

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

**Identificação molecular de um fitoplasma associado à malformação das folhas
das ornamentais *Celosia argentea* L. e *Celosia spicata* L.**

Bárbara Eckstein

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.

Bárbara Eckstein
Engenheiro Agrônomo

**Identificação molecular de um fitoplasma associado à malformação das folhas das
ornamentais *Celosia argentea* L. e *Celosia spicata* L.**

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**

Eckstein, Bárbara

Identificação molecular de um fitoplasma associado à malformação das folhas das ornamentais *Celosia argentea* L. e *Celosia spicata* L. / Bárbara Eckstein . - - Piracicaba, 2008.

50 p: il.

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

1. Filogenia 2. Fitoplasmas 3. Genética molecular 4. Plantas ornamentais I. Título

CDD

635.933913

E19i

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

Aos meus pais, Adalberto e Marlene, por todo amor e dedicação que tem por mim.

DEDICO

*Ao meu namorado Júlio, pelo amor e apoio constante,
À minha querida irmã Angélica, meu cunhado Ademar e minha afilhada Maria Eduarda,
À minha madrinha Eloísa e meus avós,*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao meu orientador Prof. Ivan Paulo Bedendo, pela confiança, orientação e conselhos, os quais tem sido valiosos para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores Vanda Pietrowski e José Renato Stangarlin, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, os quais são em parte responsáveis pelo meu ingresso no mestrado. Obrigada pelo incentivo constante, conselhos preciosos, apoio em todos os momentos e amizade.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Ricardo Harakawa do Instituto Biológico de São Paulo por ter feito a etapa de sequenciamento das amostras.

Aos amigos do laboratório de Procariotos Fitopatogênicos, Ana Paula, Daniela, Isolda, Luciano, Maria Cristina, Raquel, Renata Brito, Renata Lanza, Renata Bocci, e especialmente à Eliane, pelos bons momentos, amizade e por me ensinarem as técnicas utilizadas no laboratório.

Aos meus amigos, Andréa, Adriano, Deniele, Idiana, Luciana, Patrícia, Reginaldo, Stéfany, Tatiana Werle e Tatiana Martinazzo por todo apoio e amizade, mesmo longe continuam muito perto de mim.

Aos colegas do Departamento de Fitopatologia, particularmente à Ana Carolina, pelo bom convívio e amizade.

Aos funcionários do Departamento, especialmente ao José Edivaldo Buriola, pela amizade, bom convívio e disposição para me auxiliar em todos os momentos que precisei.

A toda a minha grande família Debo e Eckstein, por todo carinho, são muito importantes para mim.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 DESENVOLVIMENTO	13
2.1 Revisão bibliográfica	13
2.1.1 Fitoplasmas	13
2.1.2 Detecção e classificação de fitoplasmas	14
2.1.3 Plantas do gênero <i>Celosia</i>	16
2.1.4 Doenças das plantas do gênero <i>Celosia</i>	17
2.2 Material e métodos	18
2.2.1 Amostras de <i>Celosia</i>	18
2.2.2 Extração do DNA	19
2.2.3 Detecção dos fitoplasmas pela técnica de PCR	20
2.2.4 Identificação de fitoplasmas pela técnica de PCR	21
2.2.5 Eletroforese em gel de agarose	22
2.2.6 Identificação de fitoplasmas através da técnica de RFLP	22
2.2.7 Sequenciamento da região 16srDNA do fitoplasma	22
2.2.8 Clonagem	22
2.2.9 Análise das seqüências	24
2.2.10 Teste de transmissão do fitoplasma	26
2.3 Resultados e discussão	27

2.3.1 Detecção de fitoplasmas nas amostras.....	27
2.3.2 Identificação do fitoplasma pela técnica de PCR e análise de RFLP	30
2.3.3 Sequenciamento e análise putativa de sítios de restrição.....	35
2.3.4 Análise filogenética	37
2.3.5 Teste de transmissão por cuscuta em casa de vegetação.....	39
3 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS	42
APÊNDICE	49

RESUMO

Identificação molecular de um fitoplasma associado à malformação das folhas das ornamentais *Celosia argentea* L. e *Celosia spicata* L.

Plantas de crista-de-galo (*Celosia argentea*) e pluma-de-flamingo (*Celosia spicata*) são ornamentais de flores exuberantes muito apreciadas. Recentemente, em logradouros públicos de Piracicaba (SP) foi observado que plantas de ambas as espécies exibiam sintomas típicos de doenças causadas por fitoplasmas, como redução foliar, superbrotamento de ramos laterais, enfezamento da parte aérea e filodia. Com o objetivo de demonstrar que tais organismos estavam associados à doença, o presente trabalho foi conduzido. Vinte e quatro amostras de folhas e ramos obtidas de plantas sintomáticas foram submetidas à extração do DNA total, o qual foi empregado para a detecção de fitoplasmas, conduzida por duplo PCR com os iniciadores P1/P7 ou P1/Tint e 16F2n/16R2. Plantas assintomáticas de celosia foram usadas como controle negativo, enquanto plantas de vinca experimentalmente infectadas por fitoplasmas serviram como controles positivos. Fitoplasmas foram detectados em 50% das plantas sintomáticas analisadas, através da amplificação de um fragmento genômico de 1,2 Kb, visualizado na forma de banda, em gel de agarose. Amplificações foram observadas para o controle positivo, porém nenhuma banda foi visualizada quando DNA de plantas assintomáticas foi usado na reação de PCR. O emprego de iniciadores específicos revelou que todos os fitoplasmas encontrados eram pertencentes ao grupo 16SrIII. Análises de RFLP, usando as enzimas *HinfI*, *HpaII*, *TaqI*, *RsaI*, *KpnI*, *HaeIII*, *MseI*, *HhaI* e *Bsh 1236I* e análises filogenéticas, baseadas na seqüência nucleotídica do 16S rDNA, confirmaram que o fitoplasma encontrados era afiliado ao grupo 16SrIII, subgrupo J. A transmissão experimental, via cuscuteira, do fitoplasma presente em planta de crista-de-galo para planta de vinca evidenciou a natureza infecciosa da doença e que seu agente é, provavelmente, um fitoplasma.

Palavras-chave: Fitoplasma; Diagnose; Celosia

ABSTRACT

Molecular identification of a phytoplasma associated with malformation of the leaves of *Celosia argentea* L. and *Celosia spicata* L.

Plants belonging to the species *Celosia argentea* and *Celosia spicata* are appreciated as ornamentals due to their colorful flowers. Recently, plants of both species exhibiting typical symptoms induced by phytoplasmas, characterized by deformed leaves, proliferation of axillary shoots, stunt and phyllody were found in public places in Piracicaba, SP, Brazil. The present study was done to demonstrate that phytoplasmas were associated with these diseased plants. Twenty four samples composed by leaves and young shoots were obtained from symptomatic plants. Total DNA was extracted and used as template in nested PCR primed by P1/P7 or P1/Tint and 16F2n/16R2. Total DNA extracted from asymptomatic plants of celosia was used as negative control and plants of periwinkle experimentally infected with phytoplasmas were used as positive control. Phytoplasmas were detected in 50% of the symptomatic plants through the amplification of a genomic fragment of 1.2kb visualized as band in agarose gel. Amplification were also obtained for the positive control, but no band was visualized when DNA from asymptomatic plants was used in the PCR reactions. Nested PCR performed with specific primers pair revealed that the phytoplasmas found in all samples belonged to group 16SrIII. RFLP analyses conducted with the restriction enzymes *Hinf*I, *Hpa*II, *Taq*I, *Rsa*I, *Kpn*I, *Hae*III, *Mse*I, *Hha*I and *Bsh* 1236I, plus phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequences confirmed that the phytoplasma detected in diseased plants was affiliated to group 16SrIII, subgroup J. Positive experimental transmission of the phytoplasma from celosia to periwinkle, using *Cuscuta subinclusa*, indicated that the disease is infectious and that phytoplasma is, probably, the causal agent.

Keywords: Phytoplasma; Diagnosis; Celosia

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Plantas ornamentais do gênero *Celosia* sp. A = pluma-de-flamingo (*Celosia spicata*); B = crista plumosa (*Celosia argentea* do grupo flume); C = crista-de-galo (*Celosia argentea* do grupo cristata)17
- Figura 2 - Colonização por *Cuscuta* sp. de uma planta de crista-de-galo infectada por fitoplasmas e de plantas sadias de vinca e crista-de-galo.....26
- Figura 3 - Plantas de pluma-de-flamingo com sintomas de redução e deformação foliar e superbrotamento.....27
- Figura 4 - Plantas de crista-de-galo com sintomas de redução e deformação foliar e superbrotamento.....28
- Figura 5 – Plantas de crista-de-galo com sintomas de filodia, típicos de doenças causadas por fitoplasmas.....28
- Figura 6 - Amplificação do 16S rDNA do fitoplasma encontrado nas amostras sintomáticas de celosia pela técnica de duplo PCR com os iniciadores P1/P7 ou P1/Tint e R16F2n/16R2.....29
- Figura 7 - Teste da presença de inibidores da reação de PCR em plantas de crista-de-galo30
- Figura 8 – Amplificação do 16SrDNA do fitoplasma encontrado nas amostras sintomáticas de *Celosia* sp. pela técnica de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint ou P1/P7 e R16(III)F2/R1.....31
- Figura 9 – Análise de RFLP do gene 16SrDNA de fitoplasmas do grupo 16SrIII detectados em plantas de celosia, utilizando-se as enzimas *Hinf*III, *Hpa*II e *Taq*I.....33

- Figura 10 - Análise de RFLP do gene 16SrDNA de fitoplasmas do grupo 16SrIII detectados em plantas de celosia, utilizando-se as enzimas *HaeIII*, *MseI*, *RsaI* e *KpnI*.....33
- Figura 11 - Análise de RFLP do gene 16SrDNA de fitoplasmas do grupo 16SrIII detectados em plantas de celosia, utilizando-se as enzimas *HhaI* e *Bsh 1236I*34
- Figura 12 – Análise putativa dos sítios de restrição do 16S rDNA do fitoplasma associado à malformação das folhas de celosia com as mesmas enzimas utilizadas para a análise de RFLP.....36
- Figura 13 - Perfil gerado pela análise putativa de sítios de restrição com as mesmas enzimas utilizadas para a análise enzimática de RFLP.....37
- Figura 14 – Árvore filogenética construída com representantes de 16 diferentes grupos de fitoplasmas, 11 subgrupos representantes do grupo 16SrIII, o procarioto *Acholeplasma laidlawii*, e o fitoplasma associado à malformação das folhas da celosia (CelLM Br1).....38
- Figura 15 - Análise de RFLP do 16S rDNA de fitoplasmas do grupo 16SrIII detectados em plantas de crista-de-galo, cuscuta e vinca.....39
- Figura 16 – Sintomas de enfezamento da planta de crista-de-galo submetida ao teste de transmissão por cuscuta.....40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos locais de coleta e das espécies de plantas do gênero <i>Celosia</i> sp.....	19
Tabela 2 - Representantes dos 16 grupos e diversos subgrupos de fitoplasmas do grupo 16SrIII utilizados para a construção da árvore filogenética.....	25
Tabela 3 - Relação das amostras de plantas do gênero <i>Celosia</i> sp. nas quais o fitoplasma foi detectado.....	29
Tabela 4 - Comparação entre os padrões de restrição obtidos por RFLP, do fitoplasma detectado em plantas do gênero <i>celosia</i> (CG3, CG4, CG6 e CG7) com outros fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII.....	34

1 INTRODUÇÃO

As plantas ornamentais conhecidas por crista-de-galo (*Celosia argentea* L.) e pluma-de-flamingo (*Celosia spicata* L.) são muito apreciadas pela exuberância de suas flores de coloração atraente. Embora possam ser vistas crescendo voluntariamente em todas as partes do mundo, o provável centro de origem das plantas do gênero *Celosia* é a África e a Ásia. No continente africano, estas espécies são utilizadas, principalmente, como parte da dieta alimentar e como plantas medicinais pela população mais carente.

Em diversas cidades brasileiras estas ornamentais são encontradas nas ruas e jardins, sendo muitas vezes escolhidas por não exigirem muitos cuidados, além de serem bastante resistentes ao ataque de pragas e doenças. No entanto, apesar de resistentes, podem ser atacadas por alguns patógenos, tais como nematóides, fungos, vírus e bactérias.

Recentemente, nas ruas da cidade de Piracicaba (SP), foi observado que plantas de ambas as espécies apresentavam alterações que sugeriam infecção por algum agente fitopatogênico. Os sintomas exibidos pelas plantas de pluma-de-flamingo incluíam redução e deformação foliar acentuada, superbrotamento de ramos laterais e enfezamento da planta. Enquanto que nas plantas de crista-de-galo, além dos sintomas citados, foi observada a ocorrência de filodia. Como estes sintomas são tipicamente associados à presença de fitoplasmas, foi levantada a hipótese de que estes agentes estariam envolvidos com a doença, a qual foi denominada de deformação foliar da celosia.

