisadores Dr. José Aires Ventura e Dr. Hélcio Costa, do Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural – Incaper, pelo fornecimento do material de morangueiro utilizado nesta dissertação.

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima pelas fotos de microscopia eletrônica de transmissão utilizadas nesta dissertação.

Ao Dr. Ricardo Harakava, do Instituto Biológico - São Paulo, pelo auxílio no sequenciamento das amostras.

À amiga Eliane Gonçalves da Silva, pelo auxílio na interpretação das seqüências.

Aos demais professores e aos funcionários do Setor de Fitopatologia pelos ensinamentos e auxílios dispensados.

Aos amigos do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos, Alan, Ana Paula, Bárbara, Daniela, Eliane, Isolda, Luiz Fernando, Maria Cristina, Raquel, Renata Bocci, Renata Brito, Renata Lanza, Ricardo e Samuel, pela amizade, conhecimentos compartilhados e agradável convívio.

Aos amigos Adriana Jadão, Adriana Moreira, Ana Paula Mello, Daniela Flôres e Diogo Togni pela inesquecível amizade.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
Referências	12
2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FITOPLASMA ASSOCIADO AO AMARELO DA ABOBRINHA-DE-MOITA	15
Resumo	15
Abstract	15
2.1 Introdução	16
2.2 Desenvolvimento	17
2.2.1 Revisão Bibliográfica	18
2.2.2 Material e Métodos.....	19
2.2.2.1 Obtenção das plantas	19
2.2.2.2 Extração do DNA total	20
2.2.2.3 Detecção de fitoplasma por PCR	21
2.2.2.4 Identificação de fitoplasma por PCR.....	22
2.2.2.5 Identificação de fitoplasmas por análise de RFLP	23
2.2.3 Resultados e Discussão.....	24
2.2.3.1 Detecção de fitoplasma por PCR	24
2.2.3.2 Identificação do fitoplasma por PCR	25
2.2.3.3 Identificação do fitoplasma por análise de RFLP	26
2.3 Conclusões.....	29
Referências	29
3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FITOPLASMAS ASSOCIADOS À FILODIA DE FRUTOS DO MORANGUEIRO	35
Resumo	35
Abstract	36
3.1 Introdução.....	36
3.2 Desenvolvimento	39

3.2.1 Revisão Bibliográfica	39
3.2.1.1 Doenças incitadas por fitoplasmas em morangueiro	40
3.2.1.2 Filodia de frutos de morangueiro	43
3.2.1.3 Controle das doenças incitadas por fitoplasmas em morangueiro	44
3.2.2 Material e Métodos.....	45
3.2.2.1 Obtenção das plantas	45
3.2.2.2 Microscopia Eletrônica.....	47
3.2.2.3 Extração do DNA total das amostras	47
3.2.2.3.1 Extração com <i>kit</i> comercial.....	48
3.2.2.3.2 Extração rápida.....	48
3.2.2.4 Detecção de fitoplasmas por PCR.....	49
3.2.2.5 Identificação de fitoplasmas por PCR	50
3.2.2.6 Identificação de fitoplasmas por análise de RFLP	51
3.2.2.7 Sequenciamento do 16S rDNA.....	52
3.2.2.7.1 Purificação	52
3.2.2.7.2 Clonagem	52
3.2.2.7.3 Sequenciamento	54
3.2.2.7.4 Análise filogenética e de sítios putativos de restrição e cálculo do coeficiente de similaridade	54
3.2.3 Resultados e Discussão.....	57
3.2.3.1 Microscopia Eletrônica.....	57
3.2.3.2 Detecção de fitoplasmas por PCR.....	59
3.2.3.3 Identificação de fitoplasmas por PCR	60
3.2.3.4 Identificação de fitoplasmas por análise de RFLP	62
3.2.3.5 Sequenciamento do 16S rDNA.....	68
3.3 Conclusões.....	79
Referências	79

RESUMO

Identificação molecular de fitoplasmas associados ao amarelo da abobrinha-de-moita e à filodia de frutos do morangueiro

Frequentemente, fitoplasmas têm sido associados com doenças em cucurbitáceas, tanto cultivadas, como silvestres e daninhas. Em abobrinha-de-moita cultivada no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, foi observado superbrotamento de hastes, malformação da parte aérea e folhas deformadas e enrugadas, sugerindo uma possível infecção por fitoplasmas. A associação de fitoplasmas com morangueiro parece ser rara no Brasil. No entanto, nos municípios de Domingos Martins e Santa Maria de Jetibá, Estado do Espírito Santo, foram observadas plantas de morango apresentando expressiva filodia de frutos, sintoma suspeito de infecção por fitoplasmas. O presente trabalho teve por objetivos detectar e identificar molecularmente os possíveis fitoplasmas associados às plantas doentes. O DNA total das amostras, extraído com um *kit* comercial ou pelo protocolo 2X CTAB, foi amplificado por dupla PCR com os *primers* universais P1/Tint e R16F2n/R16R2. Os produtos amplificados com o primeiro par de *primers* foram reamplificados usando os pares R16(I)F1/R16(I)R1 e R16(III)F2/R16(III)R1, visando a identificação e os produtos de dupla PCR, amplificados com o segundo par de *primers*, utilizados na análise por RFLP e no sequenciamento. Para as análises filogenéticas adotaram-se seqüências nucleotídicas de fitoplasmas pertencentes a diversos grupos. Observações feitas ao microscópio eletrônico de transmissão revelaram a presença de corpúsculos pleomórficos típicos de fitoplasmas no floema de morangueiro. Por dupla PCR com os *primers* universais, foi consistentemente detectada a presença de fitoplasmas nos tecidos das plantas doentes. Com o uso dos *primers* específicos foi possível a identificação de um fitoplasma afiliado ao grupo 16SrIII em abobrinha-de-moita e de fitoplasmas afiliados aos grupos 16SrI e 16SrIII em morangueiro. A análise por RFLP confirmou os resultados obtidos com os *primers* específicos e demonstrou a presença de um fitoplasma afiliado ao grupo 16SrXIII nas amostras de morangueiro. O sequenciamento permitiu a obtenção de duas seqüências a partir das amostras de morangueiro. A primeira seqüência nucleotídica, SFP-Br1 (EU719107), apresentou 99% de similaridade com as seqüências dos fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII e a análise filogenética mostrou um maior relacionamento com o subgrupo 16SrIII-B. A segunda seqüência nucleotídica, SFP-Br-3 (EU719109), apresentou 98% de similaridade com as seqüências dos fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrXIII. A análise filogenética mostrou este fitoplasma como um representante do grupo 16SrXIII, porém localizado em um novo ramo, diverso daqueles conhecidos para representantes deste grupo. Os coeficientes de similaridade calculados para SFP-Br3 e para os subgrupos 16SrXIII-A, 16SrXIII-B e 16SrXIII-C variaram de 0,91 a 0,96, o que distinguiu o fitoplasma presente no morangueiro dos outros subgrupos de fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrXIII já existentes. Assim, através de análise molecular, foi possível relatar a abobrinha-de-moita como um novo hospedeiro de fitoplasmas do grupo 16SrIII, bem como detectar e identificar distintos fitoplasmas nas plantas de morango, inclusive um novo representante, aqui denominado de 16SrXIII-D.

Palavras-chave: Mollicutes; *Cucurbita pepo* L.; *Fragaria x ananassa* Duch.; Superbrotamento; 16SrXIII-D.

ABSTRACT

Molecular identification of phytoplasmas associated with summer squash yellow and strawberry fruit phyllody

Phytoplasmas have been associated with some diseases of cucurbit as cultivated as sylvester and weed species. Symptoms of witches' broom and leaf malformation were observed in summer squash cultivated in the Vale do Ribeira, São Paulo State, suggesting infection by phytoplasma. The association of phytoplasmas with strawberry diseases seems to be rare in Brazil. Nevertheless, in Domingos Martins and Santa Maria de Jetibá cities, located in Espírito Santo State, strawberries plants with expressive fruit phyllody were observed. This kind of symptom also suggested infection associated to phytoplasma. So, the present work was conducted in order to detect and identify possible phytoplasmas associated to symptomatic plants through molecular analysis. The DNA, extracted with a commercial kit or through 2X CTAB protocol, was amplified by nested PCR with universal primers P1/Tint and R16F2n/R16R2. The amplified products with the first primers pairs were reamplified using the primers R16(I)F1/R16(I)R1 and R16(III)F2/R16(III)R1 for specific identification; and the products of nested PCR, amplified from second primers pair, were submitted to RFLP analysis and to sequencing. For phylogenetic analysis were included sequences of phytoplasmas belonging to many groups. Results showed that pleomorphic bodies were present in the phloem of diseased strawberries plants, by using electronic microscopy. The amplifications by nested PCR with universal primers allowed the detection of phytoplasmas in the tissues of symptomatic strawberry and squash plants. PCR assays with specific primers revealed a phytoplasma of 16SrIII group in summer squash and phytoplasmas of 16SrI and 16SrIII groups in strawberry plants. RFLP analysis confirmed the occurrence of a member of 16SrIII group in summer squash and demonstrated the presence of phytoplasmas affiliated to 16SrI, 16SrIII and 16SrXIII groups in strawberry samples. The sequencing allowed the attainment of two sequences from strawberries samples. The first sequence, designated SFP-Br1 (EU719107) representing a phytoplasma affiliated to 16SrIII group, showed 99% of similarity with other sequences of phytoplasmas affiliated with this group. The phylogenetic analysis showed that this phytoplasma was more related with the subgroup 16SrIII-B. The second sequence, designated SFP-Br3 (EU719109) representing a phytoplasma affiliated to 16SrXIII group, showed 98% of similarity with members of this group. The phylogenetic analysis revealed this phytoplasma belonging to 16SrXIII group, but located on a new different branch from those previously known. The similarity coefficient indicated variations between SFP-Br3 and the three phytoplasmas affiliated to 16SrXIII-A, 16SrXIII-B and 16SrXIII-C sub-groups, varying on 0.91 to 0.96, distinguishing the strawberry phytoplasma from the other sub-groups of phytoplasma affiliated with the 16SrXIII group already existing. This way, through molecular analysis, it was possible to relate summer squash as a new host of 16SrIII group phytoplasma, as well as detecting and identifying distinct phytoplasmas on strawberry plants and characterize a new 16SrXIII-D subgroup.

Keywords: Mollicutes; *Cucurbita pepo* L.; *Fragaria x ananassa* Duch.; Witche's broom, 16SrXIII-D

1 INTRODUÇÃO

Uma diversidade de espécies de plantas de valor comercial incluindo aquelas alimentícias, ornamentais e florestais tem sido afetada por anomalias incitadas por fitoplasmas. Estes organismos foram descobertos em 1967 como agentes associados às doenças conhecidas por amarelos e por sua semelhança com os micoplasmas que ocorrem em animais e humanos receberam a denominação de *Mycoplasma-like organisms* – MLOs (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). Em 1994, o termo trivial fitoplasma foi adotado para designar os representantes deste novo grupo de fitopatógenos (PHYTOPLASMA TAXONOMY GROUP, 2004).

Os fitoplasmas podem ser definidos como organismos procarióticos desprovidos de parede celular, parasitas intracelulares obrigatórios de floema e patogênicos às plantas (DAVIS, 1995). Apesar da similaridade morfológica, o genoma dos fitoplasmas é apenas remotamente relacionado com o genoma dos micoplasmas, sendo assim representativos de um *taxon* distinto. Os fitoplasmas pertencem ao Reino Monera, Domínio Bacteria, Filo Tenericutes (bactérias gram positivas com baixo conteúdo G+C e desprovidas de parede celular) e Classe Mollicutes, sendo descendentes de um ancestral comum - *Acholeplasma laidlawii* (AGRIOS, 2005; DAVIS, 1995; BERTACCINI, 2007; HOGENHOUT et al., 2008).

Estruturalmente, as células dos fitoplasmas são limitadas por uma membrana e possuem um protoplasma contendo ribossomos e material genético. A morfologia é bastante variável, apresentando formato esferoidal a ovóide ou, menos frequentemente, tubular irregular a filamentosos. A dimensão compreende entre 200-800 nm, sendo que o genoma possui de 530-1350 kilobases (AGRIOS, 2005; LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000).

Na natureza, os fitoplasmas são comumente transmitidos e disseminados por insetos sugadores das famílias Cicadellidea (cigarrinhas) e Fulgoridea (psilídeos) (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000), porém existem relatos de representantes da família Coreidae (percevejos) como vetores (MITCHELL, 2004). Os fitoplasmas podem ser adquiridos com maior eficiência por ninfas do que por cigarrinhas adultas e sobreviver através de subseqüentes ecdises. Apesar dos relatos de transmissão transovariana (HANBOONSONG et al., 2002; KAWAKITA et al., 2000; ALMA et al., 1997), a capacidade da progênie infectada transmitir o agente patogênico ainda não foi comprovada (FIRRAO; GARCIA-CHAPA; MARZACHI, 2007). Dessa forma, os

indivíduos da progênie devem se alimentar em plantas infectadas para se tornarem vetores infectivos (AGRIOS, 2005).

Os fitoplasmas não foram ainda cultivados em meios de cultura, dessa forma, nenhuma doença de planta tem sido reproduzida em planta sadia pela inoculação direta de fitoplasmas obtidos de plantas doentes (AGRIOS, 2005). Tal fato tem conferido limitações à aplicação dos *Postulados de Koch*. No entanto, fortes evidências comprovam a patogenicidade desses agentes, destacando-se a sua constante presença em plantas sintomáticas e ausência em plantas sadias; o desenvolvimento da doença em plantas sadias após sua transmissão por vetores, enxertia ou *Cuscuta* spp.; a sua eliminação parcial ou total em plantas tratadas com antibióticos do grupo das tetraciclina ou termoterapia e conseqüente remissão dos sintomas (DAVIS, 1995).

A detecção desses organismos em plantas e vetores tem sido realizada através de coloração DAPI, microscopia eletrônica, serologia e técnicas moleculares como *Polymerase Chain Reaction* – PCR (MARGARIA et al., 2007; DAVIS, 1995; WANG; HIRUKI, 2001; HODGETS et al., 2007). Inicialmente, a identificação e classificação de fitoplasmas eram baseadas em propriedades biológicas, tais como, sintomas induzidos em plantas, gama de hospedeiros e relações com o inseto vetor. No entanto, o processo se mostrava laborioso e inconsistente (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). O atual sistema de classificação tem por base a genética dos fitoplasmas refletida na homologia do DNA cromossomal e na seqüência de nucleotídeos de genes ribossomais e permite que as análises de perfis coletivos de *Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP revelem a identidade de fitoplasmas dentro de 18 diferentes grupos (LEE et al., 1998; MONTANO et al., 2001; AROCHA et al., 2005; LEE et al., 2006). Recentemente, foi feita a proposta da classificação em 28 grupos, com base na análise simulada por computador - *in silico* RFLP (WEI et al., 2007). A nomenclatura binomial latina não tem sido aplicada aos fitoplasmas, porém para alguns representantes tem sido proposto o *taxon* provisório *Candidatus* ao nível de espécie (AGRIOS, 2005; CHRISTENSEN et al., 2005).

Os sintomas causados por fitoplasmas sugerem alterações no balanço hormonal da planta e foram, ao longo do tempo, agrupados sob o termo amarelos. Estes sintomas envolvem clorose, superbrotamento, enfezamento, virescência (desenvolvimento de clorofila em órgãos não clorofilados), filodia (transformação de órgãos florais em folhas), esterilidade de flores e declínio generalizado (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). Alterações no sistema radicular e

necrose de floema frequentemente precedem os sintomas visíveis exteriormente (AGRIOS, 2005; CHRISTENSEN et al., 2005).

O controle das doenças incitadas por esses agentes envolvem, primordialmente, medidas de prevenção, como o plantio de mudas e estacas livres do patógeno, o uso de variedades que apresentem algum nível de resistência, o controle do inseto vetor e práticas culturais visando à eliminação de fontes de inóculo (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). O tratamento com antibióticos do grupo das tetraciclinas tem sido aplicado em plantas com justificável retorno financeiro ou de grande importância ornamental, porém não tem sido adotado como método de controle em larga escala, por problemas de efeito residual e pressão de seleção em direção ao surgimento de formas resistentes do patógeno (KITAJIMA, 1994). Na busca de novas estratégias de controle, têm sido testadas atividades de indutores de resistência, de compostos secundários elaborados por fungos e plantas e de outras substâncias biologicamente ativas em associações fitoplasmas-*Catharanthus roseus* (L.) G. Don (CHIESA et al., 2007).

Uma das razões do estudo dos fitoplasmas tem sido a necessidade de se determinar métodos práticos para o controle das doenças e, para tanto, as pesquisas têm envolvido a associação de técnicas moleculares e métodos tradicionais (DAVIS, 1995). As doenças associadas aos fitoplasmas encontram-se disseminadas por todo mundo e em muitos casos são responsáveis por epidemias de impacto, bem como pela adoção de medidas quarentenárias (BERTACCINI, 2007). Os cultivos de espécies olerícolas frequentemente têm sido afetados por esses patógenos, os quais podem causar danos irreversíveis, tanto pelo curto ciclo das culturas como pelas escassas informações sobre gama de hospedeiros, insetos vetores e fontes de inóculo (DAVIS, 1995). Assim, a condução de trabalhos que venham contribuir no sentido de preencher essas lacunas é plenamente justificável. Desta forma, este trabalho teve por objetivos evidenciar e identificar por métodos moleculares os fitoplasmas associados ao amarelo da abobrinha-de-moita, ocorrente em São Paulo, e à filodia de frutos do morangueiro, observado no Espírito Santo.

Referências

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. 952 p.

ALMA, A.; BOSCO, D.; DANIELLI, A.; BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; ARZONE, A. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on health plants. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 115-121, 1997.

AROCHA, Y.; LÓPEZ, M.; PIÑOL, B.; FERNÁNDEZ, M.; PICORNELL, B.; ALMEIDA, R.; PALENZUELA, I.; WILSON, M. R., JONES, P. 'Candidatus Phytoplasma graminis' and 'Candidatus Phytoplasma caricae', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 55, n. 6, p. 2451-2463, 2005.

BERTACCINI, A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. **Frontiers in Bioscience**, Albertson, v. 12, n. 1, p. 673-689, 2007.

CHIESA, S.; PRATI, S.; ASSANTE, G.; MAFFI, D.; BIANCO, P.A. Activity of synthetic and natural compounds for phytoplasma control. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 313-314, 2007.

CHRISTENSEN, N.M.; AXELSEN, K.B.; NICOLAISEN, M.; SCHULZ, A. Phytoplasmas and their interactions with hosts. **Trends in Plant Science**, London, v. 10, n. 11, p. 526-535, 2005.

DAVIS, R.E. Fitoplasmas: Fitopatógenos procarióticos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodes. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Ed). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: RAPP, 1995. v. 3, p. 1-27.

FIRRAO, G.; GARCIA-CHAPA, M.; MARZACHI, C. Phytoplasmas: Genetics, Diagnosis and Relationships with the Plant and Insect Host. **Frontiers in Bioscience**, Albertson, v. 12, n. 1, p. 1353-1375, 2007.

HANBOONSONG, C.; CHOOSAI, S.; PANYIM, D.; DAMAK, S. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 97-103, 2002.

HODGETTS, J.; BALL, T.; BOONHAM, N.; MUMFORD, R.; DICKINSON, M. Use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) for identification of phytoplasmas in plants. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, n. 3, p. 357-365, 2007.

HOGENHOUT, S.A.; OSHIMA, K.; AMMAR, EL-D.; SHIGEYUKIKAKIZAWA, KINGDOM, H.N.; NAMBA, S. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 9, n. 4, p. 403-423, 2008.

KAWAKITA, H.; SAIKI, T.; WEI, W.; MITSUHASHI, W.; WATANABE, K.; SATO, M. Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 8, p. 909-914, 2000.

KITAJIMA, E.W. Enfermidades de plantas associadas a organismo do tipo micoplasma. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: RAPP, 1994. v. 2, p. 153-174.

LEE, I.-M.; BOTTFNER, K. D.; SECOR, G.; RIVERA-VARAS, V. 'Candidatus Phytoplasma americanum', a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 56, n. 7, p. 1593-1597, 2006.

LEE, I.-M.; DAVIS, R.E.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Phytoplasma: phytopathogenic Mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 221-255, 2000.

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 of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 48, n. 4, p. 1153-1169, 1998.

MARGARIA, P.; ROSA, C.; MARZACHÌ, C.; TURINA, M.; PALMANO, S. Detection of flavescence dorée phytoplasma in grapevine by reverse-transcription PCR. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, n. 11, p. 1496-1501, 2007.

MITCHELL, P.L. Heteroptera as Vectors of Plant Pathogens. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 519-545, 2004.

MONTANO, H.G.; DAVIS, R.E.; DALLY, S.H.; PIMENTEL, J.P.; BRIOSO, P.S.T. 'Candidatus Phytoplasma brasiliense', a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 51, n. 3, p. 1109-1118, 2001.

THE IRPCM PHYTOPLASMA/SPIROPLASMA WORKING TEAM – PHYTOPLASMA TAXONOMY GROUP. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, n. 4, p. 1243-1255, 2004.

WANG, K., HIRUKI, C. Use of heteroduplex mobility assay for identification and differentiation of phytoplasmas in the aster yellows group and the clover proliferation group. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 6, p.546-552, 2001.

WEI, W.; DAVIS, R.E.; LEE, I.-M.; ZHAO, Y. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 57, n. 8, p. 1855-1867, 2007.

2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FITOPLASMA ASSOCIADO AO AMARELO DA ABOBRINHA-DE-MOITA

Resumo

Fitoplasmas são organismos procarióticos, desprovidos de parede celular e parasitas intracelulares obrigatórios de tecidos de floema. Esses patógenos têm sido associados com doenças em cucurbitáceas, tanto em espécies cultivadas e silvestres, como em daninhas. Em plantio comercial localizado no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, foram observadas plantas de abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* L.) que apresentavam superbrotamento de ramos, malformação da parte aérea e folhas deformadas e enrugadas. Com o objetivo de evidenciar a associação de fitoplasma com os sintomas observados, bem como identificar este agente foi conduzido o presente trabalho. Através de dupla PCR, com os pares de *primers* universais para fitoplasmas, P1/Tint e R16F2n/R16R2, foi demonstrada a presença consistente desses organismos nos tecidos de planta doente, pela amplificação de um fragmento genômico de 1200 pb correspondente ao 16S rDNA. Pela mesma técnica, um fitoplasma afiliado ao grupo 16SrIII foi identificado pela amplificação de um produto de 800 pb com o par de *primers* específico R16(III)F2/R16(III)R1. A análise de RFLP, com o uso das enzimas de restrição *AluI*, *RsaI*, *HpaII*, *HhaI*, *MboI*, *KpnI* e *MseI* possibilitou confirmar a identidade do fitoplasma como sendo um representante do grupo 16SrIII. Este trabalho se constitui no primeiro relato da associação entre fitoplasma e abobrinha-de-moita no território brasileiro, evidenciando mais uma espécie de cucurbitácea como hospedeira de fitoplasma.

Palavras-chave: Mollicutes; *Cucurbita pepo* L.; Superbrotamento; RFLP

Abstract

Phytoplasmas are procaryote wall-less organisms, obligate intracellular parasites of phloem tissue. Those pathogens have been associated with cucurbits diseases on cultivated, sylvester and weed species. Summer squash (*Cucurbita pepo* L.) plants with witches' broom and leaf malformation were observed on a commercial field in Vale do Ribeira, São Paulo State. Molecular analysis was conducted to evidence the association between phytoplasma and diseased plants. The presence of the phytoplasma in the tissue was showed through the amplification of a genomic fragment of 1200 bp (16S rDNA) by nested PCR with universal primers for phytoplasmas, P1/Tint and R16F2n/R16R2. With the same technique, the amplification of a 800 bp product with specific primers R16(III)F2/R16(III)R1 allowed to identify a phytoplasma belonging to 16SrIII group. RFLP analysis with restriction enzymes *AluI*, *RsaI*, *HpaII*, *HhaI*, *MboI*, *KpnI* and *MseI* confirmed the identity of the phytoplasma as a member of 16SrIII group.

This work is the first report of an association between a phytoplasma and summer squash in the Brazilian territory which evidences a new cucurbit specie as host of a phytoplasma.

Keywords: Mollicutes; *Cucurbita pepo* L.; Witche's broom; RFLP

2.1 Introdução

A família Cucurbitaceae é composta por aproximadamente 120 gêneros e mais de 800 espécies de plantas. Nesta família, são encontradas as espécies de abóboras e morangas pertencentes ao gênero *Cucurbita*. Este gênero congrega 15 espécies, sendo *C. maxima* Duch., *C. moschata* Duch. e *C. pepo* L., cultivadas no Brasil (PUIATTI; SILVA, 2005). A espécie *C. pepo*, conhecida como abobrinha-de-moita, tem como centro de origem o México e o Sul dos Estados Unidos. A planta emite, a partir de hastes curtas e relativamente grossas, numerosas folhas grandes e profundamente recortadas, geralmente com cinco lobos, também recortados, resultando em um aspecto de moita (CARDOSO, 1998). O produto comercializado é um fruto imaturo, de polpa tenra e sementes pouco desenvolvidas e representam fonte considerável de vitamina A, cálcio, fósforo, potássio, magnésio, ácido fólico e fibras (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997). Entre as cultivares de abobrinha-de-moita introduzidas no Brasil, a “Caserta” é a mais difundida, tanto pela preferência dos consumidores quanto pela produtividade (FILGUEIRA, 2003).

