

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

**Enfezamento da couve-flor: identificação molecular de fitoplasmas,
evidência de potencial vetor e análise epidemiológica da doença**

Maria Cristina Canale Rappussi-da-Silva

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Maria Cristina Canale Rappussi-da-Silva
Engenheiro Agrônomo

**Enfezamento da couve-flor: identificação molecular de fitoplasmas,
evidência de potencial vetor e análise epidemiológica da doença**

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2010

*A Deus
Porque tudo vem de Ti; e das tuas próprias mãos, te dou.*

*Ao meu esposo, Emerson
À minha mãe, Márcia
À minha irmã, Carol
Por todo amor e afeto*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo pela orientação, amizade e por ser um exemplo que contribuiu com minha vida pessoal e profissional.

À Prof. Dra. Lilian Amorim pela orientação e confiança para a realização da parte epidemiológica deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes pelas ideias quanto aos experimentos de transmissão.

Ao Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka, pelas orientações quanto a parte de microscopia e pelo incentivo e amizade durante este período.

Ao Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati, pelos meus primeiros passos na ciência, amizade e orientações pessoais. Ao Prof. Dr. Armando Bergamim Filho, pela simpatia e experiência que conquistaram a minha admiração.

À Dra. Kátia Bruneli, da Sakata, pelo companheirismo nas viagens à procura de campos de cultivos de couve-flor e pelo envio de amostras.

À Dra. Kéti Maria Rocha Zanol, da Universidade Federal do Paraná, pela identificação das cigarrinhas.

Ao agricultor Claudenir, de Sorocaba, pela amizade e ensinamentos de campo.

Ao meu pai, Wilson e aos meus sogros Roberto e Maria José, pelos preciosos momentos em família.

Ao grande amigo Marcos César, pelo carinho e amizade em qualquer momento.

Aos membros da Igreja Batista Nova Vida, lugar de encontro com Deus, em especial nas pessoas do Pastores Marcílio e Sônia. À querida discipuladora Milze, que dedicou seu tempo para me auxiliar.

Aos colegas de laboratório Ana Paula de Oliveira Amaral Mello, Bárbara Eckstein, Eliane Gonçalves da Silva, Daniela Flôres e Isolda Cristina Ruschel Haas (irmãzinhas), Luciano de Aquino Melo e Raquel Neroni. Aos colegas de departamento André Beltrame, Ely Garcia, Júlio César Barbosa, Leonardo Toffano, Maurício Fialho, Maria Cândida Gasparoto, Maria Eugênia Escanferla, Marizete Pimentel (*in memoriam*), Nívea Tonucci, Patrícia Cia e Solange Bonaldo, que são amigos certamente inesquecíveis.

Aos professores do departamento de fitopatologia e aos funcionários Edivaldo, Jéferson, Silvia, Angélica, Sirlene e Carmen. À Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', ESALQ, onde me graduei e cursei o Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa de doutorado concedida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	18
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 DESENVOLVIMENTO.....	23
2.1 Revisão Bibliográfica.....	23
2.1.1 A cultura da couve-flor.....	23
2.1.2 Fitoplasmas.....	24
2.1.3 Enfezamento em brássicas e identificação de fitoplasmas.....	26
2.1.4 Transmissão de fitoplasmas.....	27
2.1.5 Análise epidemiológica.....	28
2.2 Material e Métodos.....	30
2.2.1 Coleta de amostras de couve-flor.....	30
2.2.2 Extração de DNA total.....	32
2.2.2.1 Extração rápida.....	32
2.2.2.2 Extração com ‘kit’ comercial.....	33
2.2.3 Condições de PCR.....	33
2.2.4 Identificação molecular através de PCR e RFLP.....	34
2.2.5 Sequenciamento do 16S rDNA de fitoplasmas.....	35
2.2.5.1 Purificação do DNA.....	35
2.2.5.2 Clonagem do 16S rDNA de fitoplasma.....	36
2.2.5.3 Extração do DNA plasmidial.....	37
2.2.5.4 Análise filogenética e de sítios putativos de restrição.....	38
2.2.6 Detecção e identificação de fitoplasmas em cigarrinhas.....	40
2.2.7 Microscopia de luz.....	40
2.2.8 Transmissão de fitoplasmas por insetos.....	40
2.2.9 Transmissão de fitoplasmas através da cuscuta.....	41
2.2.10 Análise epidemiológica.....	42

2.2.10.1 Local e coleta de dados.....	42
2.2.10.2 Definição de ‘quadrats’	42
2.2.10.3 Cálculo do índice de dispersão.....	42
2.2.10.4 Lei de Taylor modificada.....	43
2.2.10.5 Cálculo das áreas isópatas.....	43
2.3 Resultados e discussão.....	44
2.3.1 Detecção de fitoplasmas em couve-flor.....	44
2.3.2 Identificação de fitoplasma através de PCR.....	47
2.3.3 Identificação de fitoplasmas através de análise de RFLP.....	48
2.3.4 Sequenciamento, análise virtual de RFLP e análise de sítios putativos de restrição..	54
2.3.5 Análise filogenética.....	59
2.3.6 Microscopia de luz.....	63
2.3.7 Detecção e identificação de fitoplasmas em cigarrinhas.....	65
2.3.8 Transmissão do fitoplasmas por cigarrinhas.....	70
2.3.9 Transmissão de fitoplasmas através da cuscuta.....	74
2.3.10 Análise epidemiológica.....	78
2.3.10.1 Distribuição espacial.....	78
2.3.10.2 Índice de dispersão e aplicação da lei de Taylor modificada.....	82
2.3.10.3 Determinação das áreas isópatas.....	87
3 CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS.....	91
APÊNDICES.....	101

RESUMO

Enfezamento da couve-flor: identificação molecular de fitoplasmas, evidência de potencial vetor e análise epidemiológica da doença

A couve-flor está entre as folhosas mais produzidas na região do Cinturão Verde de São Paulo. A planta apresenta alto valor nutricional para os consumidores e relevante importância econômica e social para os agricultores. Em campos comerciais, têm sido observadas plantas exibindo sintomas de enfezamento e deformação da inflorescência, além da necrose dos vasos condutores. A doença foi denominada de enfezamento e a sua incidência e severidade têm se tornado mais intensas nos últimos anos, afetando a produção e levando ao abandono do cultivo. O quadro sintomatológico levantou a suspeita de que a doença pudesse estar sendo causada por fitoplasmas. Desta forma, este trabalho teve como objetivos detectar e identificar os fitoplasmas associados às plantas doentes de couve-flor, demonstrar a sua patogenicidade, buscar possíveis insetos vetores do agente patogênico e analisar a distribuição espacial da doença no campo. Amostras de plantas coletadas na região do Cinturão Verde ou enviadas de outras localidades tiveram o DNA total extraído e submetido a reações de PCR. A amplificação de fragmentos genômicos de 1,2 kb evidenciaram a presença de fitoplasmas nos tecidos de 66% das plantas sintomáticas. A detecção de fitoplasmas em plantas assintomáticas revelou a ocorrência de infecção latente e que plantas sem sintomas aparentes podem ser portadoras do patógeno. O emprego de PCR com primers específicos, análises convencionais e virtuais de RFLP e análise filogenética permitiram a identificação de fitoplasmas afiliados aos grupos 16SrIII-J, 16SrXIII e 16SrXV-A, com predominância para a ocorrência do grupo 16SrIII. Secções histológicas feitas à mão da região vascular de plantas de couve-flor doentes observadas em microscópio de luz revelaram que a região do floema apresentava-se escurecido e com início de degeneração celular. Fitoplasmas do grupo 16SrXIII foram encontrados em cigarrinhas da espécie *Balclutha hebe* coletadas em campo cultivado com couve-flor. Estes insetos foram utilizados em experimentos de transmissão e foram capazes de inocular fitoplasmas em plantas saudáveis de couve-flor e vinca. A transmissão também ocorreu a partir de plantas doentes de couve-flor para plantas saudáveis de vinca, através do emprego da planta parasita cuscuteira. Análise epidemiológica da doença foi feita em dez campos de cultivo de couve-flor, localizados no município de Sorocaba-SP. Análises do índice de dispersão, lei de Taylor modificada e áreas isopatas evidenciaram que plantas de couve-flor com sintomas de enfezamento encontraram-se agregadas no campo, e que os focos da doença tinham início nos bordos da cultura. O presente trabalho demonstrou que o enfezamento da couve-flor está associado aos fitoplasmas, os quais podem estar sendo transmitidos por cigarrinhas, sendo que, em termos epidemiológicos, a doença tem padrão agregado de distribuição no campo.

Palavras-chave: PCR; RFLP; Análise filogenética; Transmissão; Cigarrinhas; Cuscuteira; Epidemiologia

ABSTRACT

Cauliflower stunt: molecular identification of phytoplasmas, evidence of potential vector and epidemiological analysis of the disease

Cauliflower is among the most produced vegetable in the region of the Green Belt of Sao Paulo State. It has high nutritional value and relevant social and economic importance for farmers. In commercial fields, it has been observed plants exhibiting symptoms of stunting, deformation of the inflorescence and conductive vessel necrosis. The disease was named cauliflower stunt and its incidence and severity have become more intense in the past years, the production is being affected and the field is abandoned by the growers. The symptomatology raised the suspect that the disease could be caused by phytoplasmas. Thus, this study aimed to detect and identify phytoplasmas associated to diseased cauliflowers, demonstrate its pathogenicity, look for possible insect vectors of the pathogen and analyse the spatial distributions of disease in the field. Plant samples collected in the region of the green belt or sent from other locations had the total DNA extracted and subjected to PCR reactions. Amplification of genomic fragments of 1.2 kb revealed the presence of phytoplasmas in 66% of the symptomatic plants. The detection of phytoplasmas in asymptomatic plants revealed the occurrence of latent infection and that plants without visible symptoms may be infected. The use of specific primers, conventional and virtual RFLP analysis and phylogenetic analysis allowed the identification of phytoplasmas affiliated to 16SrIII-J, 16SrXIII and 16SrXV-A groups, and predominantly the occurrence of 16SrIII group. Histological sections made by hand of the vascular region of symptomatic cauliflower were observed under light microscope and revealed that the phloem was darkened and with beginning of cellular degeneration. The 16SrXIII phytoplasma was found in *Balclutha hebe* from cauliflower field. These insects were used in experiments and were able to transmit phytoplasmas to healthy cauliflower and periwinkle. The transmission also occurred from diseased cauliflower to healthy periwinkle through the parasitic plant dodder. Epidemiological analysis of the disease was made in ten plots of cauliflower, located in Sorocaba, SP. Dispersion index, modified Taylor's law and isopath areas analysis showed that cauliflower plants with symptoms of stunting were aggregated in field and initial foci were at the edge of the plot. This study demonstrated that cauliflower stunt is associated with phytoplasmas, that may be being transmitted by insects (Homoptera) and, in epidemiological terms, the diseased plants show aggregated pattern of distribution in the field.

Keywords: PCR;RFLP; Phylogenitic analysis; Transmission; Leafhoppers; Dodder; Epidemiology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Aspecto geral de um campo cultivado com couve-flor em Sorocaba-SP. 2- Planta sadia, com inflorescência normal. 3- Planta doente, com deformação da inflorescência. 4- Planta com sintomas de enfezamento, inflorescência deformada e avermelhamento parcial das folhas. 5- Parte de planta doente com proliferação de brotos laterais. 6- Presença de anel escurecido em corte transversal da haste de plantas doentes. 7- Escurecimento da região dos vasos condutores, em corte longitudinal da haste.....31
- Figura 2- Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas presentes em plantas sintomáticas de couve-flor, através de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint e R16 F2n/R2. Colunas: (M) marcador molecular 1 kb Ladder; (P+) controle positivo; amostras de couve-flor de Bragança Paulista (Br1 e Br2), Ibiúna (Ib1 e Ib2), Morungaba (Mb1 a Mb3); Sorocaba (Sr3 a Sr5) e Nova Bassano (Nb1 a Nb3); (P-) controle negativo.....46
- Figura 3- Padrões obtidos por análise de RFLP do fragmento genômico amplificado de fitoplasmas encontrados em amostras de plantas de couve-flor coletadas em Bragança Paulista e Sorocaba, utilizando-se as enzimas de restrição *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, *MboI* e *Bsh1236I*. Colunas: (M) marcador molecular PhiX174RFHaeIII; (P) controle positivo representado por fitoplasma do enfezamento do repolho (subgrupo 16SrIII-J); (Br1 e Br2) amostras de couve-flor provenientes de Bragança Paulista; (Sr3 e Sr5) amostras de couve-flor provenientes de Sorocaba.....50
- Figura 4- Padrões obtidos por análise de RFLP do fragmento genômico amplificado de fitoplasmas encontrados em amostras de plantas de couve-flor coletadas em Morungaba-SP, utilizando-se as enzimas de restrição *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, *MboI* e *Bsh1236I*. Colunas: (M) marcador molecular PhiX174RFHaeIII; (P) amostra de vinca infectada com fitoplasma do grupo 16 SrIII; (Mb1) amostra de couve-flor infectada por fitoplasma do grupo 16SrIII; (Mb2 e Mb3) amostras de couve-flor infectadas por fitoplasmas do grupo 16SrXIII.....51
- Figura 5- Padrões obtidos por análise de RFLP do fragmento genômico amplificado de fitoplasmas encontrados em amostras de plantas de couve-flor coletadas em Nova Bassano-RS, utilizando-se as enzimas de restrição *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, *MboI*, *Bsh1236I*, *HaeIII*, *BfaI* e *HinfI*. Colunas: (M) marcador molecular PhiX174RFHaeIII; (P) amostra de vinca infectada com fitoplasma do grupo 16 SrIII; Colunas (Nb1 e Nb2) amostras de couve-flor infectadas por fitoplasmas do grupo 16SrXV-.....52

- Figura 6- Padrões virtuais de RFLP obtidos pela digestão enzimática do 16S rDNA de fitoplasma do grupo 16SrIII-J identificado na amostra Sr5 de planta de couve-flor (Gel A) e do fitoplasma do enfezamento do chuchu, cuja sequência está depositada no GenBank (AF147706) (Gel B). Sítios de restrição foram reconhecidos pelas enzimas: *AluI*, *BstUI*, *HhaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI* e *RsaI*. Marcador de peso molecular MW=PhiX174DNA-*HaeIII*.....56
- Figura 7- Análise de sítios putativos de restrição do 16S rDNA de fitoplasma do grupo 16SrIII-J identificado na amostra Sr5 de planta de couve-flor (Mapa de restrição A) e do fitoplasma do enfezamento do chuchu, cuja sequência está depositada no GenBank (AF147706) (Mapa de restrição B).....56
- Figura 8- Padrões virtuais de RFLP obtidos pela digestão enzimática do 16S rDNA de fitoplasma do grupo 16SrXIII identificado na amostra Mb2 de planta de couve-flor (Gel A) e do fitoplasma da necrose do topo do mamoeiro, cuja sequência está depositada no GenBank (EU719111) (Gel B). Sítios de restrição foram reconhecidos pelas enzimas: *AluI*, *BstUI*, *HhaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI* e *RsaI*. Marcador de peso molecular MW=PhiX174DNA-*HaeIII*.....57
- Figura 9- Análise de sítios putativos de restrição do 16S rDNA de fitoplasma do grupo 16SrXIII identificado na amostra Mb2 de planta de couve-flor (Mapa de restrição A) e do fitoplasma da necrose do topo do mamoeiro, cuja sequência está depositada no GenBank (EU719111) (Mapa de restrição B).....57
- Figura 10- Padrões virtuais de RFLP obtidos pela digestão enzimática do 16S rDNA de fitoplasma do grupo 16SrXV identificado na amostra Nb1 de planta de couve-flor (Gel A) e do fitoplasma do superbrotaamento do hibisco, cuja sequência está depositada no GenBank (AF147708) (Gel B). Sítios de restrição foram reconhecidos pelas enzimas: *AluI*, *BstUI*, *HhaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI* e *RsaI*. Marcador de peso molecular MW=PhiX174DNA-*HaeIII*.....58
- Figura 11- Análise de sítios putativos de restrição do 16S rDNA de fitoplasma do grupo 16SrXV identificado na amostra Nb1 de planta de couve-flor (Mapa de restrição A) e do fitoplasma do superbrotaamento do hibisco, cuja sequência está depositada no GenBank (AF147708) (Mapa de restrição B).....59
- Figura 12- Árvore filogenética construída com representantes de 18 diferentes grupos de fitoplasma, 17 subgrupos representantes do grupo 16SrIII, 4 representantes do grupo 16SrXIII e um representante do grupo 16SrXV, o procarioto *Acholeplasma laidlawii* e fitoplasmas da couve-flor, pelo método ‘Neighbor-Joining’. Os números nos ramos representam valores de confiança no ‘bootstrapping’.....61

- Figura 13- Micrografia de luz da região vascular de plantas de couve-flor. 1. Sintoma de escurecimento da região dos feixes vasculares (seta) em caule de couve-flor coletados em campo. 2. Secção transversal da região vascular de planta sadia. 3. Secção transversal da região vascular de planta doente, com sintomas de escurecimento do floema e degeneração celular em regiões adjacentes ao floema (seta). 4. Detalhe da região vascular de couve-flor doente (seta). Floema (F), procâmbio (p), xilema (X) e parênquima (p).....64
- Figura 14- Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas presentes em cigarrinhas dos grupos de morfotipos 1 e 2. Colunas: (M) marcador molecular 1 kb Ladder; (1) amostra de cigarrinhas *Balclutha hebe*; (2) amostra de cigarrinhas *Exitianus obscurinervis*; P(-) padrão negativo representado por um inseto Deltoccephalinae coletado na área; P(+) controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasmas.....66
- Figura 15- Cigarrinhas coletadas em cultura de couve-flor, representantes de dois grupos de morfotipos, nos quais foram detectados fitoplasmas. 1. Exemplar de *Balclutha hebe*; 2. Exemplar de *Exitianus obscurinervis* (Fonte: www.bugguide.net).....66
- Figura 16- Padrões de restrição gerados pela análise virtual de RFLP do 16S rDNA do fitoplasma associado ao enfezamento da couve-flor, encontrado em cigarrinhas da espécie *B. hebe*.....68
- Figura 17- Análise dos sítios putativos de restrição do 16S rDNA do fitoplasma associado ao enfezamento da couve-flor, encontrado em cigarrinhas da espécie *B. hebe*.....68
- Figura 18- Árvore filogenética construída com representantes de 18 diferentes grupos de fitoplasma, 4 representantes do grupo 16SrXIII, o fitoplasma encontrado em *B. hebe* e o procarioto *Acholeplasma laidlawii*, utilizando o método de ‘Neighbor-Joining’. Os números nos ramos representam valores de confiança no ‘bootstrapping’.....69
- Figura 19- Ensaio de transmissão de fitoplasmas por meio de cigarrinhas das espécies *Balclutha hebe* e *Exitianus obscurinervis*. 1. Os insetos foram confinados sobre mudas de couve-flor em gaiolas feitas com garrafas plásticas. 2. Detalhe da cigarrinha sobre a planta.....72

- Figura 20- Detecção de fitoplasmas em plantas de couve-flor, transmitidos por insetos coletados no campo. As ampliações do 16S rDNA foram obtidas por duplo PCR com os iniciadores P1/Tint e R16 F2n/R2. Gel A: colunas de 1-5 representam amostras compostas de couve-flor submetidas a insetos de *B. hebe*; colunas de 5-6 representam amostras compostas de couve-flor submetidas a insetos da espécie *E. obscurinervis*. Gel B: amostra de planta de vinca (V) positiva para a presença de fitoplasma submetida à transmissão por insetos da espécie *B. hebe*. Para os géis A e B: (M) marcador molecular 1 kb Ladder; (P-) controle negativo representado por planta de vinca sadia; (P+) controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasmas.....73
- Figura 21- Identificação de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII em plantas de couve-flor e vinca para as quais foram transmitidos fitoplasmas por insetos da espécie *B. hebe* coletados no campo. Amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint na primeira reação e R16(I)F1/R1 e R16(III)F2/R1 na segunda reação. Colunas: (M) marcador molecular 1 kb Ladder; (V) planta de vinca; (3) plantas de couve-flor; (P-) padrão negativo representado por planta de vinca sadia; (P+) padrão positivo representado por planta de vinca.....73
- Figura 22- Transmissão de fitoplasmas, através da cuscuta, a partir de plantas de couve-flor infectada para plantas sadias de vinca. 1 e 2 - Estabelecimento da cuscuta em planta doente de couve-flor. 3 - Presença de clorose foliar e superbrotamento em planta de vinca induzidos por fitoplasmas.....76
- Figura 23- Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas através de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint e R16 F2n/R2, confirmando a transmissão de fitoplasmas a partir de plantas de couve-flor infectadas para plantas sadias de vinca. Colunas: (M) marcador 1 kb Ladder; plantas de vinca (V1 e V2) associadas à planta de couve-flor Cf1 através da cuscuta; planta de vinca (V3) associada à planta de couve-flor Cf2 através da cuscuta; (V) planta de vinca sadia; (P+) planta de vinca infectada previamente por fitoplasmas.....77
- Figura 24- Amplificação do 16Sr DNA de fitoplasmas presentes em plantas de vinca, através de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint na primeira reação e R16(I)F1/R1 e R16(III)F2/R1 na segunda reação, para identificação de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII, respectivamente, em plantas de vinca positivas para a transmissão de fitoplasmas feita por meio da cuscuta. Colunas: (M) marcador molecular 1 kb Ladder; (V1, V2, V3) vinca; (P+) padrões positivos representados por vincas infectadas por fitoplasmas dos grupos 16SrI (1,1 kb) e 16SrIII (0,8 kb).....77

- Figura 25- Padrão espacial de couve-flor com sintomas de enfezamento em dez áreas de plantio. Quadrados pretos indicam plantas sintomáticas e quadrados brancos, plantas assintomáticas.....79
- Figura 26- Relação entre os logaritmos da variância da incidência observada e da variância binomial teórica para a dinâmica espacial do enfezamento da couve-flor ('quadrat' 4x4). Dados de dez campos analisados em conjunto. A linha cheia representa a relação $\log (V_{obs}) = \log (A) + b \log (V_{bin})$. Log (A) é diferente de zero ($p < 0,05$) e b é diferente de 1. A linha pontilhada representa a situação hipotética de aleatoriedade.....84
- Figura 27- Áreas isópatas dos dez campos de campos de couve-flor com sintomas de enfezamento. As cores indicam variação nos valores de incidência, ou seja, verde para menor incidência e vermelho para maior incidência, além das cores intermediárias.....88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação das amostras de couve-flor, locais de origem e período de coleta.....	32
Tabela 2- Relação das amostras de couve-flor portadoras de fitoplasmas, os quais foram usados para os procedimentos de clonagem e sequenciamento do 16S rDNA.....	36
Tabela 3- Sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA representantes de fitoplasmas estudados no presente trabalho e dos 18 grupos e de subgrupos dos grupos 16SrIII e 16SrXIII, acessadas no GenBank (NCBI) e utilizadas para a construção da árvore filogenética.....	39
Tabela 4- Análise de amostras de couve-flor coletadas de plantas sintomáticas e assintomáticas visando à detecção de fitoplasmas através de PCR.....	45
Tabela 5- Relação das amostras de couve-flor sintomáticas e assintomáticas analisadas quanto a presença de fitoplasmas através de PCR e identificadas através da utilização de primers específicos para grupo, RFLP ou sequenciamento.....	62
Tabela 6- Incidência em proporção (<i>p</i>) e índices de dispersão (<i>D</i>) em diferentes divisões em ‘quadrats’ do enfezamento da couve-flor em dez áreas analisadas.....	84
Tabela 7- Parâmetros A e b da lei de Taylor modificada e R ² calculados para cada ‘quadrat’	84

1 INTRODUÇÃO

As hortaliças apresentam importância quanto ao valor nutricional, econômico e social. O consumo de hortaliças significa hábito sadio de alimentação. O setor coopera para a geração de empregos, fixação do homem no campo, a possibilidade de permanência do produtor na atividade, assim como estabilidade econômica e social das regiões produtoras. É, portanto, fundamental para o fortalecimento da agricultura familiar e o desenvolvimento regional. A couve-flor está entre as folhosas mais produzidas e comercializadas na região do Cinturão Verde de São Paulo.

Plantas de couve-flor cultivadas na região do Cinturão Verde da Cidade de São Paulo têm exibido sintomas de enfezamento e deformação da inflorescência, além da necrose dos vasos condutores. O problema ocorre desde o ano 2000 e nos últimos anos a frequência e a severidade da doença aumentou. Incidências de até 90% já foram observadas em plantios comerciais. As plantas doentes têm sido descartadas por não apresentarem padrão para comercialização. Alguns produtores, desanimados, chegam a abandonar o cultivo.

Tentativas de isolamento a partir de plantas sintomáticas foram exaustivamente realizadas nos primeiros anos de aparecimento da doença na região, porém sem sucesso para patógenos de natureza fúngica e bacteriana. Também não se constatou a presença de partículas de vírus nos tecidos de plantas doentes. Assim, com base na sintomatologia e na ausência de patógenos fúngicos, bacterianos e virais, levantou-se a hipótese da doença estar associada aos fitoplasmas.

Trabalhos anteriores já haviam demonstrado a associação de fitoplasmas com doenças de brássicas. A primeira associação entre fitoplasmas e o enfezamento em couve-flor foi relatada na Itália por Bertaccini; Pisi; Marani (1983). Problema semelhante ao observado em couve-flor já foi objeto de estudo em repolho, também cultivado no Cinturão Verde de São Paulo (AMARAL MELLO, 2007). Fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII foram associados ao enfezamento nesta cultura, enquanto estudos epidemiológicos mostraram que a doença tem padrão agregado de distribuição espacial e, ainda, que cigarrinhas da subfamília Deltocephalinae eram portadoras dos mesmos fitoplasmas encontrados no repolho.