Desta forma, visando esclarecer a etiologia da doença, os objetivos do presente trabalho foram: detectar a presença de fitoplasmas nos tecidos das plantas sintomáticas; identificá-los molecularmente e analisá-los filogeneticamente; e demonstrar a sua patogenicidade.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Fitoplasmas

Fitoplasmas são procariotos fitopatogênicos, desprovidos de parede celular, pleomórficos, que vivem e multiplicam-se em vasos de floema e na hemolinfa de insetos da ordem Hemiptera (BEDENDO, 1995; BERTACCINI, 2007). Para serem disseminados na natureza os fitoplasmas dependem, na maioria dos casos, de insetos vetores (HOGENHOUT et al., 2008).

A primeira doença causada por fitoplasmas foi relatada em 1902, identificada como um amarelecimento na planta ornamental “China aster” (*Callistephus chinensis* Nees), popularmente conhecida no Brasil como rainha margarida. Na época, os sintomas da doença, denominada de “Aster yellow”, foram descritos por Smith, o qual a definiu como uma das mais obscuras e peculiares doenças (HEWITT, 1987), por não se conhecer a sua etiologia e pelos sintomas serem muito típicos. O agente desta doença não foi detectado pelos métodos utilizados na época, devido ao seu tamanho e impossibilidade de cultivá-lo *in vitro*. Na verdade, muitos anos se passaram até que o agente causal fosse conhecido, pois a descoberta dos fitoplasmas somente ocorreu em 1967. O reconhecimento dos fitoplasmas como agentes de doença foi feito a partir da associação destes procariotos com plantas portadoras de sintomas do tipo amarelo, exibidos por plantas de rainha margarida, batata, quiri e amora. Pesquisadores japoneses detectaram, por microscopia eletrônica, a presença de fitoplasmas nos vasos de floema de plantas doentes, mas não nos tecidos de plantas sadias e, naquela época, denominaram estes microrganismos de MLO (“Mycoplasma Like Organism”), pela sua semelhança com os micoplasmas encontrados em animais. Por não possuírem parede celular, estes procariotos foram incluídos na classe Mollicutes (DOI et al., 1967).

Os fitoplasmas induzem alterações no desenvolvimento da planta hospedeira, os quais se expressam na forma de diversos tipos de sintomas. As anormalidades típicas das plantas infectadas podem se apresentar como: superbrotamento de ramos em desenvolvimento, originando a vassoura de bruxa; filodia (aparecimento de folhas em lugar de flores); virescência (coloração verde de partes florais normalmente não clorofiladas); avermelhamento de folhas e hastes; amarelecimento generalizado; declínio e enfezamento de plantas; e necrose de floema (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000; HOGENHOUT et al., 2008).

Atualmente os fitoplasmas estão associados a centenas de doenças de plantas, incluindo muitas plantas de interesse econômico, como espécies olerícolas, frutíferas, ornamentais e florestais (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000), causando doenças que muito frequentemente têm importância quarentenária (BERTACCINI, 2007). No Brasil, diversas doenças associadas aos fitoplasmas têm sido relatadas, entre elas o enfezamento do milho (BEDENDO; DAVIS; DALLY, 2000), o superbrotamento do maracujazeiro (RIBEIRO; BEDENDO, 2007) e do chuchuzeiro (MONTANO et al., 2000), o cálice gigante do tomateiro (AMARAL-MELLO et al., 2006), o enfezamento do tomateiro e da berinjela (AMARAL-MELLO et al., 2007), o lenho mole da macieira (RIBEIRO; BEDENDO; SANHUEZA, 2007), o amarelo da videira (NERONI; BEDENDO; KUNIYUKI, 2006), a síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (SILVA, 2008) e, recentemente, o enfezamento de plantas do gênero *Brassicae*, como o repolho (AMARAL-MELLO, 2007) a couve-flor (RAPUSSI; BEDENDO, 2008) e o brócolis (ECKSTEIN et al., 2008). Esta última doença tem sido responsável por epidemias severas e cada vez mais freqüentes no Estado de São Paulo.

No Brasil, a floricultura começou a se destacar como atividade de importância econômica há pouco mais de 30 anos (SILVA, 2008), e diversas anomalias que ocorrem em plantas ornamentais já foram relatadas como estando associadas aos fitoplasmas. Até o presente momento, as espécies ornamentais nas quais os fitoplasmas foram associados com algum tipo de anomalia são: crista-de-galo (*Celosia* sp.), margaridinha (*Crysanthemum parthenium*), rainha margarida (*Callistephus chinensis*), sempre viva (*Helychrisia bracteatum*) (KITAJIMA, 1994), hibisco (*Hibiscus sinensis*) (MONTANO et al., 2001), vinca (*Catharanthus roseus*) (BEDENDO; DAVIS; DALLY, 1999), bico-de-papagaio (*Euphorbia pulcherrina*) (RIBEIRO; BEDENDO, 2006), begônia (*Begonia* sp.) (RIBEIRO et al., 2006), e primavera (SILVA, 2008).

2.1.2 Detecção e Classificação de fitoplasmas

Após a descoberta dos fitoplasmas em 1967, a presença de sintomas e a subsequente observação de corpúsculos pleomórficos nos vasos de floema, usando microscopia eletrônica, foram os principais meios usados para a diagnose de doenças associadas a este tipo de agente fitopatogênico (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000).

O primeiro esquema de classificação tomava por base os sintomas da planta hospedeira e o inseto vetor do fitoplasma, pois a microscopia eletrônica não permitia a diferenciação entre os

diversos fitoplasmas. No entanto, este tipo de determinação era laboriosa, consumia muito tempo e muitos dos insetos vetores eram desconhecidos (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). Além disso, fitoplasmas relacionados podem induzir diferentes sintomas no mesmo hospedeiro vegetal e diferentes fitoplasmas podem induzir sintomas similares em determinada planta (DAVIS, 1995).

A clonagem e detecção de DNA de fitoplasma realizada por Kirkpatrick (1987) permitiu o desenvolvimento de métodos de detecção, baseados no uso de fragmentos marcados de DNA e hibridização DNA-DNA. Por permitir uma detecção sensível e específica de fitoplasmas em plantas e insetos estes métodos foram empregados nos primeiros esquemas de classificação de fitoplasmas baseados no DNA (DAVIS, 1995).

O sequenciamento da região 16S do DNA ribossômico de fitoplasmas, realizado por Lim e Sears (1989), permitiu confirmar que estes procariotos realmente pertenciam à classe Mollicutes, assim como representavam um grupo monofilético dentro desta classe, pois, até então, sua posição filogenética e classificação eram incertas (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). Além disso, o sequenciamento desta região forneceu subsídios para o emprego de novos métodos de detecção, identificação e classificação molecular de fitoplasmas, pelo fato de os genes do rRNA ribossomal serem conservados entre os procariotos e existir uma ampla base de dados sobre a seqüência de nucleotídeos do 16S rRNA (DAVIS, 1995). Assim, passaram a ser usadas no estudo dos fitoplasmas as técnicas de reação em cadeia da polimerase (“Polymerase chain reaction” - PCR) e a análise do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (“Restriction fragment length polymorphism” - RFLP).

O método de PCR, no qual um fragmento da região do 16Sr DNA dos fitoplasmas é amplificado, permite a detecção de fitoplasmas através do emprego de iniciadores (“primers”) universais, assim como a sua identificação preliminar, ao nível de grupo, quando iniciadores específicos são utilizados.

A identificação acurada de uma ampla gama de fitoplasmas, resultando na classificação dos mesmos em diferentes grupos, tem sido realizada, ao longo das duas últimas décadas, graças ao estabelecimento de um esquema de classificação baseado nas análises de RFLP do fragmento de DNA da região 16S rRNA amplificado pela reação de PCR e digerido por diversas enzimas de restrição (BERTACCINI, 2007; WEI et al., 2007). Atualmente, com base nesta técnica, os fitoplasmas são classificados em 17 grupos (LEE et al., 1998; MONTANO et al., 2001;

AROCHA et al., 2005) e mais de 50 subgrupos (LEE et al., 1998, 2004a, 2004b; JOMANTIENE et al., 2002; BARROS et al., 2002; CONCIL et al., 2005). Mais recentemente, foi proposto um esquema de classificação em 28 grupos com base em análise virtual de RFLP de mais de 800 seqüências do gene 16S rDNA de fitoplasmas depositadas no GenBank (WEI et al., 2007).

Buscando uma classificação formal para os fitoplasmas, baseada na diversidade genética do gene 16S rRNA, um grupo de pesquisadores reunidos no IRCM (International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology) fez a proposta de acomodar os fitoplasmas dentro de um gênero, denominado ‘*Candidatus* (Ca.) Phytoplasma’, sendo que este gênero compreenderia diversas espécies (IRCM, 2004). Até o momento, 26 espécies de ‘Ca. Phytoplasma’ foram descritas (HOGENHOUT et al., 2008).

2.1.3 Plantas do gênero *Celosia*

As plantas do gênero *Celosia* pertencem à família *Amaranthaceae*, sendo originárias da África e Ásia (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 2006). O gênero reúne mais de 60 espécies. As espécies ornamentais podem ser separadas em três categorias em função do tipo de flores (NATIONAL GARDEN BUREAU, 2007). A forma mais simples, conhecida como pluma-de-flamingo, possui uma inflorescência alongada e cônica, sendo que as outras duas formas, mais apreciadas, apresentam flores semelhantes a plumas delicadas ou flores achatadas e retorcidas, e são popularmente conhecidas como crista plumosa e crista-de-galo, respectivamente (Figura 1). As plantas chamadas pluma-de-flamingo são classificadas na espécie botânica *Celosia spicata*, enquanto que as duas outras formas, crista plumosa e crista-de-galo, derivadas de *C. spicata*, não têm uma classificação uniforme, pois podem ser classificadas de diversas maneiras dentro do gênero *Celosia* sp.. Segundo McCormack (2007) alguns estudiosos se referem a elas como *Celosia argentea* do grupo flume e *Celosia argentea* do grupo cristata. Outros cientistas as consideram ao nível de subespécie, como *Celosia argentea plumosa* e *Celosia argentea cristata*. Outros, elevaram estas formas ao nível de espécie como *Celosia plumosa* e *Celosia cristata*.

Estas ornamentais estão dispersas em todo o mundo de forma não cultivada (NRC, 2006), porém existem diversas variedades comerciais, tanto de porte alto como anão. Somente no Brasil, existem 89 variedades registradas no cadastro nacional de cultivares (BRASIL, 2008). As variedades de porte alto são utilizadas tanto como flores de corte quanto em jardins (GILL et al.,

2007), enquanto que as variedades anãs estão entre as flores preferidas para composição de canteiros.

É de conhecimento geral o uso das celosias como plantas ornamentais, no entanto, o que poucos sabem é que as plantas de crista-de-galo também são utilizadas na alimentação humana, na medicina popular e na agricultura. As folhas jovens e frescas de duas variedades de crista-de-galo são comuns na dieta da população de vários países da África, como Nigéria, Benin e Congo, assim como na Índia e Indonésia. São nestes mesmos locais que as propriedades medicinais destas plantas são bastante difundidas, onde são usadas no tratamento de vermes intestinais, problemas nos olhos, diarreia e outros males (NRC, 2006). A importância da planta para a agricultura está relacionada com o controle da espécie daninha *Striga* sp., parasita de raízes de outras plantas. Na Ásia e na África, a produção de sorgo pode ser reduzida em mais de 60% devido ao parasitismo. O controle em pequenas propriedades é realizado pelo plantio intercalado de crista-de-galo com a cultura agrícola, prática que pode reduzir em 55% a emergência da daninha e aumentar em 35% a produção de sorgo (OLUPO et al., 2003).