Estimativas da Food and Agriculture Organization – FAO para 2006 indicaram a China como o maior país produtor de abóboras no mundo, com uma produção de 6.060.250 toneladas, seguida pela Índia (3.678.413 toneladas), Rússia (1.184.670 toneladas), Ucrânia (1.064.000 toneladas) e EUA (861.870 toneladas). Os dados de produção de cucurbitáceas no mundo são incompletos (ZITTER; HOPKINS; THOMAS, 1996) e o Brasil não aparece nesses índices. Em termos nacionais, dados do CEAGESP indicam um volume comercializado de 18.562 toneladas de abobrinhas-de-moita em 2006 até meados de 2007 (FNP, 2007). Camargo Filho, Mazzei e Alves (2003) citam a Região Sudeste como a principal produtora de abobrinha-de-moita, sendo o Estado de São Paulo responsável por aproximadamente 30% do total produzido no Brasil.

Entre os problemas fitossanitários que ocorrem em abobrinha-de-moita, os mosaicos causados por *Papaya ringspot virus – type W* - PRSV-W; *Zucchini yellow mosaic virus* – ZYMV; *Zucchini lethal chlorosis virus* – ZLCV; *Cucumber mosaic virus* - CMV e *Watermelon mosaic virus* – WMV são os principais, tanto pela frequência, quanto por danos ao cultivo (FILGUEIRA, 2003; KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005). No entanto, é significativa a ocorrência de míldio (*Pseudoperonospora cubensis*), cretamento gomoso (*Didymella bryoniae*), oídios (*Erysiphe cichoracearum* e *Podosphaera xanthii*), nematóide-de-galhas (*Meloidogyne incognita*) (CARDOSO, 1998) e fitoplasmas (ZITTER; HOPKINS; THOMAS, 1996) prejudicando a produtividade da cultura.

As doenças associadas aos fitoplasmas em cucurbitáceas são genericamente denominadas de amarelos. Fitoplasmas são organismos procarióticos desprovidos de parede celular, parasitas intracelulares obrigatórios de vasos de floema e patogênicos às plantas, sendo que os sintomas induzidos por esses organismos sugerem a ocorrência de profundos distúrbios hormonais (DAVIS, 1995). Esses patógenos têm sido associados a centenas de doenças ocorrentes nas mais diversas espécies em todo o mundo causando sérios problemas em cultivos de plantas alimentícias, ornamentais e aquelas utilizadas como matéria-prima (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). A associação de fitoplasmas com doenças de abóbora parece ser pouco comum, sendo poucos os relatos encontrados na literatura. No entanto, em razão da relevância da cultura, da importância do patógeno e da sua ocorrência em espécies de cucurbitáceas cultivadas, silvestres e daninhas (KITAJIMA, 1994) é justificável investigar este patossistema, buscando aumentar os conhecimentos, principalmente em relação ao agente de doença.

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo detectar e identificar, por meio de técnicas moleculares, o fitoplasma associado a plantas de abobrinha-de-moita com sintomas de amarelo.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão Bibliográfica

Plantas infectadas por fitoplasmas geralmente apresentam sintomas de clorose, superbrotamento e enfezamento, entre outros, decorrentes de alterações que podem afetar o crescimento e desenvolvimento das mesmas. Anormalidades semelhantes podem ser observadas em doenças viróticas, o que levou, em passado recente, a associação errônea dos chamados amarelos aos fitovírus (WEI et al., 2007). Na década de cinquenta, Freitag (1956) relatou o aparecimento de sintomas em plantas de moranga (*Cucurbita maxima* Duch.) e abobrinha-de-moita (*Cucurbita pepo* L.) como resultante da infecção causada por *Aster yellows vírus*. Os sintomas, observados em plantas naturalmente infectadas, consistiam no clareamento de nervuras, amarelecimento foliar e enfezamento generalizado da planta. Experimentalmente, por meio do inseto vetor *Macrosteles fascifrons* e por enxertia de ramos sadios em plantas doentes, esse mesmo autor demonstrou a transmissão do agente, o qual provocou superbrotamento de ramos e virescência, bem como malformação de flores. Atualmente, conhecida por *aster yellow*, essa doença é reconhecidamente associada a fitoplasmas (ZITTER; HOPKINS; THOMAS, 1996) pertencentes ao grupo 16SrI (LEE et al., 1993). Doenças denominadas *aster yellows* são caracterizadas pela ocorrência de sintomas do tipo clorose, diminuição no porte da planta, produção anormal de ramos, esterilidade de flores, malformação de órgãos e redução da quantidade e qualidade dos frutos (AGRIOS, 2005). Em cucurbitáceas, além destes sintomas, as plantas apresentam ramos rígidos e eretos e folhas rígidas e espessas. Essa doença é encontrada em diversas hortaliças cultivadas nos Estados Unidos e em muitos outros países do mundo podendo causar perdas econômicas significativas. Em abóboras, o fitoplasma é transmitido pela cigarrinha *Macrosteles fascifrons* e algumas outras cigarrinhas polífagas e, particularmente, plantas de abobrinha-de-moita são afetadas por essa doença, sendo as plantas doentes facilmente identificadas no campo (ZITTER; HOPKINS; THOMAS, 1996).

Sintomas semelhantes podem ser induzidos por diferentes fitoplasmas, como também, diferentes sintomas podem ser induzidos por um mesmo fitoplasma. Além disso, a ocorrência de diferentes fitoplasmas causando uma mesma anomalia pode estar relacionada com a disponibilidade de inseto vetor e fontes de inóculo (DAVIS, 1995). Assim, em diversas áreas da Austrália foram observados sintomas de amarelos em plantas de abóbora (*C. maxima* Duch. e *C. moschata* Duch.) infectadas por *Candidatus Phytoplasma australiense* (grupo 16SrXII-B). Nas proximidades destas áreas, também foram encontradas plantas daninhas (*Gomphocarpus* sp.) e

mamoeiros (*Carica papaya* L.) sintomáticos portadores de fitoplasmas deste mesmo grupo (STRETEN et al., 2005). Montano et al. (2001b), assinalam a presença de fitoplasmas em plantio de abóbora (*C. moschata* Duch.) localizado no Estado do Rio de Janeiro. Posteriormente, a análise de plantas que apresentavam clorose, redução do limbo foliar e malformação de frutos permitiu identificar um fitoplasma do grupo 16SrIII-J como estando associado à doença (MONTANO et al., 2006). Os autores relatam que tal anomalia, denominada “frisado” pelos produtores locais, ocorria em campos anteriormente cultivados com chuchu, cujas plantas apresentavam superbrotamento, uma doença associada a um fitoplasma do grupo 16SrIII-J.

A associação de fitoplasmas com outras espécies de cucurbitáceas tem sido assinalada pela literatura. Fitoplasmas representantes do grupo 16SrVIII (*loofah witches' broom group*) foram encontrados em plantas de bucha (*Luffa* spp.) afetadas pelo superbrotamento, em Taiwan (CHOU et al., 1975 apud VIRAKTAMATH; ANANTHA-MURTHY; VIRAKTAMATH, 1987; LEE et al., 1993). Na Costa Rica, fitoplasmas do grupo 16SrI-B foram relatados infectando campos comerciais de chuchu e de *Sechium tacaco* (Pitt.) C. Jeffrey, uma cucurbitácea comestível destinada ao consumo interno, bem como *Rytidostylis carthaginensis* (Jacq.) Kunt., uma daninha que cresce em campos de chuchu e de *S. tacaco* (VILLALOBOS; MOREIRA; RIVERA, 2002). O relato de infecção por *Candidatus Phytoplasma australiense* (grupo 16SrXII-B) em *Cucumis myriocarpus* Naud., uma cucurbitácea daninha, foi feito por Saqib; Jones e Jones (2006), na Austrália. No Brasil, a ocorrência de fitoplasmas do grupo 16SrIII em plantas dessa família parece ser exclusiva, sendo encontrados em associação com anomalias em chuchu (KITAJIMA et al., 1999; MONTANO et al., 2000), melão-de-cheiro (*Sicana odorifera* Naud) (MONTANO et al., 2007b), bucha [*Luffa cylindrica* (L.) Roemer] (MONTANO et al., 2007b) e melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.) (MONTANO et al., 2000; RIBEIRO et al., 2004).

2.2.2 Material e Métodos

2.2.2.1 Obtenção das plantas

Material de abobrinha-de-moita com sintomas típicos de anomalia causada por fitoplasma (Figura 1) foi coletado em 2006 em plantio comercial localizado no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, e enviado pelo Dr. Valdir Yuki (Instituto Agrônomo de Campinas - IAC) para

análise no Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP. Os sintomas se caracterizavam por superbrotamento de ramos, malformação da parte aérea e folhas deformadas e enrugadas. Plantas sadias foram obtidas a partir de sementes comerciais, cultivadas em vasos contendo solo esterilizado, mantidas em casa de vegetação e utilizadas como controle negativo no processo de detecção do agente. Fitoplasma do enfezamento vermelho do milho, presente em folhas de plantas infectadas experimentalmente foi utilizado como controle positivo.



Figura 1 – (A) Planta de abobrinha-de-moita (*C. pepo* L.) com sintomas de possível infecção por fitoplasmas, coletadas em plantio comercial do Vale do Ribeira, SP. Nota-se: malformação da parte aérea e folhas deformadas e enrugadas. (B) Detalhe de enrugamento da folha

2.2.2.2 Extração do DNA total

O DNA total das amostras foi extraído segundo o protocolo descrito por DOYLE; DOYLE (1990) apud AHRENS; SEEMÜLLER (1992), com modificações. Cerca de 0,2 g de tecido fresco do talo e das nervuras das folhas foram pulverizados em nitrogênio líquido, em almofariz. Esse material foi transferido para microtubo de 1,5 mL sendo adicionados 800 μ L de tampão de extração 2X CTAB (2 g CTAB; 8,18 g NaCl; 0,74g EDTA; 1,57 g Tris-HCl; 100 mL água destilada; pH 8,0) a 60 °C e 1,6 μ L de β -mercaptoetanol. Em seguida, essa suspensão foi

incubada em banho-maria a 65 °C por 60 minutos, sendo agitada a cada 10 minutos visando à homogeneização. Após esta etapa foram adicionados 600 µL de CIA (clorofórmio/álcool isoamílico 24:1) e misturados até a obtenção de uma emulsão homogênea. Essa emulsão foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos. Aproximadamente 540 µL da fase superior (aquosa) formada nesse processo foi retirada e transferida para um novo microtubo de 1,5 mL onde foi adicionado igual quantidade de álcool isopropílico gelado (-20 °C) e mantido por uma noite a -20 °C. Passado esse período, foi efetuada uma centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação foi descartado o máximo possível de sobrenadante, preservando o precipitado. Sem desfazer o precipitado, o mesmo foi lavado por duas vezes com 1 mL de etanol 80 % por 10 minutos. Foram adicionados 500 µL de NaCl 1M incubando a 4 °C por 60 minutos. Nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos foi realizada. O sobrenadante foi retirado e transferido para novo microtubo e adicionados 350 µL de álcool isopropílico gelado (-20 °C), incubando a 4 °C por 60 minutos. Novamente, foi feita uma centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos e o precipitado foi lavado por duas vezes com 1 mL de etanol 80 %. O precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 100 µL de água deionizada esterilizada. O DNA extraído foi mantido à temperatura de -20 °C.

2.2.2.3 Detecção de fitoplasma por PCR

As amostras foram analisadas através da técnica de dupla PCR com os pares de *primers* universais, P1/Tint (SMART et al., 1996) e R16F2n/R16R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996), para detecção de fitoplasmas. Os procedimentos foram realizados em reações de 25 µL contendo 18,14 µL de água deionizada; 2,5 µL de tampão 10X; 2,0 µL de uma mistura de dNTP (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo); 0,6 µL de cada *primer* (solução 20 pmol/µL); 0,16 µL de enzima Amplitaq (5U/µL) e 1 µL do DNA. Como controles negativos nas reações de PCR foram adotados DNA de planta sadia de abobrinha-de-moita e água deionizada esterilizada e como controle positivo o DNA de planta de milho infectada com o fitoplasma do enfezamento vermelho.

Na primeira reação foi utilizado o par de *primers* P1/Tint que amplifica uma sequência de 1600 pb do DNA genômico de fitoplasmas correspondente ao 16S rDNA. O DNA total extraído das amostras foi previamente diluído na proporção de 1:10 v/v em água deionizada esterilizada e,

então, usado como modelo nas reações. A mistura de PCR foi submetida a 30 ciclos em termociclador programado para as seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 56 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos. O produto dessa primeira reação foi diluído na proporção 1:30 v/v em água deionizada esterilizada e usado como modelo na reação de reamplificação, na qual foram usados os pares de *primers* R16F2n/R16R2, que amplificam um fragmento genômico de aproximadamente 1200 pb. Neste caso, o termociclador foi programado como segue: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 3 minutos e uma etapa de extensão final a 72 °C por 7 minutos.

As sequências dos *primers* estão descritas a seguir:

P1 - 5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3'

Tint - 5'-TCA GGC GTG TGC TCT AAC CAG C-3'

R16F2n - 5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'

R16R2 - 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'

Os produtos gerados na segunda reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e as bandas de DNA visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta. O marcador de peso molecular utilizado foi 1 Kb ladder.

2.2.2.4 Identificação de fitoplasma por PCR

As amostras positivas para fitoplasma foram analisadas, separadamente, através da técnica de dupla PCR com os pares de *primers* R16(I)F1/R16(I)R1 e R16(III)F2/R16(III)R1, específicos para a identificação de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII, respectivamente (LEE et al., 1994). Os procedimentos foram realizados em reações de 25 µL contendo 18,14 µL de água deionizada; 2,5 µL de tampão polimerase 10X; 2,0 µL de uma mistura de dNTP (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo); 0,6 µL de cada *primer* (solução 20 pmol/µL); 0,16 µL de enzima Amplitaq (5U/µL) e 1 µL do produto de PCR obtido na reação com os *primers* universais P1/Tint, diluído na proporção 1:30 v/v em água deionizada esterilizada. O controle para o PCR conduzido com os *primers* específicos para a identificação de fitoplasmas do grupo 16SrI e 16SrIII foi o DNA obtido de planta de milho infectada com o fitoplasma do enfezamento vermelho (BEDENDO; DAVIS; DALLY, 2000) e o DNA obtido de planta de berinjela infectada

com o fitoplasma do enfezamento (AMARAL-MELLO, 2003), respectivamente. O programa para termociclador envolveu as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 3 minutos e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos de PCR esperados para cada par de *primer* foram fragmentos genômicos de 1100 pb para fitoplasma do grupo 16SrI e de 800 pb para fitoplasma pertencente ao grupo 16SrIII.

As seqüências dos *primers* específicos estão descritas a seguir:

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'

Os produtos gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e as bandas de DNA visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta. O marcador de peso molecular utilizado foi 1 Kb ladder.

2.2.2.5 Identificação de fitoplasmas por análise de RFLP

As seqüências amplificadas do fitoplasma encontrado em abobrinha, através de dupla PCR com os *primers* universais R16F2n/R16R2 foram analisadas por RFLP com as enzimas de restrição *AluI* (AG▼CT), *RsaI* (GT▼AC), *HpaII* (C▼CGG), *HhaI* (GCG▼C), *MboI* (▼GATC), *KpnI* (GGTAC▼C) e *MseI* (T▼TAA). Como referência foi usado o fitoplasma do enfezamento da berinjela. Alíquotas de 5 µL de cada produto de PCR foram digeridas, separadamente, com cada uma das enzimas a 36 °C por um período de 30 horas. Os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 5% corado com brometo de etídeo e as bandas visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta. O marcador de peso molecular utilizado foi o φX174 RF DNA *HaeIII* digest. Os perfis gerados foram confrontados com aqueles relatados pela literatura e o fitoplasma identificado na abobrinha foi classificado de acordo com os grupos descritos (LEE et al., 1998).

2.2.3 Resultados e Discussão

2.2.3.1 Detecção de fitoplasma por PCR

Através de dupla PCR, usando os pares de *primers* P1-Tint/R16F2n-R16R2, um fitoplasma foi detectado em tecidos doentes pela amplificação de fragmentos genômicos de 1200 pb, visualizados na forma de bandas em gel de agarose. Fragmentos de 1200 pb também foram amplificados nas reações de PCR que continham DNA de fitoplasma do enfezamento do milho, usado como controle positivo. Não foram observadas bandas de DNA nos controles negativos, representados pelo DNA de planta sadia de abobrinha e pela água deionizada (Figura 2).

Os sintomas observados nas plantas naturalmente infectadas eram indicativos da ocorrência de doença associada a fitoplasmas, sendo semelhantes àqueles anteriormente descritos para espécies de cucurbitáceas que apresentavam anomalias típicas de amarelos (ZITTER; HOPKINS; THOMAS, 1996). Relato sobre a presença de fitoplasma associado com plantas de abóbora cultivadas no Brasil foram feitos com material oriundo do estado do Rio de Janeiro por Montano et al. (2001b), os quais evidenciaram, por técnicas moleculares, a associação de fitoplasmas com plantas de abóbora da espécie *Cucurbita moschata*. Os sintomas encontrados nestas plantas foram descritos como sendo bastante similares àqueles observados nas plantas de abobrinha-de-moita cultivadas no Vale do Ribeira, em São Paulo.

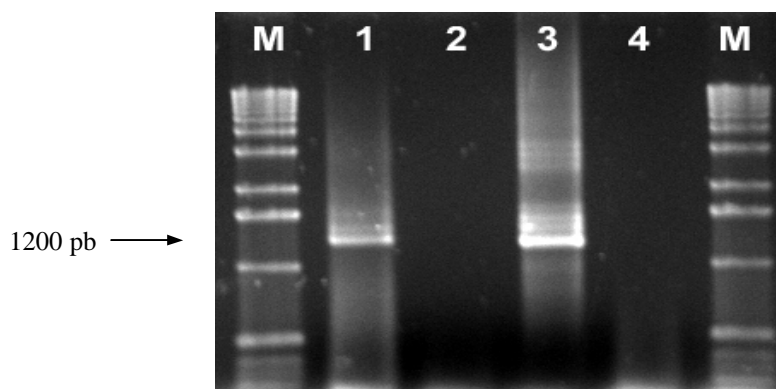


Figura 2 – Detecção de fitoplasma em planta de abobrinha-de-moita. M: marcador de peso molecular 1 Kb ladder; coluna 1: DNA de planta sintomática de abobrinha-de-moita; coluna 2: DNA de planta sadia de abobrinha-de-moita; coluna 3: DNA de planta de milho infectado com o fitoplasma do enfezamento vermelho; coluna 4: água deionizada esterilizada

2.2.3.2 Identificação do fitoplasma por PCR

Através de dupla PCR, conduzida com o par de *primers* específico para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrIII, foi revelado que o fitoplasma associado ao amarelo da abobrinha-de-moita encontrado em São Paulo é um representante deste grupo. Isto foi demonstrado pela amplificação de fragmentos genômicos de 800 pb visualizados na forma de bandas após a eletroforese processada em gel de agarose. Nas reações contendo DNA de planta de berinjela infectada pelo fitoplasma do enfezamento, usado como controle positivo, também foram visualizadas bandas esperadas de 800 pb confirmando a validade do ensaio. No entanto, nenhuma amplificação ocorreu nas reações de PCR contendo como modelo o DNA de planta sadia de abobrinha-de-moita ou a água, usados como padrões negativos (Figura 3). Quando utilizado o par de *primer* específico para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrI, a amplificação do produto esperado de 1100 pb somente ocorreu para o controle positivo, representado pelo DNA do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho. Desta forma ficou demonstrada a ausência de fitoplasmas deste grupo em associação com a doença observada no campo (Figura 4).

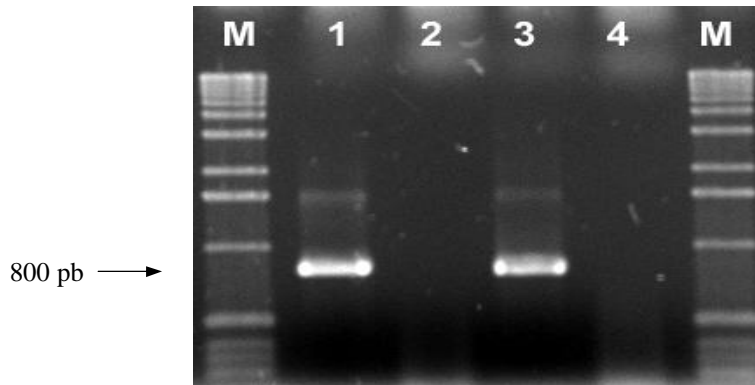


Figura 3 – Identificação do fitoplasma detectado em planta sintomática de abobrinha-de-moita, com *primers* específicos para grupo 16SrIII. M: marcador de peso molecular 1 Kb ladder; coluna 1: DNA de fitoplasma detectado em planta sintomática de abobrinha-de-moita; coluna 2: DNA de planta sadia de abobrinha-de-moita; coluna 3: DNA de fitoplasma do enfezamento da berinjela; coluna 4: água deionizada esterilizada

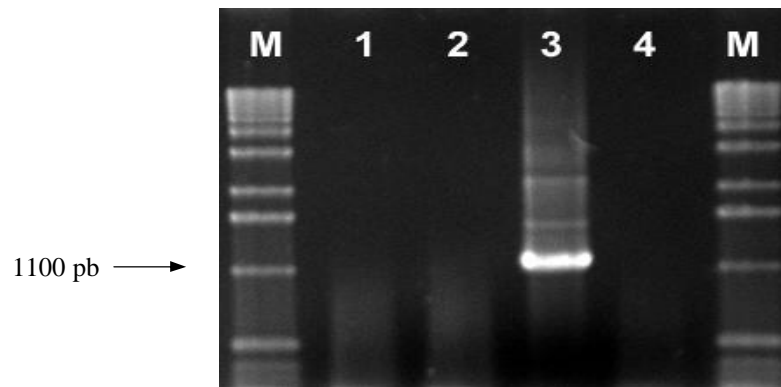


Figura 4 – Identificação do fitoplasma detectado em planta sintomática de abobrinha de moita, com *primers* específicos para grupo 16SrI. M: marcador de peso molecular 1 Kb ladder; coluna 1: DNA de fitoplasma detectado em planta sintomática de abobrinha-de-moita; coluna 2: DNA de planta sadia de abobrinha-de-moita; coluna 3: DNA de fitoplasma do enfezamento vermelho do milho; coluna 4: água deionizada esterilizada

2.2.3.3 Identificação do fitoplasma por análise de RFLP

A análise de RFLP mostrou que os perfis coletivos gerados pela digestão enzimática do 16S rDNA do fitoplasma da abobrinha foram semelhantes àqueles apresentados pelo fitoplasma do enfezamento da berinjela, usado como referência. Quando confrontados com os perfis coletivos descritos por Lee et al. (1998), ficou evidenciado que os perfis obtidos para as enzimas *HpaII*, *HhaI* e *MseI* eram típicos de fitoplasmas do grupo 16SrIII. O emprego das endonucleases *AluI*, *RsaI*, *MboI* e *KpnI* confirmaram os resultados obtidos com as enzimas anteriormente referidas, revelando que o fitoplasma em estudo era afiliado ao grupo 16SrIII e distinto dos fitoplasmas representantes dos demais grupos conhecidos. Nenhuma das enzimas utilizadas neste ensaio permitiu classificar o fitoplasma presente na abobrinha-de-moita ao nível de subgrupo (Figura 5). Apesar disto, a análise de RFLP demonstrou seguramente que o fitoplasma pertencia ao grupo 16SrIII, confirmando a identificação feita com base no PCR com o uso de *primers* específicos.

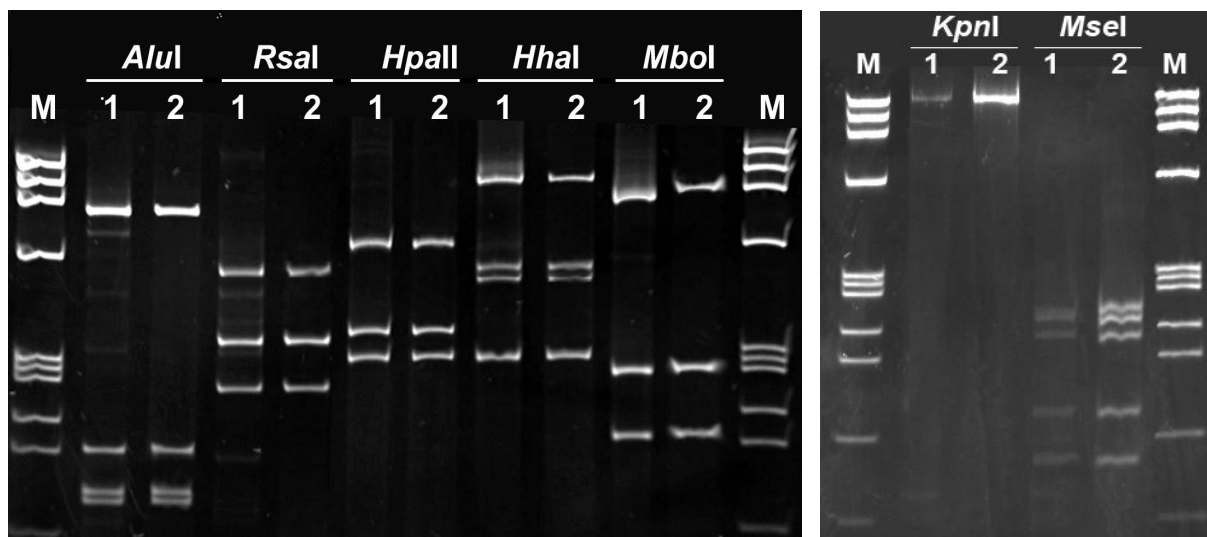


Figura 5 – Identificação do fitoplasma detectado em planta sintomática de abobrinha-de-moita por RFLP. M: marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA *Hae*III digest (1353 pb, 1078 pb, 872 pb, 603 pb, 310 pb, 271, 281 pb, 234 pb, 194 pb, 118 pb, 72 pb); 1: perfil gerado pela digestão do DNA de referência, fitoplasma do enfezamento da berinjela; 2: perfil gerado pela digestão do DNA do fitoplasma detectado em planta sintomática de abobrinha-de-moita

O aparecimento de plantas de abobrinha-de-moita exibindo sintomas de amarelos na região do Vale do Ribeira chamou a atenção de um produtor desta hortaliça, tanto assim que o material doente foi encaminhado para diagnose. Segundo o agricultor, diversas plantas sintomáticas foram observadas na cultura e como os sintomas eram típicos de infecção causada por fitoplasma, o material vegetal foi analisado na tentativa de se comprovar a presença deste patógeno nos tecidos doentes. No entanto, antes mesmo da conclusão da diagnose, o produtor comunicou que havia promovido à erradicação das plantas doentes, não se obtendo mais informações sobre possível reincidência da doença nos novos plantios (YUKI¹, informação verbal). Os resultados da análise do material foram positivos revelando a associação de fitoplasma com os sintomas de amarelo presentes nas plantas. A identificação molecular mostrou que o fitoplasma detectado pertencia ao grupo 16SrIII de acordo com a classificação fundamentada na análise de RFLP, a qual se baseia nos perfis coletivos gerados por enzimas de restrição a partir da digestão do 16S rDNA do fitoplasma amplificado por PCR (LEE et al., 1998).