Rotineiramente, fitoplasmas são detectados em plantas pela amplificação da sequência de nucleotídeos da região do 16S rDNA, através da aplicação de PCR. A classificação destes patógenos em grupos específicos tem sido feita com base na técnica de RFLP (Restriction

Fragment Length Polymorphisms), empregando-se diversas enzimas de restrição pré-estabelecidas. De maneira geral, escassos são os conhecimentos sobre insetos vetores de fitoplasma no Brasil e sobre os aspectos relacionados à epidemiologia das doenças causadas por este tipo de agente patogênico. Especificamente para couve-flor, não foram encontradas informações anteriores sobre a doença aqui denominada de enfezamento.

Desta forma, este trabalho buscou ampliar os conhecimentos sobre a doença, os quais talvez possam servir de base para o desenvolvimento de estratégias de manejo. Para isto, teve como objetivos: detectar e identificar os fitoplasmas associados às plantas doentes de couve-flor; demonstrar transmissão do fitopatógeno para plantas sadias através de insetos e da planta parasita *cuscuta*; determinar possíveis insetos vetores dos fitoplasmas envolvidos com a doença; e analisar a distribuição espacial da doença no campo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 A cultura da couve-flor

A couve-flor pertence à divisão Dicotyledonae, família Brassicaceae, espécie *Brassica oleracea* var. *botrytis*. Originária da Ásia Menor foi levada à Europa no séc. XVI e introduzida no Brasil no século XIX (MAY et al., 2007). A planta possui é fonte de sais minerais, entre eles o potássio, e de vitaminas A e do complexo B, além de possuir poucas calorias e muita fibra. A parte comestível é composta por inflorescência imatura inserida sobre um caule curto (MAY et al., 2007).

No Brasil, a couve-flor é mais cultivada nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina (MAY et al., 2007). Entre as brássicas, a couve-flor é uma das mais comercializadas em São Paulo e, neste Estado, as principais produções situam-se nas regiões de Sorocaba e Mogi das Cruzes (REVISTA RURAL, 2004). Em 2007, 10.899 toneladas de couve-flor foram comercializadas no CEAGESP-SP, ao preço de 1,47 reais o quilo (FNP, 2009).

Exigente em baixas temperaturas para formar “cabeças”, o cultivo da couve-flor torna-se restrito a regiões de temperaturas mais amenas. No entanto, cultivares adaptadas a regiões mais quentes permite a produção desta hortaliça durante o ano todo (BLANCO et al., 1997).

A região do Cinturão Verde da Cidade de São Paulo localiza-se a oeste da capital paulista e é composta por 12 municípios, dentre eles Ibiúna e Sorocaba. O clima ameno, devido a altitude elevada, favorece o desenvolvimento de verduras na região e garante maior qualidade dos produtos. A couve-flor é atualmente uma hortaliça de grande importância para os agricultores familiares que, normalmente, cultivam pequenas áreas ao longo do ano, por ser uma cultura lucrativa e bastante exigente em mão de obra (MAY et al., 2007).

2.1.2 Fitoplasmas

Fitoplasmas são bactérias fitopatogênicas que habitam o floema de plantas e a hemolinfa de insetos da ordem Hemíptera, como as cigarrinhas. São procariotos pleomórficos, devido à ausência de parede celular, de dimensões menores que as bactérias comuns e suscetíveis aos antibióticos da classe das tetraciclinas (DAVIS, 1995; BERTACCINI, 2007). Nos seus hospedeiros podem causar sintomas como virescência, filodia, esterilidade de flores, proliferação de ramos axilares, nanismos, entre outros (IRPCM, 2004). A disseminação na natureza é feita principalmente por cigarrinhas e psilídeos, porém poucas espécies destes insetos foram identificadas como vetores (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006).

Ainda não se dispõem de meio de cultura apropriado para cultivo destes procariotos, por esta razão não podem ser identificados através de características tradicionalmente utilizadas para identificação e classificação de bactérias; sendo assim, não preenchem as exigências dos postulados de Koch (BOVÉ; GARNIER, 1998).

Antes da descoberta dos fitoplasmas (DOI et al., 1967), as doenças hoje associadas a este tipo de patógeno eram atribuídas aos vírus e chamadas genericamente de “amarelos”. No entanto, a microscopia eletrônica de transmissão revelou a existência destes micro-organismos e por algum tempo foi a principal técnica utilizada para o seu estudo. Por meio desta técnica, foi demonstrado que os fitoplasmas apresentam uma organização celular muito simples, sendo envoltos por uma única membrana com três camadas, possuindo o material genético (DNA) concentrado na região central do citoplasma e apresentando uma extensa região citoplasmática de aspecto granular representativa dos ribossomos (STRETEN; GIBB, 2006).

A partir da década de oitenta, as técnicas moleculares passaram a ser adotadas nos trabalhos conduzidos com estes procariotos fitopatogênicos (DAVIS, 1995). Atualmente, a detecção e a identificação dos fitoplasmas encontrados nos diferentes hospedeiros são feitas pelo emprego de técnicas moleculares, destacando-se PCR (Polymerase Chain Reaction) e RFLP (Restriction Fragment Length Polimorfism). O sequenciamento dos nucleotídeos do 16S rDNA também tem contribuído sobremaneira para a identificação molecular, pois se constitui na base para as análises filogenéticas que revelam a similaridade genética entre fitoplasmas. Os fitoplasmas são reconhecidos como um grupo monofilético distinto dentro da classe dos Mollicutes (DAVIS, 1995) e análises filogenéticas demonstraram que os fitoplasmas são

descendentes de ancestrais bacterianos gram-positivos do gênero *Acholeplasma* (STRETEN; GIBB, 2006; WEISBURG et al., 1989).

Em um trabalho clássico, Lee; Hammond; Davis (1993) apresentaram o método de PCR, com “primers” universais derivados da sequência 16S rDNA, como sendo altamente eficiente para a detecção de uma diversidade destes procariotos presentes em uma ampla gama de hospedeiros. A identificação ou caracterização molecular, conduzida pela análise de RFLP das sequências amplificadas pelo PCR, permitiu a determinação de 9 grupos de classificação, sendo possível ainda a diferenciação de 14 subgrupos. Atualmente são reconhecidos 18 grupos e mais de 40 subgrupos para a classificação dos fitoplasmas (LEE; GUNDERSEN-RINDAL; BERTACCINI, 1998; LEE et al., 2006). No entanto, Wei et al. (2007) propuseram um sistema de classificação baseado na análise virtual de RFLP, utilizando um maior número de enzimas de restrição, em comparação com aquele usado na análise tradicional de RFLP. Desta forma, foram distinguidos 28 grupos de classificação, além de subgrupos dentro de cada grupo. Este novo sistema lança mão dos avanços da bioinformática, sendo favorecido pela maior facilidade em se conduzir o sequenciamento de bases nucleotídicas e pela maior qualidade das sequências alvos. Atualmente há mais de 800 sequências do gene 16S rDNA de fitoplasma disponíveis no banco de dados (GenBank) do NCBI (National Center for Biotechnology Informations). A disponibilidade destas sequências torna possível a digestão virtual (*in silico*), gerando padrões virtuais de RFLP, os quais são utilizados como referências para a identificação e classificação dos fitoplasmas encontrados em associação com as doenças de plantas (WEI, et al., 2007).

Novos grupos e subgrupos surgem constantemente na mesma proporção em que novos fitoplasmas são identificados e caracterizados molecularmente. Atualmente, existe uma proposição em se elevar o termo trivial fitoplasma para a categoria de gênero. O IRPCM (International Research Programme for Comparative Mycoplasmaology) (2004) tem proposto a classificação de fitoplasmas no gênero *Candidatus Phytoplasma*, que já compreende 13 gêneros.

2.1.3 Enfezamento em brássicas e identificação de fitoplasmas

A couve-flor é uma espécie suscetível ao ataque de diversos patógenos (MARINGONI, 2005). Dentre as doenças bacterianas, são relevantes a podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*), a podridão mole (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) e a mancha foliar translúcida (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*). Entre aquelas de etiologia fúngica, podem ser mencionadas a mancha de alternaria (*Alternaria brassicae*), hérnia das crucíferas (*Plasmodiophora brassicae*), de murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*). Ainda merece destaque o mosaico da couve-flor causado pelo vírus *Cauliflower mosaic virus* - CaMV, transmitido por pulgões.

Há aproximadamente duas décadas e especialmente nos últimos anos, na região do Cinturão Verde de São Paulo, uma doença de etiologia desconhecida tem se destacado em decorrência das perdas relevantes que tem causado. Em campos comerciais têm sido observados níveis de incidência que chegam a 90%. A comercialização de plantas afetadas pela doença torna-se comprometida, o que leva os produtores a abandonar a cultura ou substituí-la por outra espécie.

As plantas de couve-flor doentes podem exibir sintomas de enfezamento, folhas avermelhadas, deformação da inflorescência e um anel interno escurecido na haste principal, quando esta é seccionado transversalmente, resultante da necrose de vasos condutores. Este quadro sintomatológico foi também descrito para plantas de repolho (AMARAL MELO, 2007) e brócolis (ECKSTEIN et al., 2008) cultivadas na mesma região daquela com couve-flor. Nos campos, as maiores incidências ocorrem nas áreas marginais da cultura, justamente onde a população de insetos é maior, indicando que a introdução do patógeno é feita a partir das áreas adjacentes. A identificação molecular evidenciou a presença de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI e 16SrIII em associação com repolho (AMARAL MELLO, 2007) e representantes do subgrupo 16SrI-B estavam presentes em plantas de brócolis com sintomas de enfezamento (ECKSTEIN et al., 2008).

A primeira constatação de fitoplasma associado ao enfezamento em couve-flor foi feita por Bertaccini; Pisi; Marani (1983). Plantas com severa malformação de inflorescência em regiões de cultivo na Itália foram examinadas em microscópio eletrônico. Corpos pleomórficos, típicos de fitoplasmas, foram visualizados nos tecidos de floema das plantas sintomáticas. Outros relatos sobre a doença em brássicas se seguiram a este, sendo feitos em divesas regiões

geográficas do mundo (BERTACCINI et al., 1998; LEE et al., 2003; SALEHI; IZADPANA; SIAMPOUR, 2007). A identificação de fitoplasmas associados aos enfezamentos de brássicas como nabo, repolho, couve-flor e brócolis, conduzida em várias regiões do mundo, mostrou serem eles pertencentes a distintos grupos de classificação. Fitoplasma do grupo 16SrI foi identificado em plantas de brócolis na Itália (MARCONE; DiSERIO; RAGOZZINO, 1995) e na Sérvia (DUDUK et al., 2007). Em nabo foi constatada a presença de fitoplasma do subgrupo 16SrI-B, na República Tcheca (BERTACCINI et al., 1998). Fitoplasmas afiliados aos grupos 16SrI-A e 16SrI-B foram encontrados em repolho nos Estados Unidos (LEE et al., 2003), enquanto representantes do grupo 16SrVI foram caracterizados no Irã (SALEHI; IZADPANA; SIAMPOUR, 2007).

2.1.4 Transmissão de fitoplasmas

Além de habitar o floema de plantas, os fitoplasmas também se desenvolvem no corpo dos insetos vetores, podendo ser encontrados no intestino, hemolinfa, glândulas salivares e outros órgãos de insetos sugadores de seiva (IRPCM, 2004).

Os insetos capazes de transmitir fitoplasmas pertencem à ordem Auchenorrhyncha, famílias Cicadellidae, Fulgoromorpha e dois gêneros da família Psyllidae (STRETEN; GIBB, 2006). Mais de 75% dos vetores de fitoplasma são encontrados na subfamília Deltocephalinae (Cicadellidae) (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006). A eficiência desta ordem como vetora deve-se ao fato de que ninfas e adultos podem transmitir fitoplasmas de maneira persistente, ou seja, após a aquisição, os fitoplasmas atravessam a parede do intestino do inseto e se multiplicam na hemolinfa, atingem as glândulas salivares, sendo transmitidos durante toda a vida do vetor (WEINTRAUB, 2007). A transmissão transovariana de fitoplasmas foi evidenciada para algumas espécies de cigarrinhas, como *Hishimonoides sellatifomis*, vetora do agente do nanismo da amoreira (KAWAKITA et al., 2000) e *Matsumuratettix hiroglyphicus*, vetora do patógeno do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (HANBOONSONG et al., 2002), bem como para algumas espécies de psilídios, como *Cacopsylla melaneura* e *Cacopsylla pruni* (TEDESCHI et al., 2006) vetores de fitoplasmas associados ao superbrotamento da macieira. A detecção de fitoplasmas em insetos coletados no campo tem sido útil para evidenciar a ocorrência de novos vetores, a distribuição sazonal e geográfica de vetores e o monitoramento da doença no campo (TEDESCHI et al., 2003). Para identificar novas espécies vetoras é necessário observar a

abundância de insetos que ocorrem na área com incidência da doença, testes moleculares para detecção de fitoplasmas em insetos e experimentos de transmissão, que permitam provar a capacidade vetora do inseto (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006).

No caso específico do fitoplasma que ocorre em brássicas na região do Cinturão Verde, observações feitas pelos próprios agricultores e técnicos evidenciaram uma relação direta entre o aumento da população de cigarrinhas da subfamília Deltocephalinae e o incremento na incidência do enfezamento do repolho (AMARAL MELLO, 2007). No entanto, insetos vetores envolvidos na transmissão de fitoplasmas ainda não foram identificados no Brasil, com exceção de *Dalbulus maidis*, o vetor responsável pela disseminação do fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho (MONTANO; BRIOSO; PIMENTEL, 2007). Até o momento, pouco se conhece sobre os vetores para o agente do enfezamento da couve-flor na maioria dos países onde a doença ocorre. Nos Estados Unidos, as espécies de cigarrinhas *Macrostelus fascifrons*, *M. quadrilineatus*, *Scaphytopius irroratus* e *Ceratagallia abrupta* foram identificadas como candidatas a vetores de fitoplasmas encontrados em repolho (LEE et al., 2003); no entanto, no Irã, foi demonstrado que a cigarrinha *Circulifer haematoceps* é a espécie responsável pela disseminação de fitoplasmas na cultura (SALEHI; IZADPANA; SIAMPOUR, 2007).

A transmissão experimental de fitoplasmas pode ser feita por insetos vetores, quando o patógeno possui vetor conhecido; por meio de enxertia de ramos, quando há compatibilidade entre as espécies hospedeiras e através da cuscuta. Neste último caso, filamentos da planta parasita pertencente ao gênero *Cuscuta* são estabelecidos tanto na planta fonte como na planta receptora de fitoplasmas. Assim, por formar haustórios que retiram nutrientes dos vasos de floema, os filamentos da cuscuta permitem a passagem de fitoplasmas de uma planta para outra. As coleções de fitoplasmas existentes são geralmente mantidas em plantas de vinca (*Catharanthus roseus* L. Don), a qual atua, geralmente, como planta receptora, e a transmissão é feita por cuscuta justamente porque, na maioria das vezes, não se conhece o vetor e a aplicação da técnica de enxertia não se mostra viável. Plantas de vinca são reconhecidas como plantas úteis para o estudo de fitoplasmas e têm sido utilizadas como hospedeiras para uso experimental pois podem abrigar diferentes tipos de fitoplasmas (BERTACCINI, 2007).

2.1.5 Análise epidemiológica

A distribuição espacial é uma das propriedades ecológicas mais características das espécies (TAYLOR, 1984), sendo que esta distribuição pode ser considerada também para os patossistemas, de modo geral. Hughes; Madden; Munkvold (1996) enfatizam que a principal razão para o estudo de padrões espaciais de doenças no campo é que o padrão espacial da doença expressa o processo de dispersão do patógeno.

Dados de incidência são frequentemente utilizados em estudos epidemiológicos pois podem servir como base para estudos relacionados à intensidade da doença. Incidência é o número ou a proporção de plantas doentes e consiste na maneira mais fácil de avaliar a doença no campo. A avaliação é feita com base nos dados binários, ou seja, se a planta está doente ou não, através da observação dos sintomas. O conhecimento da distribuição da doença é necessário para avaliar os efeitos de tratamentos sobre a doença, determinar perdas e planos de amostragem (MADDEN; HUGUES, 1995), para correlacionar doenças e vetores, caracterizar o padrão de dispersão da doença e os mecanismos de transmissão, correlacionar tratos culturais, condições ambientais e dispersão da doença (BERGAMIN FILHO et al, 2002).

Diversos métodos estão disponíveis na literatura para a análise de padrões espaciais em parcelas como, por exemplo, índices de dispersão, áreas isópatas e a lei de Taylor (BERGAMIN FILHO et al., 2007). A parcela a ser analisada pode ser dividida em ‘quadrats’, que são unidades de amostragem da população de plantas doentes nos campos e têm normalmente forma retangular, com dimensões a critério do pesquisador. Em cada ‘quadrat’ o número de plantas doentes é determinado e uma distribuição de frequência é construída. A comparação é realizada através do teste de Chi-quadrado (BERGAMIN FILHO et al., 2007).

A análise espacial da distribuição de plantas doentes é uma importante ferramenta para o entendimento da epidemiologia de doenças de plantas e pode fornecer pistas sobre o modo de dispersão do patógeno (ORENSTEIN et al., 2003). Plantas que são infectadas por patógenos transmitidos por insetos frequentemente exibem padrões típicos de distribuição no campo. Beanland; Noble; Wolf (2006) observaram que videiras infectadas por fitoplasmas encontravam-se agregadas próximas às áreas de mata localizadas nos bordos da cultura. De acordo com Madden e colaboradores (1995), plantas infectadas pelo fitoplasma que causa a doença conhecida como pó amarelo da alface, que é transmitido pela cigarrinha *Macrostelus quadrilineatus*, também exibiam padrão de agregação.

Amaral Mello (2007) realizou o estudo da epidemiologia do enfezamento do repolho em Ibiúna, localizado no Cinturão Verde de São Paulo e concluiu que a doença exibiu padrão agregado de distribuição, sendo que a análise das áreas isópatas revelou que a doença havia sido introduzida na área de plantio a partir de áreas externas.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Coleta de amostras de couve-flor

Amostras de plantas sintomáticas foram coletadas em campos comerciais localizados nos municípios de Bragança Paulista, Ibiúna, Morungaba e Sorocaba, no Estado de São Paulo, e nos municípios de Caxias do Sul e Nova Bassano, no Estado do Rio Grande do Sul (Tabela 1). As plantas sintomáticas amostradas exibiam enfezamento, deformação da inflorescência, anel escurecido na haste principal e, em alguns casos, avermelhamento de bordos foliares (Figura 1). Amostras de plantas assintomáticas foram coletadas em Sorocaba e no mercado municipal de Piracicaba (Tabela 1). As amostragens foram feitas a partir de inflorescências de plantas com aproximadamente 60 dias de idade.

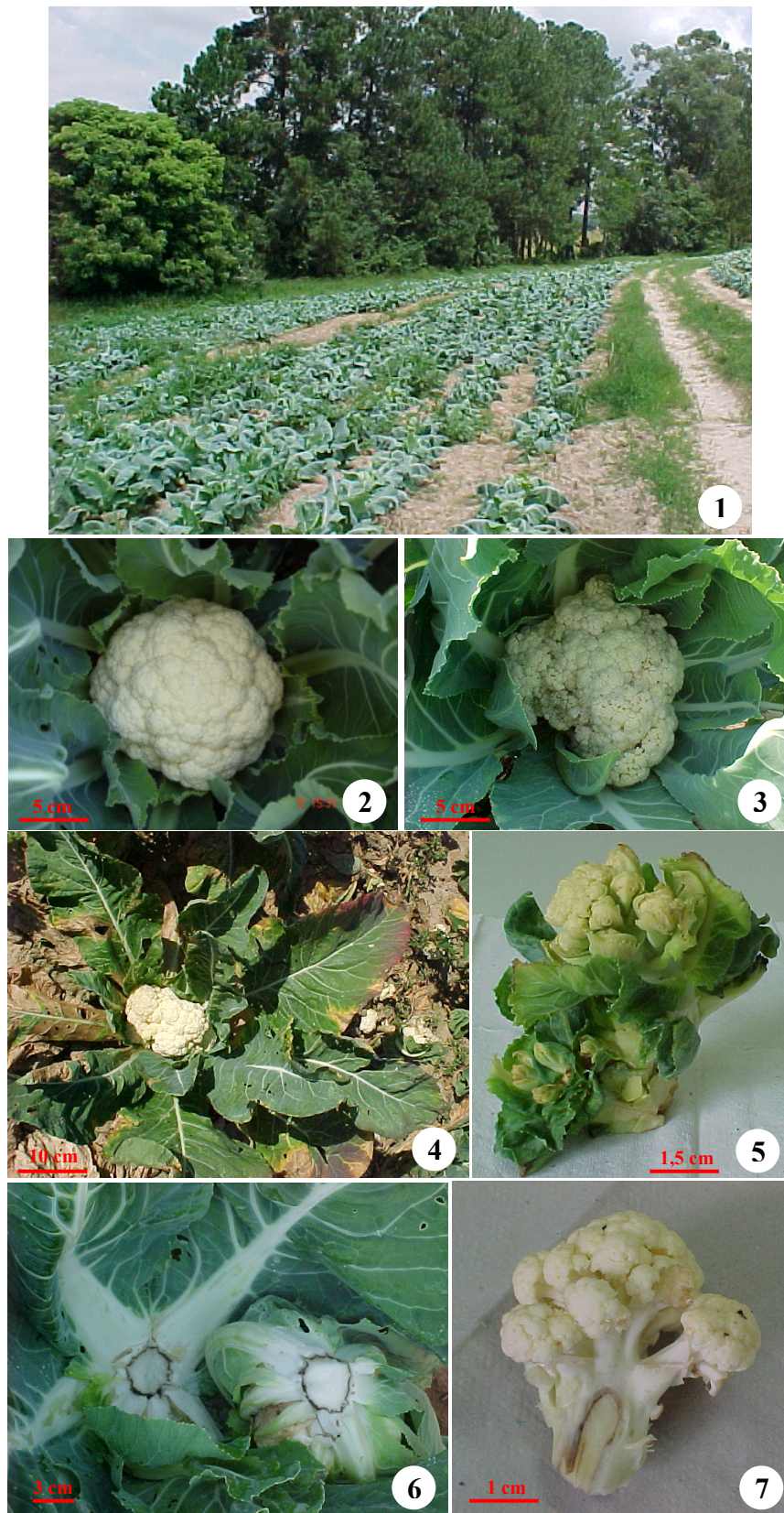


Figura 1- Aspecto geral de um campo cultivado com couve-flor em Sorocaba-SP. 2- Planta sadia, com inflorescência normal. 3- Planta doente, com deformação da inflorescência. 4- Planta com sintomas de enfezamento, inflorescência deformada e avermelhamento parcial das folhas. 5- Parte de planta doente com proliferação de brotos laterais. 6- Presença de anel escurecido em corte transversal da haste de plantas doentes. 7- Escurecimento da região dos vasos condutores, em corte longitudinal da haste

Tabela 1- Relação das amostras de couve-flor, locais de origem e período de coleta

Origem	Amostras sintomáticas	Amostras assintomáticas	Período
Bragança Paulista	4	-	jun/2003; dez/2007
Ibiúna	2	-	out/06
Morungaba	15	-	jul/2008; jul/2009
Sorocaba	14	17	ago e dez/2007; jan e jun/2008
Piracicaba	-	1	fev/2008
Caxias do Sul	1	-	mar/2008
Nova Bassano	3	-	ago/2002

2.2.2 Extração de DNA total

2.2.2.1 Extração rápida

Este tipo de extração seguiu a metodologia proposta por Doyle; Doyle (1987). O material vegetal fresco (1 g) foi macerado em nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. O extrato obtido foi coletado em microtubo de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 800 µL de tampão de extração 2X CTAB (Cationic hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) a 60°C. O extrato foi levado ao banho-maria a 65°C por 60 min, sendo agitado a cada 10 min, para homogeneizar a suspensão. Em seguida, foram adicionados 600 µL de CIA (Clorofórmio álcool isoamílico 24:1). A mistura foi centrifugada por 15 min a 20800 g. A fase superior (aquosa) foi retirada e transferida para outro microtubo de 1,5 µL, sendo a ela adicionados 540 µL de isopropanol gelado. O material permaneceu por uma noite a -20°C. Após a centrifugação por 10 min a 20800 g, descartou-se o sobrenadante e, ao precipitado, foi adicionado 1 mL de etanol 80%. A mistura foi mantida em repouso por 10 min. Em seguida, o álcool foi descartado e a operação repetida. Ao precipitado foram adicionados 500 µL de NaCl 1M e a mistura foi incubada por 30 a 60 min a 4 °C. Nova centrifugação foi realizada a 20800 g por 10 min. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80%, sendo esta operação repetida. O etanol foi descartado e os tubos foram mantidos abertos e invertidos sobre papel toalha para a secagem do precipitado. Após esta etapa, o precipitado foi ressuscitado em 100 µL de água deionizada e armazenado a -20°C

A solução tampão de extração 2X CTAB foi preparada com os seguintes componentes: 2g de CTAB; 8,18 g de NaCl; 0,74 g de EDTA; 1,57 g de Tris-HCl; 1 g de PVP (polivinilpirrolidona); 0,2 mL de mercaptoetanol (adicionado no momento do uso). Os componentes foram dissolvidos em água deionizada, completando o volume para 100 mL e o pH foi ajustado para 8,0.