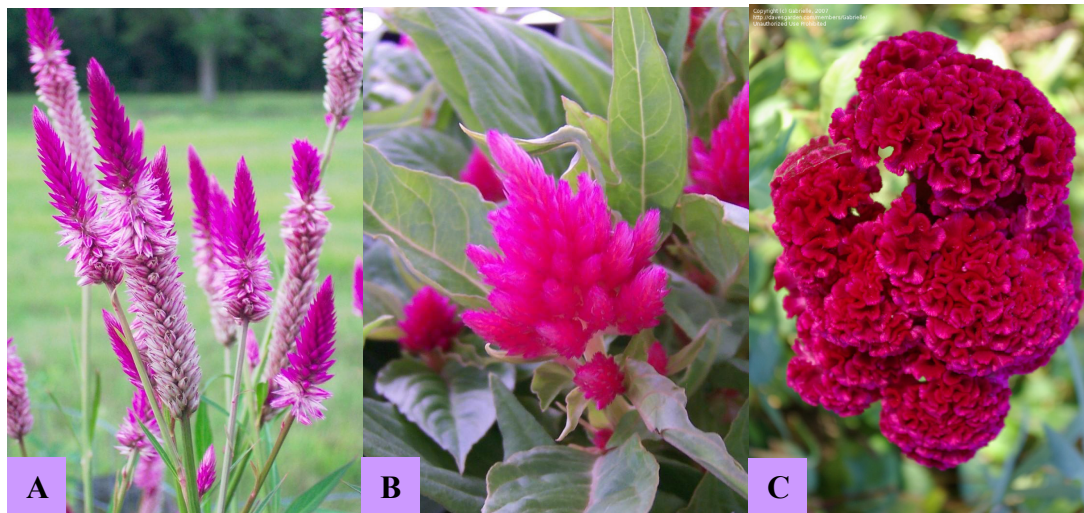


Figura 1 - Plantas ornamentais do gênero *Celosia* sp.. A = pluma-de-flamingo (*Celosia spicata*); B = crista plumosa (*Celosia argentea* do grupo flume); C = crista-de-galo (*Celosia argentea* do grupo cristata). (Fonte: site <http://davesgarden.com/>)

2.1.4 Doenças das plantas do gênero *Celosia*

As doenças geralmente não são um problema sério para as celosias, no entanto, alguns patógenos podem atacar plantas deste gênero.

Na Nigéria, a produção de crista-de-galo como vegetal folhoso é prejudicada pela presença de nematóides do gênero *Meloydogine* (NRC, 2006) e pela ocorrência de um vírus que causa mosaico e enrolamento foliar. O vírus, transmitido por pulgões, foi identificado como sendo um Potyvirus e o nome proposto para a doença foi Celosia Mosaic Virus (CIMV) (OWOLABI, 1998).

Na Flórida, o principal problema para a produção de flores de crista-de-galo e pluma-de-flamingo para corte está relacionado também com a presença de nematóides formadores de galha do gênero *Meloydogine* (GILL et al., 2007). Ainda segundo estes autores, algumas doenças fúngicas que ocasionalmente ocorrem nas celosias são do tipo damping off, causado pelos fungos *Pythium* sp., *Phytophthora* sp. ou *Rhizoctonia* sp., e manchas foliares, causadas por *Alternaria* sp. *Cercospora* sp. ou *Phyllosticta* sp.

As únicas bactérias relatadas como agentes de doenças em plantas do gênero *Celosia* são *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (ROMEIRO, 2005) e os fitoplasmas. Quanto aos fitoplasmas, o primeiro relato foi feito no Brasil por Kitajima (1994), através de microscopia eletrônica, em plantas de crista-de-galo com sintomas de superbrotamento. Mais recentemente, associações de fitoplasmas com ornamentais do gênero *Celosia* foram relatadas em Israel (TANNE et al., 2000) no Iran (BABAIE et al., 2007) e na Lituânia (SAMUITIENÉ; NAVALINSKIENÉ, 2006), sendo que neste último caso a doença foi denominada de filodia da celosia (CelPh).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Amostras de Celosia

Plantas sintomáticas de crista-de-galo (*C. argentea*) e pluma-de-flamingo (*C. spicata*), ambas de porte alto, foram coletadas em três locais distintos na cidade de Piracicaba, Estado de São Paulo (Tabela 1). Plantas sintomáticas e assintomáticas foram amostradas. Dentre as plantas sintomáticas, todas apresentavam superbrotamento de ramos novos e deformação foliar. Somente uma delas mostrou sintoma de filodia (CG4)

Tabela 1 - Relação dos locais de coleta e das espécies de plantas do gênero *Celosia* sp

Planta	Localidade	Espécie de <i>Celosia</i>
CG 1	Bairro São Dimas	<i>Celosia spicata</i>
CG 2	Bairro São Dimas	<i>Celosia spicata</i>
CG 3	ESALQ/USP	<i>Celosia argentea</i>
CG 4	ESALQ/USP	<i>Celosia argentea</i>
CG 5	Bairro Independência	<i>Celosia argentea</i>
CG 6	Bairro Independência	<i>Celosia spicata</i>
CG 7	Bairro Independência	<i>Celosia spicata</i>
CG 8	Bairro Independência	<i>Celosia argentea</i>
9 (Sadia)	ESALQ/USP	<i>Celosia argentea</i>
10 (Sadia)	Bairro Independência	<i>Celosia argentea</i>
11 (Sadia)	Bairro Independência	<i>Celosia spicata</i>

2.2.2 Extração do DNA

Vinte e quatro amostras de DNA total proveniente de plantas sintomáticas foram obtidas, sendo que para plantas assintomáticas foram obtidas nove amostras de DNA total. O DNA obtido de plantas de vinca (*Catharanthus roseus* L.) sabidamente infectadas por fitoplasmas serviu como padrão positivo para a etapa de extração.

A metodologia de extração utilizada seguiu o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1987). Amostras de aproximadamente 2g do material fresco, constituído de folhas novas e hastes, foram maceradas em almofariz contendo nitrogênio líquido até a homogeneização do material. Em seguida, o macerado foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL de capacidade, aos quais foram adicionados 800 µL do tampão de extração CTAB (2 g CTAB-cetyl trimethyl ammonium bromide, 8,18 g NaCl, 0,74 g EDTA, 1,5 g Tris- HCl, 100 mL de água destilada, pH 8,0) a 60 °C. Após a homogeneização, o material foi incubado a 60 °C, por 60-90 minutos, sendo agitado a cada 10 minutos, em vortex. Após este período, adicionou-se 600 µL de CIA (24 partes de clorofórmio e uma parte de álcool isoamílico). A mistura foi agitada por aproximadamente 1 minuto em vortex, ou até a formação de uma emulsão de aparência leitosa. Em seguida, centrifugou-se a mistura por 10 minutos à velocidade de 14.000rpm. Os tubos foram retirados cuidadosamente da centrífuga, evitando-se perturbar a interface. Com o auxílio de uma pipeta, 540 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos novos, aos quais adicionou-se 540µL de isopropanol gelado. Em seguida, os tubos foram invertidos até a completa homogeneização das soluções e colocados por duas horas, no mínimo, sob a temperatura de -20 °C para a precipitação do ácido nucléico presente na amostra. Nova centrifugação foi realizada por 10 minutos à velocidade de 14.000rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi lavado pela adição de 1 ml de etanol na concentração de 80%. O álcool foi

removido do tubo após 5-10 min. Esta operação foi realizada duas vezes. Ao precipitado foi adicionado 500 μL de uma solução de cloreto de sódio (NaCl) 1Molar, e, após dissolver o precipitado, a suspensão foi mantida por 40-60 min a 4 °C. Nova centrifugação foi realizada por 10 min à velocidade de 14.000rpm. O sobrenadante foi recuperado para um novo tubo e o precipitado foi descartado. Ao sobrenadante foram adicionados 350 μL de isopropanol gelado. Após a homogeneização do conteúdo dos tubos, o material foi mantido por 1-2 h a -20 °C. Em seguida, foi processada uma centrifugação à 14.000rpm por 10min. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado, conforme descrito anteriormente, por duas vezes. O precipitado foi deixado à temperatura ambiente para secar e, em seguida, ressuspenso em 50 μL de água deionizada autoclavada. O produto de extração foi mantido a -20 °C para uso nas reações de PCR.

2.2.3 Detecção dos fitoplasmas pela técnica da PCR

Os extratos de DNA foram diluídos em água deionizada autoclavada, nas proporções de 1:20 e 1:50 (v/v), sendo utilizados como molde nas reações de PCR.

Cada reação de PCR foi processada utilizando-se um volume final de 25 μL , contendo: 1 μL de extrato diluído de DNA; 18,7 μL de água deionizada autoclavada; 0,5 μL de cada iniciador (20 pmoles/ μL); 2 μL de uma mistura de deoxinucleotídeos trifosfato (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo); 2,5 μL de solução tampão 10X PCR e 0,17 μL de Amplitaq 5U/ μL . Os extratos diluídos de DNA de plantas assintomáticas de crista-de-galo e de plantas de vinca sabidamente infectadas por fitoplasmas foram utilizados como padrões negativo e positivo para a etapa de amplificação.

A detecção dos fitoplasmas presentes nas amostras foi realizada com o emprego de iniciadores (primers) universais para fitoplasmas, através da técnica de duplo PCR. O primeiro par de primers empregado foi P1/P7 (DENG; HITUKI, 1991; KIRKPATRICK et al., 1994), ou P1/Tint (SMART et al., 1996), que amplificam fragmentos de aproximadamente 1,8 kb que correspondem à região do gene 16S rDNA do fitoplasma. A fim de aumentar a sensibilidade da técnica, o produto da primeira reação de PCR foi diluído e utilizado como molde para uma segunda reação, utilizando-se o par de primers R16F2n/16R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996).

A programação do termociclador foi variável de acordo com o par de “primers” utilizados. Nas reações com os primers P1/Tint, o termociclador foi programado para 30 ciclos, sendo que cada ciclo compreendeu as seguintes etapas: 1 minuto a 94 °C, para a desnaturação do

ácido nucleico, 1 minuto a 56 °C para o anelamento dos primers e 2 minutos a 72 °C para a extensão da fita, além de um tempo adicional de 1 minuto e 7 minutos para a etapa de desnaturação do primeiro ciclo e extensão do último ciclo, respectivamente. Para os iniciadores P1/P7 o termociclador foi programado para 35 ciclos, cada ciclo compreendeu as etapas: 1 minuto a 94 °C para a desnaturação, 2 minutos a 60 °C para o anelamento dos iniciadores e 3 minutos a 72 °C para a extensão das fitas, com um tempo adicional de 10 minutos no último ciclo. Nas reações com os iniciadores R16F2n/16R2 a programação no termociclador foi idêntica àquela para os iniciadores P1/P7, exceto para a temperatura de anelamento, alterada para 50 °C.

Considerando que a presença de substâncias inibidoras do PCR são relativamente comuns (BERTACCINI, 2007), testes foram realizados para verificar a ocorrência das mesmas nas plantas de celosia. Para isto, 1 µL de DNA extraído de folhas ou hastes de uma planta de crista-de-galo foi combinado com o mesmo volume do DNA de plantas de vinca, sabidamente positivo para fitoplasmas, e submetido ao duplo PCR empregando-se os iniciadores universais P1/P7 e R16F2n/16R2.

2.2.4 Identificação de fitoplasmas pela técnica de PCR

Uma vez detectada a presença de fitoplasmas no tecido das plantas sintomáticas, procedeu-se à etapa de identificação, usando-se os pares de primers R16(I)F1/R1 e R16(III)F2/R1, específicos para fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI e 16SrIII, respectivamente (LEE et al., 1994). Os primers específicos para determinados grupos de fitoplasmas são utilizados somente na segunda reação do duplo PCR, utilizando-se o produto da primeira reação, amplificado com “primers” universais, como molde. Para isto, os produtos amplificados pelo par universal P1/P7 ou P1/Tint na primeira reação, foram diluídos em água na proporção de 1:50 (v/v) e usados como molde na reação seguinte.

Os padrões positivos foram representados pelo DNA extraído de plantas de milho e de chuchu sabidamente infectados com fitoplasmas do grupo 16SrI e 16SrIII, respectivamente. Como padrão negativo foi utilizado o DNA extraído de uma planta assintomática de crista-de-galo.

2.2.5 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos do duplo PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%) contendo o corante Sybr safe® 1% (Invitrogen), usando-se tampão TE 0,5X . O DNA foi submetido à corrente elétrica de 65 volts por 60 minutos O padrão de peso molecular utilizado foi o 1 Kb ladder (Life Technologies). A visualização dos fragmentos amplificados foi feita em transiluminador de luz ultravioleta.

2.2.6 Identificação de fitoplasmas através da técnica de RFLP

As seqüências de nucleotídeos de 1.2 Kb, correspondentes ao 16S rDNA amplificadas pelo duplo PCR, utilizando-se primers universais, foram submetidas à digestão com as enzimas de restrição *MseI*, *RsaI*, *KpnI*, *HinfI*, *HpaII*, *HaeIII*, *TaqI*, *HhaI* e *Bsh* 12361I. A digestão foi conduzida em tubos de microcentrífuga, de 600 µL de capacidade, contendo 3-5 µL do DNA a ser digerido, (separadamente para cada endonuclease) 0,5 µL de cada enzima de restrição, 1,5 µL do tampão correspondente à enzima e água destilada deionizada para completar um volume de 15 µL. A mistura dos reagentes foi incubada a 36 °C por 24-36 h, exceção feita para as enzimas *TaqI* e *Bsh* 12361, para as quais foram adotadas as temperaturas de 65 °C e 37 °C, por um período de 24-36 h e 16 h, respectivamente.