Um fitoplasma do grupo 16SrIII também foi identificado em plantas de abóbora da espécie *C. moschata* que apresentavam sintomas de amarelo por Montano et al. (2001a), em plantação comercial estabelecida no estado do Rio de Janeiro. A ocorrência de fitoplasmas do

¹ YUKI, V.A. Instituto Agrônomo de Campinas - IAC.

grupo 16SrIII em abóbora não parece ser específica, embora somente fitoplasmas deste grupo fossem identificados até o momento em dois dos estados brasileiros. Em outros países, fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII (*X – disease group*) parecem não ocorrer em *Cucurbita* sp., havendo relatos de representantes dos grupos 16SrI (*Aster yellows group*) (ZITTER; HOPKINS; THOMAS, 1996) e 16SrXII-B (*Stolbur group – Candidatus Phytoplasma australiense*) (STRETEN et. al., 2005).

Fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII têm sido também encontrados em associação com doenças de outras cucurbitáceas de ocorrência bastante comum em algumas regiões brasileiras, como as doenças irizado ou superbrotamento do chuchuzeiro, superbrotamento do melão de São Caetano e superbrotamento da bucha (MONTANO et al., 2007a; RIBEIRO et al., 2004; MONTANO et al., 2000; KITAJIMA et al., 1999). Representantes deste grupo têm sido ainda identificados com certa frequência em hortaliças da família das solanáceas como tomateiro e berinjela afetados pelo enfezamento ou cálice gigante (AMARAL-MELLO et al., 2006; AMARAL-MELLO; BEDENDO; CAMARGO, 2007). Dentre os fitoplasmas ocorrentes no território brasileiro, os representantes do grupo 16SrIII têm se mostrado predominantes, sendo constatados numa diversidade de espécies além daquelas pertencentes às famílias das cucurbitáceas e solanáceas. Assim, existem relatos de membros deste grupo associados ao superbrotamento em begônia (RIBEIRO et al., 2007), proliferação de ramos em bico-de-papagaio (RIBEIRO; BEDENDO, 2006), superbrotamento em crotalária (BARROS; KITAJIMA; RESENDE, 1998), superbrotamento em mandioca (BARROS; KITAJIMA; RESENDE, 1998), superbrotamento em maracujá (DAVIS et al., 1994; RIBEIRO, 2008), lenho mole em maçã (RIBEIRO; BEDENDO; SANHUEZA, 2007), superbrotamento em primavera (SILVA; BEDENDO, 2007), enfezamento em repolho (AMARAL-MELLO; FLÔRES; BEDENDO, 2006), superbrotamento em sempre-viva (DAVIS et al., 1994), amarelo em videira (NERONI; BEDENDO; KUNIYUKI, 2006) e amarelecimento e virescência em vinca (DAVIS et al., 1994; MONTANO et al., 2001b), entre outras (MONTANO; BRIOSO; PIMENTEL, 2007; SILVA; BEDENDO, 2007). Essa ampla gama de hospedeiros, associada a uma possível ocorrência de insetos vetores polípagos, a exemplo do que é citado nas infecções por fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrI em outros países (ZITTER; HOPKINS; THOMAS, 1996), pode favorecer a disseminação desses agentes e causar sérios danos às culturas hospedeiras que têm relevância econômica, entre elas as espécies cultivadas de cucurbitáceas.

2.3 Conclusões

O presente trabalho se constitui em mais uma contribuição para o conhecimento do papel dos fitoplasmas no agroecossistema brasileiro e revela, pela primeira vez, a ocorrência de um fitoplasma do grupo 16SrIII associado ao amarelo em plantas de abobrinha-de-moita (*C. pepo*).

Referências

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. 952 p.

AHRENS, U.; SEEMÜLLER, E. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, n. 8, p. 828-832, 1992.

AMARAL-MELLO, A.P.O. **Identificação molecular de fitoplasma associado ao enfezamento do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) e da berinjela (*Solanum melongena*)**. 2003. 52 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

AMARAL-MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; CAMARGO, L.E.A. Identidade molecular dos fitoplasmas associados aos enfezamentos do tomateiro e da berinjela com base na análise do gene 16S rDNA. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v.33, n.3, p.258-263, 2007.

AMARAL-MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; KITAJIMA, E.W.; RIBEIRO, L.F.; KOBORI, R. Tomato big bud phytoplasma associated with a phytoplasma belonging to group 16SrIII in Brazil. **International Journal of Pest Management**. Londres, v.52, n. 3, p.233-237, 2006.

AMARAL-MELLO, A.P.O.; FLÔRES, D.; BEDENDO, I.P. Identificação do fitoplasma associado ao enfezamento do repolho, através de análise de RFLP. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, supl., p. 239, 2006.

BARROS, T.S.L.; KITAJIMA, E.W.; RESENDE, R.O. Diversidade de isolados brasileiros de fitoplasmas através da análise do 16S rDNA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n.4, p. 459-465, 1998.

BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Detection and identification of the maize bushy stunt phytoplasma in corn plants in Brazil using PCR and RFLP. **International Journal of Pest Management**. London , v.46, n. 1, p.73-76, 2000.

CAMARGO FILHO, W.P.; MAZZEI, A.R.; ALVES, H.S. Mercado de abóboras nas cidades de São Paulo e Buenos Aires: oportunidades de expansão. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 33, n. 9, p. 61-65, 2003.

CARDOSO, A.I.I. A cultura da abobrinha-de-moita. In: GOTO, R.; TIVELLI, S.W. (Org.). **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais**. São Paulo: UNESP, 1998. cap. 4, p. 105-135.

DAVIS, R.E. Fitoplasmas: Fitopatógenos procarióticos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodes. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: RAPP, 1995. v. 3, p. 1-27.

DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; LEE, I.-M.; RESENDE, R.O.; KITAJIMA, E.W. Detection and characterization of mycoplasma-like organisms (MLOs) in diverse plant species in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, supl., p. 340, 1994.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2003. 412 p.

FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS. Hortifruitícolas. In: _____. **Agrianual 2007: anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, 2007. p. 345-356.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. Disponível em:
<<http://faostat.fao.org>> Acesso em: 29 jan. 2008.

FREITAG, J.H. Western aster yellows virus infection of squash, pumpkin, and cucumber. **Phytopathology**, St. Paul, v. 46, n. 6, p. 323-326, 1956.

GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.-M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. **Phytopathology Mediterranea**, Bologna, v. 35, n. 2, p. 144-151, 1996.

KITAJIMA, E.W. Enfermidades de plantas associadas a organismo do tipo micoplasma. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Ed). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: RAPP, 1994. v. 2, p. 153-174.

KITAJIMA, E.W.; MARTINS, M.C.; BEDENDO, I.P.; BARROS, T.S.L.; FRARE, P.M. Ocorrência do irizado do chuchuzeiro na região de Amparo, SP. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, n. 1, p. 31, 1999.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A.; REZENDE, J.A.M. Doenças das cucurbitáceas. 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. cap. 32, v.2 : doenças das plantas cultivadas. p. 293-302.

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**, St. Paul, v. 84, n. 6, p. 559-566, 1994.

LEE, I.-M.; DAVIS, R.E.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Phytoplasma: phytopathogenic Mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 221-255, 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**, St. Paul, v. 83, n. 8, p. 834-842, 1993.

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 of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 48, n. 4, p. 1153-1169, 1998.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T.; CUNHA JÚNIOR, J.O.; FIGUEIREDO, D.V.; PIMENTEL, J.P. First report of group 16SrIII phytoplasma in loofah (*Luffa cylindrica*). **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 277-278, 2007a.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T.; PEREIRA, R.C.; PIMENTEL, J.P. *Sicana odorifera* (Cucurbitaceae) a new phytoplasma host. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 287-288, 2007b.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T.; PIMENTEL, J.P.; FIGUEIREDO, D.V.; CUNHA JÚNIOR, J.O. *Cucurbita moschata*, new phytoplasma host in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 88, n. 2, p. 225-229, 2006.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T.; PIMENTEL. List of phytoplasma hosts in Brazil. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 129-130, 2007.

MONTANO, H.G.; CURE, C.A.M.; CUNHA JÚNIOR, J.O.; BRIOSO, P.S.T. 16S rRNA III phytoplasma associated with *Catharanthus roseus* virescence in Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu. **Resumos...** a, Foz do Iguaçu, 2001a. p.22,

MONTANO, H.G.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; PIMENTEL, J.P.; BRIOSO, P.S.T. Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 4, p. 429-436, 2000.

MONTANO, H.G.; PIMENTEL, J.P.; POZZER, L.; BRIOSO, P.S.T. Identificação de fitoplasma do grupo 16S rRNAIII associado ao superbrotamento de abóbora no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, supl., p. 508, 2001b.

NERONI, R.C.; BEDENDO, I.P.; KUNIYUKI, H. Identificação molecular de fitoplasmas associados ao amarelo da videira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, supl., p. 243, 2006.

PUIATTI, M.; SILVA, D.J.H. Abóboras e morangas. In: FONTES, P.C.R. (Ed.). **Olericultura: teoria e prática**. Viçosa: UFV, 2005. cap. 19, p. 279-297.

RIBEIRO, L.F.C. **Fitoplasma do superbrotamento do maracujazeiro: identificação molecular, análise filogenética e prova de patogenicidade**. 2008. 58p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

RIBEIRO, L.F.C.; BEDENDO, I.P. Proliferação de ramos em plantas comerciais de bico-de-papagaio associada a fitoplasma do grupo 16SrIII. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 367-371, 2006.

RIBEIRO, L.F.C.; BEDENDO, I.P.; SANHUEZA, R.M.V. Evidência molecular da ocorrência de um fitoplasma associado ao lenho mole da macieira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n.1, p. 30-33, 2007.

RIBEIRO, L.F.C.; AMARAL-MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; GIORIA, R. Phytoplasma associated with shoot proliferation in begonia. **Sciencia Agrícola**, Piracicaba, v.63, n. 5, p. 475-477, 2007.

RIBEIRO, L.F.C.; AMARAL-MELLO, A.P.; BEDENDO, I.P.; KITAJIMA, E.W.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Ocorrência de um fitoplasma do grupo 16SrIII associado ao enfezamento em melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.) no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 3, p. 391-393, 2004.

ROBINSON, R.W.; DECKER-WALTERS. **Cucurbits**. Wallingford: CAB International, 1997. 240 p.

SAQIB, M.; JONES, M.G.K.; JONES, R.A.C. 'Candidatus Phytoplasma australiense' is associated with diseases of red clover and paddy melon in south-west Australia. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 35, n. 2, p. 283-285, 2006.

SILVA, E.G.; BEDENDO, I.P. Infecção mista de fitoplasmas em plantas de primavera (*Bougainvillea spectabilis*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, supl., p. 215, 2007.

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, n. 8, p. 2988-2993, 1996.

STRETEN, C.; CONDE, B.; HERRINGTON, M.; MOULDEN, J.; GIBB, K. *Candidatus* Phytoplasma australiense is associated with pumpkin yellow leaf curl disease in Queensland, Western Australia and the Northern Territory. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 34, n. 1, p. 103-105, 2005.

VILLALOBOS, W.; MOREIRA, L.; RIVERA, C. First report of na aster yellows subgroup 16SrI-B phytoplasma infecting chayote in Costa Rica. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 3, p. 330, 2002.

VIRAKTAMATH, C.A.; ANANTHA-MURTHY, H.V.; VIRAKTAMATH, S. The deltocephaline leafhopper genus *Hishimonoides* in the Indian subcontinent (Homoptera). **Journal of Natural History**, London, v. 21, n. 5, p. 1225-1236, 1987.

WEI, W.; DAVIS, R.E.; LEE, I.-M.; ZHAO, Y. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 57, n. 8, p. 1855-1867, 2007.

ZITTER, T.A.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.E. (Ed.). **Compendium of cucurbit diseases**. St. Paul: APS Press, 1996. 120 p.

3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FITOPLASMAS ASSOCIADOS À FILODIA DE FRUTOS DO MORANGUEIRO

Resumo

Em 2006, no Estado do Espírito Santo, foram observados morangueiros com expressiva filodia de frutos, doença também associada à fitoplasmas já relatada em outras áreas do mundo. Assim, buscou-se demonstrar a associação entre planta doente e fitoplasmas e identificá-los nas plantas sintomáticas. Amostras de tecidos foram submetidas à observação em microscópio eletrônico. O DNA total, extraído com um kit comercial ou pelo protocolo 2X CTAB, foi amplificado por dupla PCR com os *primers* universais P1/Tint e R16F2n/R16R2. Os produtos amplificados com o primeiro par de *primers* foram reamplificados com os pares R16(I)F1/R16(I)R1 e R16(III)F2/R16(III)R1, visando a identificação e os produtos de dupla PCR, amplificados com o segundo par de *primers*, foram utilizados na análise por RFLP e no sequenciamento. Para as análises filogenéticas foram utilizadas seqüências nucleotídicas de fitoplasmas pertencentes a diversos grupos. Por microscopia eletrônica, corpúsculos pleomórficos, típicos de fitoplasmas, foram visualizados no lúmen dos elementos de vasos do floema de morangueiro e por dupla PCR com *primers* universais foi consistentemente detectada a presença de fitoplasmas nos tecidos de plantas doentes. Com o uso de *primers* específicos foi possível a identificação de representantes dos grupos 16SrI e 16SrIII nas amostras. A análise de RFLP confirmou a presença de fitoplasmas afiliados a estes grupos, bem como de um membro pertencente ao grupo 16SrXIII. O sequenciamento permitiu a obtenção de duas seqüências. A primeira seqüência nucleotídica, SFP-Br1 (EU719107), de fitoplasma representante do grupo 16SrIII apresentou 99% de similaridade com as seqüências dos fitoplasmas afiliados a este grupo e a análise filogenética mostrou um maior relacionamento com o subgrupo 16SrIII-B. A segunda seqüência nucleotídica, SFP-Br-3 (EU719109), de fitoplasma representante do grupo 16SrXIII apresentou 98% de similaridade com as seqüências dos fitoplasmas afiliados a este grupo. A análise filogenética mostrou este fitoplasma como um representante do grupo 16SrXIII, porém localizado em um novo ramo, diverso daqueles conhecidos para representantes deste grupo. Os mapas de sítios putativos de restrição revelaram diferenças entre SFP-Br3 e os subgrupos do grupo 16SrXIII. Os coeficientes de similaridade calculados para SFP-Br3 e para os subgrupos 16SrXIII-A, 16SrXIII-B e 16SrXIII-C variaram de 0,91 a 0,96, o que distinguiu o fitoplasma presente no morangueiro dos outros subgrupos de fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrXIII já existentes. Assim, através de análise molecular, foi possível detectar e identificar distintos fitoplasmas nas plantas de morango que apresentavam filodia de frutos inclusive um novo representante dentro do grupo 16SrXIII de fitoplasmas, aqui denominado de 16SrXIII-D.

Palavras-chave: Mollicutes, *Fragaria x ananassa* Duch.;RFLP; 16SrXIII-D

Abstract

In 2006, in Espírito Santo State, some strawberry plants were observed with an expressive fruit phyllody, a disease related in other countries associated with phytoplasmas. This work was developed in order to demonstrate the association between the disease plants and the phytoplasmas and identify those phytoplasmas present on the symptomatic plants. Tissue samples from diseased plants were analyzed by electronic microscopy and molecular assays. DNA was extracted with a commercial kit or 2X CTAB protocol and submitted to nested PCR using universal primers P1/Tint and R16F2n/R16R2. PCR products of P1/Tint were used for new amplification using the primers pairs R16(I)F1/R16(I)R1 and R16(III)F2/R16(III)R1. The 16S DNA sequences amplified with R16F2n/R16R2 were submitted to RFLP analysis and to sequencing. Phylogenetic analysis included sequences of phytoplasmas belonging to many groups. The results revealed pleomorphic bodies visualized by electronic microscopy in the sieve elements of floem tissue and by nested PCR, using universal primers, phytoplasmas were detected. The identification of members of 16SrI and 16SrIII groups was possible by the utilization of specific primers. The RFLP analysis confirmed the presence of phytoplasmas belonging to 16SrI and 16SrIII groups and one member of 16SrXIII group. The sequencing allowed the attainment of two sequences. The first sequence, designated SFP-Br1 (EU719107) representing a phytoplasma affiliated to 16SrIII group, showed 99% of similarity with other sequences of phytoplasmas affiliated with this group. The phylogenetic analysis showed that this phytoplasma was more related with member of subgroup 16SrIII-B. The second sequence, designated SFP-Br3 (EU719109) representing a phytoplasma affiliated to 16SrXIII group, showed 98% of similarity with members of this group. The phylogenetic analysis revealed this phytoplasma belonging to 16SrXIII group, but located on a new different branch from those previously known. The putative restriction sites revealed differences between SFP-Br3 and 16SrXIII subgroups. The similarity coefficient indicated variations between SFP-Br3 and the three phytoplasmas affiliated to 16SrXIII-A, 16SrXIII-B and 16SrXIII-C sub-groups, varying on 0.91 to 0.96, distinguishing the strawberry phytoplasma from the others sub-groups of 16SrXIII group already existing. Through molecular analysis was possible the detection and identification of distinct phytoplasmas on strawberry plants and the characterization of a new 16SrXIII-D subgroup.

Keywords: Mollicutes; *Fragaria x ananassa* Duch.; RFLP; 16SrXIII-D

3.1 Introdução

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) é um híbrido natural originado do cruzamento entre as espécies silvestres *F. chiloensis* e *F. virginiana* (SILVA; DIAS; MARO, 2007). É uma planta herbácea, rasteira, perene, porém cultivada como anual, em razão das exigências fitossanitárias, de manejo durante a entressafra e de produtividade. (DIAS et al., 2007; FILGUEIRA, 2003). O sistema radicular é superficial e a coroa, a parte que sobressai da terra, é

formada por um agregado de rizomas curtos, formando o eixo caulinar (FILGUEIRA, 2003; SILVA; DIAS; MARO, 2007). As folhas são compostas, com três folíolos cada, e apresentam um grande número de estômatos, o que torna a cultura muito sensível à falta d'água, baixa umidade relativa e altas temperaturas (SILVA; DIAS; MARO, 2007). O pseudofruto carnoso, resultante da hipertrofia do receptáculo floral, constitui-se na parte comestível, denominada morango, e é onde estão inseridos os aquênios, ou seja, os frutos verdadeiros (FILGUEIRA, 2003; SILVA; DIAS; MARO, 2007). Os aquênios são diminutos, amarelos ou avermelhados, duros e superficiais, contendo uma única semente (SILVA; DIAS; MARO, 2007).

Apesar de ser considerada uma cultura de risco e de custo elevado, o morangueiro apresenta alta rentabilidade sendo a fruta bem aceita pelo consumidor com diversas opções de comercialização pelo produtor, gerando em torno de quatro empregos diretos por hectare cultivado e outros indiretos dentro da cadeia produtiva (DIAS et al., 2007; RIOS, 2007). Historicamente era plantado para fins ornamental e medicinal em jardins europeus, porém ganhou importância comercial devido às suas qualidades nutritivas e sabor agradável, sendo, atualmente, produzido tanto para consumo *in natura*, quanto para industrialização, existindo variedades adaptadas às mais diversas condições de cultivo (SANTOS; MEDEIROS, 2003; RIOS, 2007; SILVA; DIAS; MARO, 2007). A cultura comercial do morangueiro no Brasil é relativamente nova, tendo seu início na década de 50 no Rio Grande do Sul (FILHO, 2006). A partir da década de 60, com a introdução de cultivares mais adaptadas e novas técnicas de cultivo houve a expansão da cultura para vários outros estados, estando atualmente presente em grande parte do território nacional (DIAS et al., 2007; FILHO, 2006). A partir do final da década de 90, a importação de mudas produzidas principalmente no Chile e Argentina tem se intensificado devido às características intrínsecas aos frutos (SANTOS; MEDEIROS, 2003). No Brasil, as cultivares nacionais Campinas (IAC-2712), Vila Nova, Santa Clara, Bürkley, Princesa Isabel, Guarani (IAC-5074) e as cultivares introduzidas, Oso Grande, Camarosa, Milsei-Tudla, Sweet Charlie, Toyonoka, Seascape, Dover, Ventana, Camiño Real, Aromas e Diamante são as mais difundidas (FILHO; ANTUNES; PÁDUA, 2007).

Segundo a Food and Agriculture Organization – FAO (2006), os Estados Unidos são o maior produtor mundial de morangos com 1.259.449 toneladas, seguido por Espanha (333.500 toneladas), Rússia (235.000 toneladas), Turquia (211.127 toneladas), Coreia (205.307 toneladas) e Polônia (193.666 toneladas). O Brasil produz cerca de 90.000 toneladas distribuídas entre os

estados de Minas Gerais (33%), São Paulo (32%), Rio Grande do Sul (17%), Espírito Santo (6%), entre outros (SANTOS; MEDEIROS, 2003; DIAS et al., 2007).

A expansão e a intensificação da cultura, aliadas a fatores relacionados ao clima e ao manejo, têm favorecido o aumento do número de doenças, resultando em redução da produtividade (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005; ZAMBOLIM; COSTA, 2006). Doenças consideradas secundárias e de ocorrência esporádica vêm-se tornando problema em várias regiões produtoras, além dos novos patógenos introduzidos (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005). Ainda, segundo Maas (1984), condições ambientais adversas produzem frequentemente sintomas de doenças no morangueiro. Entre as doenças bióticas que ocorrem na cultura do morangueiro podem ser destacadas aquelas provocadas por fungos [antracnose do rizoma ou chocolate - *Colletotrichum fragariae*; flor preta - *Colletotrichum acutatum*; mancha de *Mycosphaerella* - *M. fragariae* (*Ramularia tulasnei*); mancha de *Diplocarpon* - *D. earliana* (*Marsonina fragariae*); mancha de *Dendrophoma* - *D. obscurans* (sin. *Phomopsis obscurans*); murcha de *Verticillium* - *V. albo-atrum*, *V. dahliae*; podridão da coroa e dos brotos - *Rhizoctonia solani*; oídio - *Sphaerotheca macularis* f. sp. *fragariae*; podridão de *Sclerotinia* - *S. sclerotiorum*; podridão de *Phytophthora* - *P. cactorum*, *P. idaei*, *P. nicotianae*; mancha de *Pestalotiopsis* - *P. longisetula*; mofo cinzento - *Botrytis cinerea*; podridão de *Rhizopus* - *R. nigricans*]; bactéria [mancha angular (*Xanthomonas fragariae*)]; vírus [vírus da clorose marginal (*Strawberry mild yellow edge virus* - SMYEV), vírus do encrespamento (*Strawberry crinkle virus* - SCV), vírus do mosqueado (*Strawberry mottle virus* - SMOV), vírus da faixa das nervuras (*Strawberry vein banding virus* - SVBV)] (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005; DIAS; COSTA; CANUTO, 2007); nematóides causadores de danos diretos (*Pratyenchus penetrans*, *Aphelenchoides besseyi*, *A. fragariae*, *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. javanica*, *M. incognita*, *M. fallax*) e atuando como vetores de viroses (*Longidorus elongatus*, vetor de *Raspberry ringspot virus* - RRV e *Tomato black ring virus* - TBRV; *Xiphinema* sp., vetor de *Strawberry latent ringspot virus* - SLR) ou em associação com outros patógenos reduzindo a resistência da planta (podridão negra da raiz - *Pratyenchus penetrans* associado com *Rhizoctonia fragariae*) (SALGADO, 2007) e fitoplasmas (pétala verde, *aster yellow*, amarelos letais, doença multiplicadora, clorose marginal, folha murcha bronzeada e superbrotamento) (MAAS, 1984; DIEKMANN; FRISON; PUTTER, 1994).