2.2.2.2 Extração com 'kit' comercial

Na extração utilizando o 'kit' comercial Dneasy Plant Mini Kit[®] (Qiagen) foram seguidas as recomendações do fabricante. O material vegetal fresco (1 g) foi macerado com 400 µL de tampão AP1 e transferido para microtubo de 1,5 mL. Ao extrato foram adicionados 4 µL de RNase e a mistura foi incubada a 65°C por 10 min, em aparelho de banho-maria. Um volume de 130 µL do tampão AP2 foi adicionado e a mistura foi refrigerada por 5 min. Esta mistura foi aplicada numa coluna montada sobre um tubo coletor e centrifugada a 20800 g por 5 min. O sobrenadante foi recolhido em um novo microtubo, ao qual foram adicionados 675 µL do tampão AP3. Uma alíquota de 650 µL desta mistura foi aplicada em outra coluna que foi centrifugada a 6797 g por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o restante da amostra foi submetido ao mesmo procedimento anteriormente descrito. A coluna foi transferida para um novo microtubo onde foram adicionados 500 µL do tampão AW. Após incubação por 5 min, a coluna foi centrifugada a 20800 g por 2 min e a operação foi repetida para a lavagem do DNA. A coluna foi, então, transferida para microtubo para a eluição do DNA com 100 µL de tampão AE e centrifugada a 6797 g por 1 min, repetindo-se a operação. O produto da extração foi armazenado a -20°C.

2.2.3 Condições de PCR

O DNA total extraído de cada amostra de planta foi utilizado em reações de PCR, usando o extrato original ou diluído em água em proporções variáveis. Como controle negativo foi utilizado o DNA extraído de mudas de couve-flor sabidamente sadias, produzidas a partir de sementes sob condições controladas. Os padrões positivos foram representados por DNA extraído de plantas de repolho (fitoplasma do subgrupo 16SrIII-J) ou de plantas de vinca (fitoplasma do grupo 16SrI [enfazamento vermelho do milho] ou 16SrIII), comprovadamente infectadas por fitoplasmas. Para a detecção de fitoplasmas foram utilizados os iniciadores universais P1/Tint (DENG; HIRUKI, 1991; SMART et al., 1996) e R16 F2n/R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996) em PCR duplo. Na primeira reação foi utilizado o par P1/Tint, sendo o produto amplificado diluído ou não e utilizado na segunda reação com o par R16 F2n/R2, sendo que estes últimos iniciadores amplificam uma sequência nucleotídica de aproximadamente 1,2 kb do gene 16S rDNA dos fitoplasmas.

As sequências dos iniciadores utilizados são abaixo descritas:

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

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

F2n: 5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'

R2: 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'

Cada reação de PCR foi processada em volume final de 25 μ L em microtubos, contendo: 1 μ L do extrato de DNA; 18,14 μ L de água destilada deionizada; 2,5 μ L de solução tampão 10X PCR; 2 μ L de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução de 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo); 0,6 μ L de cada iniciador (concentração de 20 pmol/ μ L) e 0,16 μ L de Amplitaq 5U/ μ L. Foi utilizado também o kit de amplificação puReTaq Ready-To-Go PCR Beads[®] (GE Healthcare), no qual acrescentou-se somente 23 μ L de água destilada deionizada, 0,5 μ L de cada oligonucleotídeo e 1 μ L do DNA de interesse.

Para a primeira reação, o termociclador foi programado para 30 ciclos, sendo as etapas: 1 min a 94°C para desnaturação do ácido nucléico, 1 min a 56°C para o anelamento e 2 min a 72°C para a extensão. Para a segunda reação utilizou-se 35 ciclos com as seguintes etapas: 1 min a 94°C para a desnaturação do ácido nucléico, 2 min a 50°C para o anelamento e 3 min a 72°C para a fase de extensão; um tempo adicional de 1 e 7 min foram permitidos para a etapa de desnaturação do primeiro ciclo e para a extensão do último ciclo, respectivamente.

Os produtos gerados pelo PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% tratado com Sybr Safe[®] (Invitrogen). A corrida eletroforética foi conduzida em voltagem constante de 65 V por 60 min em solução tampão TBE 0,5X. A visualização dos fragmentos genômicos amplificados foi feita em transiluminador de luz ultravioleta. Utilizou-se o marcador molecular 1 kb Ladder (Life Technologies).

2.2.4 Identificação molecular através de PCR e RFLP

A identificação por PCR foi feita a partir de produtos amplificados com os iniciadores P1/Tint, os quais foram submetidos à reamplificação usando-se os iniciadores específicos para os fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI [primers R16(I)F1 e R16(I)R1] e 16SrIII [primers R16(III)F2 e R16(III)R1] (LEE et al., 1994). As condições de PCR e de eletroforese foram idênticas àquelas utilizadas para o par de primers R16 F2n/R2, descritas anteriormente.

As seqüências dos iniciadores específicos utilizados foram:

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'

A identificação por RFLP foi conduzida a partir das seqüências amplificadas pelo duplo PCR, com o uso de iniciadores universais P1/Tint e R16 F2n/R2. Uma alíquota de 3 a 4 µL de cada produto de PCR foi digerida, separadamente, pelas enzimas de restrição *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *HpaII*, *MseI*, *HhaI*, *MboI* e *Bsh1236I*, durante 24 h a 36°C, de acordo com as especificações do fabricante. Os produtos da digestão enzimática foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 4,5%, os primeiros 5 min a 220 V e mais 45 min a 150 V. Os géis foram coloridos com Sybr Safe® (Invitrogen) e as bandas de DNA visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta. O marcador utilizado foi ΦX174RFHaeIII. Os perfis coletivos gerados pelos fitoplasmas presentes nas amostras de plantas foram comparados com os padrões descritos na literatura para identificação e classificação de fitoplasmas (LEE et al., 1998).

2.2.5 Sequenciamento do 16S rDNA de fitoplasmas

2.2.5.1 Purificação do DNA

Produtos de PCR de amostras de couve-flor (Tabela 2) obtidos foram purificados utilizando-se 'kit' de purificação Purelink™ (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Em um microtubo foram adicionados 300 µL de tampão de captura ('binding buffer') e 75 µL de produto do PCR obtido na reação com R16 F2n/R2. Após misturar a solução obtida ela foi colocada em coluna com filtro, acoplada ao tubo coletor e centrifugada a 10621 g em temperatura ambiente. O produto que passou no tubo coletor foi descartado e a coluna foi recolocada no tubo coletor onde foi adicionado 650 µL de tampão de lavagem ('Wash buffer'). Nova centrifugação foi conduzida a 10621 g e o conteúdo do tubo coletor foi descartado e a coluna foi recolocada no mesmo tubo e submetida a nova centrifugação a 20800 g por 3 min, a fim da remoção de resíduos de tampão de lavagem. A coluna foi colocada em novo tubo e foi adicionado 50 µL de tampão de eluição ('elution buffer'). A coluna com o tampão e o DNA da amostra foi mantida em

temperatura ambiente por 1 min. Após esse período foi feita nova centrifugação a 20800 g por 2 min. O DNA purificado foi armazenado a -20°C para posterior clonagem. A concentração de DNA de cada amostra foi estimada. Uma alíquota de $1\ \mu\text{L}$ do DNA purificado juntamente com $3\ \mu\text{L}$ de tampão de carregamento foi aplicado em gel de agarose 1% corado com Sybr Safe[®] (Invitrogen) em tampão TBE 0,5X e foi submetido a eletroforese. Os fragmentos de aproximadamente 1,2 kb de fitoplasma foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta juntamente com o marcador Lambda DNA. As amostras apresentaram concentração estimada de 400 ng.

Tabela 2- Relação das amostras de couve-flor portadoras de fitoplasmas, os quais foram usados para os procedimentos de clonagem e sequenciamento do 16S rDNA

Origem	Amostra
Nova Bassano	Nb1 e Nb2
Piracicaba	Pr1
Sorocaba	Sr3 e Sr4
Morungaba	Mb2, Mb3, Mb5, Mb6

2.2.5.2 Clonagem do 16S rDNA de fitoplasma

O DNA purificado foi ligado no vetor pGEM[®] T Easy Vvector System I (Promega). Foram utilizados $3\ \mu\text{L}$ do DNA purificado, $1\ \mu\text{L}$ do vetor ($25\ \text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), $5\ \mu\text{L}$ de tampão ligase 2X e $1\ \mu\text{L}$ de T4 DNA ligase ($3\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), totalizando $10\ \mu\text{L}$ da mistura para a ligação, que foi colocada em microtubo e mantida ‘overnight’ a 4°C . Após este período, a ligação estava pronta para ser transferida para células competentes.

Para a transformação foram adicionados 2 a $3\ \mu\text{L}$ da ligação em $50\ \mu\text{L}$ de células competentes *Escherichia coli*, estirpe DH5 α (Invitrogen), e a mistura foi colocada no gelo por 30 min. Após este período, as células contendo a ligação foram submetidas a choque térmico por incubação a 42°C por exatamente 50 s e, após este período foram colocadas no gelo por 2 min. A seguir, foram adicionados $450\ \mu\text{L}$ de meio S.O.C. (Invitrogen) pré-amornado a 37°C às células transformadas, que foram incubadas a 37°C por 2 h em agitador a 200 rpm. Após o período de crescimento, foram plaqueados $100\ \mu\text{L}$ das células transformadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio LB (Luria-Bertani) (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,25 de NaCl; 4% de agar), acrescidas de $20\ \mu\text{L}$ de ampicilina ($100\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), $20\ \mu\text{L}$ X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosida) na concentração de 50 ng/mL e $20\ \mu\text{L}$ de IPTG (isopropil- β -D-

tiogalactopiranosida) na concentração de 50 ng.mL⁻¹. A placa foi mantida por uma noite em estufa a 37°C para o crescimento das colônias transformadas como DNA plasmidial recombinante, contendo o fragmento de DNA inserido no sítio de clonagem.

O vetor pGEM[®] possui, intercalado ao sítio de clonagem, um fragmento de DNA que codifica a parte amino-terminal da β-galactosidase (*lacZ*). Na presença do indutor IPTG, *lacZ* é expresso e a presença da enzima ativa pode ser facilmente visualizada pela coloração azul produzida a partir do substrato cromogênico X-gal. As colônias recombinantes exibiram cor branca (que indica a produção de β-galactosidase não-funcional), enquanto as colônias não recombinantes mostraram-se azuis (produção de β-galactosidase funcional) (LAMBALIS, 1995).

Foram selecionados 3 clones para cada amostra clonada. Os clones selecionados foram transferidos para tubos tipo Falcon contendo 10 mL de meio LB líquido com o auxílio de um palito estéril. Os tubos foram mantidos a 37°C a 200 rpm por cerca de 12 h. Para conferir se as células continham o inserto, foi feito PCR adotando o par de primers SP6/T7, adequados para insertos utilizando o vetor de clonagem pGEM[®]. Se positivo, os plasmídios foram extraídos para posterior sequenciamento.

2.2.5.3 Extração do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído utilizando o 'kit' comercial Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Para tanto, as colônias que cresceram por 12 h foram centrifugadas a 20800 g em temperatura ambiente por 5 min em microtubo de 1,5 mL, quantas vezes foram necessárias para formar pellet, que foi ressuspenso com 250 μL de 'Cell Ressuspention Solution'. A seguir, foi adicionado 250 μL de 'Cell Lysis Solution' e a solução foi misturada invertendo o tubo. À mistura foi adicionado 10 μL de 'Alkaline Protease Solution', misturando-se novamente a solução, que foi incubada em temperatura ambiente por 5 min. Após este período, foi adicionado 350 μL de 'Neutralization Solution' e a solução misturada invertendo-se o tubo. A solução foi centrifugada a 20800 g por 10 min em temperatura ambiente. A solução resultante foi transferida para uma coluna em um tubo coletor, que foi centrifugado a 20800 g por 1 min em temperatura ambiente. O que passou pela coluna foi descartado e a coluna foi removida para um novo tubo coletor, onde foi adicionado 750 μL de 'Wash Solution'. O tubo foi centrifugado a 20800 g por 1 min e o que passou pela coluna foi descartado. Novamente se adicionou 250 μL de 'Wash Solution' e a mistura foi novamente centrifugada por 2 min. Em

seguida, a coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, onde foi adicionado 100 μ L de ‘Nuclease-Free Water’, seguindo de nova centrifugação. O que passou pela coluna é o plasmídeo extraído.

O produto obtido do Miniprep foi corrido em gel de agarose 1% em tampão 0,5 TBE para quantificação estimada da concentração do DNA segundo o marcador Lambda DNA. Foram encaminhadas para sequenciamento 20 μ L das amostras que apresentaram concentração estimada de 100 ng, juntamente com os iniciadores SP6/T7 na concentração de 10 μ moles/ μ L. O sequenciamento foi realizado pela empresa MACROGEN, em Seul, na Coreia.

2.2.5.4 Análise filogenética e de sítios putativos de restrição

As sequências geradas a partir do sequenciamento foram analisadas utilizando-se programas para construção (Phred Phrap (EMBRAPA) e Bioedit) e análise de sequências MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), versão 4 (TAMURA et al., 2007). As sequências foram comparadas com aquelas de outros fitoplasmas depositadas no ‘GenBank’, possibilitando demonstrar o nível de identidade genética existente entre o fitoplasma presente na couve-flor ou nas cigarrinhas com outros fitoplasmas. Para as análises filogenéticas, foram utilizadas sequências de 18 diferentes grupos de fitoplasmas, 17 subgrupos representantes do grupo 16SrIII, 4 subgrupos representantes do grupo 16SrXIII, um representante do grupo 16SrXV e do organismo *Acholeplasma laidlawii* (Tabela 3). As sequências foram alinhadas pelo CLUSTAL-W e a árvore filogenética foi construída pelo método ‘Neighbour-joining’, sendo o ‘bootstrapping’ processado por 1000 vezes. Os mapas de sítios de restrição e géis de RFLP virtuais foram gerados através do programa pDRAW32.

Tabela 3- Sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA representantes de fitoplasmas estudados no presente trabalho e dos 18 grupos e de subgrupos dos grupos 16SrIII e 16SrXIII, depositadas no GenBank (NCBI) e utilizadas para a construção da árvore filogenética

Fitoplasma	Doença	Acesso	Referência
Mb2	Enfezamento da couve-flor – Morungaba	-	Presente trabalho
Nb2	Enfezamento da couve-flor – Nova Bassano	-	Presente trabalho
Sr5	Enfezamento da couve-flor – Sorocaba	-	Presente trabalho
<i>B. hebe</i>	<i>Balclutha Hebe</i> (Homoptera: Cicadellidae)	-	Presente trabalho
16SrI-B	Maize bushy stunt (MBS)	AY265208	LEE et al., 2004
16SrII-A	Peanut witches'-broom (PnWB)	L33765	GUNDERSEN et al., 1994
16SrIII-A	Canadian peach X-disease (CX)	L33733	GUNDERSEN et al., 1994
16SrIII-B	Clover yellow edge (CYE)	AF175304	DAVIS; DALLY, 2001
16SrIII-C	Pecan bunch (PB1)	FJ376626	GenBank
16SrIII-D	Goldenrod yellows (GR1)	FJ376627	GenBank
16SrIII-E	Spiraea stunt (SP1)	AF190228	GenBank
16SrIII-F	Milkweed yellows (MW1)	AF510724	GenBank
16SrIII-G	Walnut witches'-broom (WWB)	AF190226	GenBank
16SrIII-H	Poinsettia branch-inducing (PoiBI)	AF190223	GenBank
16SrIII-I	Virginia grapevine yellows (VGY)	AF060875	DAVIS et al., 1998
16SrIII-J	Chayote witches'-broom (ChWB)	AF147706	MONTANO et al., 2000
16SrIII-K	Strawberry leafy fruit (SLF)	AF274876	GenBank
16SrIII-L	Poisettia exuberant flower-inducing (EF-MM)	EU169138	GenBank
16SrIII-M	Montana potato purple top (PPT-MT117-1)	FJ226074	GenBank
16SrIII-N	Alaska potato purple top (PPT-AK6)	FJ376629	GenBank
16SrIII-P	Dandelion virescence (DanVir)	AF370119	JOMANTIENE et al., 2002
16SrIII-R	Cirsium white leaf (CirWL)	AF373105	JOMANTIENE et al., 2002
16SrIII-S	Western peach X-disease (WX)	L04682	GenBank
16SrIV-A	Coconut lethal yellowing (LYJ-C8)	AF498307	HARRISON et al., 2002
16SrV-A	Elm yellows (EY1)	AY197655	LEE et al., 2004
16SrVI-A	Clover proliferation (CP)	AY390261	HIRUKI; WANG, 2004
16SrVII-B	Erigeron witches'-broom (EriWB)	AY034608	BARROS et al., 2002
16SrVIII-A	Loofah witches'-broom (LFWB)	AF353090	GenBank
16SrIX-A	Pigeon pea witches'-broom (PPWB)	AF248957	DAVIS; DALLY, 2001
16SrX-A	Apple proliferation (AP)	AJ542541	SEEMÜLLER; SCHNEIDER, 2004
16SrXI-A	Rice yellow dwarf (RYD)	D12581	NAMBA et al., 1993
16SrXII-B	Australian grapevine yellows (AUSGY)	L76865	DAVIS et al., 1997
16SrXIII	Papaya apical curl necrosis (PACN)	EU719111	GenBank
16SrXIII-A	Mexican periwinkle virescence (MPV)	AF248960	DAVIS; DALLY, 2001
16SrXIII-B	Strawberry green petal (STRAW1)	U96614	JOMANTIENE et al., 1998
16SrXIII-C	Chinaberry yellows (CbY)	DQ444264	ARNEODO et al., 2007
16SXIV	Bermuda grass white leaf (BGWL)	AF248961	DAVIS; DALLY, 2001
16SrXV-A	Hibiscus witches'-broom (HibWB)	AF147708	MONTANO et al., 2001
16SrXVI	Sugar cane yellow leaf syndrome (SCYLS)	AY725228	AROCHA et al., 2005
16SrXVII-A	Papaya phytoplasma (PAY)	AY725234	AROCHA et al., 2005
16SrXVIII-A	American potato purple top wilt (APPTW)	DQ174122	LEE et al., 2006
<i>Acholeplasma laidlawii</i>		M23932	WEISBURG et al., 1989

2.2.6 Detecção e identificação de fitoplasmas em cigarrinhas

Os insetos do tipo cigarrinha foram coletados com auxílio de rede entomológica em um campo de couve-flor com alta incidência de enfezamento e nas áreas adjacentes, em maio de 2008, no município de Sorocaba-SP. Em seguida, foram trazidos para laboratório e separados em grupos com base no seu fenótipo, por meio de procedimento visual. Com isto, foram constituídos 5 grupos de diferentes morfotipos, todos pertencentes à família Cicadellidae, subfamília Deltocephalinae. Os exemplares restantes de cada grupo de morfotipo foram mantidos em microtubos à temperatura ambiente e protegidos da luminosidade. Uma amostragem de 15 insetos de cada um dos morfotipos foi usada para extração de DNA total. A extração foi conduzida utilizando o 'kit' de extração DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), segundo o protocolo descrito no item 2.2.2.2. As reações de PCR para a detecção de fitoplasmas foram conduzidas com os primers universais P1/Tint e R16 F2n/R2, segundo o protocolo descrito no item 2.2.3. A identificação do fitoplasma foi feita por meio da técnica de RFLP virtual e análise filogenética a partir de sequências obtidas pela clonagem e sequenciamento das bases nucleotídicas do 16S rDNA, seguindo os mesmos procedimentos adotados para os fitoplasmas detectados nas plantas de couve-flor descritos nos itens 2.2.5. Exemplares de insetos nos quais foram detectados fitoplasmas foram enviados para identificação taxonômica.

2.2.7 Microscopia de luz

Secções transversais de tecido vegetal da região escurecida do caule de plantas doentes foram obtidas à mão livre, utilizando lâminas de aço cortantes. As secções foram montadas em água, entre lâmina e lamínula, e observadas ao microscópio de luz Zeiss Axioskop 2, sendo as imagens capturadas com câmera digital Zeiss MRc 3 e armazenadas em arquivos digitais.

2.2.8 Transmissão de fitoplasmas por insetos

Neste ensaio foram utilizadas mudas sadias de couve-flor com três semanas de idade, obtidas a partir de sementes, crescidas em vasos e mantidas em local protegido de insetos. Os insetos foram coletados em campo com alta incidência de plantas doentes, localizado no município de Sorocaba-SP, em maio de 2008. Após a coleta com rede entomológica, 7 insetos foram depositados em cada muda, utilizando-se um sugador bucal. Os insetos das espécies *Balclutha hebe* e *Exitianus obscurinervis* foram confinados nas plantas durante 4 dias, com o

auxílio de gaiolas confeccionadas com garrafas plásticas. A escolha das espécies foi feita com base em resultados de experimentos anteriores que indicaram a presença de fitoplasmas em representantes das mesmas. Este ensaio foi conduzido com 15 mudas para *B. hebe* e 6 mudas para *E. obscurinervis*. Além disso, em 6 plantas sadias de vinca, também obtidas de sementes, foram confinados, por 4 dias, 7 insetos de *B. hebe* por planta, na tentativa de obter a transmissão do patógeno. Após o período de confinamento, os insetos foram recolhidos para extração de DNA total para ser usado em reações de PCR, visando confirmar se eram portadores de fitoplasmas.

A avaliação da transmissão foi feita três meses após a montagem do ensaio, aplicando-se a técnica de PCR, buscando a detecção de fitoplasmas nas plantas de couve-flor e de vinca. As 15 plantas submetidas aos insetos da espécie *B. hebe* e as 6 plantas submetidas àqueles da espécie *E. obscurinervis* foram agrupadas 3 a 3, sendo que cada grupo representou uma amostra; neste caso, a extração do DNA total foi feita com o ‘kit’ comercial Dneasy Plant Mini Kit[®] (Qiagen). Para as plantas de vinca, a extração foi processada a partir de cada planta, utilizando-se o protocolo de Doyle; Doyle (1987).

2.2.9 Transmissão de fitoplasmas através da cuscuta

Para os testes de transmissão por cuscuta foi utilizada a espécie *Cuscuta subinclusa*. Duas plantas sintomáticas de couve-flor foram coletadas no campo, em cultivo instalado em Sorocaba, SP. Estas plantas, comprovadamente infectadas por fitoplasmas, foram transplantadas individualmente para vasos e mantidas em casa de vegetação e serviram como fonte de fitoplasma. A cuscuta recém-geminada foi colocada sobre ambas as plantas e aguardou-se o estabelecimento definitivo dos seus filamentos no tecido da hospedeira. Após esta etapa, 3 plantas sadias de vinca, crescidas em vasos, foram colocadas nas proximidades de cada uma das plantas fonte. Os filamentos da cuscuta foram conduzidos para cada uma destas 3 plantas, as quais atuaram como receptoras de fitoplasmas. A avaliação da transmissão foi feita dois meses após o contato entre as plantas de couve-flor e vinca, através de PCR, visando a detecção de fitoplasmas nas plantas receptoras. As plantas de vinca continuaram a ser observadas quanto ao aparecimento de sintomas da doença, mesmo após a coleta de material para detecção do patógeno.

2.2.10 Análise epidemiológica

2.2.10.1 Local e coleta de dados

A análise espacial da doença foi feita em 10 áreas de cultivo de couve-flor em uma propriedade agrícola localizada em Sorocaba-SP. As áreas amostradas apresentavam condições de clima e manejo semelhantes entre elas e nas suas proximidades existiam áreas de pastagem e de mata. A coleta de dados foi iniciada em setembro de 2007, nas áreas 1, 2, 3; em março de 2008, nas áreas 4, 5, 6 e 7; e em abril de 2008, nas áreas 8, 9 e 10. As áreas mapeadas apresentavam de 300 a 728 plantas e aquelas sintomáticas foram assinaladas na planilha. As avaliações foram feitas visualmente baseando-se na expressão de sintomas da doença pela planta avaliada, tais como deformação de inflorescência, enfezamento e a presença do anel escurecido na região dos vasos condutores. Os mapas obtidos apresentavam dados binários (plantas com presença ou ausência de sintomas), os quais foram submetidos à análise por macro do programa Excel.

2.2.10.2 Definição de ‘quadrats’

As áreas foram divididas em retângulos de tamanhos diversos (2x2, 3x3 e 4x4 plantas) denominados ‘quadrats’. Para cada ‘quadrat’ foi determinada a proporção (p) de plantas afetadas na avaliação e calculada a incidência da doença na área, através da equação $p = \sum X_i / nN$, onde $\sum X_i$ é o somatório do número de plantas doentes em cada ‘quadrat’, n é o número de plantas em cada ‘quadrat’ e N é o número total de ‘quadrats’ em cada área (MADDEN; HUGHES, 1995). Esses dados são base para a determinação do índice de dispersão, ajuste à lei de Taylor modificada e caracterização da dinâmica e estrutura de focos e análise de áreas isópatas (LARANJEIRA et al., 1998).

2.2.10.3 Cálculo do índice de dispersão

O índice de dispersão (D) é função da variância observada (V_{obs}) e da variância binomial (V_{bin}). O valor de D foi estimado para cada área avaliada pela equação $D = V_{obs} / V_{bin}$ (GOTTWALD et al., 1996), onde $V_{obs} = \sum (X_i - np)^2 / n^2 (N - 1)$ e $V_{bin} = p(1 - p) / n$, de acordo com Hugues et al. (1996). O afastamento da aleatoriedade foi determinado por meio de teste Qui-quadrado, com $N-1$ graus de liberdade e ao nível de 5% de significância. Valores de D

estatisticamente iguais a 1 indicam distribuição ao acaso de plantas sintomáticas numa determinada área. Por outro lado, valores de D maiores que 1 indicam agregação e menores que 1, regularidade (GOTTWALD et al., 1996; LARANJEIRA et al., 1998).

2.2.10.4 Lei de Taylor modificada

A lei de Taylor modificada relaciona, por meio de polinômio de primeiro grau, a variância observada (V_{obs}) e a variância binomial esperada (V_{bin}) para uma distribuição aleatória ou ao acaso. Quando os dados são expressos em incidência, a distribuição binomial é a que propicia o melhor ajuste para condições de aleatoriedade (MADDEN; HUGHES, 1995). Nesse caso, $\log(V_{obs}) = \log(A) + b \log(V_{bin})$, onde $\log(A)$ e b são parâmetros (LARANJEIRA et al., 1998).