2.2.7 Sequenciamento da região 16SrDNA do fitoplasma

Com a finalidade de confirmar a identidade dos fitoplasmas encontrados em plantas de celosia, assim como verificar sua posição filogenética em relação aos demais fitoplasmas existentes, realizou-se o sequenciamento da região do 16SrDNA, amplificado pela técnica de duplo PCR. Para isto foi escolhido o fitoplasma presente na planta identificada como CG4, como sendo representativo dos fitoplasmas encontrados nas plantas de crista-de-galo e pluma-de-flamingo. O sequenciamento foi realizado a partir do DNA do fitoplasma clonado em *Escherichia coli*, conforme descrito em seguida.

2.2.8 Clonagem

Os produtos do duplo PCR, amplificados com o uso de primers universais, foram clonados em *Escherichia coli*. O processo de clonagem envolveu diversas etapas: purificação do fragmento de DNA do fitoplasma; inserção do DNA em um plasmídio (vetor); captura do vetor

pela bactéria *E. coli*; multiplicação da bactéria *E. coli* contendo o plasmídeo; e finalmente, a extração do DNA do fitoplasma inserido na bactéria para seu sequenciamento. A purificação do fragmento de DNA do fitoplasma foi feita com o “kit” PureLink™ (Invitrogen), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. A concentração do DNA nas amostras foi estimada pela comparação visual da banda do marcador Lambda DNA com as bandas do DNA purificado das amostras. As amostras de DNA purificadas foram armazenadas a temperatura de -20 °C até o momento de uso. O fragmento de DNA do fitoplasma, com concentração de aproximadamente 400 ng, foi inserido no vetor pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega) utilizando-se o “kit” comercial que acompanha o vetor, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. O vetor contendo fragmento de DNA do fitoplasma inserido, denominado simplesmente como ligação, foi inserido em células competentes de *E. coli* através de um processo denominado transformação. A transformação, realizada em células competentes de *E. coli*, estirpe DH5 α , preparadas conforme Hanahan (1983), foi realizada da forma descrita em seguida. Em um tubo de microcentrífuga, contendo 50 μ L de células competentes, adicionou-se 2-3 μ L da ligação e incubou-se a mistura por 30 minutos em gelo. Após este período, a mistura foi submetida a um choque térmico, por incubação a 42 °C por 50 segundo e, imediatamente, transferidas para o gelo, durante dois minutos. Em seguida, às células transformadas foram adicionados 450 μ L de meio de cultura Luria-Bertani (LB) (BERTANI, 1951; LURIA; BURROUS, 1957) pré-aquecido a 37 °C. Os tubos foram mantidos por 2-3 horas em agitador a velocidade de 200 rpm, a temperatura de 37 °C, para o crescimento das células transformadas. Após este período, uma alíquota de 100 μ L da suspensão de células transformadas foi transferida para placas de Petri contendo meio LB sólido acrescido de 20 μ L do antibiótico ampicilina (100 mg.mL⁻¹), 20 μ L de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosida) na concentração de 50 ng/mL e 20 μ L de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosida) na concentração de 50 mg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 12-14 h ou até o crescimento das colônias. Os produtos X-gal e IPTG permitem a avaliação da atividade da β -galactosidade das bactérias transformadas, possibilitando diferenciá-las das bactérias não transformadas, através da cor branca ou azul da colônia, respectivamente. Foram selecionadas 3 colônias transformadas, ou seja, 3 clones de cada amostra. Estes clones selecionados foram transferidos, em câmara de fluxo, para tubos do tipo “Falcon”, contendo 20 mL de meio de cultura LB líquido, pelo toque de uma ponteira de 10 μ L na colônia selecionada e

sua posterior transferência para meio de cultura. A incubação foi feita a temperatura de 37 °C por 12 h em agitador a velocidade de 200 rpm, para crescimento da bactéria.

Com a bactéria transformada, clonada e multiplicada, o próximo passo foi a extração do plasmídeo, que contém o fragmento de DNA do fitoplasma. A extração do plasmídeo de dois clones foi realizada utilizando-se o “kit” comercial Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. O terceiro clone foi conservado, em tubo de microcentrifuga (1,5 mL) contendo 500 µL da suspensão da bactéria clonada e 500 µL de glicerol (50%), tendo sido armazenado em congelador a -80 °C.

Para cada clone, uma alíquota da suspensão contendo os plasmídeos extraídos foi submetida a reação de PCR, utilizando-se o par de primers universais R16F2n/16R2, e à digestão com a enzima de restrição EcoRI para a confirmação da presença do fitoplasma nestes plasmídeos. Os plasmídeos, cujo inserto do fitoplasma foi confirmado, foram enviados para o sequenciamento, junto ao laboratório de bioquímica fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo.

2.2.9 Análise das seqüências

As seqüências geradas foram analisadas através de programas computacionais de construção (Bio Edit e PhredPhrap) e análise de seqüências (Sequence alignment – CLUSTALW). Após este processo, estas seqüências foram comparadas com seqüências de outros fitoplasmas depositadas no “GenBank”, o que possibilitou demonstrar o nível de identidade genética existente entre o fitoplasma presente nas plantas de celosia com outros fitoplasmas que ocorrem em outros hospedeiros. Para as análises filogenéticas, foram usadas 29 seqüências, que incluem 16 grupos de fitoplasmas existentes, 11 subgrupos pertencentes ao grupo 16SrIII, o organismo *Acholeplasma laidlawii* e uma seqüência obtida neste trabalho (Tabela 2). A árvore filogenética foi construída pelo método “Neighbour-joining” e o teste Bootstrapping foi processado 1.000 vezes para assegurar a confiabilidade da posição dos ramos formados na árvore construída. Os mapas de sítios putativos de restrição para as seqüências do 16S rDNA do fitoplasma encontrado em celosia e de fitoplasmas relacionados foram gerados com as mesmas endonucleases usadas na análise de RFLP, através do programa pDRAW32 e comparados.

Tabela 2 - Representantes dos 16 grupos e diversos subgrupos de fitoplasmas do grupo 16SrIII utilizados para a construção da árvore filogenética

Fitoplasma	Doença	Nº acesso	Referência
Planta CG4	Malformação das folhas de celosia	--	Presente estudo
16SrI: Aster yellows			
I-B	Maize bushy stunt (MBS)	AY265208	LEE et al., 2004
16SrII: Peanut WB			
II-A	Peanut witches' broom (PnWB)	L33765	GUNDERSEN et al., 1994
16SrIII: X Disease			
III-A	Canada X-disease (CX)	L33733	GUNDERSEN et al., 1994
III-B	Clover yellow edge (CYE)	AF175304	DAVIS; DALLY, 2001
III-E	Spiraea stunt (SP1)	AF190228	Não publicado
III-F	Milkweed yellows (MW1)	AF510724	Não publicado
III-G	Walnut witches' broom (MWB)	AF190226	Não publicado
III-H	Poinsettia branch-inducing (PoiBI)	AF190223	Não publicado
III-I	Virginia grapevine yellows (VGY)	AF060875	DAVIS et al., 1998
III-J	Chayote witches' broom (ChWB)	AF147706	MONTANO et al., 2000
III-P	Dandelion virescence (DanVir)	AF370119	JOMANTIENE et al., 2002
III-Q	Black Raspberry witches' broom (BRWBR7)	AF302841	Não publicado
III-R	Cirsium white leaf (CirWL)	AF373105	JOMANTIENE et al., 2002
16SrIV: Coconut lethal yellows			
IV-A	Coconut lethal yellowing (LYJ-C8)	AF498307	HARRISON, et al., 2002
16SrV: Elm Yellows			
V-A	Elm Yellows (EY1)	AF189214	DAVIS; DALLY, 2001
16SrVI: Clover proliferation			
VI-A	Clover proliferation (CP)	AY390261	HIRUKI; WANG, 2004
16SrVII: Ash Yellows			
VII-B	Erigeron witches' broom (EriWB)	AY034608	BARROS, et al., 2002
16SrVIII: Loofah witches' broom			
VIII-A	Loofah WB (LfWB)	AF248956	DAVIS; DALLY, 2001
16SrIX: Pigeon Pea Witches's broom group			
IX-A	Pigeon Pea WB (PPWB)	AF248957	MARTINI et al., 2007
16SrX: Apple Proliferation group			
X-A	Apple proliferation (AP)	AJ542543	SEEMÜLLER; SCHENEIDER, 2004
16SrXI: Rice yellow dwarf			
XI-A	Rice yellow dwarf (RYD)	D12581	NAMBA et al., 1993
16SrXII: Stolbur group			
XII-D	Hydrangea phyllodi (JHP)	AB010425	SAWAYANAGI et al., 1999

Tabela 2 - Representantes dos 16 grupos e diversos subgrupos de fitoplasmas do grupo 16SrIII utilizados para a construção da árvore filogenética

Fitoplasma	Doença	Nº acesso	Referência
16SrXIII: Mexican periwinkle virescence (MPV) XIII-A	Mexican Periwinkle virescence (MPV)	AF248960	DAVIS; DALLY, 2001
16SrXIV XIV-A	Bermudagrass white leaf (BGWL)	AF248961	DAVIS; DALLY, 2001
16SrXV: Hibiscus witches' broom group XV-A	Hibiscus witches' broom (HibWB26)	AF147708	MONTANO et al., 2001
16SrXVII:	'Candidatus Phytoplasma caricae'	AY725234	AROCHA et al., 2005
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Não se aplica	M 23932	WEISBURG et al., 1989

2.2.10 Teste de transmissão do fitoplasma

Em uma planta de crista-de-galo mantida em casa de vegetação (planta CG3), denominada planta fonte, na qual fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII foram detectados, foi instalada a planta parasita *Cuscuta subinclusa*. Após a colonização da planta de crista-de-galo pela cuscuta, duas plantas de vinca e uma planta sadia de crista-de-galo foram colocadas próximas a planta fonte, as quais também foram colonizadas pela cuscuta (Figura 2).



Figura 2 - Colonização por *C. subinclusa* de uma planta de crista-de-galo infectada por fitoplasmas e de plantas saudias de vinca e crista-de-galo

A cuscuta usada para a transmissão foi obtida a partir de sementes, assim como as plantas testes de vinca e crista-de-galo. Para verificação da transmissão de fitoplasmas, foram conduzidos

testes de PCR. Para as plantas de vinca e de cuscuta foram feitas duas extrações de DNA total de cada uma das plantas, ao longo de 3 meses após a instalação da cuscuta na planta de vinca. Para crista-de-galo, nove extrações foram realizadas ao longo de sete meses, após a sua colonização pela planta parasita.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Detecção de fitoplasmas nas amostras

Plantas do gênero *Celosia* conhecidas como crista-de-galo e pluma-de-flamingo, com sintomas típicos de infecção por fitoplasmas foram observadas em diferentes locais na cidade de Piracicaba (SP). Estas plantas exibiam sintomas de superbrotamento, redução e deformação foliar, enfezamento e diminuição dos entrenós na parte superior da planta (Figuras 3 e 4). Uma das plantas de crista-de-galo, além dos sintomas descritos mostrava também filodia (Figura 5). Sintomas de filodia e enfezamento foram também relatados em plantas de crista-de-galo infectadas por fitoplasmas em Israel (TANNE et al., 2000), no Iran (BABAIE et al., 2007) e na Lituânia (SAMUITIENÉ; NAVALINSKIENÉ, 2006). No entanto, estas plantas também apresentavam sintomas de amarelecimento generalizado, o que não foi verificado nas celosias coletadas em Piracicaba. Sintomas de deformação foliar, uma alteração muito freqüente nas plantas sintomáticas analisadas neste trabalho, não foram assinalados para a doença relatada nestes países.



Figura 3 - Plantas de pluma-de-flamingo com sintomas de redução e deformação foliar e superbrotamento



Figura 4 - Plantas de crista-de-galo com sintomas de redução e deformação foliar e superbrotamento



Figura 5 - Plantas de crista-de-galo com sintomas de filodia, típicos de doenças causadas por fitoplasmas

A confirmação da presença de fitoplasmas associados às plantas doentes foi obtida, em 50% das plantas sintomáticas de ambas as espécies (Tabela 3), através da amplificação de fragmentos genômicos de aproximadamente 1,2 Kb (Figura 6). O padrão de bandas exibido pelo fitoplasma presente nas amostras de crista-de-galo e pluma-de-flamingo foi idêntico àquele obtido para o fitoplasma encontrado na amostra usada como controle positivo, representada pela

planta de vinca infectada. Nenhum fragmento foi amplificado a partir do DNA da amostra de celosia assintomática (Figura 6). A amplificação do fragmento do 16S rDNA do fitoplasma presente nas plantas CG3, CG4 e CG6 foi obtida pelo emprego dos iniciadores P1/P7 na primeira reação e R16F2n/16R2 na segunda, enquanto que o fitoplasma presente na amostra CG7 foi detectado pelo emprego dos iniciadores P1/Tint para amplificação e R16F2n/16R2 para re-amplificação.