Fitoplasmas são organismos procarióticos desprovidos de parede celular, parasitas intracelulares obrigatórios, habitantes de floema e patogênicos às plantas (DAVIS, 1995). A

associação desses agentes com a cultura do morangueiro, apesar de freqüente em diversos países do mundo, não é comum no Brasil, sendo poucos os relatos existentes. No ano de 2006, nos municípios de Domingos Martins e Santa Maria de Jetibá, localizados no Estado do Espírito Santo, foram observadas plantas de morango apresentando expressiva filodia de frutos. Em razão desta doença ter sido relatada em outras áreas do mundo como estando associada à fitoplasmas buscou-se, neste trabalho, demonstrar, por intermédio de técnicas moleculares, a associação entre planta doente e fitoplasmas, bem como identificar os fitoplasmas presentes nas plantas sintomáticas.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Revisão Bibliográfica

Como agentes de doenças em plantas, os fitoplasmas têm sido associados a uma diversidade de espécies de importância econômica compreendendo aquelas alimentícias, ornamentais e florestais (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). Na cultura do morangueiro há o registro do aparecimento de uma nova espécie dessa hortaliça em razão da ocorrência de fitoplasmas. O não conhecimento da associação fitoplasma-morangueiro ocasionou, há tempos atrás, uma equivocada classificação de populações de *F. virginiana* Duch. que apresentavam pecíolos curtos, folhas e flores pequenas e copa superbrotada, como sendo uma nova espécie denominada *F. multicipita* Fern. (FERNALD, 1908 apud JOMANTIENE et al., 1998a). Estudos posteriores propuseram a manutenção do *taxon F. multicipita*, reduzindo-o a categoria de forma [*F. virginiana* ssp. *Glauca* f. *multicipita* (Fern.) Catling & J. Cayouette.] (CATLING; CAYOUEITE; POSTMAN, 1995 apud JOMANTIENE et al., 1998a) e Jomantiene et al. (1998a), por métodos moleculares, comprovaram ser um fitoplasma afiliado ao grupo 16SrVI subgrupo B, o indutor da morfologia anormal de *F. virginiana* Duch. Estes mesmos autores frisam que a morfologia descrita para o antigo *taxon F. multicipita* Fern. é a mesma observada em morangueiros comerciais (*Fragaria x ananassa* Duch.) acometidos pela doença multiplicadora conhecidamente incitada por fitoplasmas.

As doenças associadas aos fitoplasmas na cultura do morangueiro são caracterizadas por um conjunto de anomalias que englobam virescência em flores e frutos, filodia, malformação de folhas e superbrotamento de ramos (BERTACCINI et al., 1997). Tais anomalias são conhecidas desde a década de 50, sendo primeiramente descritas na Nova Zelândia (POSNETTE, 1953). Nas últimas décadas, alterações morfológicas provocadas por fitoplasmas têm sido assinaladas em diferentes variedades de morangueiro em diversas regiões do mundo (PASTORE et al., 2002), como no continente Americano (Brasil, Canadá, Estados Unidos), Europeu (França, Inglaterra, Itália, Lituânia, República Tcheca) e Oceânico (Austrália, Nova Zelândia).

3.2.1.1 Doenças incitadas por fitoplasmas em morangueiro

Dentre as doenças, a pétala verde e o *aster yellow* são aquelas mais comumente estudadas e relatadas com maiores detalhes pela literatura especializada (ANDERSEN et al., 1998). Além destas, foram descritas também os amarelos letais, a doença multiplicadora, a clorose marginal, folha murcha bronzeada e o superbrotamento.

O aparecimento de plantas de morango afetadas pela doença *aster yellow* têm sido bastante freqüente nos Estados Unidos e Canadá (MAAS, 1984). O quadro sintomatológico compreende enfezamento da planta, clorose e enrugamento de folhas, que se tornam vermelhas e marrons, flores com pétalas virescentes, vários graus de filodia e proliferação de flores, de acordo com o organismo infectante, cultivar e tempo de infecção. Como vetores do agente estão relatadas 27 espécies de cigarrinhas (DIEKMANN; FRISON; PUTTER, 1994). Os fitoplasmas associados a esta doença foram classificados como pertencentes ao grupo 16SrI, subgrupo A e subgrupo B (CLARK, 1998 apud JOMANTIENE et al., 2002a) e ao grupo 16SrI, subgrupo C (DIEKMANN; FRISON; PUTTER, 1994).

A pétala verde promove o desenvolvimento prematuro de frutos pequenos, duros e verdes (DIEKMANN, FRISON E PUTTER, 1994). As pétalas verdes ao longo do tempo podem se tornar rosas e eventualmente ocorrer o sintoma de filodia. A cigarrinha *Aphrodes bicincta* é apontada como vetora (CHIYKOWSKI; CRAIG, 1975). Esta doença é assinalada no Canadá (CHIYKOWSKI et al., 1973; CUTCLIFFE; THOMPSON, 1977) e nos Estados Unidos (MAAS, 1984) como sendo incitada por fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrI, subgrupos A e C (*Aster yellows group*) e grupo 16SrXIII, subgroup B (*Mexican Periwinkle virescence group*) (HARRISON et al. 1997; JOMANTIENE et al., 1998b); na Austrália por fitoplasmas afiliados ao

grupo 16SrXII, subgrupo B (*Stolbur group* – ‘*Candidatus Phytoplasma australiense*’) (PADOVAN; GIBB; PERSLEY, 2000); e na República Tcheca por representantes do grupo 16SrI, subgrupo C (*Aster yellows group*) (HONETSLEGROVÁ; VIBIO; BERTACCINI, 1996).

Os amarelos letais são caracterizados por dois quadros sintomatológicos. Em um deles, associado a bactérias do tipo rickettsias, é observada a descoloração de folhas velhas, a redução no tamanho de pecíolos e a clorose internerval de folhas jovens, que crescem assimetricamente. No segundo, associado aos fitoplasmas, ocorre descoloração púrpura de folhas velhas, seguida por crescimento enfezado de folhas jovens com clorose marginal, somado a abortamento de flores (MAAS, 1984; STRETEN et al., 2005). No entanto, a sobreposição de sintomas em plantas com infecção mista de rickettsias e fitoplasmas (PADOVAN; GIBB; PERSLEY, 1998) dificulta o entendimento das relações que ocorrem entre a planta e esses diferentes organismos (STRETEN et al., 2005). Nas infecções por fitoplasmas, a cigarrinha *Orosius argentatus* é relatada como inseto vetor, que se reproduz e se alimenta em espécies de plantas daninhas crescidas nas proximidades dos cultivos, não sendo o morangueiro o hospedeiro preferencial (WAITE et al., 2006). Fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrXII, subgrupo B (*Stolbur group* – ‘*Candidatus Phytoplasma australiense*’) foram associados com a ocorrência da doença na Austrália (PADOVAN; GIBB; PERSLEY, 2000) e na Nova Zelândia (ANDERSEN et al., 1998). Ainda na Austrália, Streten et al. (2005) e Waite et al. (2006), relatam uma freqüente detecção de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrI, subgrupo A (*Aster yellows group*) e ao grupo 16SrVI, subgrupo A (*Clover proliferation group*) em morangueiros com a doença dos amarelos letais. Na Lituânia, um fitoplasma do grupo 16SrXII, subgrupo E (*Stolbur group - Candidatus Phytoplasma fragariae*) tem sido associado com a doença (VALIUNAS, STANIULIS E DAVIS, 2006).

A doença multiplicadora é reconhecida pelo aparecimento de folhas pequenas e acanoadas, com pecíolos curtos e eretos, proliferação da coroa e estolões curtos. As poucas flores formadas apresentam tamanho reduzido, porém produzem frutos de tamanho normal (DIEKMANN; FRISON; PUTTER, 1994). Fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI, subgrupo K (*Aster yellows group*) e 16SrVI, subgrupo B (*Clover proliferation group*) são relatados nos Estados Unidos (JOMANTIENE et al., 1998b) e no Canadá (JOMANTIENE et al., 1998a), respectivamente, como estando associados à doença.

A clorose marginal, descrita por Terlizzi, Babini e Credi (2006), provoca o enfezamento das plantas, as quais exibem um sistema radicular pobre, folhas velhas enroladas com prematura

descoloração púrpura e folhas novas cloróticas, acanoadas, de tamanho reduzido e com pecíolos curtos. Com o progresso da doença, as plantas mostram anormalidades florais como virescência e filodia de pétalas, flores totalmente ou parcialmente estéreis produzindo frutos pequenos e deformados, folhas novas de tamanho reduzido e assimétricas, verde-pálidas e com margens cloróticas. As plantas afetadas sofrem declínio acelerado com a interrupção do crescimento e morrem. Esta doença é relatada na Itália (TERLIZZI; BABINI; CREDI, 2006) e na França (ZREIK et al., 2001) como associada a um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrXII, subgrupo A (*Stolbur group*). Em interação semelhante àquela observada com a doença dos amarelos letais, a clorose marginal pode ser induzida, tanto por fitoplasmas, quanto por γ -3-proteobactérias. No entanto, neste caso, não há diferenciação nos sintomas induzidos pelos diferentes organismos, sendo observada uma predominância das bactérias em relação aos fitoplasmas nas plantas afetadas (FOISSAC et al., 2004). Como representante das γ -3-proteobactérias indutoras da clorose marginal pode ser citada a *Candidatus Phloemobacter fragariae* ocorrendo na França, na Espanha (NOURRISSEAU; LANSAC; GARNIER, 1993) e no Japão (TANAKA; NAO; USUGI, 2006). Recentemente, na Itália, doença semelhante foi assinalada como sendo causada por uma γ -3-proteobactéria genomicamente diferente daquela já relatada (TERLIZZI et al., 2007).

A doença denominada de folha murcha bronzeada é caracterizada por sintomas similares àqueles presentes em morangueiros afetados pela pétala verde em estágio inicial, todavia, sem o aparecimento de sintomas nas flores. Aparentemente, é uma doença de menor importância para a cultura, tendo sido relatada, por enquanto, somente na Inglaterra (MAAS, 1984).

Os superbrotamentos, observados em morangueiros, são descritos por Diekmann, Frison e Putter (1994) como de ocorrência comum na América do Norte. As plantas afetadas mostram-se enfezadas, com folhagem de aparência espessa, com presença de numerosas coroas, com folhas pequenas e pecíolos estiolados, sendo que as plantas filhas se mostram severamente superbrotadas e com estolões curtos. Não há inferências sobre grupos de fitoplasmas que incitam tal anomalia.

Anomalias que ocorrem de forma isolada e que não se enquadram nas doenças anteriormente descritas são relatadas em plantas de morango infectadas por fitoplasmas. Apesar destas doenças não terem recebido nomes específicos, os sintomas observados são do tipo redução no porte da planta, superbrotamento, deformação de folhas, clorose, virescência e filodia. Fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrVI, subgrupo A (*Clover proliferation group*)

(JOMANTIENE et al., 1999a) e ao grupo 16SrIII, subgrupo B (*X-disease group*) (JOMANTIENE et al., 1999b) foram identificados em morangueiros cultivados nos Estados Unidos, enquanto fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrI, subgrupo C – *Aster yellows group*) foram associados com plantas sintomáticas no Canadá e na República Tcheca ((PASTORE et al., 2002). No Brasil, no final da década de noventa, em morangueiros apresentando típicos sintomas atribuídos a fitoplasmas foram observados corpúsculos pleomórficos no floema de plantas doentes, contudo não foi conduzida a identificação do fitoplasma, detectado através de microscopia eletrônica (SITTOLIN; PAVAN; MONTEIRO, 1998).

3.2.1.2 Filodia de frutos de morangueiro

A filodia de frutos de morangueiro pode ser entendida como a reversão dos órgãos reprodutivos florais, geralmente em torno dos aquênios, em estruturas vegetativas. Essa reversão geralmente inicia-se na extremidade distal do receptáculo e progride em direção ao cálice (JOMANTIENE et al., 2002a). As estruturas formadas, anexadas nos mesmos pontos das sementes, lembram pequenas folhas simples ou mini plantas e podem quase que cobrir toda a infrutescência, dando a impressão que houve germinação das sementes (ULLIO, 1997; JOMANTIENE et al., 2002a). Essa anomalia tem sido atribuída às respostas fisiológicas às mudanças de temperatura durante o transplante de mudas frigoconservadas, às alterações sazonais no início do florescimento e à infecção por fitoplasmas (JOMANTIENE et al., 2000). Sintomas de filodia também podem ser induzidos pela aplicação pesada de fertilizantes foliares e por herbicidas (ULLIO, 1997).

Na Itália, plantas de morango inicialmente frigoconservadas, exibindo no campo filodia de frutos, foram avaliadas para a presença de fitoplasmas e para outros fatores, tais como, nutrição, plantio e condições ambientais, que poderiam incitar o aparecimento da anomalia. Os resultados obtidos por Ullio (1997) indicaram a filodia de frutos como sendo um episódio eventual causado durante o florescimento. No ano de 2000, a filodia não-infecciosa em plantas de morango também foi observada na Tailândia em plantas frigoconservadas. O sugestivo quadro sintomatológico típico de infecção por fitoplasmas, levou Chatchawankanphanich et al. (2000) a realizarem testes serológico (ELISA indireto), molecular (PCR), biológicos (transmissão via *Cuscuta* sp. e enxertia) e microscopia eletrônica na busca do organismo infectante. Por não terem obtidos resultados positivos para fitoplasmas os autores inferiram que, a causa da filodia de frutos

de morangueiro que ocorre na Tailândia desde 1996, é uma desordem fisiológica induzida durante o armazenamento. Em adição, McGrew e Posnette (1970) apud Chatchawankanphanich (2000) citam a ocorrência de filodia não-infecciosa de frutos em plantas que não passaram pelo processo de frigoconservação, conhecida como doença de *Plymouth*.

Em experimento realizado por Lieten (2006), a aplicação foliar do herbicida metosulam na concentração de 25 ppm, 4 dias após o transplante de mudas de morangueiro frigoconservadas, proporcionou o aparecimento de filodia de frutos, a qual desapareceu nos cultivos sucessivos. O mesmo autor, em um outro experimento, testou soluções aquosas do herbicida glifosato aplicada no substrato 10 dias antes do plantio. Para a concentração de 1,0 ppm, o aparecimento de folhas amarelas com bordos recortados, flores de tamanho reduzido, frutos deformados, plantas enfezadas e filodia de frutos comprovou que resíduos do herbicida podiam ter induzido os sintomas observados. Na Flórida, em condições normais de cultivo, foi relatado o aparecimento de filodia em campos produtores de morango onde foi aplicado glifosato como agente de controle de plantas daninhas (PERES; DUVAL; SEIJO, 2005).

Jomantiene et al. (2002a), sugerem que a filodia infecciosa de frutos seja um sintoma geral associado com a infecção da planta por fitoplasmas. Representantes do grupo 16SrI, subgrupos A, B, C, K, R (*Aster yellows group*), grupo 16SrIII, subgrupos A, K (*X-disease group*), grupo 16SrVI, subgrupo B (*Clover proliferation group*), grupo 16SrXII, subgrupos A, B (*Stolbur group*) e grupo 16SrXIII, subgrupo B (*Mexican periwinkle virescence group*) têm sido consistentemente relatados em associação com essa anomalia (JOMANTIENE et al., 1999b; 2000; 2001; 2002a; 2002c; PASTORE et al., 2003).

3.2.1.3 Controle das doenças incitadas por fitoplasmas em morangueiro

Como não há informações sobre métodos curativos (DIEKMANN; FRISON; PUTTER, 1994) e inexistem plantas tolerantes ou resistentes (ZHAO; LIU; DAVIS, 2004), o controle de doenças causadas por fitoplasmas em morangueiro não difere daqueles recomendados para outros patossistemas que envolvem esse agente, sendo a prevenção o método ideal (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). Para os amarelos letais, a aplicação de inseticidas visando o controle de insetos vetores pode prevenir a ocorrência de altas incidências da doença em campo, pois esses insetos parecem não ter o morango como hospedeiro preferencial. Para essa mesma doença, o uso de redes finas visando à exclusão dos vetores tem sido muito eficiente na

prevenção da infecção (WAITE et al., 2006). Estudos genéticos têm sido conduzidos visando encontrar uma fonte segura de resistência em plantas de morango, através de mecanismos que inibam o desenvolvimento do patógeno, pela expressão transgênica de peptídeos antimicrobianos em elementos de vasos do floema (ZHAO; LIU; DAVIS, 2004).

3.2.2 Material e Métodos

3.2.2.1 Obtenção das plantas

As plantas de morango apresentando filodia de frutos foram coletadas nos municípios de Domingos Martins e Santa Maria de Jetibá (Tabela 1; Figuras 1; 2), localizados no Estado do Espírito Santo, e encaminhadas pelos pesquisadores Dr. Hélcio Costa e Dr. José Aires Ventura, do Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural – Incaper, para análise no Laboratório de Procaríotos Fitopatogênicos do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola – LEF/ESALQ/USP. Uma planta de morango assintomático, cultivar Dover, foi obtida junto ao Departamento de Produção Vegetal - LPV/ESALQ/USP e utilizada como controle negativo nos processos de detecção e identificação por PCR (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação das plantas de morango utilizadas neste estudo

Nº da amostra	Cultivar	Local de coleta	Data de recebimento
A-29	Osogrande	Santa Maria de Jetibá/ES	29/11/2006
A-33	Osogrande	Santa Maria de Jetibá/ES	29/11/2006
A-35	Osogrande	Santa Maria de Jetibá/ES	29/11/2006
A-38	Dover	LPV/ESALQ/USP	07/12/2006
A-40	Osogrande	Domingos Martins/ES	05/12/2006
A-42	Camiño real	Santa Maria de Jetibá/ES	05/12/2006

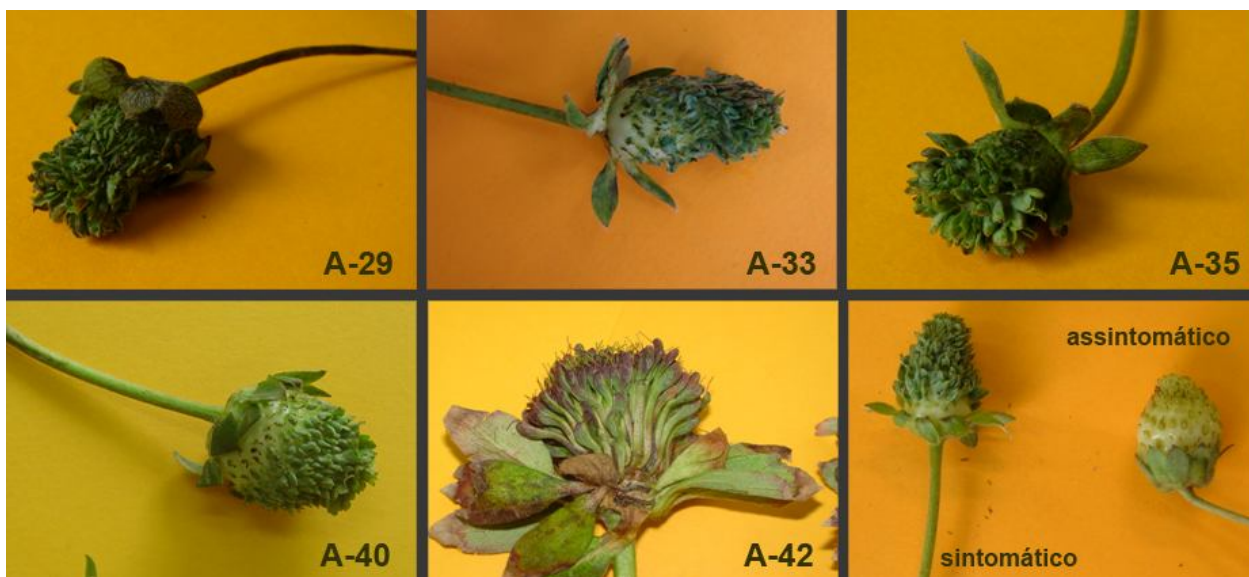


Figura 1 – Amostras de morangueiro, utilizadas neste estudo, apresentando filodia de frutos. Na amostra A-42 é observado aumento no tamanho (cálise gigante) e intenso avermelhamento das sépalas

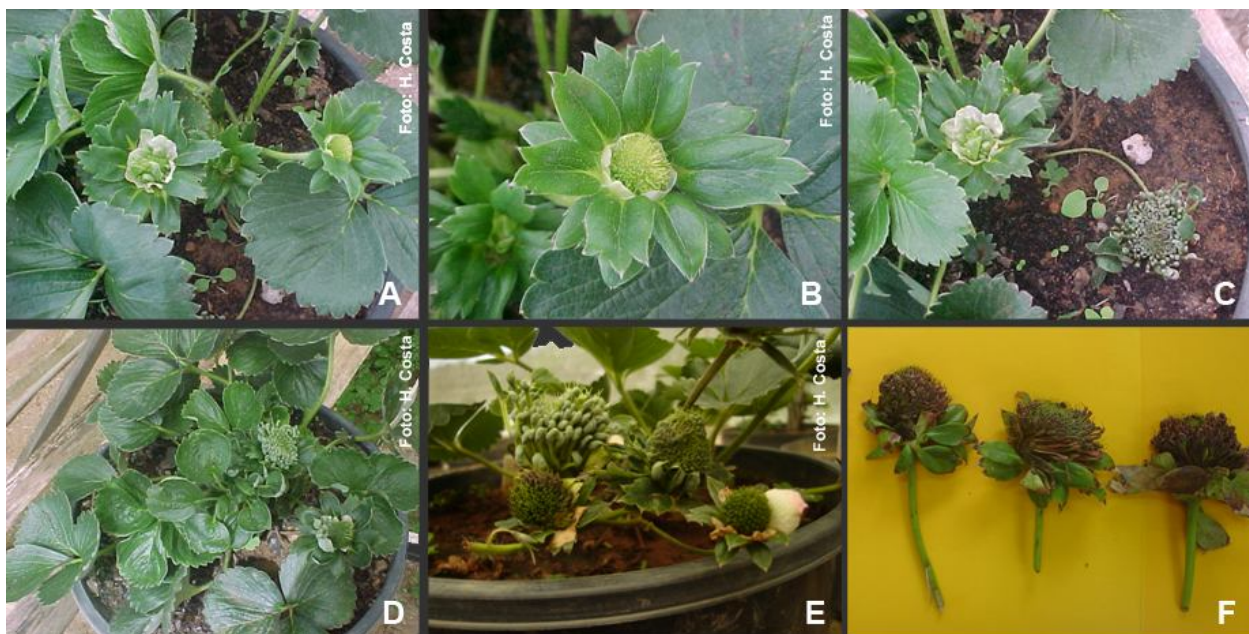


Figura 2 – Planta de morango, matriz da amostra A-42, cultivada sob condições controladas em casa de vegetação no Espírito Santo. Em A, B: infrutescências novas apresentando cálise gigante. Em C: detalhe de infrutescência nova apresentando cálise gigante e infrutescência em estágio avançado apresentando filodia de frutos. Em D, E: planta com folhas coriáceas e infrutescências apresentando filodia de frutos. Em F: Infrutescências em avançado estágio de maturação, coletadas em campo e enviadas para análise no Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos – LEF/ESALQ/USP

Folhas de plantas de milho, experimentalmente infectadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho e cultivadas sob condições controladas foram usadas como padrão positivo para os testes de PCR empregados para detecção e identificação dos fitoplasmas.

3.2.2.2 Microscopia Eletrônica

As amostras de tecidos provenientes de plantas doentes foram submetidas à observação em microscópio eletrônico de transmissão, sendo todo o procedimento realizado no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária – NAP/MEPA da ESALQ/USP, segundo protocolo descrito por Kitajima (1998). Fragmentos dos tecidos das infrutescências e pecíolos de morangueiro foram pré-fixados em fixador Karnovsky modificado (2,5 % glutaraldeído + 2,5 % paraformaldeído em tampão cacodilato 0,05 M; pH 7,2 + CaCl₂ 0,001 M) por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem em tampão cacodilato 0,05 M por três vezes, por 10 minutos cada, esses fragmentos foram pós-fixados com tetróxido de ósmio 1 % em tampão cacodilato 0,05 M por 1-2 horas. Após esse período, foram lavados com água destilada e fixados com acetato de uranila 0,5 % *en bloc* durante uma noite. Os fragmentos amostrados foram desidratados em série de acetona 30, 50, 70, 90 %, uma vez, por 10 minutos cada e 100 %, por três vezes, por 10 minutos cada. Em seguida, foram infiltrados com uma mistura 1:1 v/v de acetona/resina de Spurr por 3-4 horas e com resina pura por uma noite. Os fragmentos foram emblocados em resina pura, em fôrmas de silicone devidamente identificadas, a 70 °C por 48 horas. Os blocos foram aparados com o auxílio do aparelho Leica EM Trim, e seccionados em ultramicrotomo Leica ultracut UCT. As secções prateadas (70-80 nm) foram coletadas em telinhas de cobre previamente recobertas por película de formvar. Esse material foi contrastado com solução aquosa de acetato de uranila 1 % e citrato de chumbo de Reynolds (1,76 g de citrato de sódio + 1,33 g de nitrato de chumbo + 50 mL água destilada; pH 12) e visualizado em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900.

3.2.2.3 Extração do DNA total das amostras

De acordo com a quantidade e a qualidade das amostras recebidas para análise, foram selecionados dois diferentes métodos de extração. O primeiro método, utilizado para as amostras A-29, A-33 e A-35 consistiu-se no uso de um *kit* comercial para extração de DNA de tecidos de

plantas (Dneasy Plant Mini - Qiagen Inc.). O segundo, denominado extração rápida, utilizado para as amostras A-38, A-40 e A-42, constitui-se no protocolo 2X CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990 apud AHRENS; SEEMÜLLER, 1992), com modificações. Para os dois métodos foram utilizados 0,2 g de tecido fresco das infrutescências e das nervuras das folhas e pulverizado em nitrogênio líquido. Ambos os métodos encontram-se descritos a seguir.