As regressões foram calculadas pelo método dos quadrados mínimos, utilizando o programa computacional Excel. Consideraram-se como variáveis independentes o logaritmo das variâncias binomiais estimadas para cada avaliação e como variáveis dependentes o logaritmo das variâncias observadas. Foi feita a análise de regressão para os dados em conjunto de todas as áreas avaliadas. A adequação do ajuste do modelo aos dados foi avaliada por meio do coeficiente de determinação (R^2) e do padrão dos resíduos (MADDEN et al., 1995). A igualdade do parâmetro b à unidade e de $\log(A)$ diferente de zero e foi testada pelo teste t (MADDEN et al., 1995), usando a estimativa do parâmetro e seu erro padrão. Valores de $\log(A)$ significativamente maiores do que zero e b maiores que 1 ao nível de 5% de probabilidade foram considerados indicativos de agregação e iguais a 1, de aleatoriedade (MADDEN; HUGHES, 1995).

2.2.10.5 Cálculo das áreas isópatas

As áreas isópatas para cada área foram calculadas com o auxílio do aplicativo Statistica 6.0 (Stasoft, Tulsa, OK) por meio do procedimento de uniformização dos quadrados mínimos ponderados pela distância. Para tal, foi utilizada a matriz dos valores não-transformados de proporção de plantas afetadas de cada 'quadrat'. Para cada área, o número de áreas isópatas previamente escolhidas foi igual. Entretanto os níveis de cada área isópata foram arbitrariamente escolhidos, com o objetivo de realçar possíveis diferenças (LARANJEIRA et al., 1998).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Detecção de fitoplasmas em couve-flor

Considerando as amostras sintomáticas, fitoplasmas foram detectados em 26 das 39 amostras, ou, em termos percentuais, 66,5% das plantas que mostravam sintomas de enfezamento. Para as plantas assintomáticas, de um total de 18 amostras, fitoplasmas foram encontrados em 11 delas, representando 61% das plantas analisadas. Estes resultados estão apresentados na Tabela 4.

A associação de fitoplasmas com os tecidos doentes foi demonstrada pela amplificação de fragmentos genômicos de aproximadamente 1,2 kb, visualizados na forma de bandas no gel de agarose, após a corrida eletroforética. A presença de bandas de 1,2 kb são típicas para fitoplasmas, quando o par de primers P1/Tint-R16 F2n/R2 são empregados em PCR duplo.

O mesmo padrão de banda constatado para os fitoplasmas encontrados nas amostras de couve-flor foi obtido para os controles positivos, representados pelo DNA extraído de plantas doentes de repolho ou de vinca. Não houve amplificação para o controle negativo, representado pelo DNA de plantas sadias de couve-flor ou pela água.

Em relação às plantas sintomáticas, todas as 4 amostras coletadas em Bragança Paulista apresentaram resultados positivos para a presença de fitoplasma; o mesmo tipo de resultado foi constatado para as 2 amostras provenientes de Ibiúna. Dentre as 15 plantas amostradas em Morungaba, 7 revelaram a presença do patógeno em seus tecidos; enquanto das 14 plantas originárias de Sorocaba, 10 se mostraram portadoras de fitoplasmas. A única amostra oriunda de Caxias do Sul se mostrou negativa e nas 3 amostras de Nova Bassano foram detectados fitoplasmas. Quanto às plantas assintomáticas, em 10 plantas, de um total de 17 plantas amostradas em Sorocaba, foi possível a detecção de fitoplasmas. Um fato interessante é que a única planta amostrada em Piracicaba, sem sintomas, comprada no mercado municipal, revelou ser portadora de fitoplasmas nos seus tecidos. As amplificações obtidas nas reações de duplo PCR, com os iniciadores universais P1/Tint e R16 F2n/R2, para os fitoplasmas presentes nas diversas amostras positivas estão representadas na Figura 2, a qual mostra os resultados positivos das 2 amostras coletadas em Ibiúna, das 3 amostras de Nova Bassano e de amostras representativas de Bragança Paulista (2), Sorocaba (3) e Morungaba (3).

Tabela 4- Análise de amostras de couve-flor coletadas de plantas sintomáticas e assintomáticas visando à detecção de fitoplasmas através de PCR

Local	Amostras sintomáticas	Resultado de PCR	Amostras assintomáticas	Resultado de PCR
Bragança Paulista	Br1	+		
	Br2	+		
	Br3	+		
	Br4	+		
Ibiúna	Ib1	+		
	Ib2	+		
Morungaba	Mb1	+		
	Mb2	+		
	Mb3	+		
	Mb4	+		
	Mb5	+		
	Mb6	+		
	Mb7	+		
	Mb8	-		
	Mb9	-		
	Mb10	-		
	Mb11	-		
	Mb12	-		
	Mb13	-		
	Mb14	-		
	Mb15	-		
Sorocaba	Sr1	-	Sr1'	+
	Sr2	-	Sr2'	+
	Sr3	+	Sr3'	+
	Sr4	+	Sr4'	+
	Sr5	+	Sr5'	+
	Sr6	+	Sr6'	+
	Sr7	-	Sr7'	+
	Sr8	-	Sr8'	+
	Sr9	+	Sr9'	+
	Sr10	+	Sr10'	+
	Sr11	+	Sr11'	-
	Sr12	+	Sr12'	-
	Sr13	+	Sr13'	-
	Sr14	+	Sr14'	-
			Sr15'	-
			Sr16'	-
			Sr17'	-
			Pr1'	+
Piracicaba				
Caxias do Sul	Cs1	-		
Nova Bassano	Nb1	+		
	Nb2	+		
	Nb3	+		

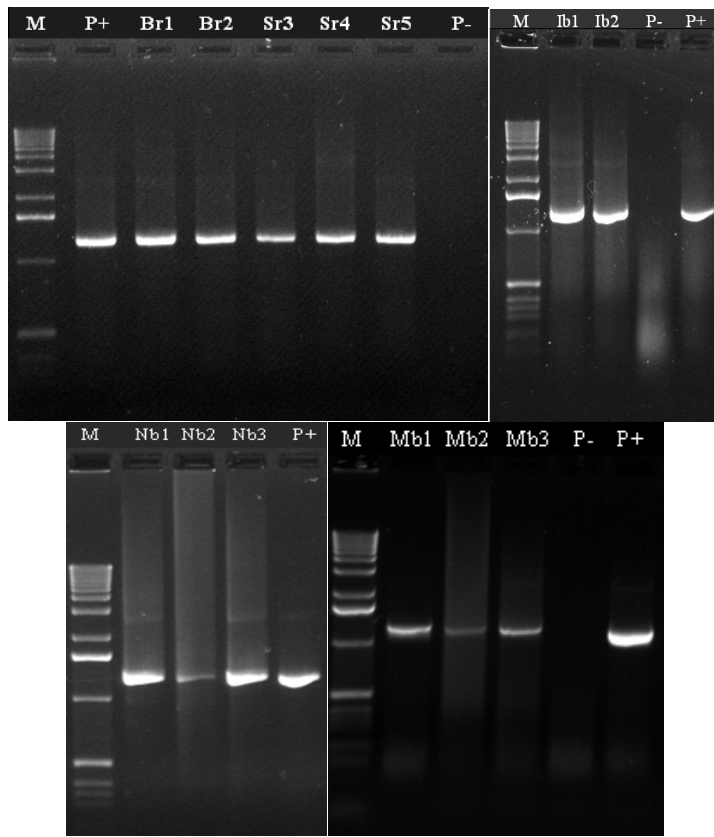


Figura 2- Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas presentes em plantas sintomáticas de couve-flor, através de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint e R16 F2n/R2. Colunas: (M) marcador molecular 1 kb Ladder; (P+) controle positivo; amostras de couve-flor de Bragança Paulista (Br1 e Br2), Ibiúna (Ib1 e Ib2), Morungaba (Mb1 a Mb3); Sorocaba (Sr3 a Sr5) e Nova Bassano (Nb1 a Nb3); (P-) controle negativo

A detecção de fitoplasmas em 66,5% de plantas sintomáticas evidenciou a forte associação destes procariotos com os sintomas de enfezamento observados nas plantas de couve-flor. No entanto, a ocorrência de plantas sintomáticas com resultados negativos pode ser atribuída à baixa concentração de fitoplasmas nos tecidos do hospedeiro ou, mesmo, à distribuição irregular do procarioto na planta, como já relatado em outros trabalhos de mesma natureza (DAVIS, 1995; CONSTABLE; GIBB; SYMONS, 2003). Por outro lado, a detecção de fitoplasmas em plantas que não apresentavam sintomas da doença pode ser creditado à ocorrência de infecções tardias, como relatado para alface, nos trabalhos de Zhou et al. (2002). No presente estudo, as amostras assintomáticas foram obtidas de plantas pertencentes à mesma variedade e coletadas no mesmo dia e num mesmo local. Assim, exclui-se a possibilidade da interferência de fatores do ambiente ou genótipo do hospedeiro na expressão dos sintomas. A ocorrência de hospedeiros assintomáticos dificulta a correta diagnose, o que leva a subestimar a incidência da doença no campo; além disto, tem implicações na epidemiologia da doença, pois plantas aparentemente sadias podem servir como fonte de inóculo, uma vez que, provavelmente, o patógeno é transmitido por vetores presentes no campo.

2.3.2 Identificação de fitoplasma através de PCR

Exceção feita a duas amostras de Morungaba, nas demais amostras positivas sintomáticas ou assintomáticas, coletadas no estado de São Paulo, foi identificada a ocorrência de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII. A presença de fitoplasmas deste grupo de classificação foi revelada pela visualização de bandas correspondentes à amplificação de fragmentos genômicos de 0,8 kb, a partir do 16S rDNA (dados não mostrados). Para a amostra Sr4, proveniente de Sorocaba, foram amplificados fragmentos de 1,1 kb, quando utilizado o par de primers específico para grupo 16SrI, evidenciando a presença de fitoplasmas representantes deste grupo (dados não mostrados). Assim, para esta amostra ficou caracterizada a ocorrência de infecção mista. Em duas amostras de Morungaba (Mb2 e Mb3) e nas 3 amostras positivas originárias de Nova Bassano não ocorreu amplificação de fragmentos genômicos com o uso dos pares específicos para identificação de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII.

O uso de primers específicos para a identificação de fitoplasmas pode ser considerada como uma etapa anterior à identificação mais refinada feita utilizando a técnica de RFLP. O emprego de primers específicos tem sido muito útil para a detecção de distintos fitoplasmas numa

mesma planta, evidenciando a ocorrência de infecções mistas (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). A alta frequência de representantes do grupo 16SrIII encontrada nas plantas de couve-flor reforça os resultados de outros trabalhos que têm mostrado a predominância de ocorrência de fitoplasmas afiliados a este grupo, nas áreas do estado de São Paulo. Como exemplos, plantas de repolho (AMARAL MELLO, 2007), berinjela (AMARAL MELLO, 2004), tomate (AMARAL MELLO, 2004; AMARAL MELLO; BEDENDO; CAMARGO, 2006), brócolis (ECKSTEIN et al., 2008), videira (NERONI, 2009), maracujá (RIBEIRO, 2008), abobrinha-de-moita (MELO; BEDENDO; YUKI, 2009), primavera (SILVA, 2008) amostradas no Estado paulista mostraram consistente e predominantemente a presença de fitoplasmas do grupo 16SrIII. A ocorrência de infecção mista por fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII também foi relatada em repolho cultivado na área do Cinturão Verde de São Paulo e, neste caso, também foi constatada a predominância de fitoplasmas associados ao grupo 16SrIII (AMARAL MELLO, 2007). A presença de fitoplasmas de ambos os grupos associados tanto ao enfezamento do repolho como da couve-flor e a ocorrência de representantes do grupo 16SrIII em brócolis, também na região do Cinturão Verde, sugere a existência de um vetor comum responsável pela transmissão dos patógenos para estas espécies de brássicas.

2.3.3 Identificação de fitoplasmas através de análise de RFLP

As análises de RFLP foram conduzidas com as amostras Br1 e Br2 de Bragança Paulista; Sr3 e Sr5 de Sorocaba; Mb1, Mb2 e Mb3 de Morungaba; e Nb1 e Nb2 de Nova Bassano.

Os padrões coletivos de RFLP, gerados pela digestão enzimática dos produtos amplificados por PCR a partir do DNA obtido das amostras de Sorocaba e Bragança Paulista, se apresentaram indistinguíveis entre si e com o padrão positivo, este representado pelo fitoplasma do repolho, um afiliado do grupo 16SrIII-J (Figura 3). Comparados com os padrões relatados pela literatura (LEE et al., 1998; MONTANO et al., 2000), foi possível confirmar os fitoplasmas encontrados nas amostras de couve-flor como sendo típicos representantes do grupo 16SrIII, subgrupo J. Estes resultados confirmaram a identificação feita por PCR, na qual foi evidenciada a ocorrência de fitoplasmas quando os primers específicos para grupo 16SrIII foram usados nas reações de PCR, contendo o DNA de plantas sintomáticas de couve-flor.

Fitoplasmas detectados em amostras de Morungaba (Mb1, Mb2 e Mb3), por sua vez, geraram perfis eletroforéticos idênticos aos fitoplasmas afiliados aos grupos 16SrIII e 16SrXIII

(LEE et al., 1998). Os padrões eletroforéticos obtidos para o DNA amplificado a partir da amostra Mb1 são similares aos padrões apresentados por fitoplasmas do grupo 16SrIII, para o conjunto de enzimas usadas na análise de RFLP (Figura 4). Por sua vez, os perfis resultantes da digestão enzimática do 16S rDNA dos fitoplasmas encontrados nas amostras Mb2 e Mb3 são idênticos àqueles do fitoplasma representante típico do grupo 16SrXIII, o agente da virescência em vinca (Figura 4). O padrão de vinca usado neste ensaio como representante do grupo 16SrIII não havia sido anteriormente identificado ao nível de subgrupo.

Os padrões de restrição gerados pela amplificação do fragmento genômico dos fitoplasmas detectados nas duas plantas sintomáticas provenientes de Nova Bassano (Nb1 e Nb2) foram idênticos entre si e coincidentes com aqueles relatados pela literatura para fitoplasma pertencentes ao grupo 16SrXV-A (MONTANO et al., 2001). Adicionalmente às enzimas de restrição utilizadas nos ensaios anteriores de RFLP, foram empregadas as endonucleases *HaeIII*, *BfaI* e *HinfI*, as quais complementaram e possibilitaram a identificação dos fitoplasmas presentes em couve-flor como afiliados ao grupo 16SrXV-A (Figura 5).

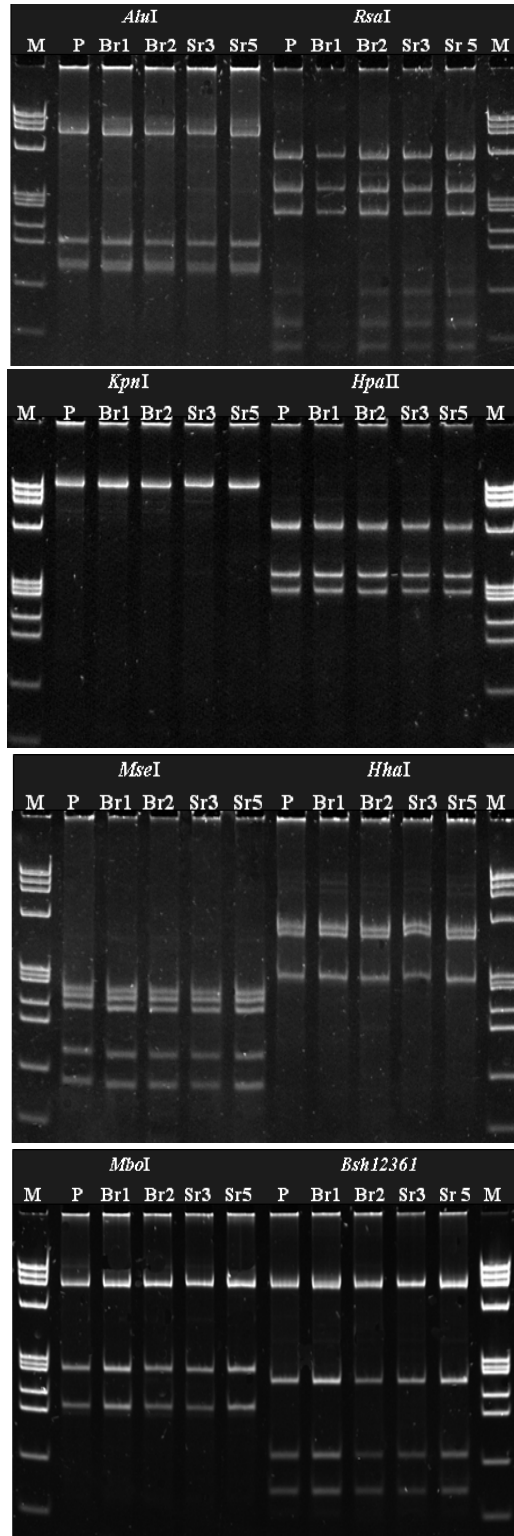


Figura 3- Padrões obtidos por análise de RFLP do fragmento genômico amplificado de fitoplasmas encontrados em amostras de plantas de couve-flor coletadas em Bragança Paulista e Sorocaba, utilizando-se as enzimas de restrição *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, *MboI* e *Bsh1236I*. Colunas: (M) marcador molecular PhiX174RFHaeIII; (P) controle positivo representado por fitoplasma do enfezamento do repolho (subgrupo 16SrIII-J); (Br1 e Br2) amostras de couve-flor provenientes de Bragança Paulista; (Sr3 e Sr5) amostras de couve-flor provenientes de Sorocaba

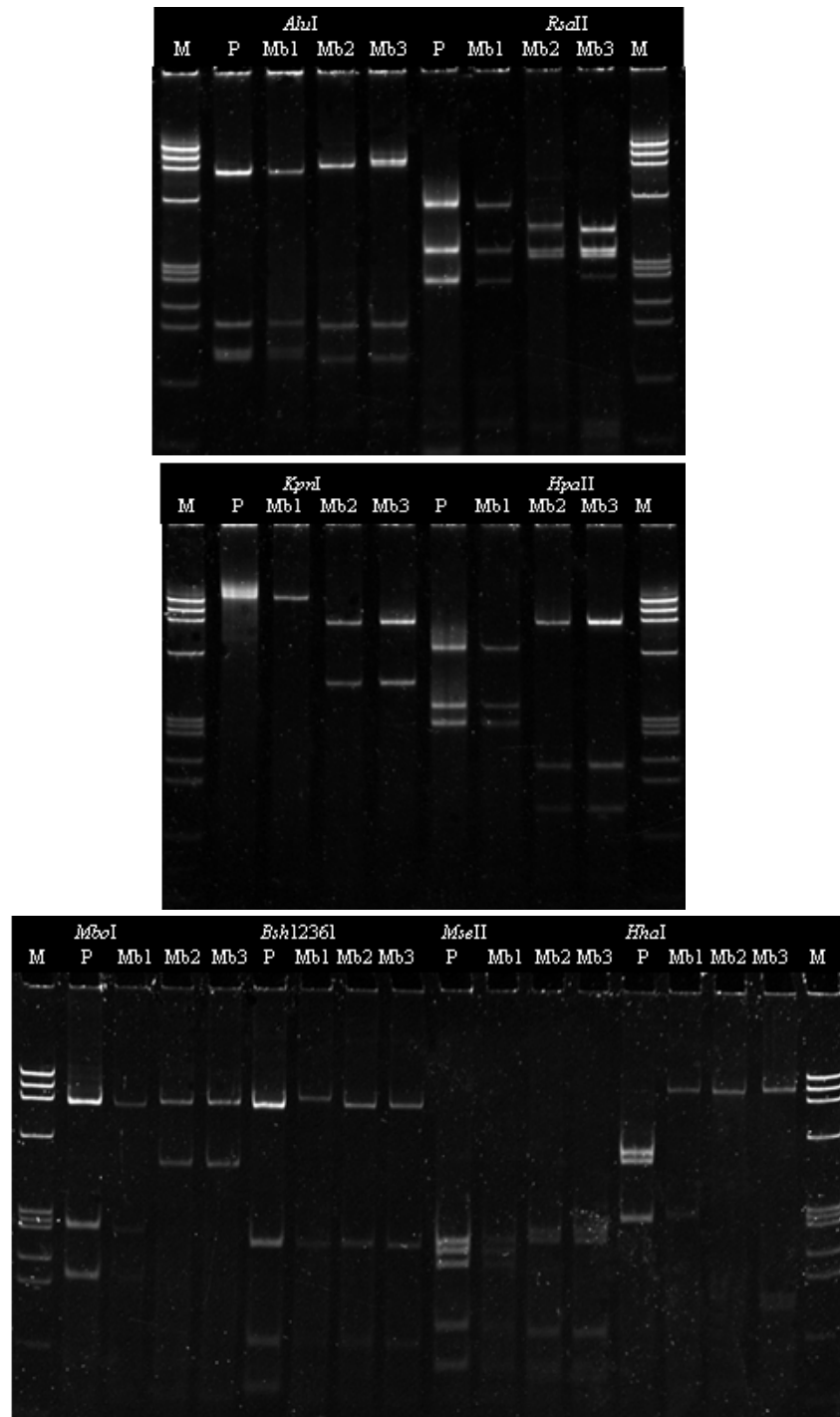


Figura 4- Padrões obtidos por análise de RFLP do fragmento genômico amplificado de fitoplasmas encontrados em amostras de plantas de couve-flor coletadas em Morungaba-SP, utilizando-se as enzimas de restrição *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, *MboI* e *Bsh1236I*. Colunas: (M) marcador molecular PhiX174RFHaeIII; (P) amostra de vinca infectada com fitoplasma do grupo 16 SrIII; (Mb1) amostra de couve-flor infectada por fitoplasma do grupo 16SrIII; (Mb2 e Mb3) amostras de couve-flor infectadas por fitoplasmas do grupo 16SrXIII

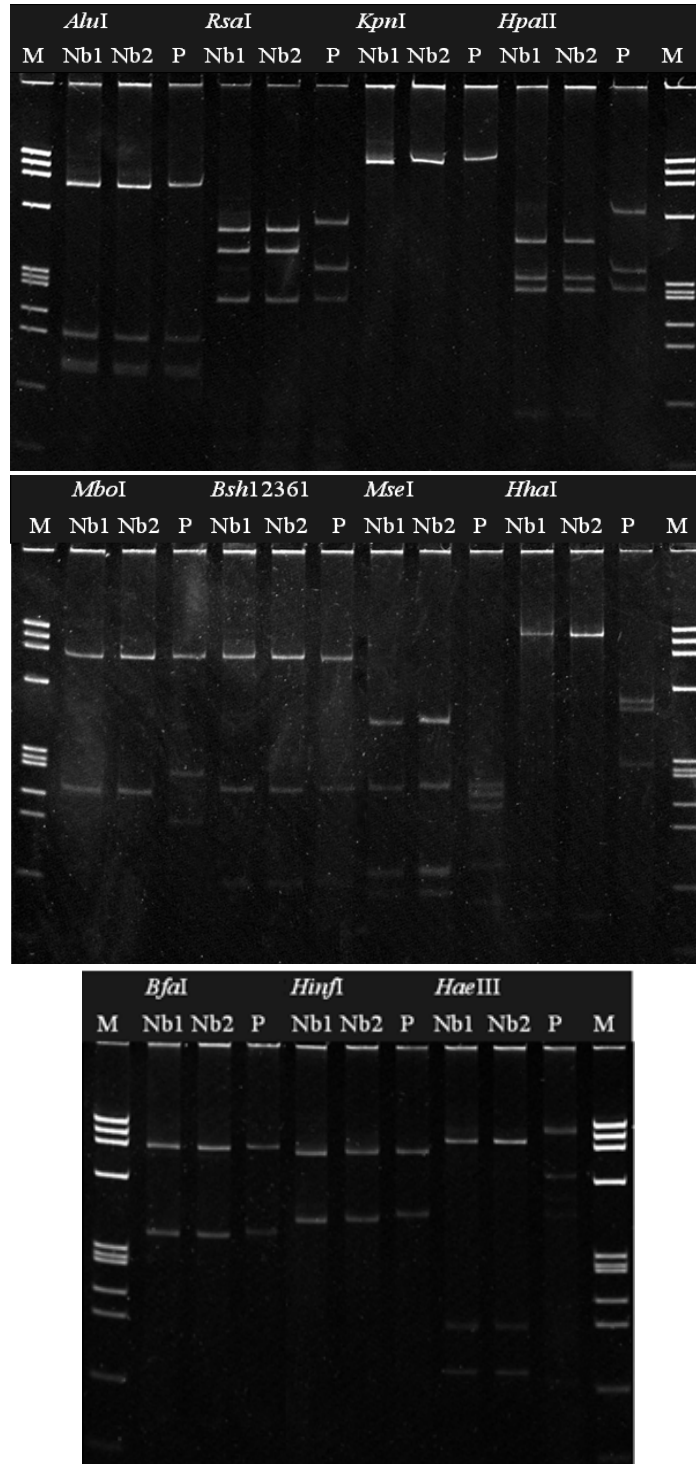


Figura 5 - Padrões obtidos por análise de RFLP do fragmento genômico amplificado de fitoplasmas encontrados em amostras de plantas de couve-flor coletadas em Nova Bassano-RS, utilizando-se as enzimas de restrição *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, *MboI*, *Bsh1236I*, *HaeIII*, *BfaI* e *HinfI*. Colunas: (M) marcador molecular PhiX174RF*HaeIII*; (P) amostra de vinca infectada com fitoplasma do grupo 16 SrIII; Colunas (Nb1 e Nb2) amostras de couve-flor infectadas por fitoplasmas do grupo 16SrXV-A

A identificação de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII-J em couve-flor, através de análise de RFLP, foi definida principalmente pelos produtos de digestão gerados pelas enzimas *HhaI* e *Bsh* 1236 (*Bst*UI), as quais produziram padrões eletroforéticos típicos de fitoplasmas do referido subgrupo. O fitoplasma representante do grupo 16SrIII subgrupo J foi identificado primeiramente no Brasil por Montano et al. (2000), em plantas de chuchu e da espécie silvestre conhecida por melão de São Caetano. Posteriormente, fitoplasmas deste subgrupo foram caracterizados molecularmente em plantas de abóbora com superbrotamento (MONTANO et al., 2006) e em repolho com sintomas de enfezamento (AMARAL MELLO, 2007). Este fitoplasma também foi encontrado em associação com plantas de alho apresentando a doença denominada de tristeza, muito importante na cultura desta olerícola em campos de produção localizados na Argentina (GALDEANO et al., 2004). Aparentemente a ocorrência de fitoplasmas membros do 16SrIII-J está limitada à América do Sul, sugerindo a presença de um ancestral comum (GALVIS; LEGIZAMÓN; GAITÁN, 2007).