Tabela 3 - Relação das amostras de plantas do gênero *Celosia* sp. nas quais o fitoplasma foi detectado

Amostra	Localidade	Espécie de Celosia	Deteção do fitoplasma
CG 1	Bairro São Dimas	<i>C. spicata</i>	negativo
CG 2	Bairro São Dimas	<i>C. spicata</i>	negativo
CG 3	ESALQ/USP	<i>C. argentea</i>	positivo
CG 4	ESALQ/USP	<i>C. argentea</i>	positivo
CG 5	Bairro Independência	<i>C. argentea</i>	negativo
CG 6	Bairro Independência	<i>C. spicata</i>	positivo
CG 7	Bairro Independência	<i>C. spicata</i>	positivo
CG 8	Bairro Independência	<i>C. argentea</i>	negativo
9 (Sadia)	ESALQ/USP	<i>C. argentea</i>	negativo
10 (Sadia)	Bairro Independência	<i>C. argentea</i>	negativo
11 (Sadia)	Bairro Independência	<i>C. spicata</i>	negativo

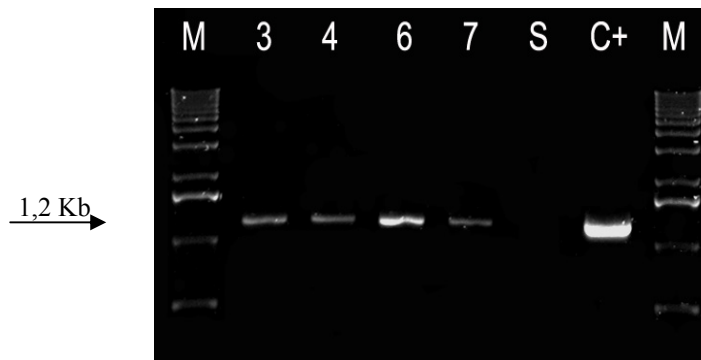


Figura 6 - Amplificação do 16S rDNA do fitoplasma encontrado nas amostras sintomáticas de celosia pela técnica de duplo PCR com os iniciadores P1/P7 ou P1/Tint e R16F2n/16R2. Coluna M = Marcador molecular 1 Kb ladder; Coluna 3 e 4 = crista-de-galo sintomática; Coluna 6 e 7 = pluma-de-flamingo sintomática; Coluna S = planta sadia de crista-de-galo; Coluna C+ = controle positivo representado por vinca infectada

Embora a técnica da PCR seja muito sensível, não é raro a ocorrência de resultados negativos para plantas que exibem sintomas tipicamente associados aos fitoplasmas (SILVA, 2008). Um dos fatores envolvidos na obtenção de resultados negativos pode ser a presença de substâncias inibidoras da amplificação do fragmento genômico alvo do patógeno,

O teste realizado para verificação da presença de substâncias inibidoras da PCR em plantas de crista-de-galo confirmou que, o DNA extraído das folhas desta planta contém alguma substância capaz de inibir a reação da PCR, porém tais substâncias não estão presentes nos tecidos de hastes da planta. Isto foi confirmado pelo fato de reações de PCR contendo o DNA de uma planta de vinca sabidamente infectada mais o DNA proveniente de hastes de plantas de crista-de-galo também infectada ter amplificado fragmentos de tamanho esperado. Contrariamente nas reações de PCR contendo o DNA de vinca infectada mais o DNA proveniente das folhas da mesma planta de crista-de-galo não ocorreu amplificação do fragmento esperado. Nas reações contendo apenas o DNA extraído de vinca foi verificada a amplificação do 16S rDNA do fitoplasma (Figura 7). Tais resultados sugeriram que a presença de substâncias inibidoras nas plantas de celosia possa ser responsável pela ocorrência de falsos negativos para as plantas que exibiam sintomas típicos da doença. Além da presença de inibidores, falsos negativos também podem ocorrer devido à distribuição irregular e a baixa concentração do fitoplasma nos tecidos da hospedeira (CHRISTENSEN et al., 2004; BERGES; ROTT; SEEMÜLLER, 2000). Portanto, a não detecção destes patógenos na totalidade das plantas sintomáticas não significa necessariamente que os mesmos não estejam presentes em seus tecidos.

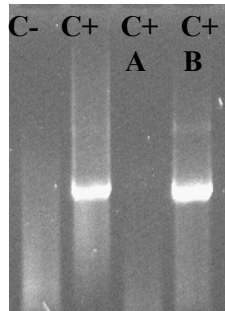


Figura 7 - Teste da presença de inibidores do PCR. C- = controle negativo (água); C+ = controle positivo (DNA de planta de vinca sabidamente infectada por fitoplasmas); C+/A = controle positivo + DNA extraído de folhas de crista-de-galo; C+/B = controle positivo + DNA extraído de hastes de crista-de-galo

2.3.2 Identificação do fitoplasma pela técnica de PCR e análise de RFLP

A identificação molecular através da técnica de duplo PCR foi conduzida com o emprego de iniciadores específicos para fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII, utilizados após a primeira reação de PCR com os primers universais P1/Tint ou P1/P7. Nenhum fragmento do 16S rDNA de fitoplasma foi amplificado a partir das amostras de celosia com o emprego dos iniciadores

específicos para fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrI. Amplificação foi obtida para o controle positivo, representado por uma amostra de milho, sabidamente infectada por fitoplasma deste grupo (dados não mostrados). No entanto, quando os iniciadores específicos para fitoplasmas do grupo 16SrIII foram empregados, observou-se a amplificação de fragmentos genômicos de aproximadamente 0,8 Kb, em todas as amostras de celosia nas quais o fitoplasma havia sido detectado e para o controle positivo, representado por DNA extraído de uma amostra de chuchuzeiro, sabidamente infectada por fitoplasma deste grupo. Nenhum fragmento foi amplificado a partir do DNA da planta assintomática (Figura 8). Os resultados revelaram claramente que o fitoplasma detectado nas amostras de crista-de-galo e pluma-de-flamingo pertenciam ao grupo 16SrIII.

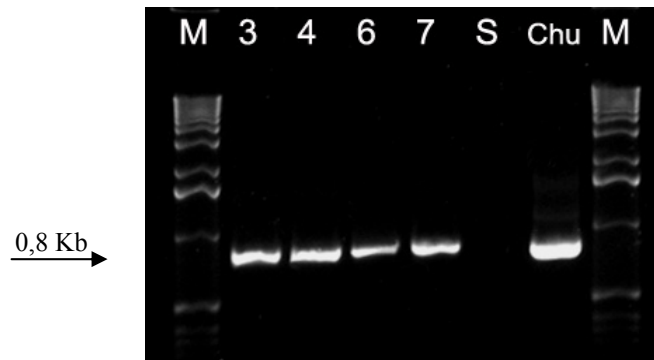


Figura 8 - Amplificação do 16SrDNA do fitoplasma encontrado nas amostras sintomáticas de *Celosia* sp. pela técnica de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint ou P1/P7 e R16(III)F2/R1. Coluna M = Marcador molecular 1 Kb ladder; Coluna 3 e 4 = crista-de-galo sintomática; Coluna 6 e 7 = pluma-de-flamingo; Coluna S = planta sadia de crista-de-galo; Coluna C+ = controle positivo, representado por fitoplasma do grupo 16SrIII

A identificação de um fitoplasma do grupo 16SrIII em associação com plantas sintomáticas de celosia soma mais um hospedeiro de fitoplasmas deste grupo, cujos representantes têm sido encontrados freqüentemente nos continentes europeu e americano (LEE et al., 1998). Fitoplasmas deste grupo estão associados a doenças que ocorrem em diversas espécies de plantas cultivadas, entre elas algumas ornamentais. Particularmente no Brasil, a maioria dos fitoplasmas encontrados em plantas ornamentais foi classificada como pertencente ao grupo 16SrIII, como por exemplo o fitoplasma associado ao superbrotamento da begônia (RIBEIRO et al., 2006), à proliferação de ramos de bico-de-papagaio (RIBEIRO; BEDENDO, 2006), e ao superbrotamento de ramos da primavera (SILVA et al., 2008).

A ocorrência de um fitoplasma do grupo 16SrIII em plantas de crista-de-galo foi relatada anteriormente em Israel (TANNE et al., 2000), porém o mesmo não foi classificado ao nível de subgrupo e a sequência de nucleotídeos do 16S rDNA não foi disponibilizada, não sendo, portanto, possível compará-lo com o fitoplasma que ocorre no Brasil em plantas de celosia.

Além de fitoplasmas do grupo 16SrIII, plantas de crista-de-galo podem ser naturalmente infectadas por representantes de outros 2 grupos distintos de fitoplasmas. Na Lituânia, um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrI, subgrupo M, foi associado a plantas exibindo sintomas de uma doença denominada de filodia da Celosia (CelPh) (SAMUITIENÉ; NAVALINSKIENÉ, 2006). Enquanto no Iran, uma doença presente em plantas desta espécie foi associada a um fitoplasma do grupo VI, subgrupo A (BABAIE et al., 2007). Não existe nenhum relato sobre a ocorrência de fitoplasmas em plantas de pluma-de-flamingo.

As análises de RFLP conduzidas neste trabalho mostraram que os padrões eletroforéticos obtidos para o fitoplasma encontrado nas quatro amostras positivas foram indistinguíveis entre si, e do representante do grupo 16SrIII, subgrupo J (MONTANO et al., 2000), utilizado como padrão neste trabalho (Figura 9 e Figura 10). A caracterização molecular foi feita usando-se as enzimas de restrição e confirmou a identificação previamente realizada com o uso de iniciadores específicos para fitoplasmas do grupo 16SrIII.

Os padrões de restrição coletivos obtidos para o fitoplasma encontrado em celosia foram comparados com aqueles descritos na literatura (LEE et al., 1998; MONTANO et al., 2000; JOMANTIENE et al., 2002; BARROS et al., 2002) (Tabela 4). Ficou evidenciado que o fitoplasma associado às plantas de celosia não pertenciam aos subgrupos 16SrIII-A, 16SrIII-C, 16SrIII-D, 16SrIII-E, 16SrIII-G, 16SrIII-I, 16SrIII-P e 16SrIII-R. No entanto, as *HinfI*, *HpaII*, *TaqI*, *RsaI*, *KpnI*, *HaeIII* e *MseI* não permitiram a diferenciação entre os subgrupos 16SrIII-J, 16SrIII-B e 16SrIII-F. A fim de diferenciar os fitoplasmas do subgrupos 16SrIII-J e 16SrIII-F daqueles do subgrupo 16SrIII-B uma digestão foi feita com a enzima *HhaI*, cujo perfil descartou a possibilidade do fitoplasma pertencer ao subgrupo 16SrIII-B (Figura 11). No entanto, como as enzimas empregadas não permitiram a diferenciação dos fitoplasmas entre os subgrupos 16SrIII-F e 16SrIII-J, a endonuclease *Bsh* 12361I foi utilizada, sendo que, o perfil gerado por este enzima (Figura 11) demonstrou que o fitoplasma encontrado nas plantas de celosia pertencia ao subgrupo 16SrIII-J.

O sintoma de malformação foliar foi consistentemente observado em plantas de crista-de-galo e pluma-de-flamingo infectadas por fitoplasmas do grupo 16SrIII, subgrupo J, e é uma característica típica da doença. Dessa forma, está sendo proposto, que o nome da doença seja malformação das folhas de celosia, correspondendo em inglês a “Celosia leaves malformation” (CeLLM).