3.2.2.3.1 Extração com *kit* comercial

O material pulverizado foi transferido para microtubo de 1,5 mL, sendo adicionados 400 µL de tampão AP1 (Qiagen) e 4 µL de RNase A (20 mg/ mL). Em seguida, essa suspensão foi incubada em banho-maria a 65 °C por 10 minutos. Após esta etapa, foram adicionados 130 µL de tampão AP2 (Qiagen). O material foi incubado por 5 minutos em gelo e centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi recuperado para a coluna QIAshredder (Qiagen) e centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos. A fração que passou por esta coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 675 µL de tampão AP3/E (Qiagen) e homogeneizados. Essa mistura foi transferida para a coluna DNeasy (Qiagen) e centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto, sendo descartada a fração que passou pela coluna. A coluna DNeasy (Qiagen) foi transferida para um novo microtubo de 2 mL, onde foram adicionados 500 µL de tampão AW (Qiagen) e efetuada uma centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto, descartando-se o material que passou pela coluna. Reutilizando o microtubo de 2 mL, foram adicionados 500 µL de tampão AW (Qiagen) à coluna e realizada uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos. A coluna DNeasy (Qiagen) foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e, por duas vezes, foi adicionado 100 µL de tampão AE (Qiagen) no centro da coluna, incubando por 5 minutos à temperatura ambiente e procedendo uma centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. O DNA extraído foi armazenado a - 20 °C.

3.2.2.3.2 Extração rápida

Depois de pulverizado em nitrogênio líquido, o material foi transferido para microtubo de 1,5 mL sendo adicionados 800 µL de tampão de extração 2X CTAB (2 g CTAB; 8,18 g NaCl; 0,74g EDTA; 1,57 g Tris-HCl; 100 mL água destilada; pH 8,0) a 60 °C e 1,6 µL de β-

mercaptoetanol. Em seguida, essa suspensão foi incubada em banho-maria a 65 °C por 60 minutos, sendo agitada a cada 10 minutos visando a homogeneização. Após esta etapa foram adicionados 600 µL de CIA (clorofórmio/álcool isoamílico 24:1) e misturados até a obtenção de uma emulsão homogênea. Essa emulsão foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos. Aproximadamente 540 µL da fase superior (aquosa) formada nesse processo foi retirada e transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, no qual foi adicionada a mesma quantidade de álcool isopropílico gelado (-20 °C), sendo a mistura incubada por uma noite à -20 °C. Em seguida, foi efetuada uma centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação foi descartado o máximo possível de sobrenadante preservando o precipitado. Sem desfazer o material precipitado, o mesmo, foi lavado por duas vezes com 1 mL de etanol 80 % por 10 minutos. Foram adicionados 500 µL de NaCl 1M incubando a 4 °C por 60 minutos. Nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos foi realizada. O sobrenadante foi retirado e transferido para novo microtubo e a este foi adicionado 350 µL de álcool isopropílico gelado (-20 °C), incubando a 4 °C por 60 minutos. Novamente, foi feita uma centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos, sendo o precipitado lavado por duas vezes com 1 mL de etanol 80 %. O precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 100 µL de água deionizada esterilizada. O DNA extraído foi mantido a -20 °C.

3.2.2.4 Detecção de fitoplasmas por PCR

As amostras foram analisadas através da técnica de duplo PCR com os pares de *primers* universais, P1/Tint (SMART et al., 1996) e R16F2n/R16R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996), para detecção de fitoplasmas. As amplificações foram conduzidas em reações de 25 µL contendo 18,14 µL de água deionizada; 2,5 µL de tampão polimerase 10X; 2,0 µL de uma mistura de dNTP (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo); 0,6 µL de cada *primer* (solução 20 pmol/µL); 0,16 µL de enzima Amplitaq (5U/µL) e 1 µL do DNA molde. Como controles negativos foram adotados DNA extraído de plantas assintomáticas de morangueiro (A-38) e água deionizada esterilizada e, como controle positivo, DNA obtido de planta de milho infectada com o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho.

Na primeira reação foi utilizado o par de *primers* P1/Tint, que amplifica uma sequência de 1600 pb do DNA genômico de fitoplasmas. O DNA total extraído das amostras foi diluído na

proporção 1:20 v/v em água deionizada esterilizada. O termociclador foi programado para 30 ciclos nas seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 56 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos. O produto amplificado na primeira reação foi diluído na proporção 1:50 v/v em água deionizada esterilizada e submetido à nova re-amplificação com os pares de *primers* R16F2n/R16R2, o qual amplifica uma sequência de 1200 pb. Neste caso, o termociclador foi programado para as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 3 minutos e concluída por uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

As sequências dos *primers* encontram-se descritas abaixo:

P1 - 5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3'

Tint - 5'-TCA GGC GTG TGC TCT AAC CAG C-3'

R16F2n - 5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'

R16R2 - 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'

Os produtos gerados na segunda reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com Sybr safe (Invitrogen) e as bandas de DNA visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta. O marcador de peso molecular utilizado foi 1 Kb ladder.

3.2.2.5 Identificação de fitoplasmas por PCR

Os produtos amplificados com o par de *primers* P1/Tint foram diluídos na proporção 1:50 v/v em água deionizada esterilizada e submetidos a nova amplificação usando-se os pares de *primers* R16(I)F1/R16(I)R1 e R16(III)F2/R16(III)R1, específicos para identificação de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII, respectivamente (LEE et al., 1994). As reações de PCR foram processadas num volume total de 25 µL contendo 18,14 µL de água deionizada; 2,5 µL de tampão polimerase 10X; 2,0 µL de uma mistura de dNTP (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo); 0,6 µL de cada *primer* (solução 20 pmol/µL); 0,16 µL de enzima Amplitaq (5U/µL) e 1 µL do produto de PCR obtido na reação com os *primers* universais P1/Tint. Os controles foram representados pelo DNA de fitoplasma do enfezamento vermelho (grupo 16SrI) (BEDENDO; DAVIS; DALLY, 2000) e DNA de fitoplasma do irizado do chuchuzeiro (grupo 16SrIII) (RIBEIRO et al., 2004). O termociclador foi programado para as seguintes etapas:

desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 3 minutos e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos amplificados esperados para cada par de *primer* são de 1100 pb para fitoplasmas do grupo 16SrI e de 800 pb para fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII.

As sequências dos *primers* encontram-se descritas abaixo:

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'

Os produtos gerados pelo PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com Sybr safe e as bandas de DNA visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta. O marcador de peso molecular utilizado foi 1 Kb ladder.

3.2.2.6 Identificação de fitoplasmas por análise de RFLP

As sequências do 16S rDNA amplificadas por PCR com os *primers* universais P1/Tint-R16F2n/R16R2 foram analisadas por RFLP com as enzimas de restrição *AluI* (AG▼CT), *KpnI* (GGTAC▼C), *MseI* (T▼TAA), *RsaI* (GT▼AC), *HhaI* (GCG▼C), *MboI* (▼GATC), *HpaII* (C▼CGG), *HinfI* (G▼ANTC), *BfaI* (C▼TAG), *TaqI* (T▼CGA), *Bsh1236I* (CG▼CG) e *HaeIII* (GG▼CC), empregando-se as sequências do 16S rDNA do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho e do fitoplasma do irizado do chuchuzeiro como referências para os grupos 16SrI e 16SrIII, respectivamente. Alíquotas de 5 µL de cada produto de PCR foram digeridas separadamente com cada uma das enzimas a 36 °C por um período de 30 horas. Os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 5% corado com Sybr safe e as bandas visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta. O marcador de peso molecular utilizado foi o φX174 RF DNA *HaeIII* digest (Invitrogen). Os perfis gerados foram confrontados com aqueles descritos pela literatura e os fitoplasmas identificados nas amostras foram classificados dentro dos grupos atualmente reconhecidos (LEE et al.,1998).

3.2.2.7 Sequenciamento do 16S rDNA

Os produtos de duplo PCR amplificados a partir das amostras A-29 e A-42 foram purificados, clonados em *Escherichia coli* e submetidos ao sequenciamento. As seqüências obtidas foram comparadas entre si e com seqüências de outros fitoplasmas e de outros organismos que incitam doenças com sintomas semelhantes às de fitoplasmas em morangueiro.

3.2.2.7.1 Purificação

Os produtos de PCR foram purificados com o uso do *kit* comercial PureLink™ (Invitrogen), segundo o protocolo disponibilizado pelo fabricante.

Em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 300 µL de Binding Buffer (Invitrogen) e 75 µL de produto da PCR obtido na reação com o par de *primer* R16F2n/R16R2. Essa mistura foi transferida para a coluna Spin Column (Invitrogen) e centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. O produto que passou pela coluna foi descartado. Ao produto retido na coluna foram adicionados 650 µL de Wash buffer (Invitrogen) e conduzida nova centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. Após o descarte do produto que passou pela coluna foi efetuada uma centrifugação a 13.000 rpm por 3 minutos. Após essa etapa, a coluna foi transferida para novo microtubo, adicionando-se ao centro da mesma, 50 µL de Elution buffer (Invitrogen). Procedeu-se a incubação por 1 minuto à temperatura ambiente e, por fim, centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos.

A concentração dos produtos purificados foi estimada comparativamente com o marcador Lambda DNA por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com Sybr safe, e as bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.2.7.2 Clonagem

Aproximadamente 400 ng do produto purificado foi submetido à ligação em vetor plasmidial, com o uso do *kit* comercial pGEM T Easy Vector System I (Promega).

Em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 3 µL do DNA purificado, 1 µL do vetor (25 ng/µL), 5 µL de tampão ligase 2X e 1 µL de T4 DNA ligase (3 U/µL). Essa mistura foi mantida a 4 °C por uma noite. Neste estágio, a ligação estava apta para ser transferida para células competentes de *Escherichia coli*, por transformação.

Uma mistura de 3 μL do produto da ligação e de 50 μL de suspensão de células competentes de *E. coli*, estirpe DH5 α previamente preparadas segundo Hanahan (1983), foi incubada em gelo por 30 minutos. Após esse período, essa mistura foi submetida a choque térmico a 42 °C por 50 segundos e, imediatamente, transferidas para o gelo por 2 min.

Realizada a transformação, foram adicionados 450 μL de meio Luria Bertani (LB) líquido (1% de triptona; 0,5 % de extrato de levedura; 0,25 % de NaCl) pré-aquecido à 37 °C às células transformadas e realizada a incubação a 37 °C por 2 horas, sob agitação moderada (200 rpm). Após o período de crescimento, 100 μL da suspensão de células transformadas foram transferidos para placas de Petri contendo 20 ml de meio LB sólido (1 % de triptona; 0,5 % de extrato de levedura; 0,25 % de NaCl; 4 % de ágar), adicionado com 20 μL de ampicilina (100 mg/mL), 20 μL X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosida) na concentração de 50 ng/ml e 20 μL IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosida) na concentração de 50 mg/mL, sendo as placas mantidas por uma noite a 37 °C. As colônias recombinantes, de cor branca, foram selecionadas e transferidas para tubos *Falcon* contendo meio LB líquido e incubadas a 37 °C por 12 horas sob agitação moderada (200 rpm).

A extração do DNA plasmidial foi realizada com o *kit* comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 1,5 mL da cultura de células e realizada centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. O precipitado foi ressuspenso com 250 μL de Cell Resuspension Solution (Promega). Após esse passo, foram adicionados 250 μL de Cell Lysis Solution (Promega) e homogeneizados. A essa mistura foram adicionados 10 μL de Alkaline Protease Solution (Promega) incubando-se à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 350 μL de Neutralization Solution (Promega) realizada centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para a coluna Spin Column (Promega). Nova centrifugação foi realizada a 13.000 rpm por 1 minuto. A coluna foi lavada com 750 μL de Wash Solution (Promega), centrifugada a 13.000 rpm por 1 minuto e, novamente lavada com 250 μL de Wash Solution. Após nova centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto foi descartado o material que passou pela coluna. Nova centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos foi processada. A coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e foram adicionados 100 μL de Nuclease-Free Water (Promega). Por fim, foi realizada uma centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto e o produto obtido foi armazenado a -20 °C.

A confirmação dos insertos obtidos foi feita através de reações de PCR com o par de *primer* universal para fitoplasmas (R16F2n/R16R2) e um par de primer para o vetor plasmidial pGEM T (M13F/M13R) (MESSING, 1993) e digestão com a enzima *EcoR1*, usando-se como molde o DNA plasmidial extraído.

3.2.2.7.3 Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foram utilizados 3 µL de água deionizada esterilizada, 2 µL de tampão 2,5X (Save Money, 1M Tris-Hcl pH=9,0; 1M MgCl²), 1 µL de cada *primer* (M13F/M13R) na concentração de 5 pmoles/µL, 2 µL de DYEnamic (GE) e 2 µL de DNA plasmidial extraído. O programa utilizado foi composto por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20 segundos, anelamento a 50 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 60 segundos.

Visando a precipitação dos fragmentos obtidos na reação de sequenciamento foram adicionados 2 µL sódio/EDTA e 60 µL de etanol 100 % seguida por uma centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e, sobre o precipitado, foram adicionados 150 µL de etanol 70 % e realizada nova centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a 40 °C por 10 minutos.

Os precipitados foram ressuspensos em 10 µL de Hi-Di Formamida e dispostos na placa do sequenciador (ABI 3100 - ABI Prism / Applied Biosystems).

3.2.2.7.4 Análise filogenética e de sítios putativos de restrição e cálculo do coeficiente de similaridade

As seqüências geradas foram analisadas através dos programas Phred phrap (<http://bioinformatica.cenargen.embrapa.br/phph/>), Bioedit, Multiple Sequence Alignment – CLUSTALW e MEGA 4 e comparadas com seqüências de outros fitoplasmas depositadas no *GenBank*. Para as análises filogenéticas foram utilizadas seqüências nucleotídicas de fitoplasmas pertencentes a diversos grupos que estão associados a várias doenças do morangueiro, de duas bactérias que causam sintomas semelhantes àqueles causados por fitoplasmas nessa cultura e do

organismo *Acholeplasma laidlawii* (Tabela 2). A árvore filogenética foi construída pelo método *Neighbour-joining* e o *Bootstrapping* processado por 1000 vezes.

Com o auxílio do *software* pDRAW32 foi realizada a digestão *in silico* das seqüências obtidas utilizando-se as mesmas enzimas adotadas para a análise de RFLP. Desta forma gerados os mapas de sítios putativos de restrição. O mesmo procedimento foi realizado para fitoplasmas similares àqueles encontrados em plantas de morango, tomando-se por base as seqüências depositadas no *GenBank*.

Com base na análise dos sítios putativos de restrição foram calculados coeficientes de similaridade (F) entre as seqüências dos fitoplasmas detectados nas amostras de morangueiro e outros fitoplasmas de maior similaridade com estes, de acordo com o citado por Lee et al. (1998). F foi obtido por $F = 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$, onde X e Y são dois fitoplasmas distintos; N_X e N_Y são os números de fragmentos resultantes da digestão de X e Y, respectivamente e N_{XY} o número de fragmentos compartilhados pelos dois fitoplasmas.

Tabela 2 – Relação dos representantes dos grupos de fitoplasmas e das bactérias que incitam doenças com sintomas semelhantes em morangueiro, adotados neste estudo, para análise filogenética. Entre eles os fitoplasmas detectados nas amostras de morangueiro A-29 e A-42 e o organismo *A. laidlawii*

Organismo	Doença	Nº de acesso <i>GenBank</i>	Referência
SFP-Br1 (A-29)	Strawberry fruit phyllody	EU719107	este estudo
SFP-Br3 (A-42)	Strawberry fruit phyllody	EU719109	este estudo
16SrI: Aster yellows group			
I-A	Tomato big bug	L33760	GUNDERSEN et al., 1994.
I-B	<i>Oenothera</i> virescence	M30790	LIM; SEARS, 1989.
I-C	Clover phyllody	AF222065	<i>GenBank</i>
I-K	Strawberry multiplier disease	U96616	JOMANTIENE et al., 1998b.
I-R	Strawberry fruit phyllody	AY102275	JOMANTIENE et al., 2002c.
16SrIII: X Disease group			
III-A	Canada peach X-disease	L33733	GUNDERSEN et al., 1994.
III-B	China-tree decline	AY081817	GALDEANO et al., 2004.
III-J	Chinaberry yellows	AF495657	HARRISON; BOA; CARPIO, 2003.
III-K	Strawberry fruit phyllody	AF175304	JOMANTIENE et al., 2001.
16SrVI: Clover proliferation group			
VI-A	Clover proliferation	L33761	GUNDERSEN et al., 1994.
VI-B	Strawberry multiplier disease	AF036354	JOMANTIENE et al., 1998a.
16SrXII: Stolbur group			
XII-A	Strawberry marginal chlorosis	DQ350615	TERLIZZI; BABINI; CREDI, 2006.
XII-B	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma australiense'	L76865	DAVIS et al., 1997
XII-E	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma fragariae'	DQ086423	VALIUNAS; STANIULIS; DAVIS, 2006.
16SrXIII: Mexican periwinkle virescence group			
XIII-A	Mexican periwinkle virescence	AF248960	DAVIS; DALLY, 2001
XIII-B	Strawberry multiplier disease	U96614	JOMANTIENE et al., 1998b.
XIII-C	Chinaberry yellows	AF495882	HARRISON; BOA; CARPIO, 2003.
<i>Candidatus</i> Phlomobacter fragariae	Strawberry marginal chlorosis	AB246669	TANAKA; NAO; USUGI, 2006.
γ -3-proteobacteria	Strawberry marginal chlorosis	DQ538372	TERLIZZI, et al., 2007
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	-----	M23932	WEISBURG et al., 1989.

3.2.3 Resultados e Discussão

3.2.3.1 Microscopia Eletrônica

Corpúsculos pleomórficos, típicos de fitoplasmas, foram visualizados no lúmen dos elementos de vasos do floema nos tecidos da amostra A-42 (Figura 3).

A microscopia eletrônica tem sido uma técnica útil na detecção de fitoplasmas, embora seja considerada menos sensível que as técnicas moleculares. Isto se deve, sobretudo, ao reduzido tamanho dos fragmentos vegetais amostrados, pois os fitoplasmas podem apresentar distribuição irregular na planta e baixa concentração nos tecidos, fatores que comprometem sua observação e, por conseqüência, sua detecção. Apesar de não fazer parte dos objetivos propostos neste trabalho, o uso da microscopia eletrônica de transmissão serviu como complemento aos resultados obtidos com a aplicação do método da PCR.

No Brasil, dezenas de espécies de plantas têm sido relatadas como hospedeiras de fitoplasmas, sendo tal associação constatada essencialmente por microscopia eletrônica (KITAJIMA, 1994). Através dessa técnica, Sittolin, Pavan e Monteiro (1998) relataram pela primeira vez no país a associação de fitoplasmas à cultura do morangueiro pela observação de corpúsculos pleomórficos no lúmen dos elementos de vasos do floema de plantas que exibiam redução do desenvolvimento, virescência de flores, filodia dos aquênios, proliferação da inflorescência e ausência de clorose nas folhas. Na República Tcheca, a presença de fitoplasmas em plantas de morango com sintomas de pétala verde foi inicialmente observada por microscopia eletrônica, sendo, posteriormente, conduzida à identificação destes agentes com o uso de técnicas moleculares (HONETSLEGROVÁ; VIBIO; BERTACCINI, 1996). Na Austrália, em plantas com sintomas de pétala verde e amarelo letal, fitoplasmas foram observados em alta concentração em células de elementos de vasos de floema (ANDERSEN et al., 1998).

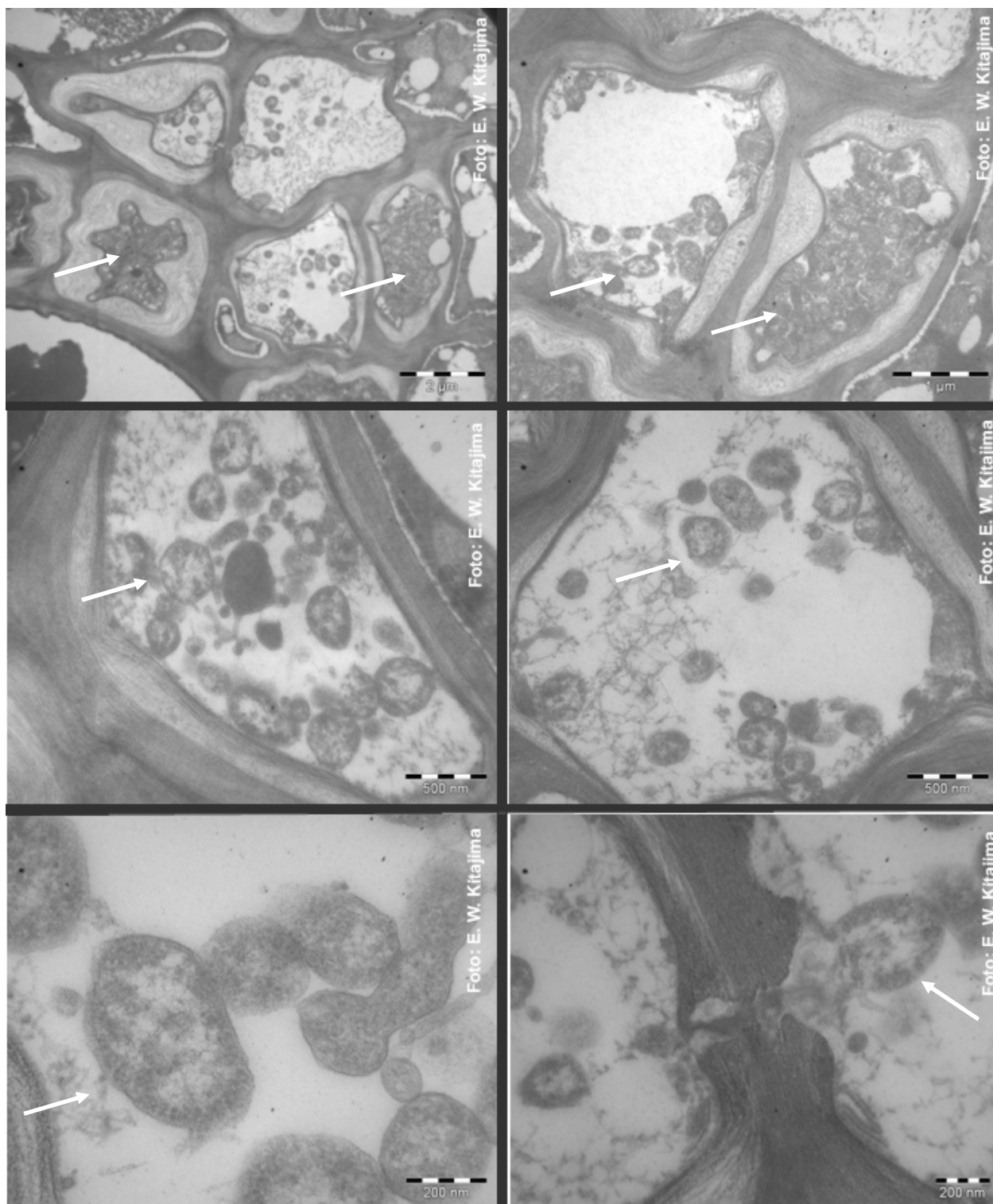


Figura 3 – Detecção, por Microscopia Eletrônica de Transmissão, de fitoplasmas em elementos de vasos do floema de morangueiro com sintomas de filodia. As setas indicam aglomerados de células e células individuais de fitoplasmas nos vasos

Em doenças como os amarelos letais e clorose marginal, a presença dos agentes causais rickettsias ou *Candidatus phloemobacter fragariae*, respectivamente, ocorrendo isoladamente ou em associação com fitoplasmas pode ser observada por microscopia eletrônica, bem como a presença de fitoplasmas isoladamente como organismos indutores dessas doenças (GREBER; GOWANLOCK, 1979; NOURRISSEAU; LANSAC; GARNIER, 1993; TANAKA; NAO; USUGI, 2006). De acordo com Siddique et al. (1998), para muitas doenças, células de fitoplasmas podem ser observadas em grande número dentro dos elementos de floema de plantas com sintomas externos visíveis. No entanto, estes autores citam que, muitas vezes, o patógeno pode estar presente em título muito baixo, o que dificulta sua detecção mesmo nos tecidos de hospedeiros que mostram sintomas externos. Dessa forma, pode-se inferir para o presente trabalho, que nas amostras de morangueiro em que não houve a visualização de fitoplasmas o patógeno poderia estar presente em título muito baixo, não sendo assim possível sua detecção. Ainda, o resultado aqui obtido permite afirmar que, apenas fitoplasmas estão associados com os sintomas observados na amostra A-42, sendo descartadas as possibilidades de infecção mista com agentes não pertencentes a esse grupo de organismos ou a atribuição da doença a um outro fator biótico.

3.2.3.2 Detecção de fitoplasmas por PCR

Nas cinco amostras de morangueiro que apresentavam filodia de frutos (A-29, A-33, A-35, A-40, A-42), bem como no controle positivo representado por planta de milho portadora do fitoplasma do enfezamento, foi consistentemente detectada a presença de fitoplasmas. A detecção foi demonstrada pela amplificação de fragmentos genômicos correspondentes ao 16S rDNA, de aproximadamente 1200 pb, através de duplo PCR com os *primers* universais P1/Tint - R16F2n/R16R2. Para a amostra de morangueiro assintomática (A-38) e para a água nenhuma amplificação foi observada (Figura 4).