As enzimas de restrição *Bsh*1236 e *MseI* permitiram a caracterização de fitoplasmas do grupo 16SrXIII nas plantas de couve-flor. Fitoplasmas deste grupo têm aparecido mais recentemente e com boa frequência, à medida em que ampliam as pesquisas realizadas com maior diversidade de espécies vegetais cultivadas no território brasileiro. O representante padrão para este grupo é o fitoplasma associado à virescência da vinca (LEE et al., 1998), porém também já foram relatados fitoplasmas deste grupo em plantas de morango com sintomas de filodia observadas nos Estados Unidos (JOMANTIENE et al., 1998) e em árvores de cinamomo portadoras de uma doença conhecida como declínio (ARNEODO et al., 2005), bastante comum em países da América do Sul. No Brasil, fitoplasmas do grupo 16SrXIII foram encontrados em plantas de mamão que apresentavam a doença ‘vira-cabeça’, ocorrente em pomares instalados no estado do Espírito Santo (MELO et al., 2007; MELO, 2009). Na própria região do Cinturão Verde, recentemente foi relatada a presença de fitoplasmas deste grupo em plantas de brócolis (ECKSTEIN et al., 2009) cultivadas em campos comerciais. A frequente ocorrência de fitoplasmas do grupo 16SrXIII em hospedeiros diversos, indica que estes agentes de doença estão amplamente distribuídos, principalmente no continente americano e que a sua especificidade pela planta hospedeira parece ser baixa.

A identificação de fitoplasmas do subgrupo 16SrXV-A em plantas de couve-flor provenientes de Nova Bassano evidenciou que esta olerícola é um novo hospedeiro para

representantes deste grupo. Estes fitoplasmas foram inicialmente caracterizados em plantas de hibisco com superbrotamento, encontradas no estado do Rio de Janeiro, sendo indicados representantes de uma nova espécie denominada ‘*Candidatus Phytoplasma brasiliense*’ (MONTANO et al., 2001). Mais recentemente, no Estado de São Paulo, em plantas de hibisco exibindo sintomas de superbrotamento de ramos, enfezamento, clorose de folhas e declínio foram também identificados fitoplasma pertencentes ao grupo 16SrXV-A (SILVA et al., 2009). A ocorrência deste tipo de fitoplasma em uma espécie hortícola e num local distante dos Estados onde foi encontrado anteriormente mostra que a sua distribuição pode ser mais abrangente e que sua gama de hospedeiros pode ser mais ampla.

2.3.4 Sequenciamento, análise virtual de RFLP e análise de sítios putativos de restrição

Foram clonados e sequenciados os fragmentos genômicos correspondentes ao 16S rDNA dos fitoplasmas encontrados nas amostras de couve-flor: Sr3 e Sr5 coletadas em Sorocaba, Mb5 e Mb6 oriundas de Morungaba e Pr1 de Piracicaba, previamente identificados como representantes do grupo III-J; Mb2 e Mb3 originárias de Morungaba, representando o grupo 16SrXIII; Nb1 e Nb2 provenientes de Nova Bassano, representantes do grupo 16SrXV-A (Tabela 2). O sequenciamento foi repetido por três vezes para cada material genético de fitoplasma encontrado em cada amostra. As sequências consenso foram determinadas e encontram-se no Apêndice deste trabalho.

Os fragmentos genômicos obtidos a partir dos fitoplasmas presentes nas amostras Sr3 e Sr5 apresentaram, respectivamente, 1243 e 1241 pares de bases e mostraram identidade com o fitoplasma associado ao superbrotamento do chuchu, grupo 16SrIII-J (GenBank, acesso AF147706). Também mostraram identidade com o grupo 16SrIII-J, os fitoplasmas das amostras Mb5, com 1221 pares de bases, e Mb6, com 1287 pares de bases, além daquele identificado na amostra de couve-flor de Piracicaba (Pr1), com 1281 pares de bases. As sequências nucleotídicas determinadas para os fitoplasmas presentes nas amostras Mb2 e Mb3 apresentaram 1244 e 1240 pares de bases, respectivamente, e mostraram identidade com o fitoplasma da necrose apical do mamoeiro, pertencente ao grupo 16SrXIII (GenBank, acesso EU719111). As sequências do fragmento 16S rDNA do fitoplasma identificado na amostra Nb1, com 1273 pares de bases, e na amostra Nb2, com 1298 pares de bases, apresentaram identidade com o fitoplasma agente do superbrotamento do hibisco (grupo 16SrXV-A) (GenBank, acesso AF147708).

As seqüências concenso dos fitoplasmas encontrados nas amostras Sr5, Mb2 e Nb1 foram selecionados como representantes dos grupos 16SrIII-J, 16SrXIII e 16SrXV-A, respectivamente, para a condução da análise virtual de RFLP e elaboração dos mapas de restrição.

Os padrões coletivos de RFLP revelados por estes fitoplasmas foram indistinguíveis daqueles gerados pelos fitoplasmas representantes dos grupos 16SrIII-J, 16SrXIII e 16SrXV-A usados como referências, cujas seqüências estavam depositadas no GenBank. Os padrões eletroforéticos para as amostras Sr5, Mb2 e Nb1 estão representados nas Figuras 6, 8 e 10, respectivamente. Os padrões resultantes da análise virtual de RFLP foram similares àqueles revelados pela análise convencional de RFLP, conduzida com a digestão enzimática dos produtos de PCR usando-se as mesmas 8 endonucleases.

As seqüências do 16S rDNA dos fitoplasmas presentes nas amostras Sr5, Mb2 e Nb1, submetidas à análise de sítios putativos de restrição, apresentaram os mesmos sítios de restrição, para todas as enzimas selecionadas para a análise, quando em comparação com os perfis das seqüências de fitoplasmas dos grupos 16SrIII-J (Figura 7), 16SrXIII (Figura 9) e 16SrXV (Figura 11).

O sequenciamento das bases nucleotídicas do 16S rDNA permitiu confirmar a associação de fitoplasmas pertencentes a três grupos distintos com o enfezamento da couve-flor, levando a uma análise em relação ao patossistema fitoplasmas-brássicas. Assim, fitoplasmas do grupo 16SrIII foram predominantes em plantas de couve-flor com enfezamento, assim como ocorreu para o enfezamento do repolho, anteriormente relatado por Amaral Mello (2007), que também encontrou fitoplasma do grupo 16SrIII, subgrupo J, associado a esta doença. O sequenciamento possibilitou confirmar que a couve-flor também é uma nova espécie hospedeira de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrXIII e 16SrXV-A, como já evidenciado nas análises convencionais de RFLP, conduzidas neste trabalho. Fitoplasma do grupo 16SrXIII já foi encontrado em plantas de brócolis com sintomas de enfezamento por Eckstein et al. (2009) também em Morungaba, ou seja, na mesma região onde se encontrou fitoplasma do grupo 16SrXIII em couve-flor.

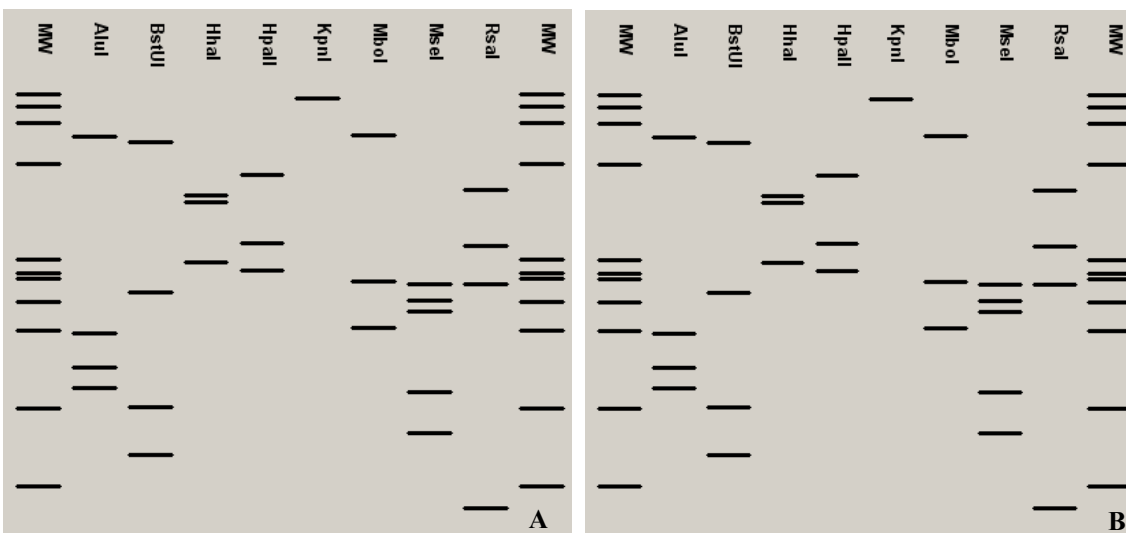


Figura 6- Padrões virtuais de RFLP obtidos pela digestão enzimática do 16S rDNA de fitoplasma do grupo 16SrIII-J identificado na amostra Sr5 de planta de couve-flor (Gel A) e do fitoplasma do enfezamento do chuchu, cuja sequência está depositada no GenBank (AF147706) (Gel B). Sítios de restrição foram reconhecidos pelas enzimas: *AluI*, *BstUI*, *HhaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI* e *RsaI*. Marcador de peso molecular MW=PhiX174DNA-*HaeIII*

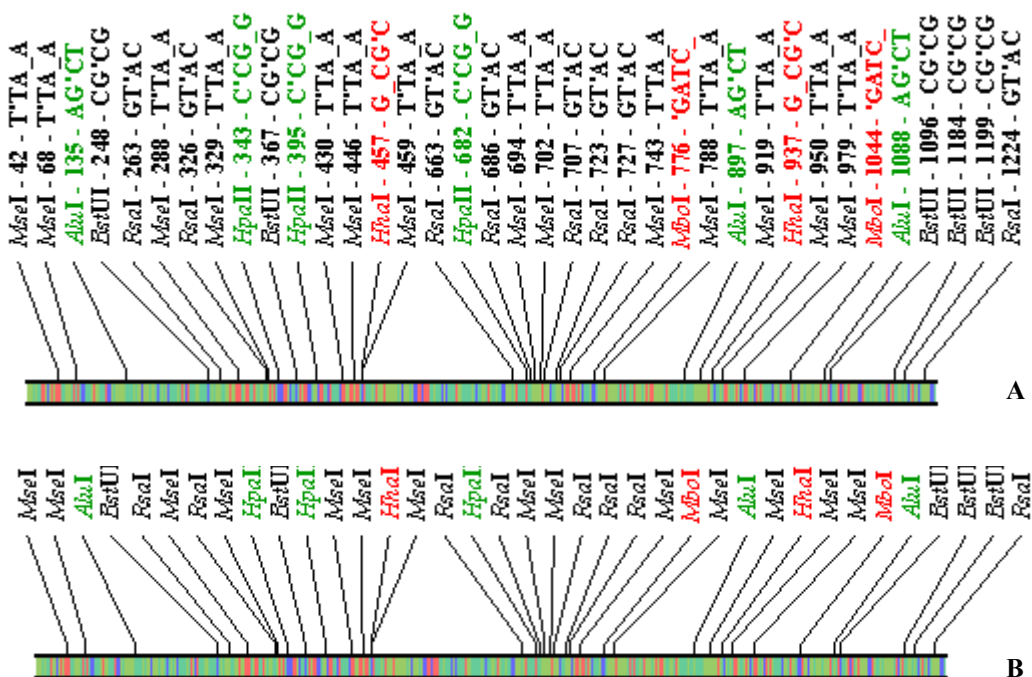


Figura 7- Análise de sítios putativos de restrição do 16S rDNA de fitoplasma do grupo 16SrIII-J identificado na amostra Sr5 de planta de couve-flor (Mapa de restrição A) e do fitoplasma do enfezamento do chuchu, cuja sequência está depositada no GenBank (AF147706) (Mapa de restrição B)

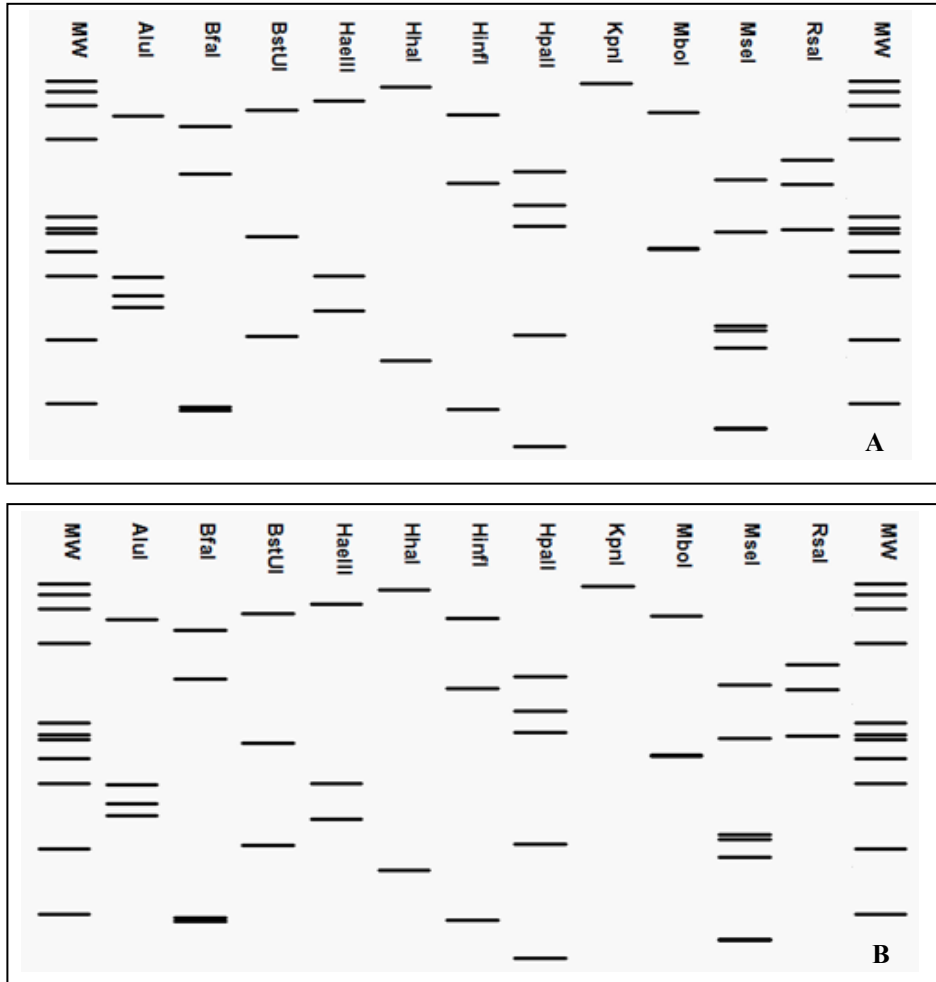


Figura 10- Padrões virtuais de RFLP obtidos pela digestão enzimática do 16S rDNA de fitoplasma do grupo 16SrXV identificado na amostra Nb1 de planta de couve-flor (Gel A) e do fitoplasma do superbrotamento do hibisco, cuja sequência está depositada no GenBank (AF147708) (Gel B). Sítios de restrição foram reconhecidos pelas enzimas: *AluI*, *BstUI*, *HhaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI* e *RsaI*. Marcador de peso molecular MW=PhiX174DNA-*HaeIII*

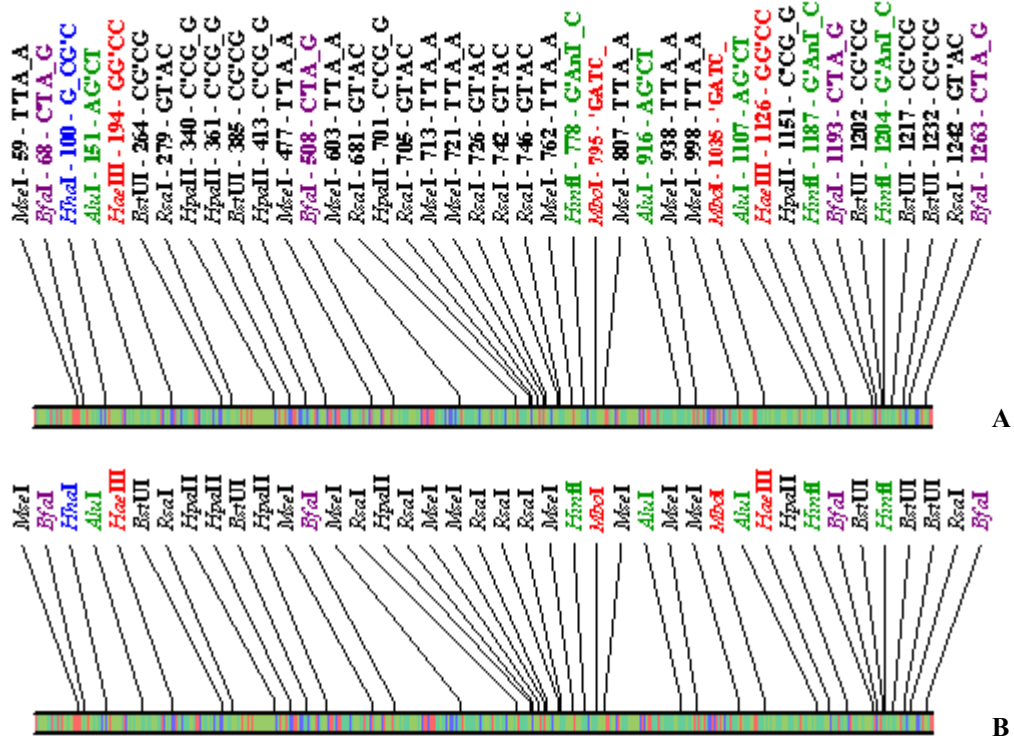


Figura 11- Análise de sítios putativos de restrição do 16S rDNA de fitoplasma do grupo 16SrXV identificado na amostra Nb1 de planta de couve-flor (Mapa de restrição A) e do fitoplasma do superbrotamento do hibisco, cuja sequência está depositada no GenBank (AF147708) (Mapa de restrição B)

2.3.5 Análise filogenética

A partir das sequências consenso determinadas para cada um dos fitoplasmas representativos do grupo 16SrIII-J, 16SrXIII e 16SrXV-A identificados neste trabalho foi construída uma árvore filogenética (Figura 12). Para tanto, foram utilizadas sequências de fitoplasmas depositadas no Genbank representantes de 18 grupos distintos, 17 subgrupos pertencentes ao grupo 16SrIII, 4 representantes do grupo 16SrXIII e um do grupo 16SrXV, além da sequência de *Acholeplasma laidlawii*. Os números nos ramos representam valores de confiança no 'bootstrapping'.

As sequências nucleotídicas determinadas para os fitoplasmas presentes nas amostras Sr5, Mb2 e Nb1 de couve-flor foram alocadas nos mesmos ramos que os fitoplasmas do superbrotamento do chuchu (16SrIII-J), da necrose do mamoeiro (16SrXIII) e do superbrotamento do hibisco (16SrXV-A), respectivamente. Embora o fitoplasma do grupo

16SrXIII encontrado em couve-flor não tivesse sido identificado ao nível de subgrupo, a análise filogenética mostrou que o mesmo está mais relacionado ao fitoplasma do mamoeiro, o qual foi determinado como um representante de um novo subgrupo, proposto como 16SrXIII-D (MELO, 2008). A árvore filogenética mostrou resultados congruentes com aqueles obtidos nas análises convencionais e virtuais de RFLP, bem como nas análises dos mapas de restrição, agregando os fitoplasmas identificados em couve-flor àqueles usados como referências para os grupos 16SrIII, 16SrXIII e 16SrXV.

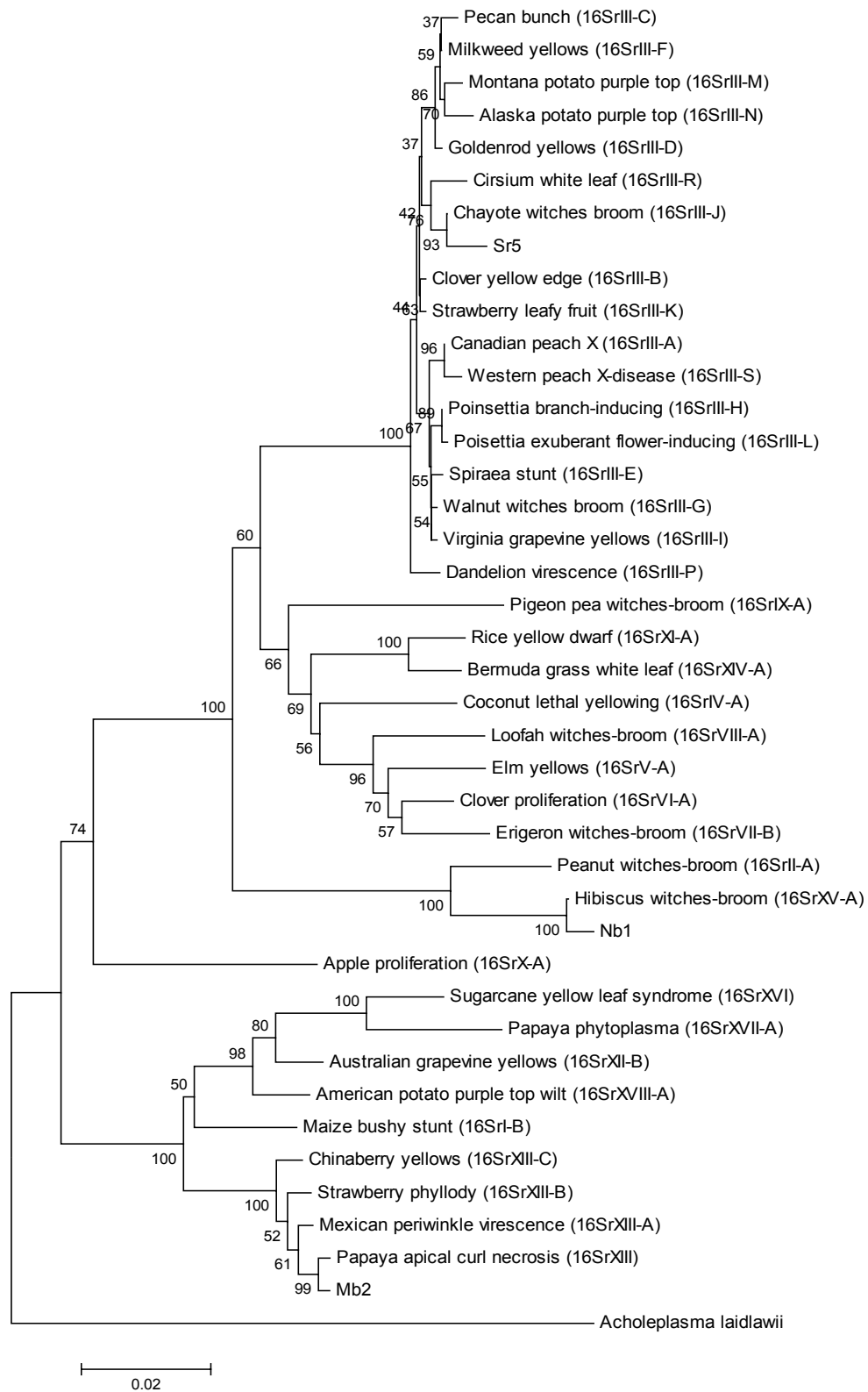


Figura 12- Árvore filogenética construída com representantes de 18 diferentes grupos de fitoplasma, 17 subgrupos representantes do grupo 16SrIII, 4 representantes do grupo 16SrXIII e um representante do grupo 16SrXV, o procarioto *Acholeplasma laidlawii* e fitoplasmas da couve-flor, pelo método 'Neighbor-Joining'. Os números nos ramos representam valores de confiança no 'bootstrapping'.