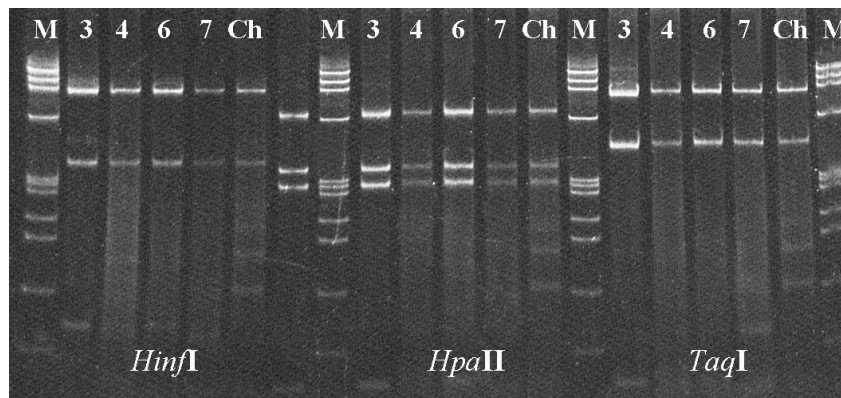


Figura 9 - Análise de RFLP do gene 16SrDNA de fitoplasmas do grupo 16SrIII detectados em plantas de celosia, utilizando-se as enzimas *Hinf*I, *Hpa*II e *Taq*I. Colunas 3 e 4 = fitoplasmas detectados em crista-de-galo; Colunas 5 e 6 = fitoplasmas detectados em pluma de flamingo; Coluna Chu = padrão positivo representado pelo fitoplasma do grupo 16SrIII-J; M= Marcador molecular PhiX174RFFHaeIII

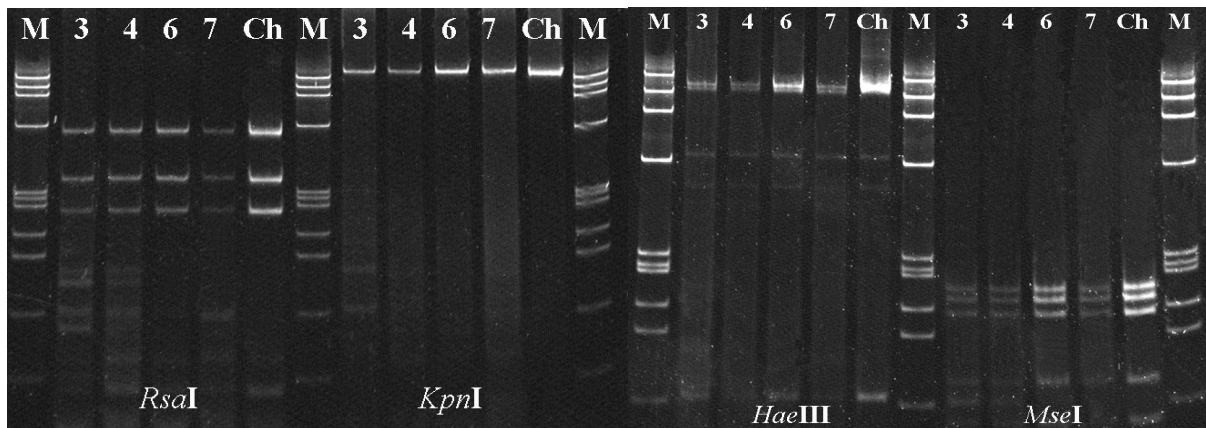


Figura 10 - Análise de RFLP do gene 16SrDNA de fitoplasmas do grupo 16SrIII detectados em plantas de celosia, utilizando-se as enzimas *Rsa*I, *Kpn*I, *Hae*III e *Mse*I. Colunas 3 e 4 = fitoplasmas detectados em crista-de-galo; Colunas 5 e 6 = fitoplasmas detectados em pluma-de-flamingo; Coluna Chu = padrão positivo representado pelo fitoplasma do grupo 16SrIII-J; M= Marcador molecular PhiX174RFFHaeIII

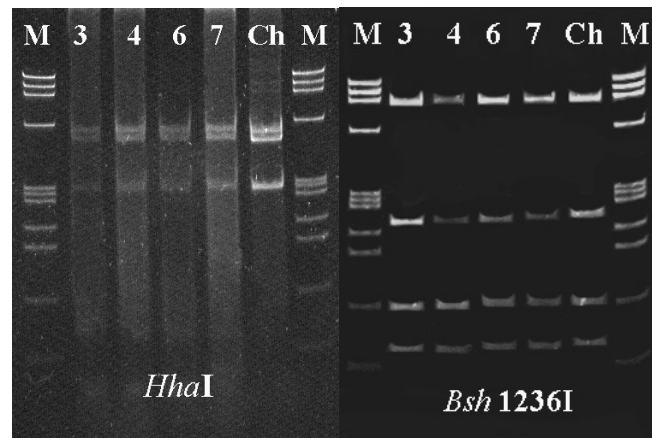


Figura 11 - Análise de RFLP do gene 16SrDNA de fitoplasmas do grupo 16SrIII detectados em plantas de celosia, utilizando-se as enzimas *HhaI* e *Bsh 1236I*. Colunas 3 e 4 = fitoplasmas detectados em crista-de-galo; Colunas 5 e 6 = fitoplasmas detectados em pluma-de-flamingo; Coluna Chu = padrão positivo representado pelo fitoplasma do grupo 16SrIII-J; M= Marcador molecular PhiX174RFHaeIII

Tabela 4 - Comparação entre os padrões de restrição obtidos por RFLP, do fitoplasma detectado em plantas do gênero celosia (CG3, CG4, CG6 e CG7) com outros fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII

"Strain" do fitoplasma	Grupo 16SrIII (subgrupo)	Tipos de padrões de restrição para diferentes enzimas								
		<i>HhaI</i>	<i>Bsh 1236I</i>	<i>HinfI</i>	<i>HpaII</i>	<i>TaqI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MseI</i>	<i>RsaI</i>	<i>KpnI</i>
CG 3	III	2	1	1	2	1	1	1	1	1
CG 4	III	2	1	1	2	1	1	1	1	1
CG 6	III	2	1	1	2	1	1	1	1	1
CG 7	III	2	1	1	2	1	1	1	1	1
CX ^a	III (A)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CYE ^a	III (B)	1	1	1	2	1	1	1	1	1
PB ^a	III (C)	2	2	1	2	1	1	2	1	1
GR1 ^a	III (D)	2	3	1	2	1	1	3	1	1
SP1 ^a	III (E)	3	1	1	1	1	1	1	1	1
MW1 ^a	III (F)	2	2	1	2	1	1	1	1	1
WWB ^a	III (G)	1	1	1	1	1	1	1	2	1
PoiBI ^b	III (H)	1	4	1	1	1	1	1	1	1
VGY ^c	III (I)	1	1	1	1	1	1	2	1	1
ChWB ^d	III (J)	2	1	1	2	1	1	1	1	1
DanVir ^e	III (P)	2	--	2	2	1	1	1	1	1
CirWL ^e	III (R)	4	--	1	2	--	--	1	1	2

Os números representam os diferentes tipos de padrões de restrição obtidos para as diversas endonucleases.

Abreviações: CX = Canadian X-disease; CYE = Clover yellow edge; PB = Pecan bunch; GR1 = Golden rod yellows; SP1 = Spirea stunt; MW1 = Milkweed yellows; WWB = Walnut witches' broom; PoiBI = Poinsettia branch-inducing; VGY = Virginia Grapevine yellows; ChWB = Chayote witches' broom; DanVir = Dandelion virescence; CirWL = Cirsium white leaf. As letras sobrescritas indicam a referência: a = Lee et al. (1998); b = Davis (não publicado, citado por BARROS et al., 2002); c = Davis et al. (1998); d = Montano et al. (2000); e = Jomantiene et al. (2002)

O fitoplasma do subgrupo 16SrIII-J foi primeiramente identificado no Brasil, em chuchuzeiro e Melão-de-São Caetano, no Estado do Rio de Janeiro (MONTANO et al., 2000). Os autores relataram que este fitoplasma poderia ser uma nova linhagem ou até uma espécie distinta dos demais fitoplasmas conhecidos, pois, aparentemente, não ocorriam em outros locais, além América do Sul. Oito anos após a descoberta destes fitoplasmas, tem se confirmado a sua ocorrência limitada à América do Sul, pois, até o presente momento, os fitoplasmas pertencentes ao subgrupo 16SrIII-J só foram identificados nesta região geográfica. No Brasil, além de estarem associados ao superbrotamento do chuchuzeiro e do melão de São Caetano fitoplasmas deste subgrupo foram identificados em plantas de abóbora (*Cucurbita moschata* L.) com sintomas de superbrotamento (MONTANO et al., 2006), em plantas de repolho apresentando a doença conhecida como enfezamento (AMARAL MELLO, 2007). Além do Brasil, fitoplasmas deste subgrupo foram relatados na Bolívia, associados ao declínio do cinamomo (*Melia azedarach* L.) (HARRISON; BOA; CARPIO, 2003), na Argentina, associados com plantas de alho afetadas pela doença conhecida por tristeza do alho (*Allium sativum* L.) (GALDEANO et al., 2004), e na Colômbia, em plantas de café (*Coffea arabica* L.) com sintomas da doença “Coffe crispiness disease” - CCD) (GALVIS; LEGIZAMÓN; GAITÁN, 2007).

Um fato interessante é que os diversos fitoplasmas deste subgrupo, que são comprovadamente próximos geneticamente, tem sido relatados em diferentes espécies de plantas e locais relativamente distantes, o que sugere sua ampla distribuição no continente assim como baixa especificidade quanto à planta hospedeira. Também interessante é a hipótese feita por Galvis, Legizamóm e Gaitán (2007), segundo a qual a relação existente entre os fitoplasmas deste subgrupo sugere a presença de um ancestral comum na América do Sul e que as culturas que foram introduzidas recentemente no continente, como o café, se tornaram hospedeiras alternativas para esta linhagem de fitoplasmas. Esta hipótese pode ser aplicada também para as plantas de celosia, uma vez que as plantas deste gênero são possivelmente originárias da África e Ásia (NRC, 2006).

2.3.3 Sequenciamento e análise putativa de sítios de restrição

Uma seqüência consenso foi determinada a partir do alinhamento das seqüências obtidas para três clones do fitoplasma presente na planta de crista-de-galo (CG4). Esta seqüência permitiu confirmar a identidade do fitoplasma como sendo um representante do grupo 16SrIII,

como já havia sido feito através de PCR e RFLP. A seqüência, representada por um fragmento de 1253 nucleotídeos (Apêndice A), foi submetida à análise putativa de sítios de restrição e análise filogenética. A análise putativa dos sítios de restrição, foi feita tanto para o fitoplasma associado à malformação das folhas de celosia como para o fitoplasma associado ao superbrotamento do chuchuzeiro, usando-se as mesmas enzimas utilizadas para a análise de RFLP. A comparação entre estes fitoplasmas demonstrou que eles tinham exatamente os mesmos sítios de restrição para as enzimas selecionadas (Figura 12). Os perfis virtuais gerados foram idênticos para ambos os fitoplasmas e se mostraram concordantes com aqueles obtidos por RFLP, a partir do DNA amplificado por PCR (Figura 13). Estes resultados comprovaram a confiabilidade da análise enzimática de RFLP e revelam que o fitoplasma presente na amostra de celosia é idêntico àquele associado ao superbrotamento do chuchuzeiro. Dessa forma, foi reforçada a identificação dos fitoplasmas associados à malformação das folhas de celosia como pertencente ao subgrupo 16SrIII-J.

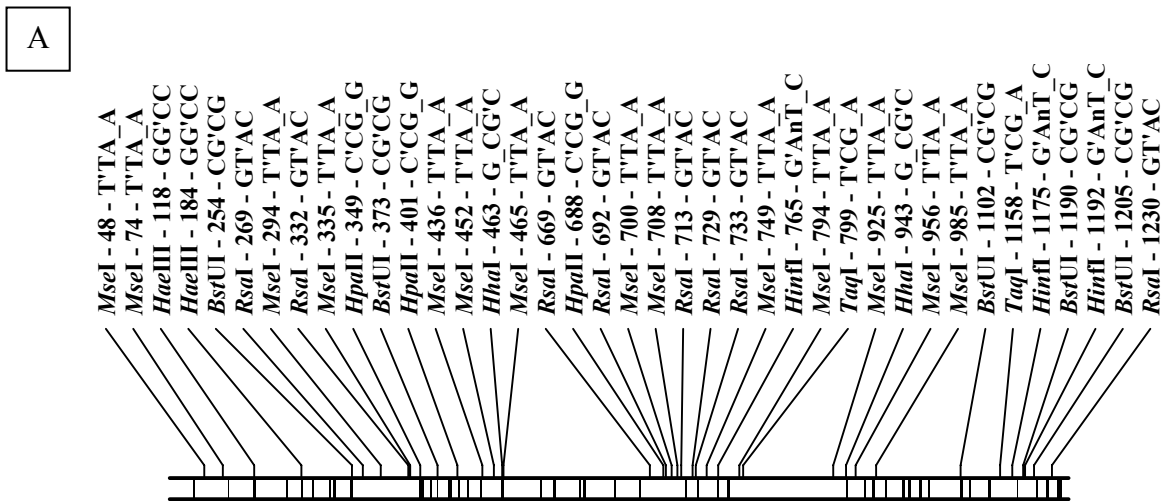


Figura 12 - Análise putativa de sítios de restrição do 16S rDNA do fitoplasma associado à malformação das folhas de celosia com as mesmas enzimas utilizadas para a análise de RFLP. A: seqüência do fitoplasma associado à malformação das folhas de celosia (planta CG4); B: seqüência do fitoplasma associado ao superbrotamento do chuchuzeiro, representante do grupo 16SrIII-J (nº acesso: AF147706).