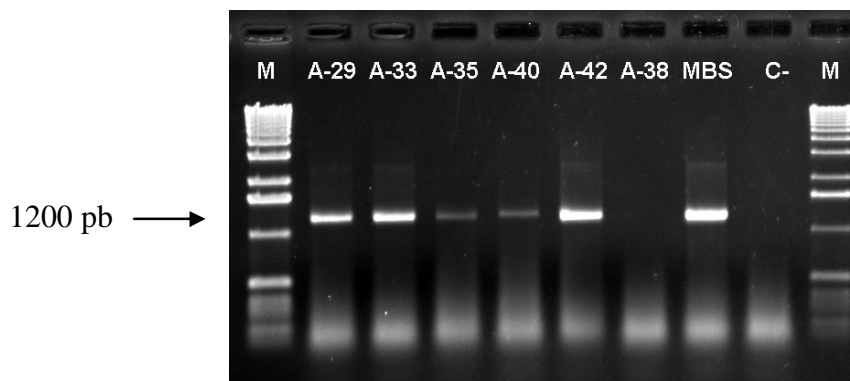


Figura 4 - Detecção de fitoplasmas, por duplo PCR com os primers universais P1/Tint - R16F2n/R16R2, em plantas de morango apresentando filodia de frutos. M: marcador de peso molecular 1 Kb ladder; A-29, A-33, A-35, A-40, A-42: amostras de morangueiro sintomático; A-38: amostra de morangueiro assintomático; MBS (*Maize Bushy Stunt phytoplasma*): controle positivo; C- (controle negativo): água deionizada

Com base nos sintomas presentes nos frutos analisados neste estudo, a detecção de fitoplasmas nos tecidos era esperada, uma vez que, mesmo não sendo os únicos agentes indutores, frequentemente a filodia de frutos está associada com a presença de fitoplasmas nos tecidos das plantas doentes (BERTACCINI et al., 1997). Particularmente para a amostra A-42, os resultados obtidos via PCR foram confirmados pela análise feita por microscopia eletrônica de transmissão. Para as demais amostras, os resultados positivos obtidos por PCR e não confirmados por microscopia pode ser justificado pela maior sensibilidade da técnica molecular.

3.2.3.3 Identificação de fitoplasmas por PCR

Com o uso de *primers* específicos para os grupos 16SrI e 16SrIII, foi possível a identificação de representantes desses dois grupos nas amostras de morangueiro analisadas. Para todas as amostras ocorreu à amplificação de fragmentos genômicos de 1100 pb, típicos para fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrI (Figura 5). Destaca-se que para as amostras A-35, A-40 e A-42 as bandas observadas no gel foram mais intensas, enquanto para as amostras A-29 e A-33 as bandas se apresentaram menos intensas, o que denota uma menor concentração de fitoplasma nos tecidos. Fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII foram identificados nas amostras A-29 e A-33, através da amplificação de fragmentos de DNA de 800 pb, característicos para fitoplasmas deste grupo (Figura 6). Ressalta-se que para ambas as amostras as bandas visualizadas no gel foram bem definidas e intensas, indicando um alto título do agente nos tecidos das plantas. Amplificações esperadas ocorreram para os controles positivos, revelando a validade dos testes

de PCR para a identificação dos fitoplasmas. Nenhuma amplificação foi observada para os controles negativos, representados DNA extraído de planta assintomática (A-38) e água.

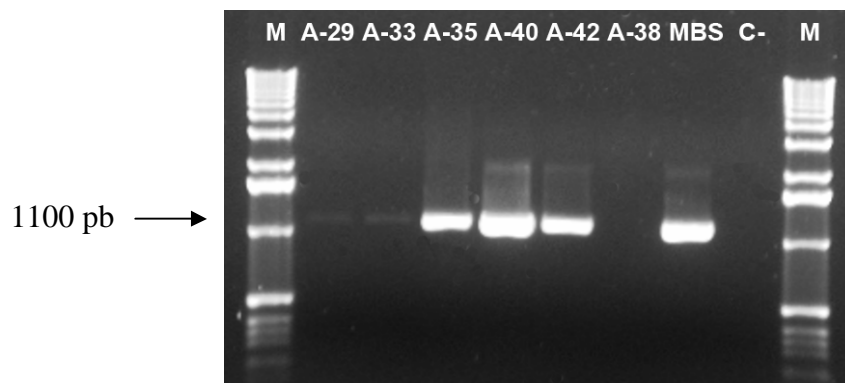


Figura 5 - Identificação de fitoplasmas do grupo 16SrI, por duplo PCR com os primers P1/Tint - R16(I)F1/R16(I)R1, em plantas de morango apresentando filodia de frutos. M: marcador de peso molecular 1 Kb ladder; A-29, A-33, A-35, A-40, A-42: amostras de morangueiro sintomático; A-38: amostra de morangueiro assintomático; MBS (*Maize Bushy Stunt phytoplasma*): controle positivo; C- água deionizada: controle negativo

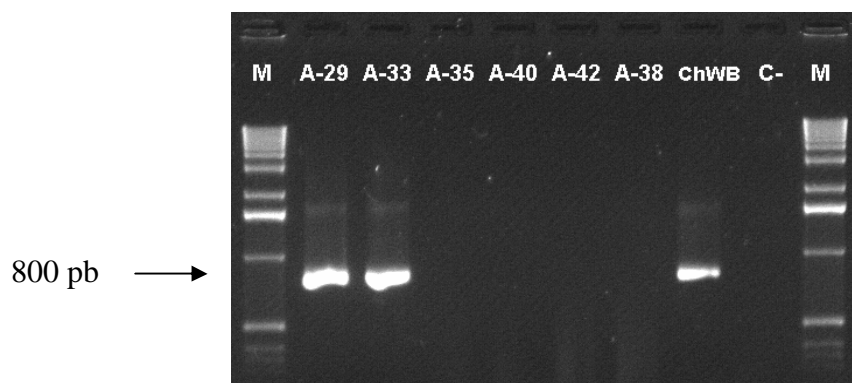


Figura 6 - Identificação de fitoplasmas do grupo 16SrIII, por duplo PCR com os primers P1/Tint-R16(III)F2/R16(III)R1, em plantas de morango apresentando filodia de frutos. M: marcador de peso molecular 1 Kb ladder; A-29, A-33, A-35, A-40, A-42: amostras de morangueiro sintomático; A-38: amostra de morangueiro assintomático; ChWB (*Chayote Witches broom phytoplasma*): controle positivo; C- água deionizada: controle negativo

Os resultados obtidos neste estudo mostraram a ocorrência de infecção mista em morangueiro por fitoplasmas pertencentes a dois grupos distintos, nas amostras A-29 e A-33. É interessante notar que em ambas as amostras, aparentemente o título do fitoplasma do grupo 16SrI é baixo em relação à concentração do fitoplasma do grupo 16SrIII. Segundo Lee et al., 1994, a associação de mais de um tipo de fitoplasma com um mesmo hospedeiro é comum,

porém, o fitoplasma dito secundário frequentemente está presente em título muito baixo, assim como foi observado neste trabalho.

Os grupos 16SrI e 16SrIII congregam o maior número de fitoplasmas identificados e aparentemente, fitoplasmas do grupo 16SrIII se encontram mais restritos ao hemisfério ocidental (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). Representantes destes grupos também têm sido identificados com frequência em associação com diversas doenças ocorrentes no Brasil (MONTANO; BRIOSO; PIMENTEL, 2007).

3.2.3.4 Identificação de fitoplasmas por análise de RFLP

A análise dos perfis coletivos de RFLP, gerados pela digestão do produto amplificado em PCR com as enzimas de restrição *AluI*, *KpnI*, *MseI*, *RsaI*, *HhaI*, *MboI*, *HpaII*, *HinfI*, *BfaI*, *TaqI*, *Bsh12361* e *HaeIII*, confirmou a presença de fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII nas amostras A-29 e A-33. Os perfis de restrição obtidos para o fitoplasma presente nas amostras de morangueiro foram indistinguíveis entre si, considerando cada uma das enzimas, exceção feita para a enzima *Bsh12361*. Estes perfis foram idênticos àqueles apresentados pelo fitoplasma usado como referência para o grupo 16SrIII, com exceção dos perfis produzidos pela enzima *HhaI* (Figuras 7; 8; 9). Apesar da análise de RFLP permitir a identificação segura de fitoplasma do grupo 16SrIII nas amostras sintomáticas de morangueiro, não foi possível identificar o fitoplasma ao nível de subgrupo, pois os perfis de restrição mostrados pelo fitoplasma não se ajustaram perfeitamente àqueles adotados (LEE et al., 1998) para classificar os representantes dos diversos subgrupos pertencentes ao grupo 16SrIII.

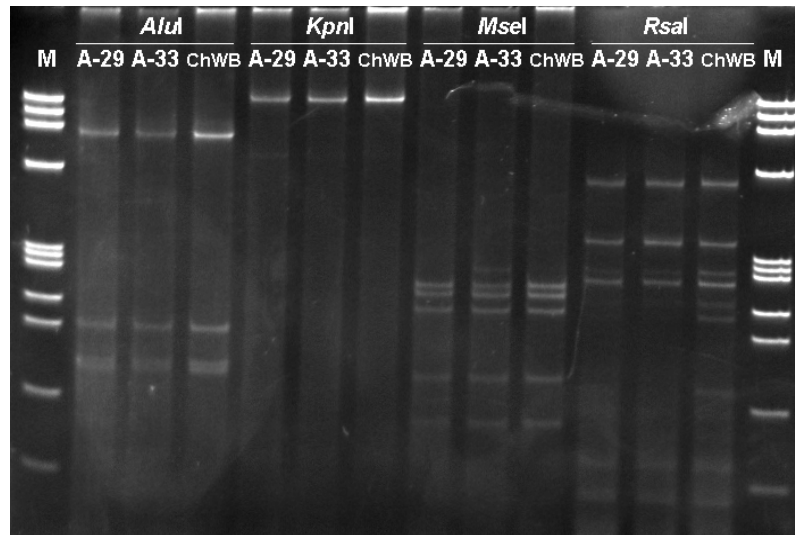


Figura 7 – Identificação dos fitoplasmas detectados nas amostras sintomáticas de morangueiro A-29 e A-33, por RFLP com as enzimas *AluI*, *KpnI*, *MseI* e *RsaI*. ChWB: fitoplasma de referência para grupo 16SrIII; M: marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA *HaeIII* digest (1353 pb, 1078 pb, 872 pb, 603 pb, 310 pb, 271, 281 pb, 234 pb, 194 pb, 118 pb, 72 pb)

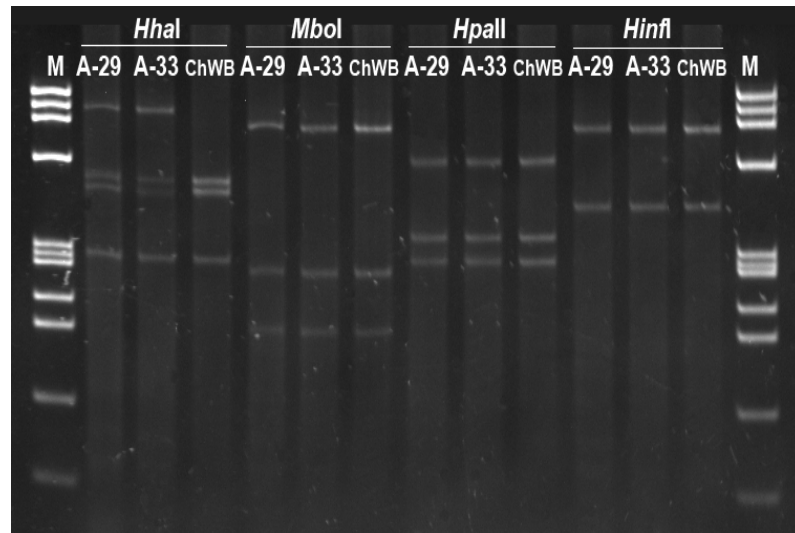


Figura 8 – Identificação dos fitoplasmas detectados nas amostras sintomáticas de morangueiro A-29 e A-33, por RFLP com as enzimas *HhaI*, *MboI*, *HpaII* e *HinfI*. ChWB: fitoplasma de referência para o grupo 16SrIII. M: marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA *HaeIII* digest (1353 pb, 1078 pb, 872 pb, 603 pb, 310 pb, 271, 281 pb, 234 pb, 194 pb, 118 pb, 72 pb)

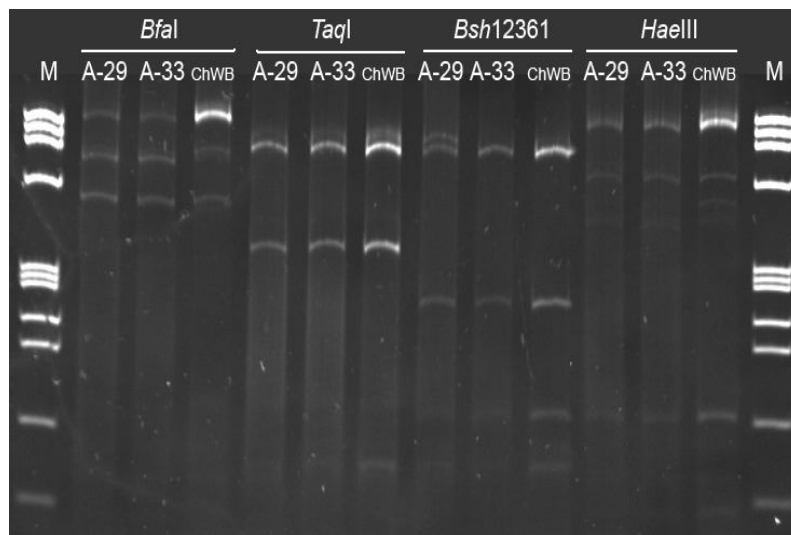


Figura 9 – Identificação dos fitoplasmas detectados nas amostras sintomáticas de morangueiro A-29 e A-33, por RFLP com as enzimas *BfaI*, *TaqI*, *Bsh12361* e *HaeIII*. ChWB: fitoplasma de referência para o grupo 16SrIII. M: marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA *HaeIII* digest (1353 pb, 1078 pb, 872 pb, 603 pb, 310 pb, 271, 281 pb, 234 pb, 194 pb, 118 pb, 72 pb)

Os resultados deste trabalho revelaram mais uma espécie de rosácea, cultivada no Brasil, como sendo um novo hospedeiro de um fitoplasma representante do grupo 16SrIII, uma vez que, um fitoplasma deste mesmo grupo foi relatado, anteriormente, em plantas de macieira exibindo sintomas da doença conhecida como lenho mole (RIBEIRO; BEDENDO; SANHUEZA, 2007). Além das rosáceas, espécies pertencentes às famílias Ampelidaceae, Apocynaceae, Begoniaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Cruciferae, Euphorbiaceae, Leguminosae, Nyctaginaceae, Passifloraceae e Solanaceae já foram identificadas como portadoras de fitoplasmas deste grupo, no Brasil (MONTANO, BRIOSO, PIMENTEL, 2007; SILVA, 2008). A constatação de mais um membro do grupo 16SrIII em rosáceas fortalece a informação da predominância destes fitoplasmas no país permitindo inferir uma possível ausência de especificidade entre espécies botânicas hospedeiras e fitoplasmas relacionados a este grupo.

O aparecimento de bandas inespecíficas observadas para algumas enzimas de restrição, considerando-se os padrões de grupo 16SrIII obtidos neste trabalho em comparação com aqueles descritos por Lee et al. (1998), poderia ser explicado pela ocorrência da infecção mista de fitoplasmas nas amostras, uma vez que tais bandas indicam a presença de fitoplasma do grupo 16SrI. Considerando especificamente os padrões de restrição obtidos com a enzima *HhaI*, a presença de bandas inespecíficas poderia ser interpretada como a ocorrência de sequências heterogêneas de operons rRNA, como já demonstrado em outros trabalhos para fitoplasmas do

grupo 16SrIII (JOMANTIENE et al., 2002c; AMARAL MELLO; BEDENDO; CAMARGO, 2006).

Nas amostras A-35, A-40 e A-42, fitoplasmas do grupo 16SrI foram consistentemente detectados através da PCR com *primers* específicos indicados para identificação de fitoplasmas deste grupo. A análise de RFLP confirmou a presença de fitoplasma do grupo 16SrI nas amostras A-35 e A-40, no entanto revelou a ocorrência de um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrXIII na amostra A-42.

Os padrões de restrição apresentados pelos fitoplasmas encontrados nas amostras A-35 (Figura 10) e A-40 (dados não apresentados) foram idênticos entre si e não se distinguiram daqueles observados para o fitoplasma do enfezamento do milho, um representante típico do grupo 16SrI subgrupo B, usado como controle. Com base nos perfis eletroforéticos gerados pelas enzimas *AluI*, *KpnI*, *MseI*, *RsaI* ficou demonstrado que o fitoplasma do morangueiro é um afiliado ao grupo 16SrI (Figura 10). Como complemento, os padrões de restrição obtidos pela digestão enzimática conduzida com as enzimas *HhaI* e *HpaII* permitiram identificar este fitoplasma como um representante do grupo 16SrI, subgrupo B (Figura 10). Fitoplasmas afiliados ao subgrupo 16SrI-B são citados por Jomantiene et al. (2002a) como incitadores de filodia em frutos de morangueiro. No entanto, inexistem relatos no Brasil desse grupo de fitoplasmas ocorrendo em rosáceas. Assim, este é o primeiro relato da presença de fitoplasma afiliado ao grupo 16SrI, subgrupo B em espécies de rosáceas no Brasil. Fitoplasmas pertencentes ao subgrupo 16SrI-B são de ocorrência comum no Brasil, sendo registrados em associação com doenças de diversas espécies botânicas cultivadas, tais como cana-de-açúcar (SILVA, 2008), dendezeiro (BRIOSO et al., 2006), margaridinha (BIANCHINI; BEDENDO, 2000), milho (BEDENDO; DAVIS; DALLY, 2000) e videira (NERONI; BEDENDO; KUNIYUKI, 2006).

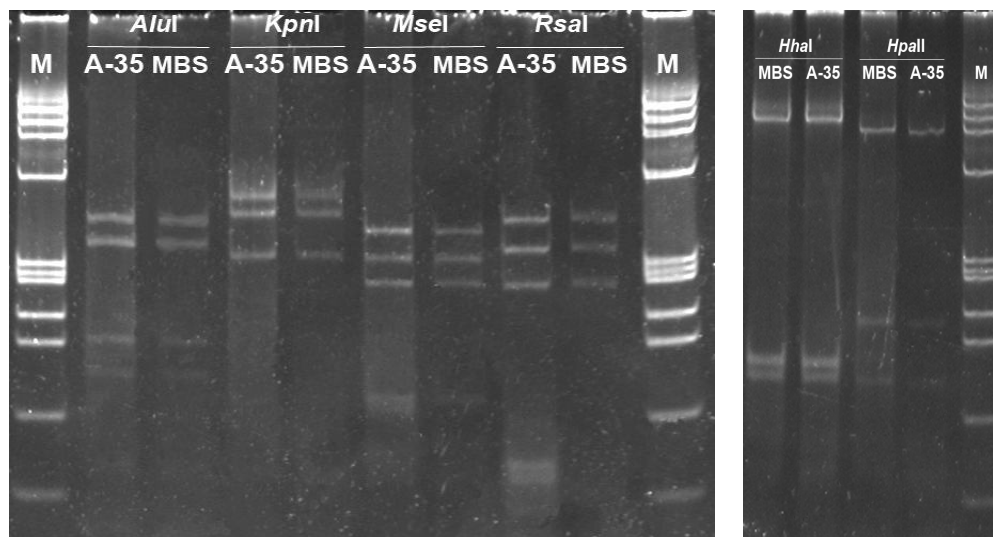


Figura 10 – Identificação do fitoplasma detectado na amostra sintomática de morangueiro A-35, por RFLP com as enzimas *AluI*, *KpnI*, *MseI*, *RsaI*, *HhaI* e *HpaII*. MBS: fitoplasma de referência para o grupo 16SrI; M: marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA *HaeIII* digest (1353 pb, 1078 pb, 872 pb, 603 pb, 310 pb, 271, 281 pb, 234 pb, 194 pb, 118 pb, 72 pb)

Apesar da identificação de um fitoplasma do grupo 16SrI por meio da PCR com os *primers* específicos, a análise de RFLP com as onze enzimas de restrição (Figuras 11; 12) demonstrou que o fitoplasma presente na amostra A-42 pertencia ao grupo 16SrXIII. No entanto, este resultado não se constituiu em surpresa, pois fitoplasmas atualmente componentes do grupo 16SrXIII eram classificados como sendo afiliados ao grupo 16SrI, subgrupo I (GUNDERSEN et al., 1996). Estudos moleculares conduzidos com estes fitoplasmas levaram ao estabelecimento de critérios que justificaram sua reclassificação num grupo novo, distinto do grupo 16SrI (LEE et al., 1998). Atualmente, o par de *primers* específicos R16(I)F1/R16(I)R1, inicialmente desenvolvidos para a identificação de fitoplasmas do grupo 16SrI, pode também amplificar fragmentos genômicos de fitoplasmas do grupo 16SrXIII, como já referido, bem como de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrXII (TERLIZZI; BABINI; CREDI, 2006). Assim sendo, quando os resultados de PCR conduzidos com estes *primers* forem positivos, há necessidade de se recorrer à análise de RFLP para complementar a identificação correta dos fitoplasmas.

No presente estudo, as enzimas de restrição *MseI*, *HhaI*, *MboI*, *HpaII*, *HinfI*, *BfaI*, *Bsh1236I* e *TaqI* produziram, para o fitoplasma encontrado na amostra A-42, perfis idênticos àqueles relatados para fitoplasmas do grupo 16SrXIII (LEE et al., 1998) permitindo classificar o referido fitoplasma como um representante deste grupo (Figuras 11 e 12). No entanto, a enzima *KpnI* (Figura 11) não gerou perfil de restrição para o fitoplasma do morangueiro, contrariamente

ao que foi relatado para os membros do grupo 16SrXIII, de acordo com o esquema de classificação vigente (LEE et al. 1998). Ainda, o perfil obtido com a enzima *AluI* foi similar, mas não idêntico, àquele descrito para fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrXIII, porém se mostrou distinto dos perfis referidos para fitoplasmas representantes dos demais grupos (Figura 11). A enzima *RsaI* produziu um perfil inédito (Figuras 11), ou seja, totalmente diferente de todos os perfis relatados para fitoplasmas dos grupos conhecidos, de acordo com o esquema de classificação (LEE et al., 1998). No entanto, para todas as enzimas utilizadas neste trabalho, os perfis coletivos encontrados para o fitoplasma do milho, usado como padrão de referência, estavam de acordo com esperado, mostrando a validade dos resultados obtidos pela análise de RFLP.

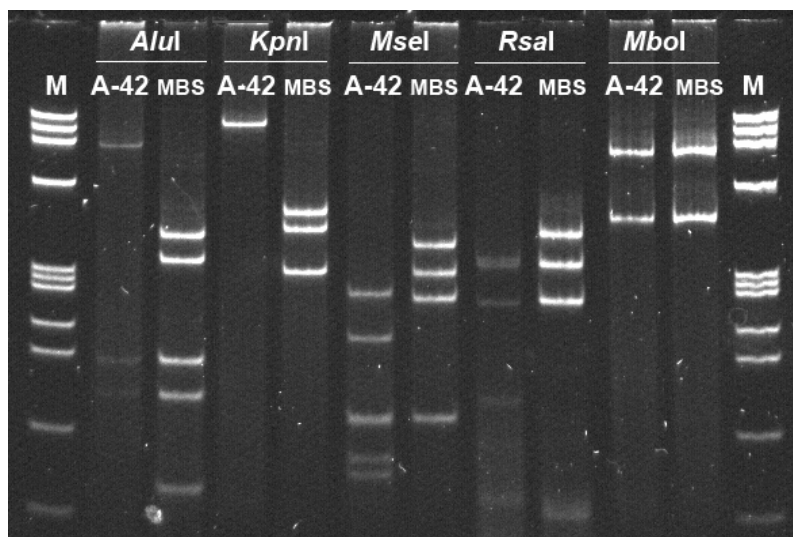


Figura 11 – Identificação do fitoplasma detectado na amostra A-42, por RFLP com as enzimas *AluI*, *KpnI*, *MseI*, *RsaI* e *MboI*. MBS: DNA de referência; M: marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA *HaeIII* digest (1353 pb, 1078 pb, 872 pb, 603 pb, 310 pb, 271, 281 pb, 234 pb, 194 pb, 118 pb, 72 pb)

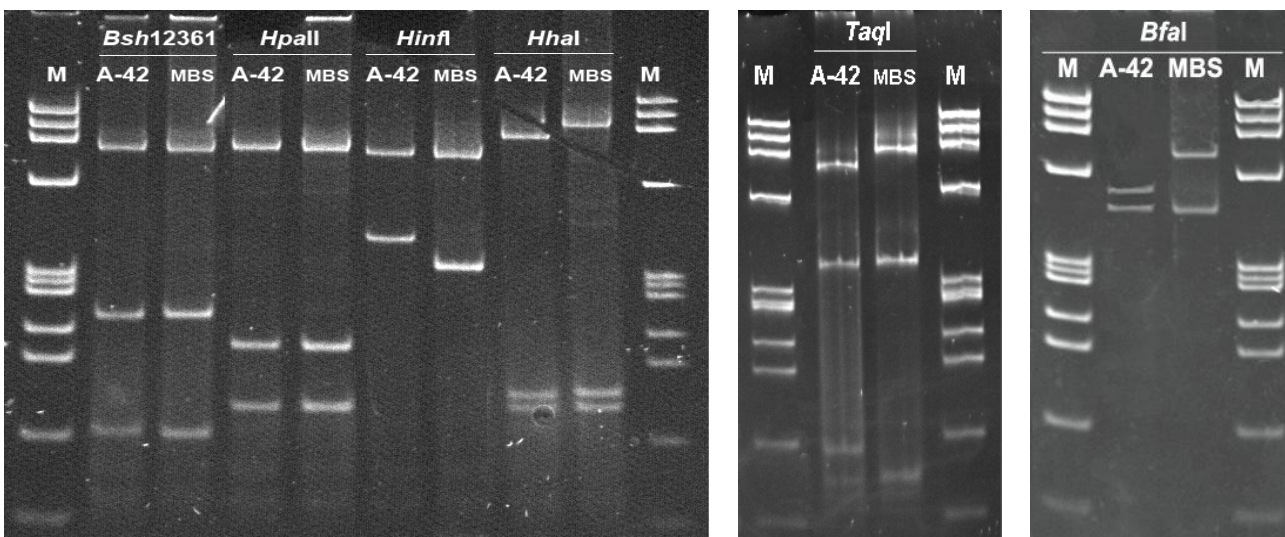


Figura 12 – Identificação do fitoplasma detectado na amostra A-42, por RFLP com as enzimas *Bsh12361*, *HpaII*, *HinfI*, *HhaI*, *TaqI* e *BfaI*. MBS: DNA de referência; M: marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA *HaeIII* digest (1353 pb, 1078 pb, 872 pb, 603 pb, 310 pb, 271, 281 pb, 234 pb, 194 pb, 118 pb, 72 pb)

Atualmente, são reconhecidos três representantes de subgrupos distintos para o grupo 16SrXIII, sendo o MPVP (*Mexican periwinkle virescence phytoplasma*), agente da virescência da vinca, pertencente ao subgrupo 16SrXIII-A (LEE et al., 1998), o STRAWB1P (*STRAWB1 phytoplasma*), um fitoplasma relacionado com doenças do morangueiro nos Estados Unidos, representante do subgrupo 16SrXIII-B (JOMANTIENE et al., 1998b) e o CbY1P (*Chinaberry yellows phytoplasma*), associado com o amarelecimento do cinamomo, um membro do subgrupo 16SrXIII-C (HARRISON; BOA; CARPIO, 2003). Em razão dos padrões de restrição obtidos para o fitoplasma da amostra A-42 se mostrarem distintos daqueles encontrados para os representantes dos subgrupos 16SrXIII-A (Lee et al., 1998) e 16SrXIII-B (JOMANTIENE et al., 1998b), para as enzimas *AluI*, *KpnI* e *RsaI*, exclui-se a possibilidade de classificar este fitoplasma como pertencente a estes subgrupos. O fitoplasma representante do subgrupo 16SrXIII-C foi caracterizado através de metodologia diferente da análise de RFLP, aplicada na caracterização molecular do fitoplasma do morangueiro. Assim sendo, com base nos resultados de RFLP não foi possível comparar estes dois fitoplasmas.