A Tabela 5 apresenta uma síntese dos grupos de fitoplasmas encontrados nas plantas de couve-flor sintomáticas e assintomáticas amostradas e que foram identificados por meio dos métodos utilizados neste trabalho, ou seja, PCR com primers específicos para grupo, RFLP e sequenciamento

Tabela 5- Relação das amostras de couve-flor sintomáticas e assintomáticas analisadas quanto a presença de fitoplasmas através de PCR e identificadas através da utilização de primers específicos para grupo, RFLP ou sequenciamento

Local	Amostras sintomáticas	Identificação	Amostras assintomáticas	Identificação
Bragança Paulista	Br1	16SrIII-J		
	Br2	16SrIII-J		
	Br3	16SrIII		
	Br4	16SrIII		
Ibiúna	Ib1	16SrIII		
	Ib2	16SrIII		
Morungaba	Mb1	16SrIII		
	Mb2	16SrXIII		
	Mb3	16SrXIII		
	Mb4	16SrIII		
	Mb5	16SrIII-J		
	Mb6	16SrIII-J		
	Mb7	16SrIII		
	Mb8	-		
	Mb9	-		
	Mb10	-		
	Mb11	-		
	Mb12	-		
	Mb13	-		
	Mb14	-		
	Mb15	-		
Sorocaba	Sr1	-	Sr1'	16SrIII
	Sr2	-	Sr2'	16SrIII
	Sr3	16SrIII-J	Sr3'	16SrIII
	Sr4	16SrI e 16SrIII	Sr4'	16SrIII
	Sr5	16SrIII-J	Sr5'	16SrIII
	Sr6	16SrIII	Sr6'	16SrIII
	Sr7	-	Sr7'	16SrIII
	Sr8	-	Sr8'	16SrIII
	Sr9	16SrIII	Sr9'	16SrIII
	Sr10	16SrIII	Sr10'	16SrIII
	Sr11	16SrIII	Sr11'	-
	Sr12	16SrIII	Sr12'	-
	Sr13	16SrIII	Sr13'	-
	Sr14	16SrIII	Sr14'	-
		Sr15'	-	
		Sr16'	-	
		Sr17'	-	
Piracicaba			Pr1'	16SrIII-J
Caxias do Sul	Cs1	-		
Nova Bassano	Nb1	16SrXV-A		
	Nb2	16SrXV-A		
	Nb3	16SrXV-A		

2.3.6 Microscopia de luz

As secções histológicas observadas em microscópio de luz podem ser visualizadas na Figura 13. A região do floema das plantas doentes, conforme mostra a Figura 13.1, encontrava-se escurecida devido à provável ação dos fitoplasmas. Plantas sadias apresentam a região vascular clara, quase indistinguível com relação ao tecido parenquimático. As secções transversais desta região em plantas sadias revelaram tecidos íntegros, de cor clara e, assim como na visualização a olho nu, é imperceptível a diferença existente entre tecidos uma vez que não foram utilizados corantes diferenciais (Figura 13.2). Nas amostras das plantas com sintoma, a região do floema (Figuras 13.3 e 13.4) apresenta-se escurecida e com início de degeneração celular. Os tecidos, tanto vasculares como os parenquimáticos, podem ser nitidamente diferenciados mesmo sem o uso de corante, pois as alterações causadas pela provável presença do fitoplasma no floema sugerem indução de alteração em tecidos adjacentes ao floema também.

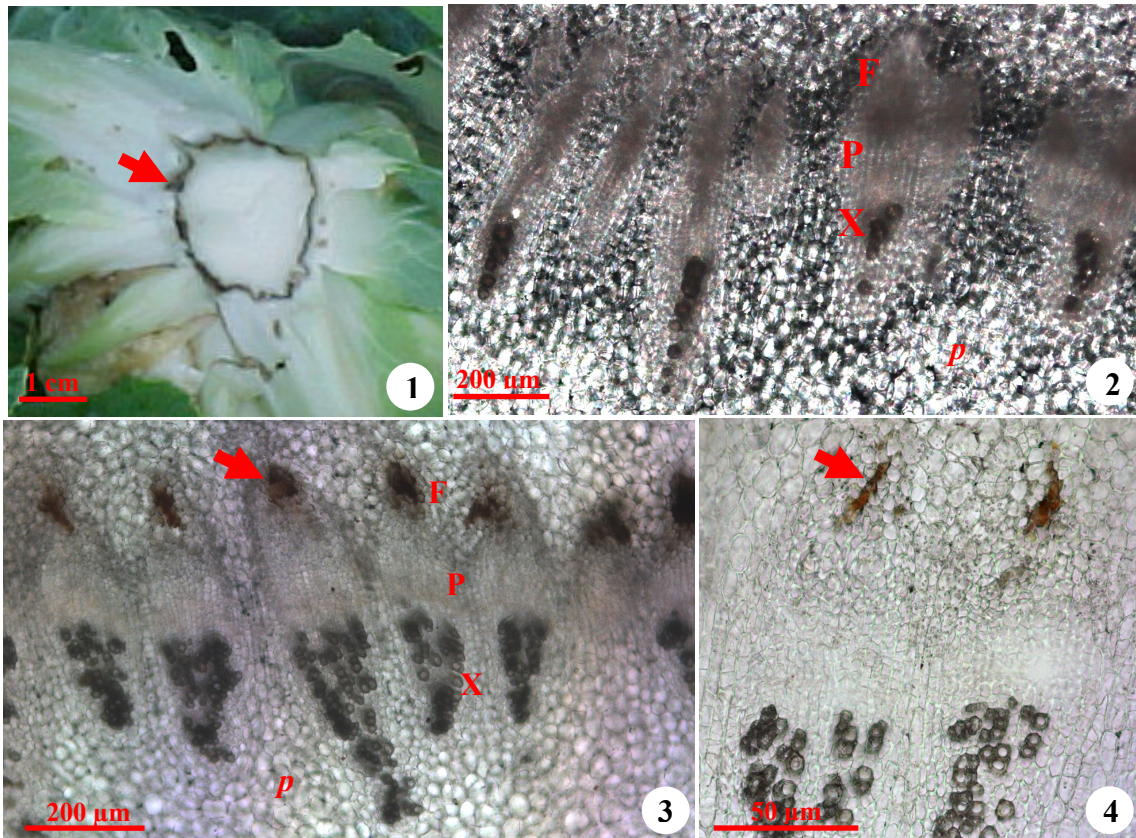


Figura 13- Micrografia de luz da região vascular de plantas de couve-flor. 1. Sintoma de escurecimento da região dos feixes vasculares (seta) em caule de couve-flor coletados em campo. 2. Secção transversal da região vascular de planta sadia. 3. Secção transversal da região vascular de planta doente, com sintomas de escurecimento do floema e degeneração celular em regiões adjacentes ao floema (seta). 4. Detalhe da região vascular de couve-flor doente (seta). Floema (F), procâmbio (p), xilema (X) e parênquima (p)

Segundo Khan; Srivastava; Singh (2006), o escurecimento da região do floema em plantas de couve-flor infectadas por fitoplasmas deve-se, provavelmente, a respostas de resistência da planta à infecção de fitoplasma. Os fitoplasmas também causam alterações na concentração de metabólitos e alguns destes estão envolvidos nos mecanismos de defesa das plantas (CHOI et al., 2004; JUNQUEIRA; BEDENDO; PASCHOLATI, 2004).

Necrose de floema também está no quadro de sintomas de doenças associadas a fitoplasma (STRETEN; GIBB, 2006). A infecção por fitoplasma pode produzir metabólitos que rompem com a integridade do tecido do floema (GUTHRIE et al., 2001). Em plantas de sésamo foi observada a formação de exudatos escurecidos em decorrência da infecção por fitoplasmas (AKHTAR et al., 2009). Estudos histológicos mostraram que fitoplasmas induzem aberrações

anatômicas como a deposição de calose nos elementos crivados, seguido de colapso do sistema de transporte de seiva e afetam também na diferenciação destes tecidos (GARNIER et al., 2001).

O escurecimento de vasos condutores em couve-flor também já foi atribuído a doenças causadas por patógenos fúngicos. Sintomas ocasionados por infecção por fitoplasma em outras culturas, como o milho, também já foram atribuídos a outros patógenos, como o *Fusarium* sp. e outras bactérias fastidiosas (JOVIC et al., 2007). Pilkington et al. (2004) também relatam um escurecimento nos tecidos logo abaixo da periderme em plantas de alfafa e este escurecimento diferiu daquele causado por outra bactéria vascular, *Clavibacter* sp. Os autores vinculam este sintoma com a infecção pelo fitoplasma associado à doença ‘Australian lucerne yellows’.

A ilustração dos cortes histológicos observada na Figura 13 e as ilustrações na Figura 1 estão de acordo com a descrição de sintomas que ocorrem em outras brássicas, como repolho (AMARAL MELLO, 2007) e brócolis (ECKSTEIN et al., 2008). Nos Estados Unidos, em plantas de repolho também foram observados estes sintomas, ou seja, vasos escurecidos, proliferação de brotos laterais na base da planta e avermelhamento das folhas (LEE et al., 2003).

2.3.7 Detecção e identificação de fitoplasmas em cigarrinhas

Como tentativa para identificar cigarrinhas portadoras de fitoplasmas e para identificar os fitoplasmas encontrados nestes insetos, cinco grupos de morfotipos foram submetidos à análise de PCR. Dentre os cinco grupos de morfotipos de cigarrinhas avaliados, fitoplasmas foram detectados em dois destes grupos, através da amplificação de fragmentos genômicos de aproximadamente 1,2 kb, visualizados na forma de bandas em gel de agarose (Figura 14). Exemplares de cada um destes grupos, os quais haviam sido mantidos em laboratório, foram encaminhados para a Dra. Keti Zanol, taxonomista especializada na subfamília Deltocephalinae, para identificação dos insetos ao nível de espécie. As cigarrinhas foram classificadas como pertencentes às espécies *Balclutha hebe* (Kirkaldy, 1906) e *Exitianus obscurinervis* (Stål, 1959) (Figura 15).

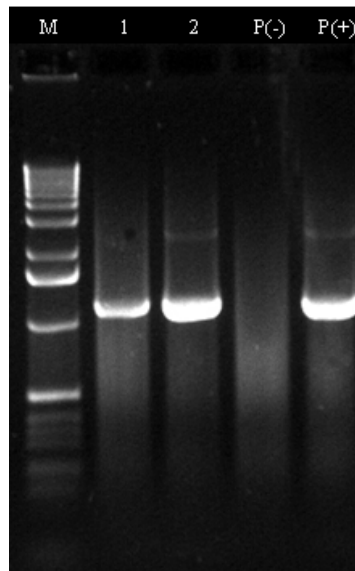


Figura 14- Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas presentes em cigarrinhas dos grupos de morfotipos 1 e 2. Colunas: (M) marcador molecular 1 kb Ladder; (1) amostra de cigarrinhas *Balclutha hebe*; (2) amostra de cigarrinhas *Exitianus obscurinervis*; P(-) padrão negativo representado por um inseto Deltocephalinae coletado na área; P(+) controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasmas



Figura 15- Cigarrinhas coletadas em cultura de couve-flor, representantes de dois grupos de morfotipos, nos quais foram detectados fitoplasmas. 1. Exemplar de *Balclutha hebe*; 2. Exemplar de *Exitianus obscurinervis* (Fonte: www.bugguide.net)

Embora fitoplasmas fossem detectados em representantes da espécie *E. obscurinervis*, não foi possível proceder à identificação destes fitoplasmas, pois as amplificações obtidas no PCR não foram adequadas para serem usadas nas análises de RFLP ou sequenciamento do fragmento genômico. Em contrapartida, foi possível clonar e sequenciar o fragmento amplificado de 1,2 kb, detectado em *B. hebe*. A sequência obtida foi aqui denominada de *B. hebe*, contendo 1245 pares de bases e encontra-se descrita no Apêndice deste trabalho. O sequenciamento foi repetido por três vezes. A sequência nucleotídica foi utilizada para análise virtual de RFLP e

mapa de sítio putativo de restrição através de programas de computador apropriados para este tipo de análise. Os perfis virtuais gerados pelo fitoplasma encontrado na amostra de *B. hebe* foram praticamente indistinguíveis daqueles apresentados pelo fitoplasma agente da necrose apical do mamoeiro, um representante do grupo 16SrXIII (Figura 16). Além disso, os sítios putativos de restrição foram muito similares para ambos os fitoplasmas em relação às enzimas selecionadas para este tipo de análise (Figura 17). A árvore filogenética foi construída a partir da sequência do fitoplasma encontrado em *B. hebe*, fitoplasmas representantes de 18 diferentes grupos de classificação (Figura 18) e mostrou que o fitoplasm identificado na cigarrinha fica alocado no mesmo ramo que o fitoplasma agente da necrose apical do mamoeiro. Os valores do 'bootstrapping' foram suficientes para suportar a posição dos ramos componentes da árvore filogenética.

O presente trabalho mostrou que plantas sintomáticas de couve-flor também eram portadoras de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrXIII, portanto a presença de fitoplasmas deste mesmo grupo em insetos coletados na cultura ou nas suas proximidades sugere que os representantes de *B. hebe* possam ter alguma relação com a transmissão do fitoplasma agente da doença em couve-flor. Ressalta-se que em plantas de brócolis com enfezamento, também amostradas na região do Cinturão Verde, foram detectados fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrXIII (ECKSTEIN et al., 2009). Apesar de o presente trabalho mostrar a predominância de fitoplasmas do grupo 16SrIII e da ocorrência de fitoplasmas do grupo 16SrI em associação com plantas de couve-flor mostrando sintomas de enfezamento, nenhum representante destes grupos foi identificado nos insetos da espécie *B. hebe*. No entanto, fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII foram detectados tanto em plantas de repolho com enfezamento como em cigarrinhas da subfamília Deltocephalinae, indicando que insetos desta subfamília podem estar envolvidos na transmissão dos fitoplasmas para a cultura do repolho na região de Ibiúna-SP, que também faz parte do cinturão verde de São Paulo (AMARAL MELLO, 2007).

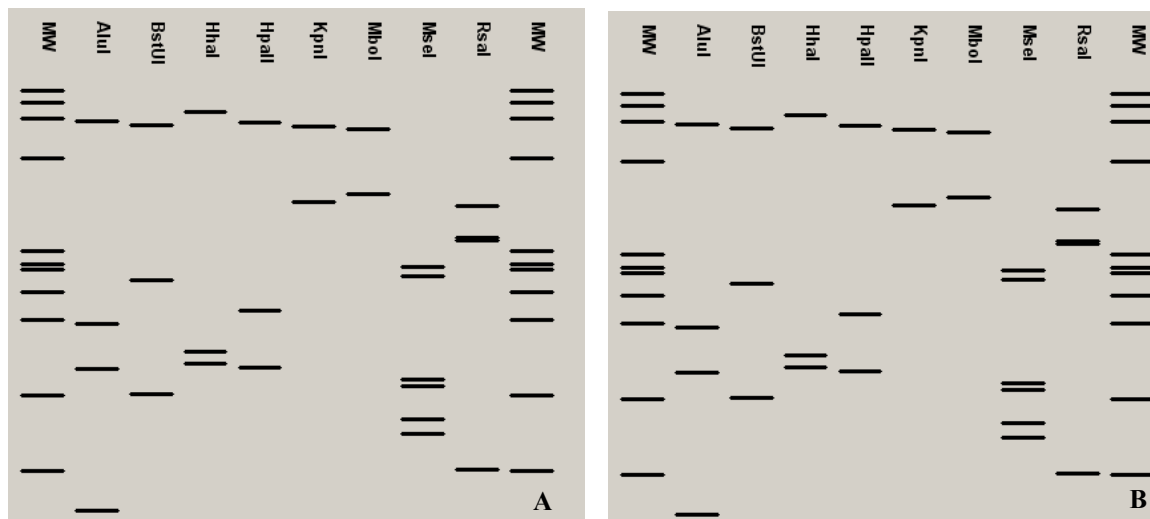


Figura 16- Padrões de restrição gerados pela análise virtual de RFLP do 16S rDNA do fitoplasma associado ao enfezamento da couve-flor, encontrado em cigarrinhas da espécie *B. hebe*

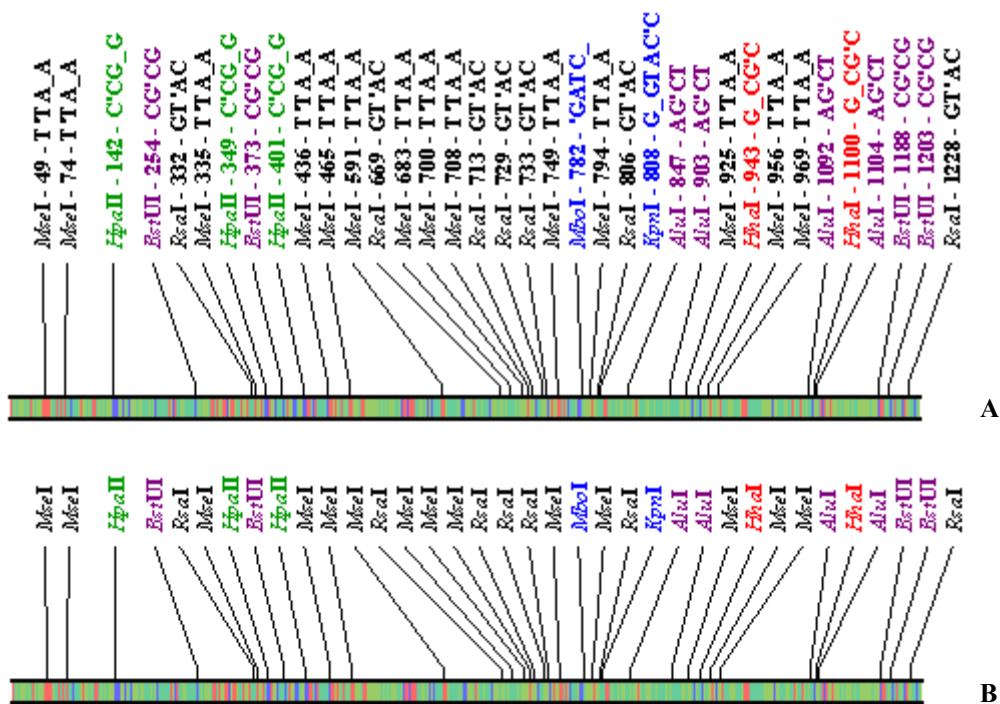


Figura 17- Análise dos sítios putativos de restrição do 16S rDNA do fitoplasma associado ao enfezamento da couve-flor, encontrado em cigarrinhas da espécie *B. hebe*

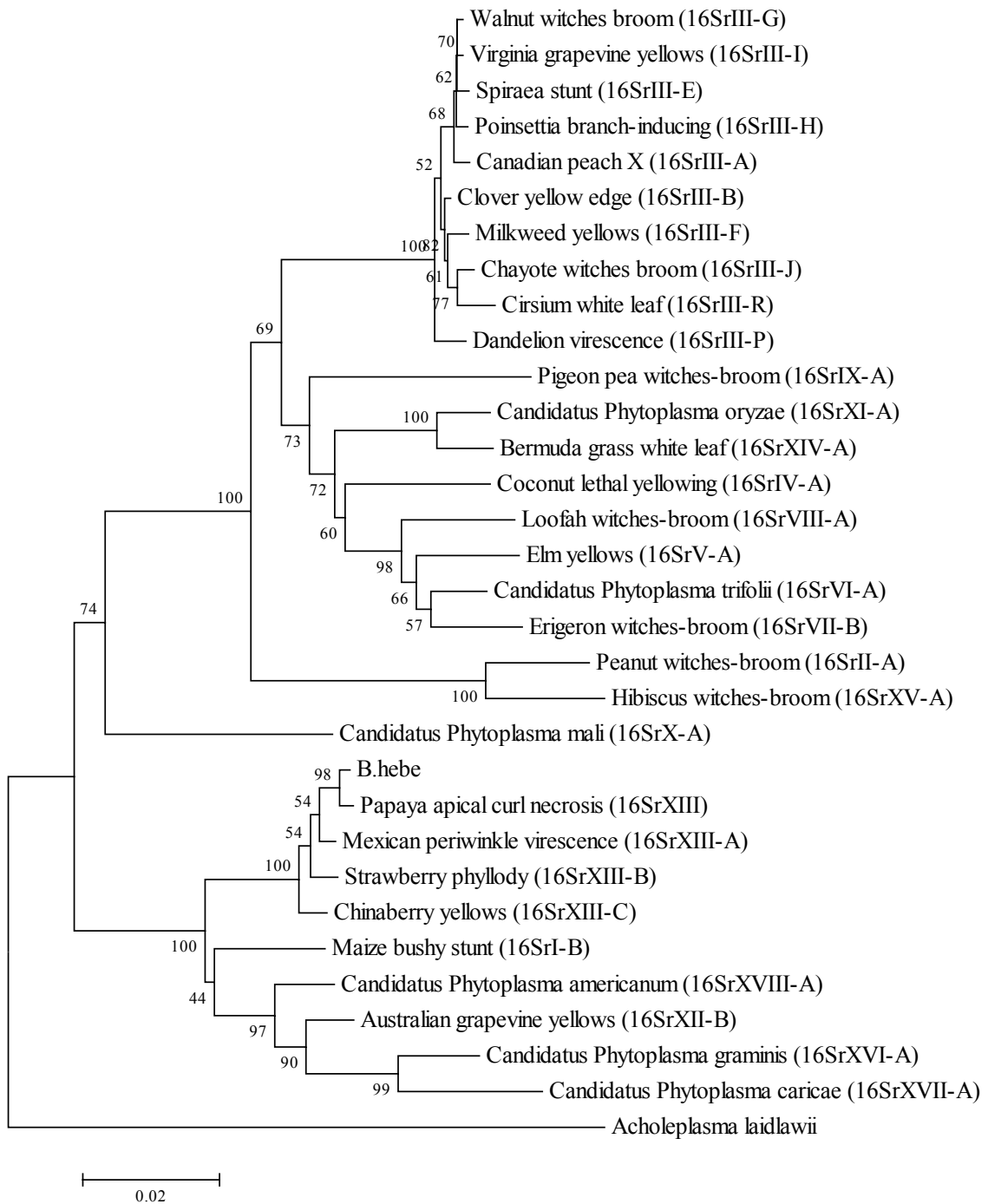


Figura 18- Árvore filogenética construída com representantes de 18 diferentes grupos de fitoplasma, 4 representantes do grupo 16SrXIII, o fitoplasma encontrado em *B. hebe* e o procarioto *Acholeplasma laidlawii*, utilizando o método de 'Neighbor-Joining'. Os números nos ramos representam valores de confiança no 'bootstrapping'

A espécie *B. hebe* foi encontrada em maior abundância nos locais amostrados, seguida por *E. obscurinervis*. A abundância de uma determinada espécie de inseto em uma área é um dos primeiros indicativos de que esta espécie possa estar envolvida na disseminação do patógeno (PILKINGTON et al., 2003).

Outra informação importante é em relação à propensão do inseto encontrado na área em se alimentar em plantas da espécie em estudo, sobrevivendo, portanto, na cultura. Isto reforça a ideia de que aquele inseto possa ser um provável vetor do agente patogênico. Apesar de se alimentar de capim, *E. exitiosus* pode transmitir mollicutes como o espiroplasma, agente do enfezamento, para plantas de milho (NAULT, 1980). Em função da diversidade de cigarrinhas presentes no Brasil é possível que insetos vetores neste país sejam diferentes daqueles relatados no exterior, principalmente daqueles que ocorrem em regiões temperadas. É provável também que outras espécies além destes potenciais vetores também possam vetorar o patógeno em áreas de couve-flor. Arocha et al. (2009) encontraram *Exitianus* sp. em campos de capim napier com sintomas de enfezamento e 60% dos indivíduos carregavam fitoplasma do subgrupo 16SrIII-A. Trata-se de insetos polípagos e, sendo assim, apresentam potencial para transmitir patógenos para uma ampla gama de espécies botânicas (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006).

O conhecimento de espécies vetoras de fitoplasmas pode auxiliar no esclarecimento de aspectos epidemiológicos importantes, como a gama de hospedeiros alternativos do patógeno e do inseto. Estas cigarrinhas são fortes candidatas a vetor de fitoplasmas e experimentos de transmissão poderão demonstrar o seu papel no patossistema formado pela couve-flor e fitoplasmas.

2.3.8 Transmissão de fitoplasmas por cigarrinhas

Insetos da espécie *B. hebe*, por serem mais abundantes nos campos cultivados com couve-flor, foram confinados em 15 plantas de couve-flor e as cigarrinhas *E. obscurinervis*, em 6 plantas, por ocorrerem em menor proporção no campo amostrado (Figura 19). A partir das 5 amostras compostas, sendo cada amostra constituída por 3 plantas submetidas à inoculação por *B. hebe*, apenas uma resultou em reação positiva para a presença fitoplasmas (Figura 20.A). Nenhuma planta, no entanto, apresentou sintoma da doença. Estes resultados revelaram que num grupo de aproximadamente 100 insetos coletados ao acaso num campo comercial, pelo menos um estava infectado pelo fitoplasma agente da doença, sendo capaz de transmitir o mesmo para pelo

menos uma planta sadia de couve-flor. Este resultado sugere que possivelmente insetos desta espécie possam estar envolvidos com a transmissão do patógeno do enfezamento da couve-flor. O sucesso de transmissão de fitoplasmas por cigarrinhas é geralmente baixo, como, por exemplo, relatado no trabalho de Jarausch et al. (2001), os quais demonstraram menos de 1% de sucesso na transmissão de fitoplasma com *Cacopsylla pruni* para plantas de abricó. Os resultados obtidos no presente estudo, portanto, abrem uma porta para investigações mais detalhadas sobre uma possível atuação de insetos desta espécie como vetores dos fitoplasmas agentes do enfezamento. Deve ser lembrado que este tipo de resultado pode ser considerado como um dos primeiros indícios para investigações mais específicas, visando a identificação de vetores.

Quanto aos insetos da espécie *E. obscurinervis*, nas duas amostras compostas constituídas de 3 plantas não foi detectada a presença de fitoplasmas. Isto não permite afirmar que indivíduos da referida espécie não sejam capazes de veicular os fitoplasmas associados à doença, pois o número de insetos testados foi muito pequeno, reduzindo em muito a probabilidade de se encontrar algum exemplar portador dos agentes do enfezamento.