(continua)

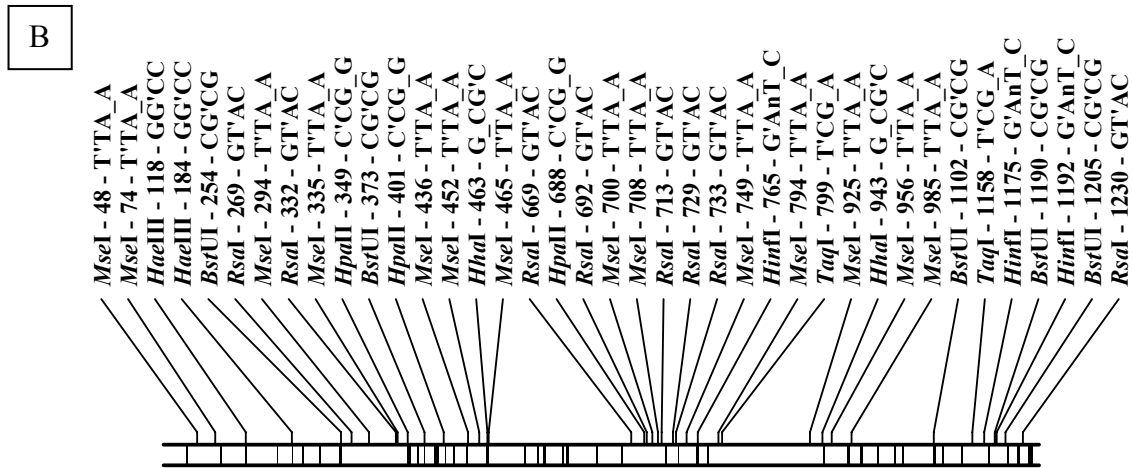


Figura 12 - Análise putativa de sítios de restrição do 16S rDNA do fitoplasma associado à malformação das folhas de celosia com as mesmas enzimas utilizadas para a análise de RFLP. A: sequência do fitoplasma associado à malformação das folhas de celosia (planta CG4); B: sequência do fitoplasma associado ao superbrotamento do chuchuzeiro, representante do grupo 16SrIII-J (nº acesso: AF147706)

(conclusão)

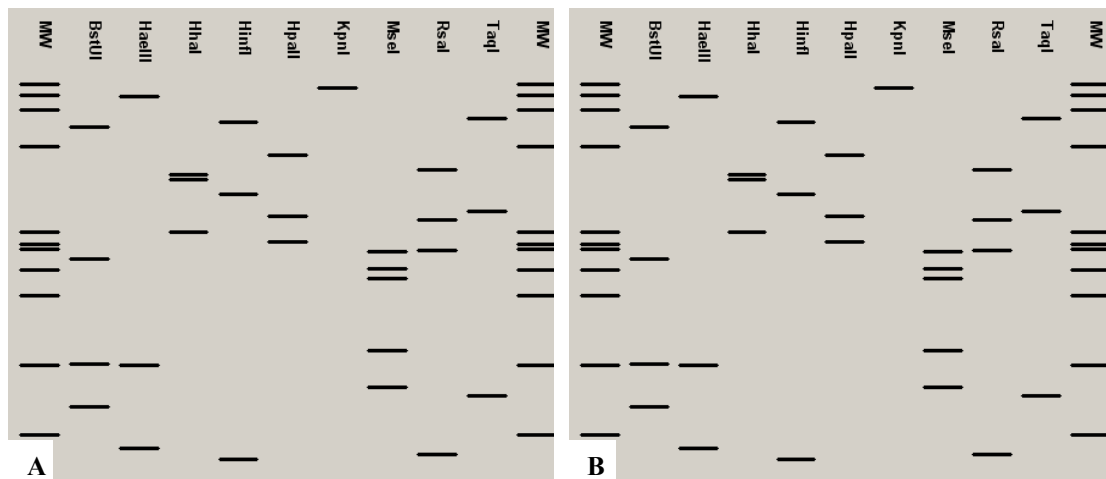


Figura 13 - Perfil gerado pela análise putativa de sítios de restrição com as mesmas enzimas utilizadas para a análise enzimática de RFLP. A = fitoplasmas associados à malformação das folhas de celosia; B = fitoplasma associado ao superbrotamento do chuchu, representante do subgrupo 16S rIII-J

2.3.4 Análise filogenética

A árvore filogenética construída a partir da sequência de nucleotídeos de 27 fitoplasmas, onde 16 seqüências representaram diferentes grupos de fitoplasmas e as demais corresponderam a vários representantes de subgrupos do grupo 16SrIII, demonstrou a relação existente entre estes

organismos (Figura 14). Os valores de 1000 vezes do teste de “Bootstrapping”, forneceram suporte aos agrupamentos formados. O fitoplasma associado à malformação das folhas da celosia ficou no mesmo braço do fitoplasma associado ao superbrotamento do chuchuzeiro, representante do subgrupo 16SrIII-J e se mostrou distinto dos demais grupos de fitoplasmas.

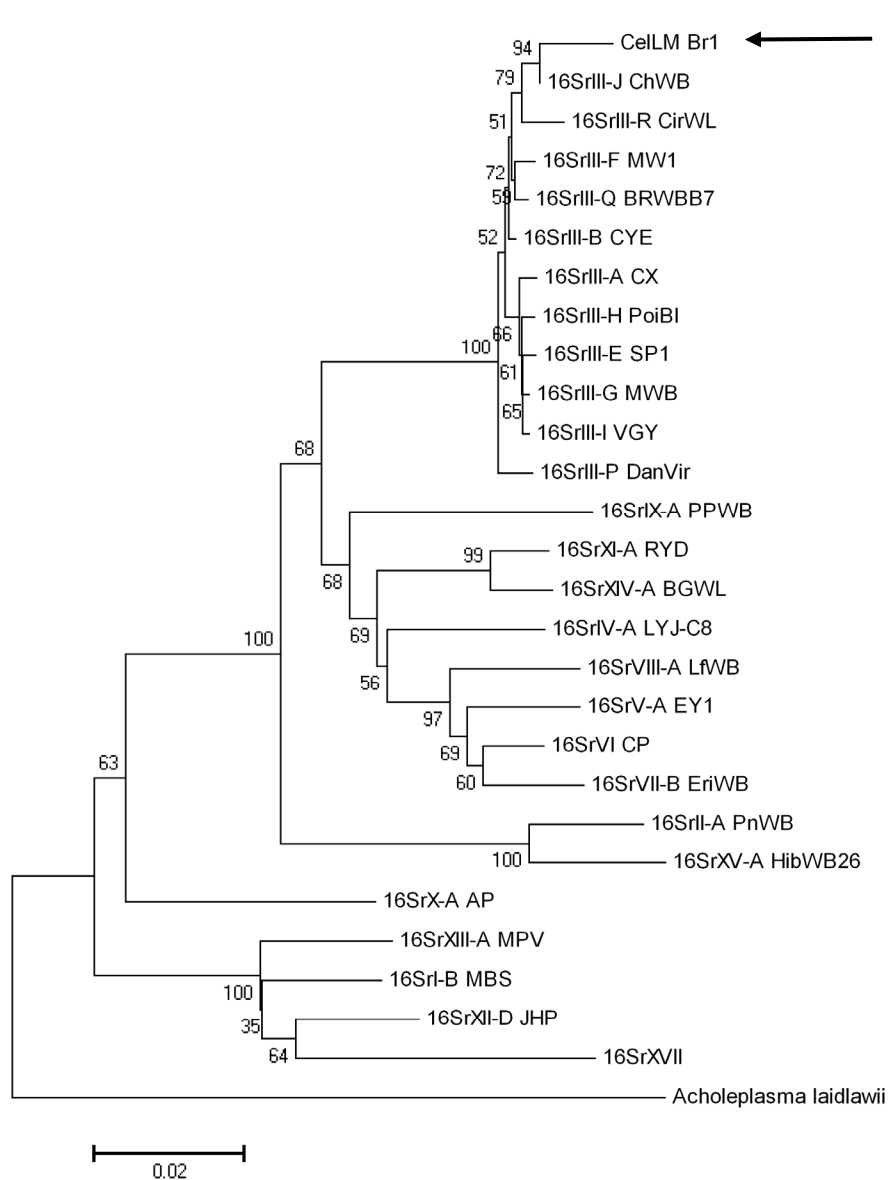


Figura 14 - Árvore filogenética construída com representantes de 16 diferentes grupos de fitoplasmas, 11 subgrupos representantes do grupo 16SrIII, o procarioto *Acholeplasma laidlawii*, e do fitoplasma associado à malformação das folhas da celosia (CelLM Br1). Os números nos ramos indicam os valores de confiança baseados no “Bootstrapping”

2.3.5 Teste de transmissão por cuscuta em casa de vegetação

O fitoplasma presente na planta fonte de crista-de-galo foi detectado nos tecidos da cuscuta 45 dias após o estabelecimento do contato entre elas. Com relação às plantas de vinca, o fitoplasma foi detectado em uma das duas plantas, três meses após o contato entre as plantas de crista-de-galo e vinca, feito através da cuscuta.

A fim de confirmar a identidade do fitoplasma, os produtos de PCR, obtido com o DNA extraído da planta de crista-de-galo, cuscuta e vinca foram submetidos à análise de RFLP com as enzimas *KpnI*, *RsaI*, *MboI*, *HpaII*, *MseI*, *AluI* e *HhaI*. Esta análise mostrou que os padrões de restrição apresentados pelo fitoplasma presente nas três plantas foram indistinguíveis entre si e do fitoplasma do superbrotamento do chuchu, confirmando sua identificação como um representante do grupo 16SrIII-subgrupoJ (Figura 15).

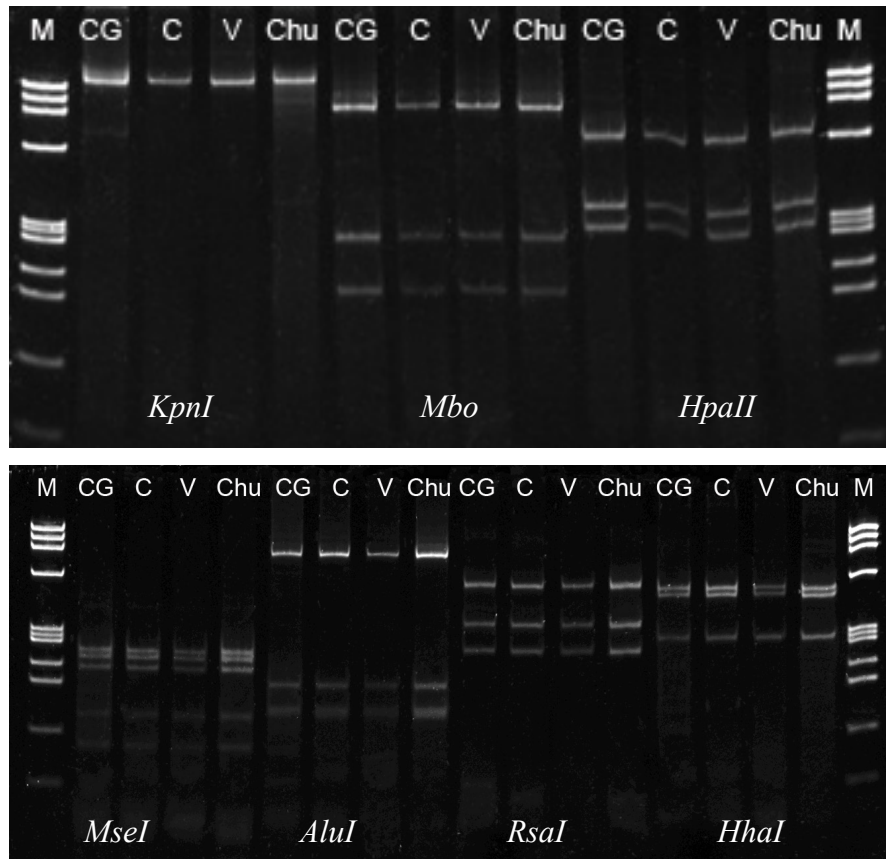


Figura 15 - Análise de RFLP do 16S rDNA de fitoplasmas do grupo 16SrIII detectados em plantas de crista-de-galo, cuscuta e vinca. M= Marcador PhiX174RFHaeIII; CG: Amostra CG 3 de crista-de-galo (*Celosia argentea*); C= Chu: padrão positivo representado pelo fitoplasma do grupo 16SrIII (Chuchu)

Os resultados dos testes de transmissão de fitoplasma para plantas da mesma espécie foram negativos. Embora a planta de crista-de-galo tenha apresentado sintomas de enfezamento, e leve deformação e redução foliar, quando comparada com uma planta não submetida ao teste de transmissão (Figura 16), não foi possível detectar a presença de fitoplasmas no tecido desta planta, mesmo realizando nove extrações de DNA ao longo do tempo. No entanto, existe a possibilidade da interferência de inibidores ou da baixa concentração do fitoplasma nos tecidos desta planta.