3.2.3.5 Sequenciamento do 16S rDNA

O sequenciamento foi obtido para os fitoplasmas encontrados nas amostras A-29 e A-42. As seqüências consenso foram selecionadas com base na ausência de polimorfismo demonstrado

para as diversas seqüências alinhadas. Assim, para o fitoplasma presente na amostra A-29 foi determinada uma seqüência consenso denominada de SFP-Br1 (*Strawberry Fruit Phyllody*) e para aquele da amostra A-42 a seqüência SFP-Br3, as quais foram depositadas no *GenBank* e identificadas por (EU719107) e (EU719109), respectivamente (Tabela 7).

As seqüências nucleotídicas presentes no 16Sr DNA do fitoplasma representante do grupo 16SrIII presente no morangueiro apresentaram 99% de similaridade com as seqüências dos diversos fitoplasmas afiliados a este grupo, com base em comparações feitas com seqüências encontradas no *GenBank*. A relação filogenética entre o fitoplasma identificado no morangueiro e os fitoplasmas afiliados a diversos grupos (Tabela 2) está apresentada em uma árvore filogenética gerada a partir das respectivas seqüências nucleotídicas (Figura 15). O fitoplasma do morangueiro, representado por SFP-Br1, se apresentou como distinto dos fitoplasmas afiliados aos demais grupos e ficou alojado no mesmo ramo dos fitoplasmas pertencentes ao diversos subgrupos do grupo 16SrIII.

A análise dos mapas de sítios putativos de restrição confirmou os resultados obtidos pela análise de RFLP (dados não apresentados). Através destas análises ficou demonstrado que o fitoplasma encontrado no morangueiro é um representante do grupo 16SrIII, porém não foi possível determinar a identidade deste fitoplasma ao nível de subgrupo. Apesar disto, a árvore filogenética gerada pela seqüência nucleotídica representativa deste fitoplasma e de outros 14 fitoplasmas representantes de subgrupos pertencentes ao grupo 16SrIII (Tabela 3) mostrou que o fitoplasma identificado no morangueiro está filogeneticamente mais relacionado com o fitoplasma representante do subgrupo 16SrIII-B (Figura 13).

Anomalias do tipo clorose e enfezamento têm sido observadas em morangueiro com sendo incitadas por fitoplasma pertencentes ao subgrupo 16SrIII-B (JOMANTIENE et al., 1999b). No Brasil, fitoplasmas pertencentes a este subgrupo têm sido relatados causando superbrotamento em berinjela, crotalária, mandioca (BARROS; KITAJIMA; RESENDE, 1998), maracujá (RIBEIRO, 2008) e primavera (SILVA, 2008). Ainda no Brasil, um fitoplasma do grupo 16SrIII foi relatado em macieira, uma espécie de rosácea à qual também pertence o morangueiro, no entanto este agente não foi identificado ao nível de subgrupo (RIBEIRO; BEDENDO; SANHUEZA, 2007). É interessante notar, entretanto, que as plantas de morango cultivadas nos campos comerciais localizados no Estado do Espírito Santo e analisadas neste

estudo eram originárias de mudas importadas do Chile (VENTURA², informação verbal). Segundo Santos e Medeiros (2003), devido às características dos frutos, têm ocorrido uma intensa importação de mudas de morangueiro do Chile e da Argentina, nas últimas décadas. Embora não tenham sido encontrados relatos da ocorrência deste agente em morangueiro no território chileno, é muito provável que as mudas estivessem originalmente infectadas por fitoplasmas. A entrada do material infectado no país pode ser justificada pelo aparecimento tardio dos sintomas, os quais se manifestam em estádios mais avançados do ciclo da cultura. Assim, a ausência de sintomas externos prejudicaria a diagnose feita visualmente, sendo necessária à aplicação de técnicas que permitissem a segura detecção de fitoplasmas, com o objetivo de evidenciar infecções latentes que poderiam estar presentes nos materiais submetidos às inspeções fitossanitárias.

² VENTURA, J.A. Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER.

Tabela 3 – Relação dos representantes dos subgrupos do grupo 16SrIII de fitoplasmas. Entre eles o fitoplasma SFP-Br1 detectado na amostra A-29 de morangueiro e o organismo *A. laidlawii*

Organismo	Doença	Nº de acesso <i>GenBank</i>	Referência
SFP-Br1 (A-29)	Strawberry fruit phyllody	EU719107	este estudo
16SrIII: X Disease group			
III-A	Canada peach X-disease	L33733	GUNDERSEN et al., 1994.
III-B	China-tree decline	AY081817	GALDEANO et al., 2004.
III-E	Spiraea stunt	AF190228	<i>GenBank</i>
III-F	Milkweed yellows	AF510724	<i>GenBank</i>
III-G	Walnut witches' broom	AF190227	<i>GenBank</i>
III-H	Poinsettia branch-inducing	AF190223	<i>GenBank</i>
III-I	Virginia grapevine yellows	AF060875	DAVIS et al., 1998.
III-J	Chinaberry yellows	AF495657	HARRISON; BOA; CARPIO, 2003.
III-K	Strawberry fruit phyllody	AF175304	JOMANTIENE et al., 2001.
III-L	Cassava frogskin disease	AY737647	ALVAREZ et al., 2003.
III-P, rrnA	Dandelion virescence	AF370119	JOMANTIENE, et al., 2002b.
III-P, rrnB	Dandelion virescence	AF370120	JOMANTIENE, et al., 2002b.
III-R, rrnA	Cirsium white leaf	AF373105	JOMANTIENE, et al., 2002b.
III-R, rrnB	Cirsium white leaf	AF373106	JOMANTIENE, et al., 2002b.
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	-----	M23932	WEISBURG et al., 1989.

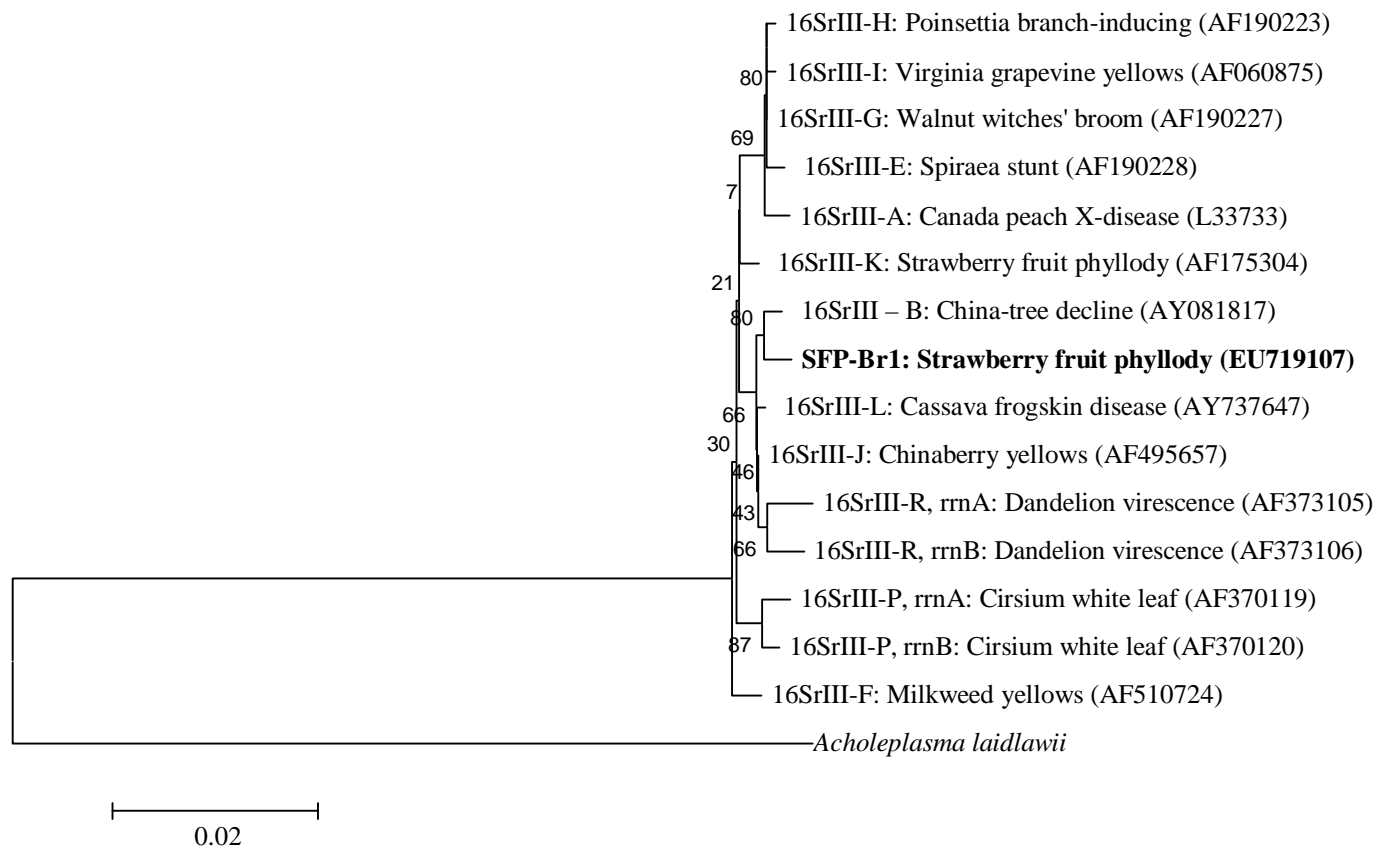


Figura 13 - Árvore filogenética, contruída pelo método *Neighbor-Joining*, de sequências 16S rDNA de 15 fitoplasmas relacionados ao grupo 16SrIII e o organismo *Acholeplasma laidlawii*. Os números nos ramos são valores de confiança (*Bootstrap*). SFP-Br1 representa o fitoplasma detectado na amostra A-29 de morangueiro

Com base nas seqüências nucleotídicas obtidas para o fitoplasma afiliado ao grupo 16SrXIII detectado na amostra A-42 de morangueiro, identificado por SFP-Br3 e aquelas disponíveis no *GenBank* para os demais representantes do grupo 16SrXIII, ficou demonstrado que o fitoplasma presente no morangueiro apresentou 98% de similaridade com os demais fitoplasmas representantes do grupo 16SrXIII. A árvore filogenética gerada a partir das diferentes seqüências nucleotídicas determinadas para o fitoplasma do morangueiro e para os demais fitoplasmas integrantes do grupo 16SrXIII (Tabela 2), mostra que o fitoplasma encontrado no morangueiro está localizado em um novo ramo, diverso daqueles conhecidos para representantes de subgrupos pertencentes ao 16SrXIII (Figura 15). Os mapas de sítios putativos de restrição gerados para a seqüência de nucleotídeos da amostra A-42 quando comparados aos outros fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrXIII, mostrou que o fitoplasma encontrado na amostra A-42 de morangueiro e representados por SFP-Br3 se mostrou distinto daqueles (Figura 14). Baseado na análise dos mapas de sítios putativos de restrição para dez enzimas, foram gerados fragmentos de acordo com os obtidos por análise enzimática de RFLP do produto amplificado do fitoplasma representado pela seqüência SFP-Br3 (Figura 14). A seqüência SFP-Br3 difere da seqüência do agente do MPV (16SrXIII-A) pela presença de um sítio *RsaI* na posição 872 e pela ausência dos sítios *RsaI* na posição 800, *KpnI* na posição 802 e *AluI* na posição 1098. Em relação ao fitoplasma 16SrXIII-B, é visualizado em SFP-Br3 a presença dos sítios *RsaI* na posição 271, *MseI* na posição 288, *AluI* na posição 841 e *RsaI* na posição 872 e ausência dos sítios *BfaI* na posição 22, *RsaI* na posição 800, *KpnI* na posição 802 e *AluI* na posição 1098. Quando comparadas as seqüências SFP-Br3 e 16SrXIII-C é observada naquela, a presença dos sítios *RsaI* na posição 271, *MseI* na posição 288, *AluI* na posição 841 e *RsaI* na posição 872 e ausência dos sítios *RsaI* na posição 800, *KpnI* na posição 802 e *AluI* na posição 1098. Estes sítios estão localizados dentro da região correspondente ao fragmento de 1200 pb que é amplificado na PCR pelos *primers* universais R16F2n/R16R2 e usado para classificação de fitoplasmas segundo o atual esquema de classificação (LEE *et al.*, 1998).

De acordo com Lee et al. (1998), coeficientes de similaridade, calculados com base nos sítios putativos de restrição, iguais ou menores do que 0,90 separam fitoplasmas em grupos distintos. Isto mostra que coeficientes maiores que 0,90, em complemento a outras evidências, agrupam seguramente fitoplasmas pertencentes a um mesmo grupo. Desta forma, como os coeficientes de similaridade calculados para SFP-Br3 e outros três fitoplasmas afiliados aos

subgrupos 16SrXIII-A, 16SrXIII-B e 16SrXIII-C variaram de 0,91 a 0,96 (Tabela 4), é possível afirmar que SFP-Br3 pertence ao grupo 16SrXIII, como o já demonstrado por métodos anteriores. Ainda, baseados nos resultados obtidos para os três subgrupos já existentes e definidos pela literatura, o fitoplasma presente no morango pode ser classificado como um novo subgrupo afiliado ao grupo 16SrXIII.

Tabela 4 – Coeficientes de similaridade baseados na análise dos mapas de sítios putativos de restrição das sequências do 16S rDNA obtidas da amostra A-42 de morangueiro (SFP-Br3) e outros fitoplasmas representantes do grupo 16SrXIII

Fitoplasma	Subgrupo de afiliação	SFP-Br3	MPV	STRAWB1	CbY1
SFP-Br3	16SrXIII-D	1,00			
MPV	16SrXIII-A	0,96	1,00		
STRAWB1	16SrXIII-B	0,92	0,97	1,00	
CbY1	16SrXIII-C	0,91	0,96	0,95	1,00

Através dos resultados revelados pela análise de RFLP *in silico*, baseada nos mapas de sítios putativos de restrição (Tabela 5), o fitoplasma detectado na amostra A-42 de morangueiro pode ser proposto como representante de um novo subgrupo de fitoplasma relacionado ao grupo 16SrXIII. Neste caso, o novo membro pode ser identificado como 16SrXIII-D.

Tabela 5 – Comparação entre os padrões de restrição, obtidos pela análise de géis virtuais de RFLP, do fitoplasma encontrado na amostra A-42 de morangueiro que apresentava filodia de frutos, com os demais representantes dos subgrupos do grupo 16SrXIII de fitoplasmas.*

Fitoplasmas 16SrXIII	subgrupos	Padrões de restrição para diversas enzimas									
		<i>AluI</i>	<i>BfaI</i>	<i>HhaI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HpaII</i>	<i>KpnI</i>	<i>MboI</i>	<i>MseI</i>	<i>RsaI</i>	<i>TaqI</i>
MPVP ¹	A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
STRAWB1P ²	B	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1
CbY1P ³	C	2	1	1	1	2	1	1	2	1	1
SFP-Br3P ⁴	D	3	1	1	1	1	2	1	1	3	1

*Os números em cada coluna representam os diferentes perfis obtidos por RFLP *in silico* com cada enzima de restrição. (1) *Mexican periwinkle virescence phytoplasma* – MPV. (2) *Strawberry multiplier disease phytoplasma*, isolado STRAWB1. (3) *Chinaberry yellow phytoplasma*, isolado CbY1. (4) *Strawberry fruit phyllody phytoplasma*, SFP-Br3.

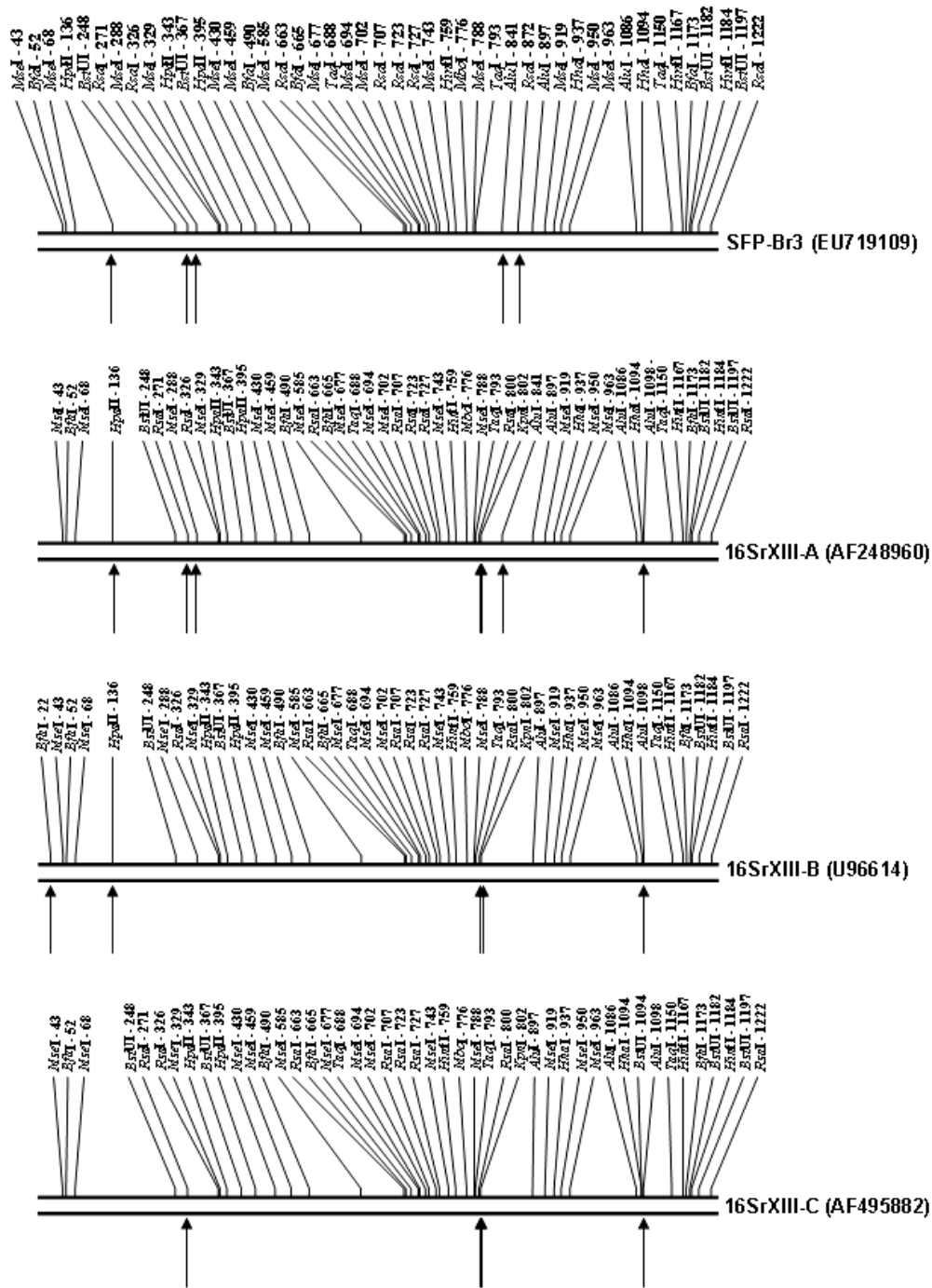


Figura 14 – Mapas de sítios putativos de restrição do 16S rDNA do fitoplasma associado à filodia de frutos do morangueiro (SFP-Br3) e dos fitoplasmas relacionados ao grupo 16SrXIII (16SrXIII-A: Mexican periwinkle virescence – MPV; 16SrXIII-B: Strawberry multiplier disease – STRAWB1; 16SrXIII-C: Chinaberry yellow - CbY1). Os números que acompanham as enzimas indicam a localização do sítio de restrição dentro da sequência e as setas indicam os diferentes sítios de restrição encontrados entre as sequências. A enzima *Bst*UI constitui-se no isoesquisômero da enzima *Bsh*12361. Os números de acesso no *GenBank* encontram-se entre parênteses

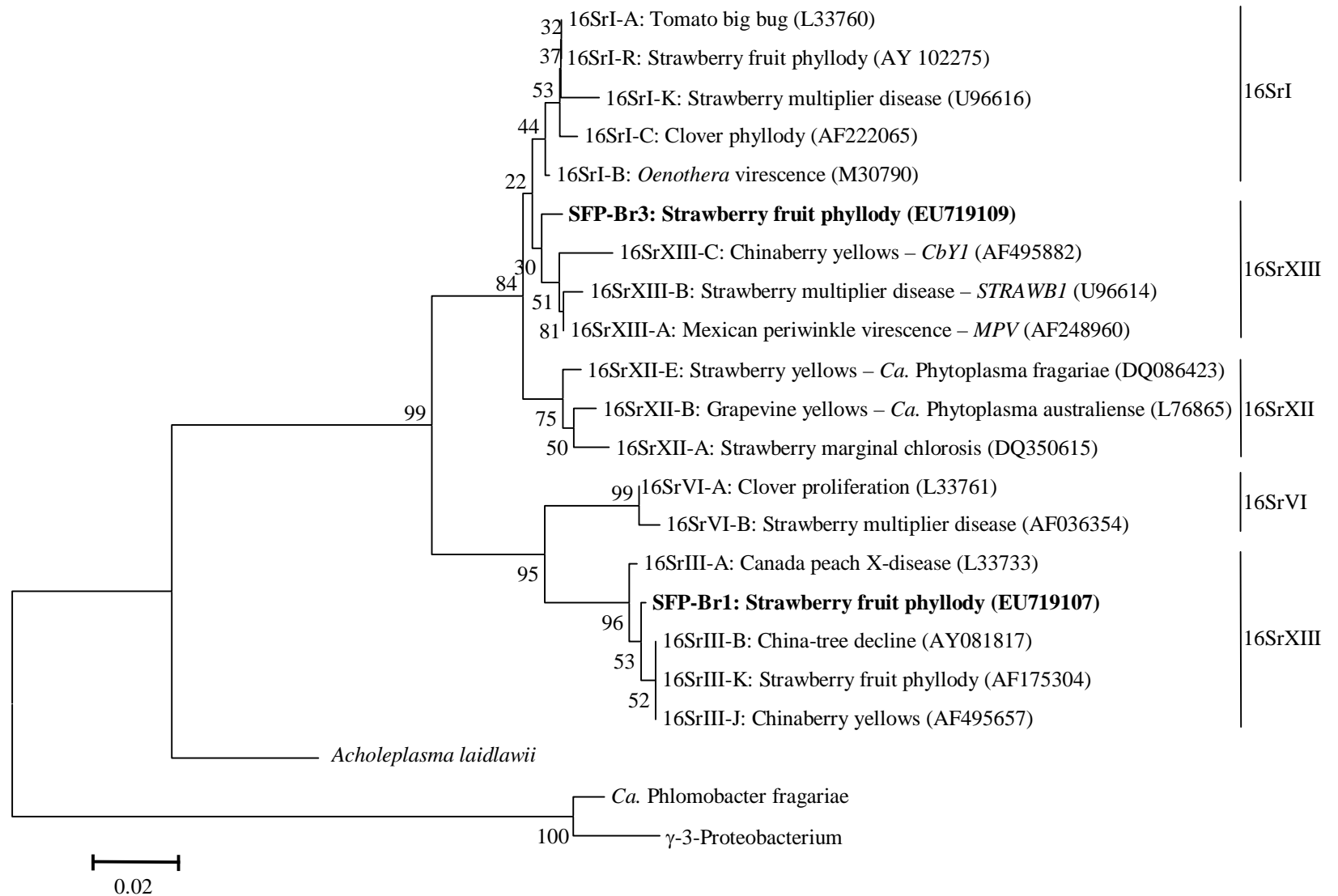


Figura 15 - Árvore filogenética, contruída pelo método *Neighbor-Joining*, de seqüências 16S rDNA de 19 fitoplasmas, 2 bactérias associadas com doenças em morangueiro e *Acholeplasma laidlawii*. Os números nos ramos são valores de confiança (*Bootstrap*). SFP-Br1 e SFP-Br3 representam os fitoplasmas detectados nas amostras de morangueiro, neste estudo

A filodia de frutos tem sido relatada como sendo causada por diferentes agentes de natureza abiótica ou biótica (ULLIO, 1997; JOMANTIENE et al., 2000). Em relação aos fitoplasmas como agentes de filodia, embora representantes de diversos grupos possam estar associados ao sintoma, mais frequentemente tem sido relatados representantes dos grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrXIII (JOMANTIENE et al., 1999b, 2001, 2002c; PASTORE et al., 2003) (Tabela 6). O fato de distintos fitoplasmas estarem associados ao sintoma de filodia não se constitui em fato excepcional, uma vez que sintomas similares podem ser induzidos por diferentes tipos de fitoplasmas, bem como diferentes tipos de sintomas podem ser causados por fitoplasmas intimamente relacionados (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). No Brasil, podem ser citado como exemplo infecção mista de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI e 16SrIII em plantas de primavera (SILVA; BEDENDO, 2007), repolho (AMARAL-MELLO, 2007) e videira (NERONI; BEDENDO; KUNUYUKI, 2006).