Em relação às plantas de vinca, nas quais os insetos de *B. hebe* foram confinados, apesar de nenhuma planta ter mostrado sintoma da doença, fitoplasmas foram encontrados em uma das plantas, de um total de seis plantas analisadas individualmente (Figura 20.B). Este resultado está em conformidade com aquele obtido para insetos desta espécie confinados em plantas de couve-flor, se constituindo num indicativo de que possivelmente esta espécie esteja envolvida com transmissão dos fitoplasmas.

A identificação dos fitoplasmas que foram transmitidos pela cigarrinha para plantas de couve-flor e vinca foi realizada pela aplicação de PCR duplo com os pares de primers específicos na segunda reação. A análise dos produtos de PCR revelou a amplificação de fragmentos genômicos de 1,1 kb e 0,8 kb, evidenciando a presença simultânea de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI e 16SrIII, tanto na amostra composta de couve-flor como na planta individual de vinca (Figura 21). Estes resultados são concordantes com aqueles encontrados nas plantas de couve-flor que exibiam sintomas de enfezamento coletadas em campos comerciais, as quais revelaram associação de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII com plantas.



Figura 19- Ensaio de transmissão de fitoplasmas por meio de cigarrinhas das espécies *Balclutha hebe* e *Exitianus obscurinervis*. 1. Os insetos foram confinados sobre mudas de couve-flor gaiolas feitas com garrafas plásticas. 2. Detalhe da cigarrinha sobre a planta

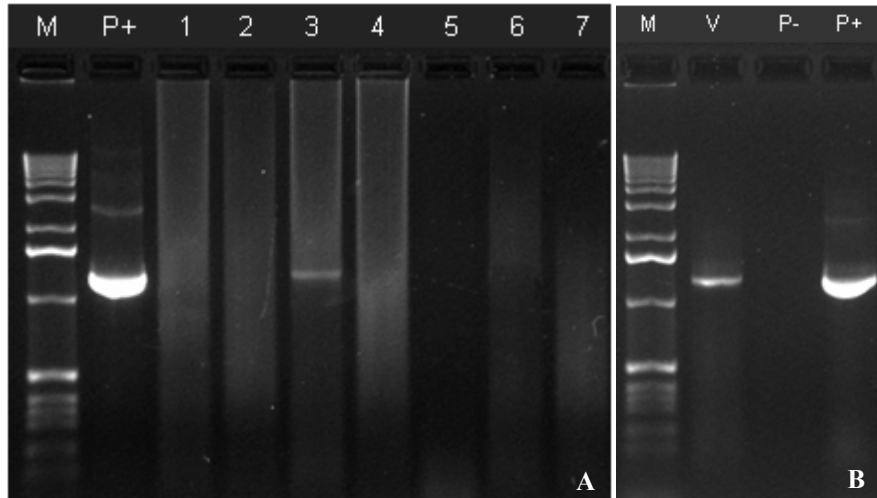


Figura 20- Detecção de fitoplasmas em plantas de couve-flor, transmitidos por insetos coletados no campo. As amplificações do 16S rDNA foram obtidas por duplo PCR com os iniciadores P1/Tint e R16 F2n/R2. Gel A: colunas de 1-5 representam amostras compostas de couve-flor submetidas a insetos de *B. hebe*; colunas de 5-6 representam amostras compostas de couve-flor submetidas a insetos da espécie *E. obscurinervis*. Gel B: amostra de planta de vinca (V) positiva para a presença de fitoplasma submetida à transmissão por insetos da espécie *B. hebe*. Para os géis A e B: (M) marcador molecular 1 kb Ladder; (P-) controle negativo representado por planta de vinca sadia; (P+) controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasmas

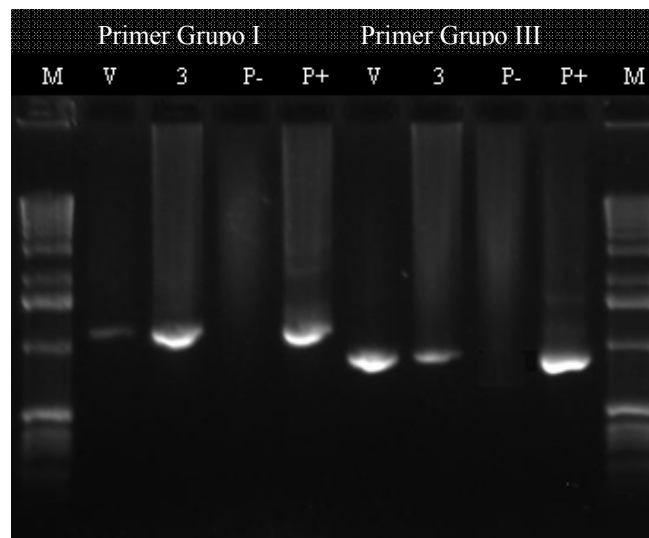


Figura 21- Identificação de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII em plantas de couve-flor e vinca para as quais foram transmitidos fitoplasmas por insetos da espécie *B. hebe* coletados no campo. Amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint na primeira reação e R16(I)F1/R1 e R16(III)F2/R1 na segunda reação. Colunas: (M) marcador molecular 1 kb Ladder; (V) planta de vinca; (3) plantas de couve-flor; (P-) padrão negativo representado po planta de vinca sadia; (P+) padrão positivo representado por vinca

As cigarrinhas provenientes do campo conseguiram sobreviver nas plantas até o quarto dia após o confinamento, quando as gaiolas foram retiradas. Os grupos de insetos, tanto da espécie *B. hebe* como de *E. obscurinervis*, confinados em cada planta de couve-flor e nas plantas de vinca, foram coletados após o quarto dia e tiveram o DNA extraído e usado em PCR, visando a detecção de fitoplasmas em seus tecidos. Todos os grupos de insetos geraram resultados positivos (dados não mostrados), indicando que os mesmos eram portadores de fitoplasmas; no entanto a identificação dos mesmos não foi realizada devido à má qualidade do DNA obtido. O fato de ter sido constatado um período curto de sobrevivência dos insetos nas plantas de couve-flor evidencia que estas espécies vegetais possivelmente não hospedem os insetos. Como a doença tem início nos bordos dos campos plantados com couve-flor, pode-se formular a hipótese de que as cigarrinhas se hospedam em plantas que ocorrem nas áreas de mata ou de pastagens, localizadas nas proximidades da cultura. De acordo com Pilkinton e colaboradores (2004), o inseto não necessariamente deve habitar ou preferir se alimentar na planta hospedeira do fitoplasma para ser considerado vetor da doença.

2.3.9 Transmissão de fitoplasmas através da cuscuta

Um período de 30 dias foi necessário para o estabelecimento da cuscuta nas duas plantas de couve-flor sintomáticas e sabidamente infectadas com fitoplasmas que serviram como plantas fonte do patógeno (Figura 22.1 e 22.2). Após este período, os filamentos da planta parasita foram conduzidos para plantas de vinca crescidas em vasos, as quais foram colocadas nas proximidades das plantas de couve-flor.

Os primeiros sintomas induzidos pelos fitoplasmas foram observados em plantas de vinca a partir de quatro semanas após o estabelecimento do contato entre plantas através da cuscuta. Os sintomas se caracterizaram por clorose foliar, superbrotamento dos ramos e enfezamento da planta (Figura 22.3).

A partir da planta de couve-flor denominada de Cf1 foram obtidas duas plantas de vinca infectadas com fitoplasmas e da planta denominada de Cf2, foi obtida uma planta doente de vinca. Além dos sintomas exibidos pelas plantas, a presença do fitoplasma foi confirmada pela amplificação de fragmentos de DNA de aproximadamente 1,2 kb, correspondentes ao 16S rDNA, através do emprego de PCR conduzido com os primers universais para a detecção de fitoplasmas (Figura 23). O duplo PCR com iniciadores específicos (Figura 24) resultou na amplificação de

fragmentos genômicos de 1,1 kb a partir de DNA extraído da planta de vinca identificada por V3, demonstrando que a planta de couve-flor Cf2 era portadora de fitoplasmas do grupo 16SrI. Em contrapartida, fragmentos de 0,8 kb foram amplificados quando o DNA foi extraído das plantas de vinca V1 e V3, revelando que a planta Cf1 abrigava em tecidos fitoplasmas do grupo 16SrIII. Com isto, ficou demonstrada a transmissão dos fitoplasmas e a evidência de que fitoplasmas distintos podem ser os agentes causais do enfezamento da couve-flor.

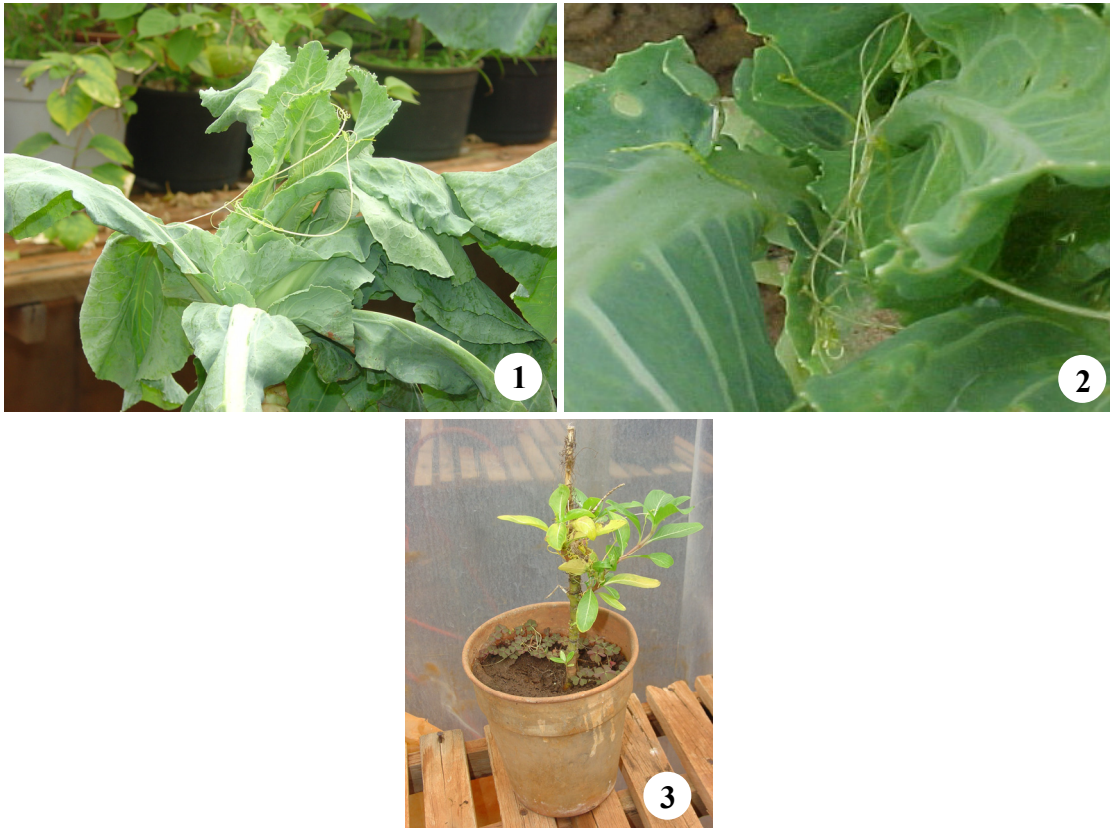


Figura 22- Transmissão de fitoplasmas, através da cuscuta, a partir de plantas de couve-flor infectada para plantas saudáveis de vinca. 1 e 2 - Estabelecimento da cuscuta em planta doente de couve-flor. 3 - Presença de clorose foliar e superbrotamento em planta de vinca induzidos por fitoplasmas

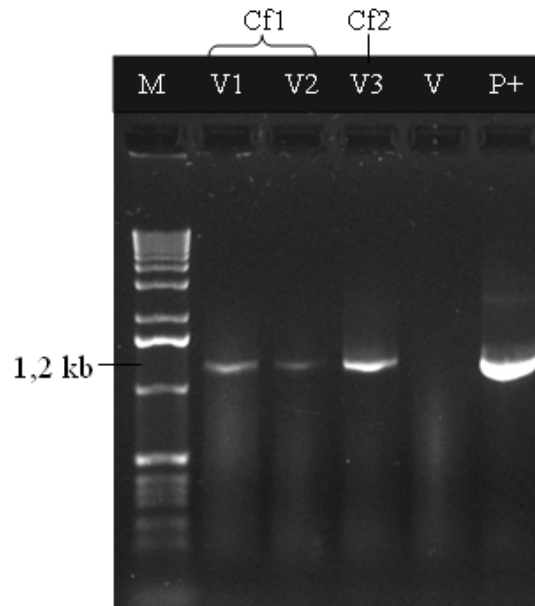


Figura 23- Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas através de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint e R16 F2n/R2, confirmando a transmissão de fitoplasmas a partir de plantas de couve-flor infectadas para plantas saudias de vinca. Colunas: (M) marcador 1 kb Ladder; plantas de vinca (V1 e V2) associadas à planta de couve-flor Cf1 através da cuscuta; planta de vinca (V3) associada à planta de couve-flor Cf2, através da cuscuta; (V) planta de vinca sadia; (P+) planta de vinca infectada previamente por fitoplasmas

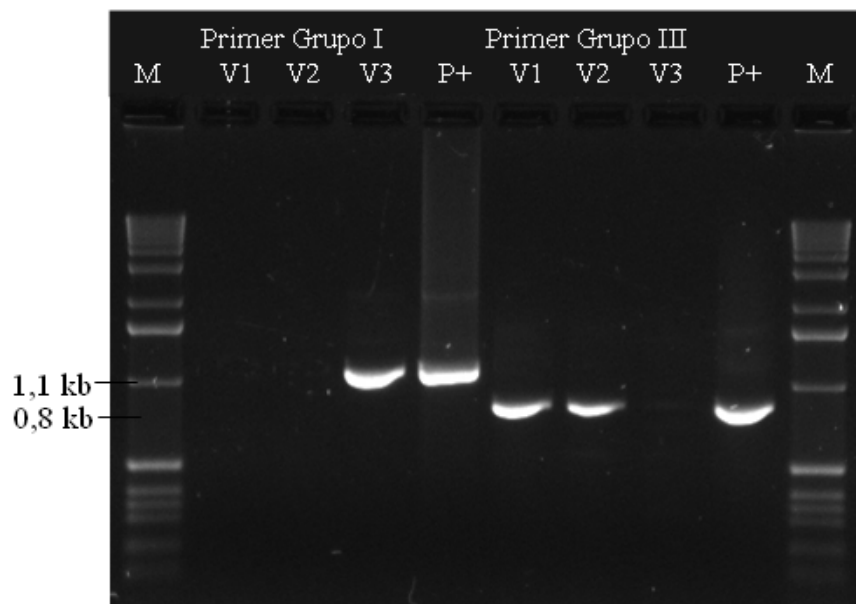


Figura 24- Amplificação do 16Sr DNA de fitoplasmas presentes em plantas de vinca, através de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint na primeira reação e R16(I)F1/R1 e R16(III)F2/R1 na segunda reação, para identificação de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII, respectivamente, em plantas de vinca positivas para a transmissão de fitoplasmas feita por meio da cuscuta. Colunas: (M) marcador molecular 1 kb Ladder; (V1, V2, V3) vinca; (P+) padrões positivos representados por vincas infectadas por fitoplasmas dos grupos 16SrI (1,1 kb) e 16SrIII (0,8 kb)

2.3.10 Análise epidemiológica

2.3.10.1 Distribuição espacial

A distribuição espacial foi avaliada em campos localizados em Sorocaba-SP, observando-se os sintomas visualmente. As ilustrações das áreas avaliadas e dos sintomas estão na Figura 1. Os mapas das áreas avaliadas, representando plantas saudáveis (quadrados brancos) e plantas com sintomas (quadrados pretos), são apresentados na Figura 25, contendo o número de plantas em cada área e a incidência (p) da doença. As áreas 1 a 3 são do híbrido Barcelona e foram avaliadas em setembro de 2007; as áreas 4 a 7 são do híbrido Cindy e foram avaliadas em março de 2008; as áreas 8 a 10 são do híbrido Sarah e foram avaliadas em abril de 2008. As avaliações foram feitas no final do ciclo de cultivo, ou seja, quando inflorescência ou “cabeças” estavam formadas, facilitando a visualização dos sintomas.

A incidência mais baixa observada em campo foi de 4% ($p=0,04$) na área 2 e a mais alta foi de 42% ($p=0,42$) na área 10. Embora não tenha sido feita análise temporal da doença, observa-se um aumento gradual da incidência da doença no campo no decorrer do tempo, o que pode ser devido à presença constante do inóculo conferida pelas plantas infectadas e ao plantio sucessivo da cultura e elevado número de cigarrinhas no campo.

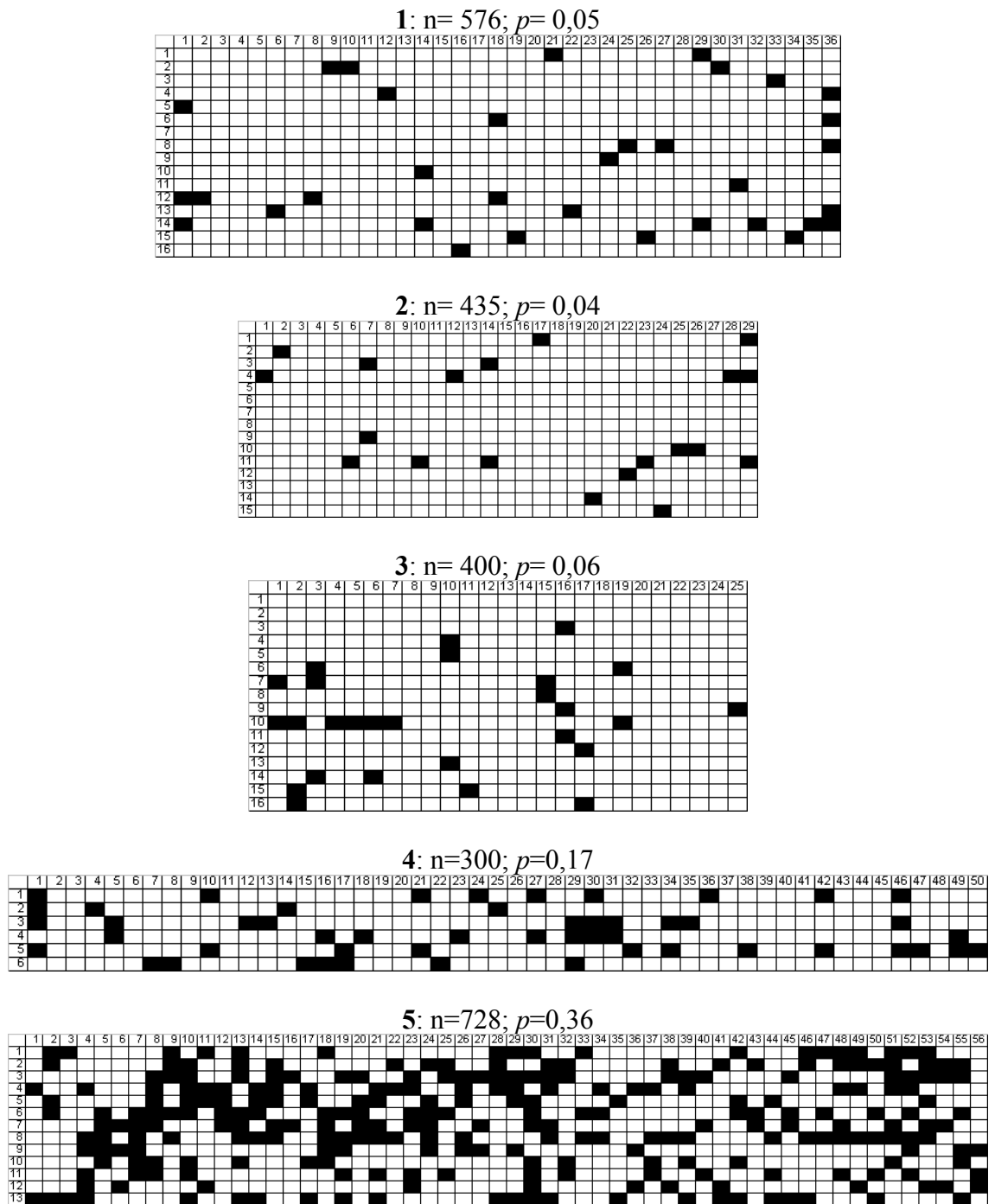
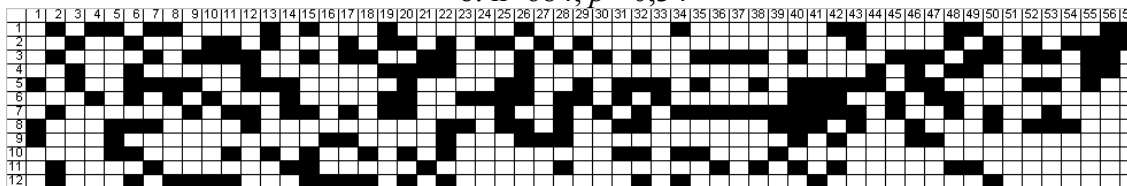


Figura 25- Padrão espacial de couve-flor com sintomas de enfezamento em dez áreas de plantio. Quadrados pretos indicam plantas sintomáticas e quadrados brancos, plantas assintomáticas (continua)

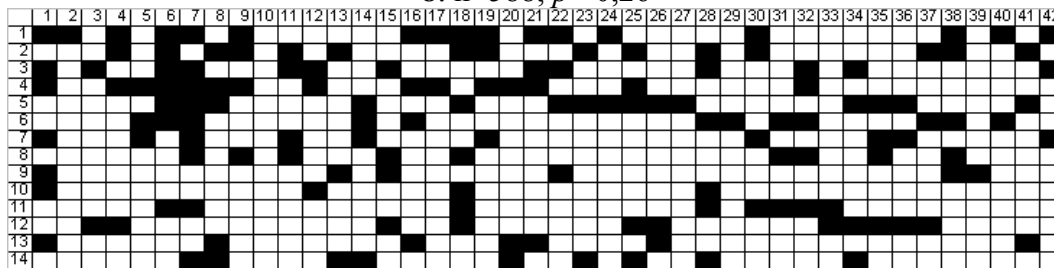
6: $n=684$; $p=0,34$



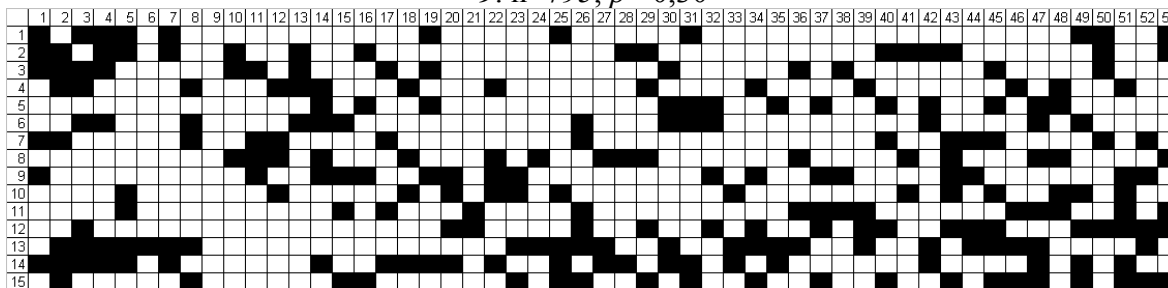
7: $n=728$; $p=0,38$



8: $n=588$; $p=0,26$



9: $n=795$; $p=0,30$



10: $n=550$; $p=0,42$

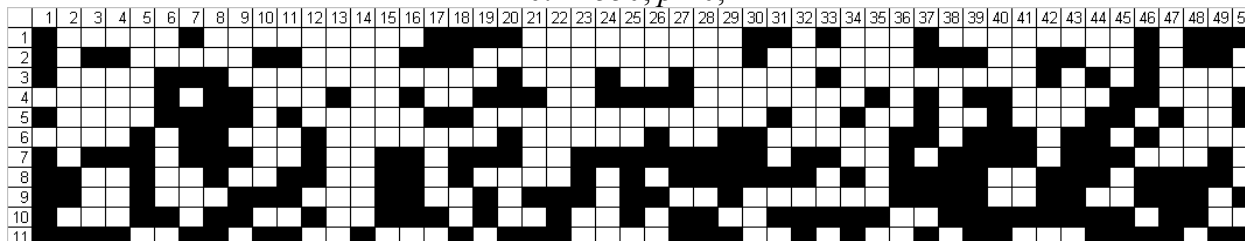


Figura 25- Padrão espacial de couve-flor com sintomas de enfezamento em dez áreas de plantio. Quadrados pretos indicam plantas sintomáticas e quadrados brancos, plantas assintomáticas (conclusão)

As avaliações do enfezamento em couve-flor foram feitas no final do ciclo da cultura devido a manifestação tardia do sintoma da doença ocasionada por fitoplasma. Zhou et al. (2002) relatam que a expressão de sintomas de infecção por ‘Aster yellows’ em alface tende a ocorrer logo antes da colheita e que em campos com altas proporções de plantas sintomáticas deve também haver muitas plantas que foram infectadas e iriam manifestar sintomas se não fossem colhidas.

Observou-se um aumento da incidência da doença na área, no período de estudo. O problema tem ocorrido com maior intensidade nos últimos anos, como observam os próprios agricultores da região. Aparentemente os problemas ocasionados por fitoplasmas apresentam determinadas épocas de pico e depois são novamente esquecidos. No caso do café, a doença ‘Coffee crispiness disease’, ocasionada por fitoplasma, não traz prejuízos sobre a produção. No entanto, em casos extremos, a produtividade pode ser drasticamente reduzida, como tem ocorrido desde 1997 na Colômbia (GALVIS et al., 2007). Estas ocorrências intermitentes de doenças causadas por fitoplasmas também são relatados para cultivos de cenoura e repolho nos Estados Unidos (LEE et al., 2003).