Figura 16 - Sintomas de enfezamento da planta de crista-de-galo submetida ao teste de transmissão por cuscuta (planta à direita)

3 CONCLUSÃO

Os estudos realizados neste trabalho, visando a detecção, identificação molecular e comprovação de patogenicidade de fitoplasmas associados a duas espécies de plantas do gênero da celosia, permitiram concluir que um fitoplasma do grupo 16SrIII, subgrupo J, estão consistentemente associados à doença denominada malformação das folhas de celosia, havendo evidências de que seja o possível agente causal da doença.

REFERÊNCIAS

- AMARAL MELLO, A.P.O. Tomato big bud associated with a phytoplasma belonging to group 16SrIII in Brazil. **International Journal of Pest Management**, London, v. 52, n. 3, p. 233-237, 2006.
- _____. **Identificação de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença**. 2007. 64 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- AMARAL MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; CAMARGO, L.E.A. Identidade molecular dos fitoplasmas associados aos enfezamentos do tomate e da berinjela com base na análise do gene 16S rDNA. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 113-118, 2007.
- AROCHA, Y.; LÓPEZ, M.; PIÑOL, B.; FERNANDEZ, M.; PICORNELL, B.; ALMEIDA, R.; PALENZUELA, I.; WILSON, M.R.; JONES, P. ‘*Candidatus* Phytoplasma graminis’ and ‘*Candidatus* Phytoplasma caricae’ two novel phytoplasmas associates with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 2451-2463, 2005.
- BABAIE, G.; KHATABI, B.; BAYAT, H.; RASTGOU, M.; HOSSEINI, A.; SALEKDEH, G.H. Detection and characterization of phytoplasmas infecting ornamental and weed plants in Iran. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, p. 368-37, 2007.
- BARROS, T.S.L.; DAVIS, R.E.; RESENDE, R.O.; DALLY, E.L. Erigeron witches’-broom phytoplasma in Brazil represents new Subgroup VII-B in 16S rDNA gene group VII the ash yellows phytoplasma group. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 10, p. 1142-1148, 2002.
- BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Detecção e caracterização de fitoplasmas em plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) e de pimenta (*Capsicum frutescens*) através das técnicas de duplo PCR e RFLP. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, n.3, p.197-201, 1999.
- _____. 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. 42, p. 73-76, 2000.
- BERGES, R.; ROTT, M.; SEMÜLLER, E. Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. **Phytopathology**, Dossenheim, v. 90, n. 10, p. 1145-1152, 2000.
- BERTACCINI, A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. **Frontiers of Bioscience**, Bologna, v.12, p. 673-689, Jan. 2007.
- BERTANI, G. Studies on lysogenesis. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 62, p. 293-300, 1951.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/cultivares/RNC_07_08_2006_72.htm>. Acesso em: 19 set. 2008.

CHRISTENSEN, N.M.; NICOLAISEN, M. HANSEN, M. SCHULZ, A. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 11, p. 1175-1184, 2004.

COUNCIL, L.; MENEGUZZI, N.; GALDEANO, E.; TORRES, L.; NOME, C.; NOME, S. Detection and molecular characterisation of an alfalfa phytoplasma in Argentina that represents a new subgroup in the 16S rDNA Ash Yellows group ('*Candidatus* Phytoplasma fraxini'). **European Journal of Plant Pathology**, Heidelberg, v. 113, p. 255-265, 2005.

DAVIS, R.E. Fitoplasmas: fitopatógenos procarióticos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 3, p. 1-27, 1995.

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**, Saint Paul, v. 85, p. 790-797, 2001.

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 group), and group 16SrIII, new subgroup. **Vitis**, Landau, v. 37, p. 131-137, 1998.

DENG, S.; HIRUKI, C. Amplification of a 16SrRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 14, p. 53-61, 1991.

DOI, Y.; TERANAKA, M.; YORA, K.; ASUYAMA, H. Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the floem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches broom, aster yellows, paulownia witches broom. **Phytopathology Society of Japan**, Tokyo, v. 33, p. 259-266, 1967.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry**, New York, v. 19, p. 11-15, 1987.

ECKSTEIN, B.E.; SILVA, E.G.; BEDENDO, I.P.; BRUNELLI, K. Primeiro relato da ocorrência de fitoplasmas em cultura do brócolis no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, p. 93, 2008. Suplemento.

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

GALVIS, C.A.; LEGIZAMÓN, J.E.; GAITÁN, A.L. Detection and identification of a group 16SrIII-related phytoplasma associated with coffee crispiness disease in Colombia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 3, p. 248-252, 2007.

GILL S.; BALGE, R.; DUTKEY, E.; MACLACHLAN, W.; KLINK, S. Production of Celosia as cut flowers. **Cooperative Extension Service Fact Sheet**, Maryland, n. 684, p. 1-8, 2007.

GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primers pair. **Phytopathology Mediterranea**, Bologna, v. 36, p. 144-151, 1996.

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

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 166, n. 4, 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**, London, v. 52, p. 147-157, 2003.

HARRISON, N.A.; MYRIE, W.; JONES, P.; CARPIO, M.L.; CASTILLO, M.; DOYLE, M.M.; OROPEZA, C. 16S rRNA interoperon sequence heterogeneity distinguishes strain populations of the palm lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 141, p. 183-193, 2002.

HEWITT, W.B. R.E. Smith: pioneer in phytopathology. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 41-50, 1987.

HIRUKI, C.; WANG, K. Clover proliferation phytoplasmas: '*Candidatus* Phytoplasma Trifolii'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1349-1353, 2004.

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

INTERNATIONAL RESEARCH PROGRAMME ON COMPARATIVE MYCOPLASMOLOGY. 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**, Reading, v. 54, p. 1243-1255, 2004.

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

KIRKPATRICK, B.C.; STENGER, D.C.; MORRIS, T.J.; PURCELL, A.H. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. **Science**, Washington, v. 238, n. 4824, p. 197-200, 1987.

KIRKPATRICK, B.C.; SMART, G.; GARDNER, S.; GAO, J.L.; AHRENS, U.; MAURER, R.; SCHNEIDER, B.; LORENZ, K.H.; SEEMÜLLER, E. HARRISON, N.A.; NAMBA, S.; DAIRE, X. Phylogenetic relationships of plant pathogenic MOLs established by 16S/23S rDNA spacer sequences. **IOM letters**, Alabama, v. 3, p. 228-229, 1994.

KITAJIMA, E.W. Enfermidades de plantas associadas a organismos do tipo micoplasma. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 153-174, 1994.

LEE, I-M; DAVIS, R.E.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Phytoplasma: phythopatogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, Washington, v. 54, p. 221-252, 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 ribosomal protein gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 48, p. 1153-1169, 1998.

LEE, I-M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; HAMMOND, R.W.; DAVIS, R.E. Use of mycoplasma-like organisms (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested PCR assay to detect mixed MLO infection in a single host plant. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 559-566, 1994.

LEE, I-M.; MARTINI, M.; MARCONE, C.; ZHU, S. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 337-347, 2004a.

LEE, I-M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; DAVIS, R.E.; BOTTNER, K.D.; MARCONE, C.; SEEMÜLLER, E. 'Candidatus Phytoplasma asteris' a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1037-1048, 2004b.

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

LURIA, S.E.; BURROUS, J.W. Hybridization between *Escherichia coli* and Shigella. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 74, p. 461-476, 1957.

MARTINI, M.; LEE, I-M.; BOTTNER, K.D.; ZHAO, Y.; BOTTI, BERTACCINI, A.; HARRISON, N.A.; CARRARO, L.; MARCONE, C.; KLAN, J.; OSLER, R. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 2037-2051, 2007.

McCORMACK, G. **Cook Islands Biodiversity Database, Version 2007.2**. Disponível em: <<http://cookislands.bishopmuseum.org>>. Acesso em: 05 set. 2008.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T.; PIMENTEL, J.P.; FIGUEIREDO, D.V.; CUNHA JUNIOR, J.O. Cucurbita moschata, new phytoplasma host in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, p. 226, 2006.

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 chayote in Brazil. **Plant disease**, Saint Paul, v. 84, p. 429-436, 2000.

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

NAMBA, S.; OYAIZU, H.; KATO, S.; IWANAMI, S.; TSUCHIZAKI, T. Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 43, p. 461-467, 1993.

NATIONAL GARDEN BUREAU. *Celosia (Celosia cristata)*. Horticulture Update, 2007. Disponível em: <<http://aggiehorticulture.tamu.edu/extension/newsletters/hortupdate/apr06/Celosia.html>>. Acesso em: 04 jul. 2008.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Lost crops of Africa**. Washington: National Academic Press, 2006. v. 2.

NERONI, R.C.; BEDENDO, I.P. KUNIYUKI, H. Fitoplasmas associados com sintomas do tipo amarelo em videira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, p. 45, 2006. Suplemento.

OLUPO, J.R.; OSIRU, D.S.O.; ORYOKOT, J.; GEBREKIDAN, B. The effectiveness of *Celosia argentea* (Striga "chaser") to control *Striga* on sorghum in Uganda. **Crop Protection**, Alberta, v. 22, p. 463-468, 2003.

OWOLABI, T.A.; TAIWO, M.A.; THOTTAPPILLY, G.A.; PROLL, E. RABENSTEIN, F. Properties of a virus causing mosaic and leaf curl disease of *Celosia argentea* L. in Nigeria. **Acta Virologica**, Bratislava, v. 42, n. 3, p. 133-139, 1998.

RAPUSSI, M.C.C.; BEDENDO, I.P. Enfezamento da couve-flor associado a fitoplasma do grupo 16SrIII. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, p. 91, 2008. Suplemento.

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

RIBEIRO, L.F.C.; BEDENDO, I.P. Associação constante de um fitoplasma do grupo II com o superbrotamento da maracujazeiro cultivado em diversas regiões brasileiras. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 33. p. 60, 2007. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 30., 2007, Jaboticabal.

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.; GIÓGIA, R. Phytoplasmas associated with shoot proliferation in begônia. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, p. 475-477, 2006.

ROMEIRO, R.S. Fitobactérias de ocorrência mais comum no Brasil. In: _____. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa: Ed.UFV, 2005. p. 397-415.

SAMUITIENÉ, M.; NAVALINSKIENÉ, M. Molecular detection and characterization of phytoplasma infecting *Celosia argentea* L. plants in Lithuania. **Agronomy Research**, Tartu, v. 4, p. 345-348, 2006.

SAWAYANAGI, T.; HORIKOSHI, N.; KANEHIRA, T.; SHINOHARA, M.; BERTACCINI, A.; COUSIN, M.T.; HIUKI, C.; NAMBA, S. 'Candidatus Phytoplasma japonicum', a new phytoplasma taxon associated with Japanese hydrangea phyllody. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 49, p. 1475-1285, 1999.

SEEMÜLLER, E.; SCHNEIDER, B. 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit decline, respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p.1217-1226, 2004.

SILVA, E.G. **Identificação de fitoplasmas associados à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar e ao superbrotamento da primavera (*Bougainvillea spectabilis*) no Estado de São Paulo**. 2008. 98 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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

TANNE, E.; KUZNETSOVA, L.; COHEN, J.; ALEXANDROVA, S.; GERA, A. Phytoplasmas as causal agents of Celosia disease in Israel. **HortScience**, Palo Alto, v. 35, n. 6, p. 1103-1106, 2000.

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

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

APÊNDICE

APÊNDICE A - Sequência parcial do gene 16S rDNA do fitoplasma associado à malformação das folhas de celosia, presente na planta CG4

```
AACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAAAGTAAGGGCATCTTTACTTTTTTAAAAGACCTTCTTTGA
AGGTATGCTTAAGGAGGGGCTTGGCAGACATTAGTTAGTTGGCAGGGTAAAGGCCTACCAAGAC
TATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAATC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGGGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGT
GAACGATGAAGTACCTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTAAGGAAGAAAAAAGAGTGGAAAAACT
CCCTTGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAA
GGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTTAATAAGTCTATAG
TTAATTTCAGCGCTTAACGCTGTTGTGCTATAGAAACTGTTTTACTAGAGTGAGTTAGAGGCAA
GCGGAATTCCATGTGTAGCGGTA AAAATGCATAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTANGCGG
CTTGCTGGGACTTTACTGACGCTGGAGCACGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCAGGTA AAAACCGGTA CTGAAGTTAACACA
TTAAGTACTCCGCTTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCG
CACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATT
TTCTTGCGAAGTTATAGAAATATAATGAAGTTATCAGGAAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC
AGCTCGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTTCTAAAACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAATTGCCAG
CGTGTAATGATGGGGACTTTAACGAGACTGCCAATGAAAAATTGGAGGAAGGTGGGGATTACGC
CAAATCATCATGCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGTTGATACAAAGAGTAG
CTGAAACGCGAGTTCTTAGCCAATCTCACAAAATCAATCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTC
GACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTACCG
GGTTTGTACACACCGCCCGTCAAATCACTA
```

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](#)