Tabela 6 – Doenças e anomalias incitadas por fitoplasmas relacionados aos grupos 16SrI, 16SrIII e 16XIII em plantas de morango

Doença	Fitoplasma	País de ocorrência	Referências
aster yellow	16SrI-A; 16SrI-B; 16SrI-C	Canadá; Estados Unidos	DIEKMANN; FRISON; PUTTER (1994); JOMANTIENE et al. (2002a)
pétala verde	16SrI-A; 16SrI-B; 16SrI-C; 16SrXIII-B	Canadá; Estados Unidos; República Tcheca	HONETSLEGROVÁ; VIBIO; BERTACCINI (1996); HARRISON et al. (1997); JOMANTIENE et al. (1998)
amarelos letais	16SrI-A	Austrália	STRETEN et al. (2005); WAITE et al. (2006)
doença multiplicadora	16SrI-K	Estados Unidos	JOMANTIENE et al. (1998b)
filodia	16SrI-A; 16SrI-B; 16SrI-C; 16SrI-K; 16SrI-R; 16SrIII-A; 16SrIII-K; 16SrXIII-B	Estados Unidos, Itália	JOMANTIENE et al. (1999b; 2001; 2002c); PASTORE et al. (2003)
anomalias gerais	16SrI-C; 16SrIII-B	Canadá; Estados Unidos; República Tcheca	JOMANTIENE et al. (1999b); PASTORE et al. (2002)

Em adição, é conhecido que, naturalmente, muitas espécies vegetais parecem ser infectadas apenas por um único fitoplasma, enquanto existem outras que são infectadas por vários fitoplasmas distintos (LEE; GUNDERSEN-RINDAL; BERTACCINI, 1998). Assim, a presença de vetores polífagos nos campos de cultivo, poderia estar influenciando diretamente o aparecimento de infecções mistas, bem como de novos hospedeiros vegetais de fitoplasmas.

Tabela 7 – Sequências consenso SFP-Br1 e SFP-Br3 selecionadas e depositadas no *GenBank* para os fitoplasmas detectados nas amostras A-29 e A-42 de morangueiro, respectivamente

>SFP-Br1 (EU719107)

TAAAGGCATCTTTACTTTTTTAAAAGACCTTCTTTGAAGGTATGCTTAAGGAGGGGCTTGCAGACACATT
 AGTTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCA
 CATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGG
 AAACCTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTACCTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTAAGGA
 AGAAAAAGAGTGAAAAAACTCCCTTGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGC
 AGCCCGAGTAATACATAAGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTT
 TAATAAGTCTATAGTTAATTTAGTGTCTTAACGCTGTTGTGCTATAGAAACTGTTTTACTAGAGTGAGT
 TAGAGGCAAGCGGAATTCATGTGTAGCGGTA AAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGT
 AAGCGGCTTGCTGGGACTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
 CAGGTAGTCCACGCCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCGGGTAAAACCGGTAAGTGAAGTTAACACAT
 TAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAA
 GCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATTTTCTTGCGA
 AGTTATAGAAATATAATGGAGGTTATCAGGAAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGT
 GAGATGTTAGGTTAAGTCCATAAACGAGCGCAACCCTTGTGCTTAATTGCCAGCATGTAATGATGGGG
 ACTTTAACGAGACTGCCAATGAAAAATTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCTTA
 TGATCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGTTGATACAAAGAGTAGCTGAAACGCAAGTTCTTAGCCAA
 TCTCACAAAATCAATCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTA
 ATCGCGAATCAGCATGTGCGGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCAA

>SFP-Br3 (EU719109)

CTGCTAAGACTGGATAGGAGATAAGAAGGCATCTTCTTATTTTTAAAAGACCTAGTAATAGGTATGCTT
 AAGGAAGGGCTTGCCTCACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCC
 GGGCTGAGAGGCTGAACGGCCACATTGGAAGTACTGAGACACGGTCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
 AGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTCCGTA
 CGTAAAGTTCTTTTATTAAGGAAGAAAAGATGGTGGAAAAACCATTATGACGGTACTTAATGAATAAG
 CCCCCGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACATAGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGG
 CGTAAAGGGTGCCTAAGCGGTTAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTTAACATTGTGATGCTATA
 AAAACTGTTGACTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGGAAATTCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATA
 TATGGAGGAACACCATGAGCGAAGGCGGCTTGTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGG
 GGAGCAACCAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTACTAGACGTTGGGTTAAA
 CCAGTGTGCAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGG
 AATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTCACC
 AGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAATACAGTGGAGGTTATCAGTTGTACAGGTGGTGCAT
 GGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTGTTAAT
 TGCCATCATTAAGTTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
 CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGA
 AGCGAAAGTTTTGGCAAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCAT
 GAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTGCGGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACA
 CCGCCCGTCAA

3.3 Conclusões

Por análise molecular, foi possível detectar e identificar distintos fitoplasmas nas plantas de morango que apresentavam filodia de frutos (16SrI, 16SrIII e 16SrXIII), inclusive um novo representante afiliado ao grupo 16SrXIII de fitoplasmas, aqui denominado 16SrXIII-D.

Referências

AHRENS, U.; SEEMÜLLER, E. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, n. 8, p. 828-832, 1992.

ALVAREZ, E.; MEJIA, J.F.; LOKE, J.B.; HERNANDEZ, L.; LLANO, G.A. Detecting the phytoplasm-frogskin disease association in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Colombia. **Phytopathology**, St. Paul, n. 93, supl., p. S4, 2003.

AMARAL MELLO APO; BEDENDO IP; CAMARGO, LEA. Sequence heterogeneity in the 16S rDNA of tomato big bud phytoplasma belonging to group 16SrIII. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, n. 4, p. 245-249, 2006.

AMARAL-MELLO, A.P.A. **Identificação molecular de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença**. 2007. 66p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ANDERSEN, M.T.; LONGMORE, J.; LIEFTING, L.W.; WOOD, G.A.; SUTHERLAND, P.W.; BECK, D.L.; FORSTER, R.L.S. Phormium yellow leaf phytoplasma is associated with strawberry lethal yellow disease in New Zealand. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, n. 6, p. 606-609, 1998.

ARNEODO, J.D.; MARINI, D.C.; GALDEANO, E.; MENEGUZZI, N.; BACCI JÚNIOR, M.; DOMECCO, C.; NOME, S.F.; CONCI, L.R. Diversity and geographical distribution of phytoplasmas infecting china-tree in Argentina. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, n. 2, p. 70-75, 2007.

BARROS, T.S.L.; KITAJIMA, E.W.; RESENDE, R.O. Diversidade de isolados brasileiros de fitoplasmas através da análise do 16S rDNA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n.4, p. 459-465, 1998.

BEDENDO, I.P. Micoplasmas e espiroplasmas. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 9, v.1 princípios e conceitos. p. 202-210.

BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Detection and identification of the maize bushy stunt phytoplasma in corn plants in Brazil using PCR and RFLP. **International Journal of Pest Management**. London, v.46, n. 1, p.73-76, 2000.

BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; PASTORE, M.; RECUPERO, S.; GUERRINI, S.; GRIMALDI, D. Nested-PCR assays for detection of phytoplasmas in strawberry. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 439, p. 787-790, 1997.

BIANCHINI, L.; BEDENDO, I.P. Presença de um fitoplasma do grupo I, evidenciado por PCR, em plantas de erigeron (*Erigeron bonariensis* L.) com superbrotaamento. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, supl., p. 348, 2000.

BRIOSO, P.S.T.; MONTANO, H.G.; FIGUEIREDO, D.V.; POLTRONIERI, L.S.; FURLAN JÚNIOR, J. Amarelecimento fatal do dendezeiro: sequenciamento parcial do fitoplasma associado. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, supl., p. 50, 2006.

CHATCHAWANKANPHANICH, O.; KLADPAN, S.; PIPATTHANVONG, N.; KITTIPAKORN, K.; SRITHONGCHAI, W. Occurrence of non-infectious phyllody disease of strawberry in Thailand. **The Kasetsart Journal**, Bangkok, v. 34, n. 4, p. 458-463, 2000.

CHIYKOWSKI, L.N.; COLPITTS, S.R.; COULOMBE, L.J.; DELBRIDGE, R.W.; GOURLEY, C.O.; LAWRENCE, C.H.; MURRAY, R.A.; SANTERRE, J.; THOMPSON, L.S. Strawberry green petal disease in Quebec and the maritime provinces, 1971-72. **Canadian Plant Disease Survey**, Ontario, v. 53, n. 2, p. 63-66, 1973.

CHIYKOWSKI, L.N.; CRAIG, D.L. Reaction of strawberry cultivars to clover phyllody (green petal) agent transmitted by *Aphrodes bicinta*. **Canadian Plant Disease Survey**, Ontario, v. 55, n. 2, p. 66-68, 1975.

CONVERSE, R.H.; ADAMS, A.N.; BARBARA, D.J.; CLARK, M.F.; CASPER, R.; HEPP, R.F.; MARTIN, R.R.; MORRIS, T.J.; SPIEGEL, S.; YOSHIKAWA, N. Laboratory detection of viruses and mycoplasma-like organisms in strawberry. **Plant Disease**, St. Paul, v. 72, n. 9, p. 744-749, 1988.

CUTCLIFFE, J.A.; THOMPSON, L.S. Incidence of green petal disease in strawberry in Prince Edward Island. **Canadian Plant Disease Survey**, Ontario, v. 57, n. 1, p. 1-2, 1977.

DAVIS, R.E. Fitoplasmas: Fitopatógenos procarióticos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodes. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: RAPP, 1995. v. 3, p. 1-27.

DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Revised subgroup classification of group 16SrV phytoplasmas and placement of flavescence dorée-associated phytoplasmas in two distinct subgroups. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 7, p. 790-797, 2001.

DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.-M.; HABIL, N. '*Candidatus* Phytoplasma australiense,' a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 47, n. 2, p. 262-269, 1997.

DAVIS, R.E.; JOMANTIENE, R.; DALLY, E.L.; WOLF, T.K. Phytoplasmas associated with grapevine yellows in Virginia belong to group 16SrI, subgroup A (tomato big bud phytoplasma subgroup), and group 16SrIII, new subgroup I. **Vitis**, Siebeldingenn, n. 37, p. 131-137, 1998.

DIAS, M.S.C.; COSTA, H.; CANUTO, R.S. Manejo de doenças do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, p. 64-77, 2007.

DIAS, M.S.C.; SILVA, J.J.C.; PACHECO, D.D.; RIOS, S.A.; LANZA, F.E. Produção de morangos em regiões não tradicionais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, p. 24-33, 2007.

DIEKMANN, M.; FRISON, E. A.; PUTTER, T. (Ed.). **FAO/IPGRI technical guidelines for the safe movement of small fruit germoplasm**. Roma: FAO/ International Plant Genetic Resources Institute, 1994. 125 p.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2.ed. Viçosa: UFV, 2003. 412 p.

FILHO, J.D. Cultivares de morango. In: CARVALHO, S.P. (Coord.) **Boletim do morango**: cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico. Belo Horizonte: FAEMG, 2006. p. 15-22.

FILHO, J.D.; ANTUNES, L.E.C.; PÁDUA, J.G. Cultivares. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, p. 20-23, 2007.

FOISSAC, X.; DANET, J.L.; ZREIK, L.; SALAR, P.; VERDIN, E.; NOURRISSEAU, J.G.; GARNIER, M. "*Candidatus Phlomobacter fragariae*" is the prevalent agent of marginal chlorosis of strawberry in french production fields and is transmitted by the planthopper *Cixius wagneri* (China). **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 656, p. 93-97, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. Disponível em:
<<http://faostat.fao.org>> Acesso em: 7 abr. 2008.

FRÁNOVA, J.; PETRZIK, K.; PAPERSTEIN, F.; KUCEROVÁ, J.; NAVRÁTIL, M.; VÁLOVA, P.; NEBESÁROVÁ, J. JAKESOVÁ, H. Experiences with phytoplasma detection and identification by different methods. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 247-248, 2007.

GALDEANO, E.; TORRES, L.E.; MENEGUZZI, N.; GUZMÁN, F.; GOMEZ, G.G.; DOCAMPO, D.M.; CONCI, L.R. Molecular characterization of 16S ribosomal DNA and phylogenetic analysis of two X-disease group phytoplasma affecting china-tree (*Melia azedarach* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) in Argentina. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 3, p. 174-181, 2004.

GREBER, R.S.; GOWANLOCK, D.H. Rickettsia-like and Mycoplasma-like Organisms associated with two yellows-type diseases of strawberries in Queensland. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 30, p. 1101-1109, 1979.

GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.-M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. **Phytopathology Mediterranea**, Bologna, v. 35, n. 2, p. 144-151, 1996.

GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.-M.; REHNER, S.A.; DAVIS, R.E.; KINGSBURY, D.T. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, n. 17, p. 5244-5254, 1994.

GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.-M.; SCHAFF, D.A.; HARRISON, N.A.; CHANG, C.J.; DAVIS, R.E.; KINGSBURY, D.T. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (Aster Yellows and related phytoplasmas) and III (X-Disease and related phytoplasmas). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 46, n. 1, p. 64-75, 1996.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 166, p. 557-580, 1983.

HARRISON, N.A.; BOA, E.; CARPIO, M.L. Characterization of phytoplasmas detected in chinaberry trees with symptoms of leaf yellowing and decline in Bolivia. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 147-157, 2003.

HARRISON, N.A.; LEGARD, D.E.; DiBONITO, R.; RICHARDSON, P.A. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 2, p. 230, 1997.

HONETSLEGROVÁ, J.F.; VIBIO, M.; BERTACCINI, A. Electron microscopy and molecular identification of phytoplasmas associated with strawberry green petals in the Czech Republic. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 102, n. 9, p. 831-835, 1996.

JOMANTIENE, R.; DALLY, E.L.; DAVIS, R.E.; MAAS, J.L. Phytoplasmas in strawberry with fruit phyllody. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 567, p. 635-638, 2002a.

JOMANTIENE, R.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; MAAS, J.L. The distinctive morphology of '*Fragaria multicipita*' is due to phytoplasma. **HortScience**, Alexandria, v. 33, n. 6, p. 1069-1072, 1998a.

JOMANTIENE, R.; DAVIS, R.E.; MAAS, J.L.; DALLY, E.L. Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene operon sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 48, n. 1, p. 269-277, 1998b.

JOMANTIENE, R.; DAVIS, R.E.; VALIUNAS, D.; ALMINAITE, A. New group 16SrIII phytoplasmas lineages in Lithuania exhibit rRNA interoperon sequence heterogeneity. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht ,v. 108, n. 6, p. 507-517, 2002b.

JOMANTIENE, R.; MAAS, J.L.; DALLY, E.L.; DAVIS, R.E. First report of clover proliferation phytoplasma in strawberry. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 10, p. 967, 1999a.

JOMANTIENE, R.; MAAS, J.L.; DALLY, E.L.; DAVIS, R.E. First report of clover yellow edge and STRAWB2 phytoplasmas in strawberry in Maryland. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 11, p. 1072, 1999b.

JOMANTIENE, R.; MAAS, J.L.; DALLY, E.L.; DAVIS, R.E. Strawberry fruit phyllody caused by phytoplasmas. **HortScience**, Alexandria, v. 35, n. 3, p. 391, 2000.

JOMANTIENE, R.; MAAS, J.L.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Molecular Identification and classification of a phytoplasma associated with phyllody of strawberry fruit in Maryland. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 3, p. 335, 2001.

JOMANTIENE, R.; MAAS, J.L.; TAKEDA, F.; DAVIS, R.E. Molecular Identification and classification of strawberry phyllod fruit phytoplasma in group 16SrI, new subgroup R. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 8, p. 920, 2002c.

KITAJIMA, E.W. **Curso Introductório de microscopia eletrônica de transmissão**. Piracicaba: Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia eletrônica aplicada à pesquisa agropecuária – NAP/MEPA, 1998. 43p.

KITAJIMA, E.W. Enfermidades de plantas associadas a organismo do tipo micoplasma. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: RAPP, 1994. v. 2, p. 153-174.

LEE, I.-M.; DAVIS, R.E.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Phytoplasma: phytopathogenic Mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 221-255, 2000.

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**, St. Paul, v. 84, n. 6, p. 559-566, 1994.

LEE, I.-M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; BERTACCINI, A. Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 12, p. 1359-1366, 1998.

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 of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 48, n. 4, p. 1153-1169, 1998.

LEE, I.-M.; KLOPMEYER, M.; BARTOSZYK, I.M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; CHOU, T.-S.; THOMSON, K.L.; EISENREICH, R. Phytoplasma induced free-branching in comercial poisettia cultivars. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, p. 178-182, 1997.

LIETEN, P. Effect of metosulam and glyphosate on flower abnormalities of strawberry. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 708, p. 401-404, 2006.

LIM, P.O.; SEARS, B.B. 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, n. 11, p. 5901-5906, 1989.

MAAS, J.L. **Compendium of strawberry diseases**. St. Paul: APS, 1984. 138 p.

MESSING, J. New M13 vectors for cloning. **Methods Enzymology**, New York, v. 101, p. 20-78, 1983.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T.; PIMENTEL. List of phytoplasma hosts in Brazil. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 129-130, 2007.

NERONI, R.C.; BEDENDO, I.P.; KUNIYUKI, H. Identificação molecular de fitoplasmas associados ao amarelo da videira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, supl., p. 243, 2006.

NEW ENGLAND BIOLABS TECHNICAL LITERATURE. Disponível em: <http://www.biochem.northwestern.edu/holmgren/Glossary/Definitions/Def-S/star_activity.html>. Acesso em: 26 abr. 2008.

NOURRISSEAU, J. G.; LANSAC, M.; GARNIER, M. Marginal chlorosis, a new disease of strawberries associated with a Bacterium-like organism. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, n. 10, p. 1055-1059, 1993.

NOURRISSEAU, J.G.; LANSAC, M.; GARNIER, M. Marginal chlorosis, a new disease of strawberries associated with a Bacteriumlike Organism. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, n. 10, p. 1055-1059, 1993.

PADOVAN, A.; GIBB, K.; PERSLEY, D. Association of ‘*Candidatus Phytoplasma australiense*’ with green petal and lethal yellows diseases in strawberry. **Plant Pathology**, Collingwood, v. 49, n. 3, p. 362-369, 2000.

PADOVAN, A.; GIBB, K.; PERSLEY, D. Phytoplasmas associated with diseases in strawberry. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 27, n. 4, p. 280, 1998.

PASTORE, M.; CUBICCIOTTI, G.; BERTACCINI, A.; GRAZIANO, V. Phytoplasma infection in strawberry cultivation in southern Italy. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 567, p. 639-642, 2002.

PASTORE, M.; PALTRINIERI, S.; GRAZIANO, V.; PRIORE, R.; NUGNES, P.; BERTACCINI, A. Molecular detection of stolbur phytoplasmas in *Trialeurodes vaporariorum* (Westw.) collected in strawberry fields with phyllody disease. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 83, n. 4, p. 314, 2003.

PERES, N.A.; DUVAL, J.R.; SEIJO, T.E. Determination of the cause of phylloid strawberry fruit in annual strawberry production in central Florida. **Proceedings of the annual meeting of the Florida State Horticultural Society**, Goldenrod, v. 118, p.115-118, 2005.

POSNETTE, A.F. Green petal – a new virus disease of strawberries. **Plant Pathology**, Oxford, v.2, n. 1, p. 17-18, 1953.

RIBEIRO, L.F.C. **Fitoplasma do superbrotamento do maracujazeiro: identificação molecular, análise filogenética e prova de patogenicidade**. 2008. 58p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

RIBEIRO, L.F.C.; AMARAL-MELLO, A.P.; BEDENDO, I.P.; KITAJIMA, E.W.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Ocorrência de um fitoplasma do grupo 16SrIII associado ao enfezamento em melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.) no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 3, p. 391-393, 2004.

RIBEIRO, L.F.C.; BEDENDO, I.P.; SANHUEZA, R.M.V. Evidência molecular da ocorrência de um fitoplasma associado ao lenho mole da macieira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n.1, p. 30-33, 2007.

RIOS, S.A. Melhoramento genético do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, p. 14-18, 2007.

SALGADO, S.M.L. Nematóides em morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, p. 78-83, 2007.

SANTOS, A. M.; MEDEIROS, A. R. M. (Ed.). **Morango**: produção. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003. 81p (Frutas do Brasil 40).

SIDDIQUE, A.B.M.; GUTHRIE, J.N.; WALSH, K.B.; WHITE, D.T.; SCOTT, P.T. Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with australian papaya dieback. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, n. 10, p. 1112-1120, 1998.

SILVA, A.F.; DIAS, M.S.C.; MARO, L.A.C. Botânica e fisiologia do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, p. 7-13, 2007.

SILVA, E.G. **Identificação molecular de fitoplasmas associados à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar e ao superbrotamento da primavera (*Bougainvillea spectabilis*)**. 2008. 97p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SILVA, E.G.; BEDENDO, I.P. Infecção mista de fitoplasmas em plantas de primavera (*Bougainvillea spectabilis*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, supl., p. 215, 2007.

SITTOLIN, I.M.; PAVAN, M.A.; MONTEIRO, S.B. Ocorrência de fitoplasma em morangueiro cultivar Dover, no Estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 24, n. 1, p. 60, 1998.

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, n. 8, p. 2988–2993, 1996.

STRETEN, C.; WAITE, G.K.; HERRINGTON, M.E.; HUTTON, D.G.; PERSLEY, D.M.; GIBB, K.S. Rickettsia-like-organisms and phytoplasmas associated with diseases in Australian strawberries. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 34, n. 2, p.157-164, 2005.

TANAKA, M.; NAO, M.; USUGI, T. Occurrence of strawberry marginal chlorosis caused by “*Candidatus Phlomobacter fragariae*” in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 72, n. 6, p. 374-377, 2006.

TANAKA, M.A.S.; BETTI, J.A.; KIMATI, H. Doenças do morangueiro. 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. cap. 56, v.2 : doenças das plantas cultivadas. p. 489-499.

TERLIZZI, A.; BABINI, R.; CREDI, R. First report of stolbur phytoplasma (16SrXII-A) on strawberry in northern Italy. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, n. 6, p. 831, 2006.

TERLIZZI, F.; BABINI, A.R.; LANZONI, C.; PISI, A.; CREDI, R. First Report of a γ 3-proteobacterium associated with diseased strawberries in Italy. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, n. 12, p. 1688, 2007.

ULLIO, L. Strawberry phyllody on cold-stored (frigo) plants in the sydney region, Australia. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 439, p. 781-786, 1997.

VALIUNAS, D.; STANIULIS, J.; DAVIS, R.E. ‘*Candidatus* Phytoplasma fragariae’, a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry, *Fragaria x ananassa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 56, n. 1, p. 277-281, 2006.

WAITE, G.; HUTTON, D.; STRETEN, C.; HERRINGTON, M.; PERSLEY, D.; GIBB, K. Strawberry lethal yellows. **Strawberry R&D: update 2006**. Disponível em: <http://www.qldstrawberries.com.au/pdf/strawberry_update_2006_part2.pdf>. Acesso em: 04 abr. 2008.

WEI, W.; DAVIS, R.E.; LEE, I.-M.; ZHAO, Y. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 57, n. 8, p. 1855-1867, 2007.

WEINTRAUB, P.G.; BEANLAND, LeANN. Insect vectors of phytoplasmas. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto v. 51, p. 91-111, 2006.

WEISBURG, W.G.; TULLY, J.G.; ROSE, D.L.; PETZEL, J.P.; OYAIZU, H.; YANG, D.; MANDELCO, L.; SECHREST, T.G.; LAWRENCE, J.; VAN ETTEN, J.; MANILOFF, J.; WOESE, C.R. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas basis for their classification. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, n. 12, p. 6455-6467, 1989.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H. Manejo integrado de doenças. In: CARVALHO, S.P. (Coord.) **Boletim do morango: cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico**. Belo Horizonte: FAEMG, 2006, p. 55-80.

ZHAO, Y.; LIU, Q.; DAVIS, R. Transgene expression in strawberries driven by a heterologous phloem-specific promoter. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 23, n. 4, p. 224-230, 2004.

ZREIK, L.; DANET, J.L.; FOISSAC, X.; GANDAR, J.; NOURRISSEAU, J.G.; VERDIN, E.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. Marginal chlorosis of strawberry plants can be induced by two different phloem-restricted bacteria: the proteobacterium '*Candidatus Phlomobacter fragariae*' and the stolbur phytoplasma. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 551, p. 101-106, 2001.

Keywords

1. Summer squash
2. Phylogeny
3. Phytoplasmas – molecular assays
4. Strawberry
5. Witche's broom

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)