Padrões espaciais são características importantes para definir a função e a dinâmica de sistemas ecológicos (ZHOU et al., 2002). A incidência de infecção por fitoplasma é dependente do número e abundância de insetos vetores e de plantas alternativas que abrigam o patógeno (SHARON et al., 2005). A incidência pode ser maior se plantas daninhas ou outras plantas atuam como reserva de fitoplasmas e de insetos vetores (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006). Assim, o controle de daninhas que ocorrem nas áreas de cultivo da couve-flor, tanto adjacentes aos campos quanto nas entrelinhas, pode contribuir para a redução da incidência da doença.

O uso de inseticidas, mesmo que frequente, não controla totalmente o aparecimento de doença porque a transmissão do patógeno pode ocorrer mais rápido do que a ação dos produtos (WEINTRAUB, 2007). Além disso, há constante influxo de novos vetores para o campo de cultivo. Porém, segundo Weintraub (2007), o emprego de inseticidas pode ajudar a controlar a população de vetores e reduzir a transmissão do patógeno dentro da cultura.

As plantas de couve-flor cultivadas nas áreas 1, 2 e 3 eram do híbrido Barcelona (Hoticeres), para meia estação. Os outros dois híbridos eram Cindy e Sarah, ambos precoces de verão (Sakata). As áreas cultivadas com o híbrido Barcelona apresentaram baixa incidência de enfezamento, que poderia ter sido ocasionado pelas diferenças nas temperaturas entre as épocas

nas quais avaliações da distribuição espacial da doença foram realizadas, pela preferência do vetor a diferentes híbridos do hospedeiro ou por haver a possibilidade de reação diferente à infecção por fitoplasma entre híbridos de couve-flor.

Fatores ambientais podem influenciar no comportamento das cigarrinhas, por isso pode ter ocorrido maior incidência do enfezamento no primeiro semestre do ano de 2008. As cigarrinhas coletadas em campos de couve-flor portando fitoplasmas, identificadas no presente trabalho, *B. hebe* e *E. obscurinervis*, são insetos encontrados principalmente em regiões tropicais e subtropicais (PARADELL; VIRLA; TOLEDO, 2001; KNIGHT, 1987). Em temperaturas mais altas, que ocorrem no sudeste brasileiro no verão, podem ter seu ciclo acelerado e também o aumento da atividade de machos em busca das fêmeas (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006). Estes fatores podem estar envolvidos no aumento da incidência do enfezamento da couve-flor nos primeiros meses do ano de 2008.

Danos sazonais na produção de batata ocasionados pela doença ‘Potato purple top’, causada por fitoplasma transmitido pela cigarrinha *Ciculifer tenellus*, estão associados com a ocorrência e abundância de cigarrinhas que aparecem nos campos de cultivo logo no início do verão (MUNYANEZA et al., 2008). Assim, melhor compreensão a respeito da dinâmica de população de insetos em cultivos de couve-flor pode auxiliar no manejo da doença associada a fitoplasma nesta cultura.

Os diferentes híbridos de couve-flor cultivados em Sorocaba podem apresentar comportamento distinto quanto à infecção por fitoplasma. No entanto, nada se conhece a respeito. Lederer; Seemüller (1991) discutem a possibilidade de existir diferença na suscetibilidade de espécies de *Alnus* para infecção por fitoplasmas, porém isto pode ser devido à preferência da cigarrinha vetora. A ocorrência de doenças ocasionadas por fitoplasmas está intimamente relacionada com a preferência do vetor aos seus hospedeiros e à capacidade de transmissão do patógeno (LEE; GUNDERSEN-RINDAL; BERTACCINI, 1998). Assim, maiores incidências da doença em áreas cultivadas com o híbrido Barcelona podem estar associadas à preferência dos vetores a determinados híbridos de couve-flor.

2.3.10.2 Índice de dispersão e aplicação da lei de Taylor modificada

Na Tabela 6 encontram-se os resultados do índice de dispersão (D) e incidência (p) para cada parcela. Os maiores valores de D foram observados em ‘quadrats’ de 4x4 plantas. As áreas 1

a 4 apresentaram distribuição ao acaso e, pelo teste de Chi-quadrado, foi detectada agregação da doença nas áreas 5 a 10, que apresentavam incidências maiores do que 25%.

As áreas 1 a 3 foram avaliadas em setembro de 2007, enquanto as avaliações das outras áreas foram feitas no primeiro semestre de 2008. Houve, portanto, aumento da incidência da doença de um ano para outro e, conforme se elevou a incidência, agregação da doença também foi detectada.

Os valores dos parâmetros b e $\log(A)$ e o R^2 da lei de Taylor modificada encontram-se na Tabela 7. Nos campos de couve-flor analisados neste trabalho, foi detectada agregação quando as áreas foram divididas em 3x3 e 4x4 plantas. Valores de $\log(A)$ estatisticamente maiores do que zero e de b superiores a 1 são indicativo de agregação. Quanto maior for o valor de b , mais agregados estão as plantas doentes e a agregação varia de acordo com a incidência. A representação gráfica da lei de Taylor está na Figura 26. A inclinação de 1,33 da reta obtida pelos pontos, que representam cada parcela avaliada, indica a agregação da doença ($R^2=0,98$).

Tabela 6- Incidência em proporção (p) e índices de dispersão (D) em diferentes divisões em 'quadrats' do enfezamento da couve-flor em dez áreas analisadas

Áreas	p	D		
		2X2	3X3	4X4
1	0,0590	1,1952	1,1439	1,0895
2	0,0460	1,0130	0,9524	0,9002
3	0,0675	1,1239	1,3553	1,2843
4	0,1700	1,0612	0,9806	1,4653
5	0,3695	1,1598	1,5979*	1,9913*
6	0,3377	1,1385	1,1848	1,5499*
7	0,3805	1,1919*	1,3943*	1,4438*
8	0,2602	1,2076*	1,3456*	1,8722*
9	0,3057	1,3089*	1,5449*	1,6510*
10	0,4273	1,4099*	1,7380*	1,9164*

* D = variância observada/variância binomial. Significâncias (*) foram calculadas pela distribuição de chi-quadrado. Valores significativamente maiores que 1 indicam agregação de plantas sintomáticas ($P < 0,05$)

Tabela 7- Parâmetros A e b da lei de Taylor modificada e R^2 calculados para cada 'quadrat'

'Quadrats'	Conjunto das áreas		
	b	Log(A)	R^2
2X2	1,07	0,18*	0,98
3X3	1,18*	0,44*	0,96
4X4	1,33*	0,86*	0,98

* Valores significativamente diferentes de 1 para b e de zero para log(A), pelo teste t, ao nível de 5% de probabilidade

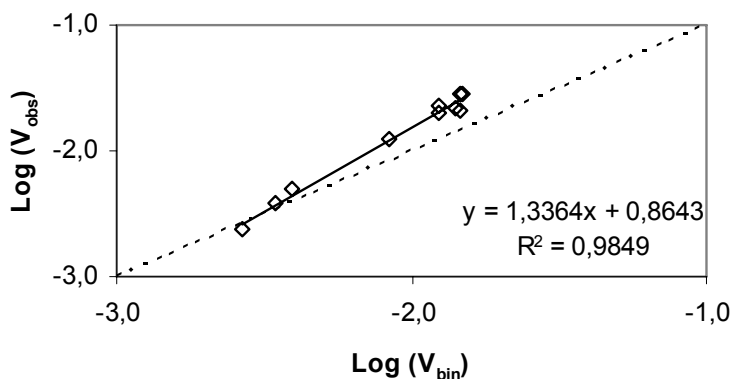


Figura 26- Relação entre os logaritmos da variância da incidência observada e da variância binomial teórica para a dinâmica espacial do enfezamento da couve-flor ('quadrat' 4x4). Dados de dez campos analisados em conjunto. A linha cheia representa a relação $\log(V_{obs}) = \log(A) + b \log(V_{bin})$. Log(A) é diferente de zero ($p < 0,05$) e b é diferente de 1. A linha pontilhada representa a situação hipotética de aleatoriedade

As áreas analisadas eram adjacentes a locais de pastagem e floresta e o controle de plantas daninhas que se desenvolvem nas entrelinhas do plantio de couve-flor não era feito com muito esmero, proporcionando o desenvolvimento das daninhas por entre a cultura (Figura 1.1). Portanto, cigarrinhas que possam estar atuando como vetores do agente causal podem ser advindas de áreas externas às áreas de plantio, além de se abrigar nas plantas invasoras presentes nas entrelinhas da cultura. Plantas que permanecem fora das áreas da cultura são fundamentais para a manutenção de inóculo e disseminação da doença causada por fitoplasma (CARRARO et al., 2002). Estes fatores podem explicar a ocorrência de agregação do enfezamento na cultura da couve-flor.

Segundo Laranjeira e colaboradores (1998), o aspecto que mais esclarece no estudo da epidemiologia da doença não é a ocorrência ou não de agregação, mas, sim, a partir de qual valor de incidência a agregação pode ser identificada. Para o enfezamento da couve-flor, agregação ocorreu em campos onde a incidência era maior do que 25%. Assim, conforme ocorre o aumento da incidência, existe a tendência de se encontrar agregação da doença na área. Devido à alta incidência encontrada nos campos de couve-flor, é possível que mais de uma espécie de cigarrinha possa estar atuando como vetora de fitoplasmas.

Para ‘Aster yellows’ em alface, doença causada por fitoplasma, incidências maiores que 0,052 são requeridas para que agregação seja detectada (MADDEN et al., 1995). A incidência da mesma doença em alface variou de 3 a 72%, e a maioria dos campos avaliados (53%) apresentou agregação da doença (BEANLAND et al., 2005). A distribuição espacial do enfezamento do repolho foi agregada e, neste caso, valores baixos de incidência, como 4,7%, foram suficientes para que a agregação fosse detectada (AMARAL MELLO, 2007).

Beanland; Noble; Wolf (2006) observaram que a ocorrência de agregação era mais frequente em áreas maiores. Nas áreas de couve-flor avaliadas neste trabalho, do mesmo modo, agregação foi observada em áreas que continham maior número de plantas para serem avaliadas, ou seja, de 550 a 795 plantas.

A agregação da doença no campo de cultivo também evidencia que a infecção não ocorre nos viveiros de muda, mas após o estabelecimento da cultura (BEANLAND; NOBLE; WOLF, 2006).

O parâmetro b significativamente maior que 1 é indicativo de agregação e isto é um atributo importante na caracterização espacial de espécies vetoradas (TAYLOR et al., 1984). A

doença ocasionada por fitoplasma em repolho revelou parâmetro b igual a 1,21 (AMARAL MELLO, 2007). Em alface foi relatado inclinação de 1,18 e este resultado é atribuído à transmissão persistente pelo vetor *Macrostelus quadrilineatus* (MADDEN et al., 1995). Para o patossistema *Xylella fastidiosa* e citros, que apresenta como vetor cigarrinhas Cicadellidae, o parâmetro b calculado por Laranjeira (1997) foi de 1,13. Para o enfezamento da couve-flor, no presente trabalho, a inclinação foi de 1,33. A inclinação da reta indica que o padrão espacial de doenças com vetor varia mais em função do comportamento do vetor do que com fatores característicos do patógeno ou do hospedeiro (BERGAMIN FILHO et al., 2002). A grande vantagem da lei de Taylor sobre outros métodos de estudo do padrão espacial de doenças é que a agregação de todo o conjunto de dados é descrito pelo menor número de parâmetros (A e b). O índice de dispersão, por sua vez, requer um parâmetro D para cada subconjunto de dados (BERGAMIN FILHO et al., 2007)

Os resultados obtidos com a lei de Taylor modificada para o enfezamento da couve-flor estão de acordo com os resultados obtidos com o índice de dispersão. Portanto, plantas de couve-flor com sintomas de enfezamento exibem acentuada agregação.

2.3.10.3 Determinação das áreas isópatas

Através das áreas isópatas é possível observar linhas no espaço com a mesma intensidade de doença e o gradiente de doença que move-se a partir do foco (BERGAMIN FILHO et al., 2002). A análise de áreas isópatas foi feita a partir dos mapas das áreas que indicam a presença de plantas doentes e sadias. Cada cor representa determinado intervalo de incidência. Observa-se a concentração dos focos da doença tendo início nos bordos das áreas, indicando que a doença é introduzida a partir das áreas externas e vai avançando para o centro das áreas. Focos também vão surgindo no centro da área à medida que a incidência da doença aumenta. Isto pode ser conferido nas áreas 3, 4 e 5 (Figura 27).

Para o enfezamento do repolho também houve indicação clara através das áreas isopatas de que a doença é introduzida na área de plantio a partir de áreas externas, principalmente aquelas próximas às áreas de mata, devido a presença de focos da doença nos arredores da cultura (AMARAL MELLO, 2007). Em vinhedos na América do Norte, videiras infectadas com fitoplasmas exibem agregação e a ocorrência de plantas doentes é relacionada com a transmissão por insetos vetores que se movem para dentro da cultura a partir de matas adjacentes a ela (BEANLAND et al., 2005).

Portanto, o enfezamento da couve-flor pode estar sendo introduzido nas áreas de cultivo a partir de áreas de mata através de insetos vetores que ali se abrigam.

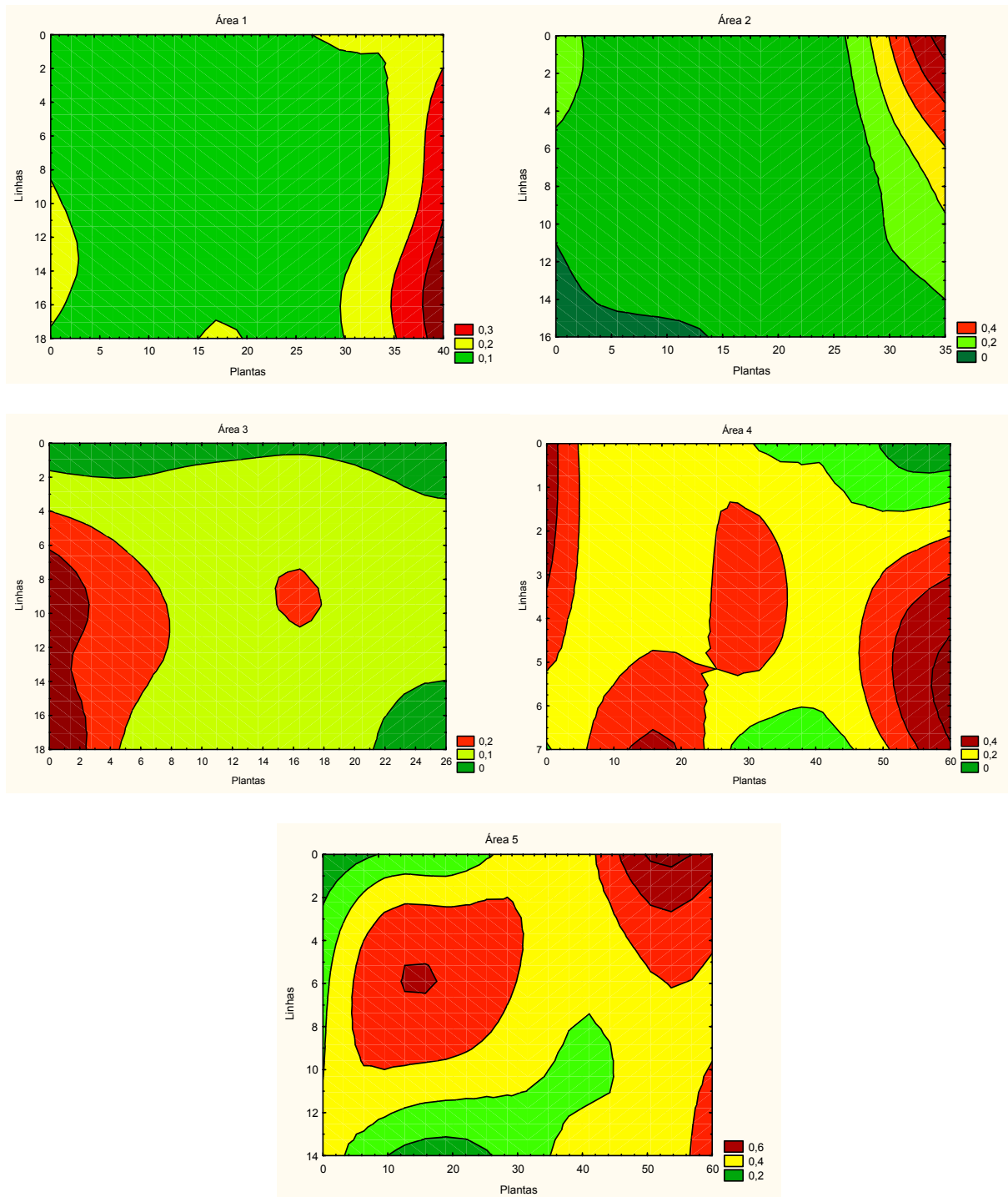


Figura 27- Áreas isópatas dos dez campos de campos de couve-flor com sintomas de enfezamento. As cores indicam variação nos valores de incidência, ou seja, verde para menor incidência e vermelho para maior incidência, além das cores intermediárias (continua)

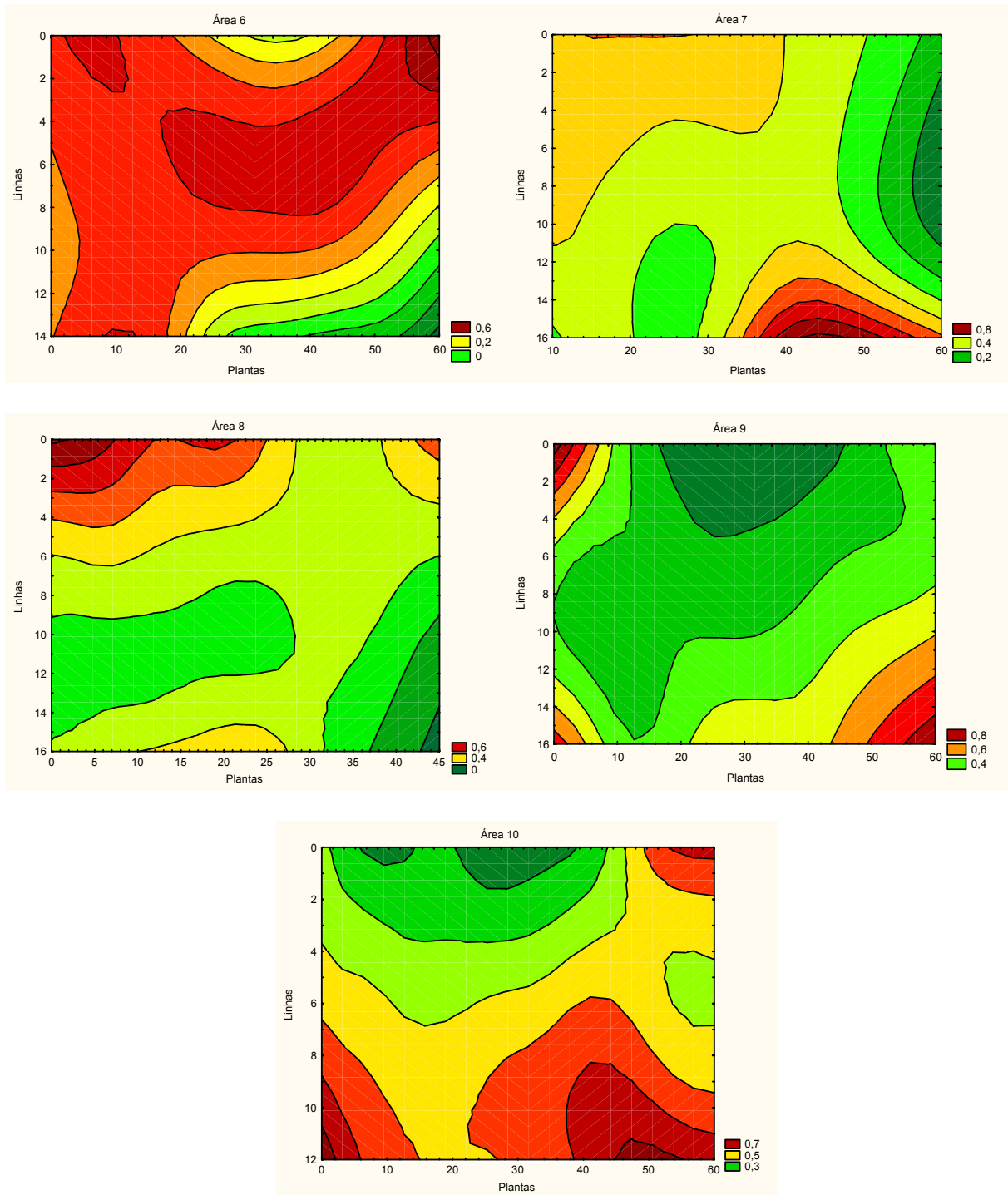


Figura 27- Áreas isópatas dos dez campos de campos de couve-flor com sintomas de enfezamento. As cores indicam variação nos valores de incidência, ou seja, verde para menor incidência e vermelho para maior incidência, além das cores intermediárias (conclusão)

3 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, foi possível associar a ocorrência de fitoplasma com plantas de couve-flor com sintomas de enfezamento e constatar a possibilidade de infecções assintomáticas. Os fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrIII-J, 16SrXIII e 16SrXV-A estão associados a plantas de couve-flor com sintomas de enfezamento, porém houve predominância de fitoplasma do grupo 16SrIII.

Cigarrinhas das espécies *Balclutha hebe* e *Exitianus obscurinervis*, coletadas em campos de couve-flor, se mostraram portadoras de fitoplasma. Foi identificado fitoplasma pertencente ao grupo 16SrXIII na espécie *B. hebe*, que foi capaz de transmitir fitoplasma para couve-flor e vinca no ensaio de transmissão. Foi também possível transmitir fitoplasmas, através da cuscuta, a partir de plantas doentes de couve-flor para plantas de vinca.

No campo, plantas de couve-flor com sintomas de enfezamento encontravam-se agregadas e o patógeno foi introduzido a partir de áreas externas, sendo o foco da doença localizado nos bordos das áreas cultivadas.

REFERÊNCIAS

- AKHTAR, K.P.; SARWAS, G.; DICKINSON, M.; AHMAD, M.; HAQ, M.A.; HAMMED, S.; IQBAL, M.J. Sesame phyllody disease: its symptomatology, etiology, and transmission in Pakistan. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 33, p. 477-486, 2009.
- AMARAL MELLO, A.P.O. **Identificação molecular de fitoplasma associado ao enfezamento do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) e da berinjela (*Solanum melogena*)**. 2004. 52p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- AMARAL MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; CAMARGO, L.E.A. Sequence heterogeneity in the 16S rDNA of tomato big bud phytoplasma belonging to group 16SrIII. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, p. 245-249, 2006.
- AMARAL MELLO, A.P.O. **Identificação de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença**. 2007. 64p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- ARNEODO, J.D.; GALDEANO, E.; ORREGO, A.; STAUFFER, A.; NOME, S.F.; CONCI, L.R. Identification of two phytoplasmas detected in China-trees with decline symptoms in Paraguay. **Australasian Plant Pathology**, Sydney, v. 34, 583-585, 2005.
- ARNEODO, J.D.; MARINI, D.C.; GALDEANO, E.; MENEGUZZI, N.; BACCI JR, M.; DOMECCQ, C.; NOME, S.F. Diversity and geographical distribution of phytoplasmas infecting china-tree in Argentina. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, p. 70-75, 2007.
- AROCHA, Y.; LOPEZ, M.; PINOL, B.; FERNANDEZ, M.; PICORELL, 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 Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 2451-2463, 2005.
- AROCHA, Y.; ZERFY, T.; ABEBE, G.; PROUD, J.; HANSON, J.; WILSON, M.; JONES, P.; LUCAS, J. Identification of potential vectors and alternative plant hosts for the phytoplasma associated with napier grass stunt disease in Ethiopia. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, p. 126-132, 2009.
- 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 rRNA gene group VII, the ash yellows phytoplasma group. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 1142-1148, 2002.
- BEANLAND, L.L.V.; MADDEN, C.W.; HOY, S.A.; MILLER, S.A.; NAULT, L.R. Temporal distribution of aster leaf-hopper sex ratios and spatial pattern of aster yellows phytoplasma disease in lettuce. **Annals Entomology Society American**, Lexington, v. 98, p. 756-762, 2005.

- BEANLAND, L.; NOBLE, R.; WOLF, T.K. Spatial and temporal distribution of north American grapevine yellows disease and of potential vectors of the causal phytoplasmas in Virginia. **Environmental Entomology**, College Park, v. 35, p. 332-344, 2006.
- BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F.F. Análise espacial de epidemias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.10, p.155-218, 2002.
- BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F.F. Análise espacial e temporal de epidemias de patógenos de solo. In: POLTRONIERI, L.S.; VERZIGNASSI, J.R. (Ed.) **Fitossanidade na Amazônia: inovações tecnológicas**. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2007, cap. 1, p. 17-36.
- BERTACCINI, A.; PISI, A.; MARANI F.; Virescenza e fillodia del cavolfiore e del broccolo. **Informatore Fitopatológico**, Bologna, v. 33, p. 57-60, 1983.
- BERTACCINI, A.; VORÁCKOVÁ, Z.; VIBIO, M.; FRÁNOVÁ, J.; NAVRÁTIL, M.; SPAK, J.; NEBESÁROVÁ, J. Comparison of phytoplasmas infecting winter oilseed rape in the Czech Republic with italian *Brassica* phytoplasmas and their relationship to the aster yellows group. **Plant Pathology**, Oxford, v. 47, p. 317-324, 1998.
- BERTACCINI, A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. **Frontiers in Bioscience**, Albertson, v. 12, p. 673-689, 2007.
- BLANCO, M.C.S.G; GROPPA, G.A.; TESSARIOLI NETO, J. Couve-flor (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.). In: COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL – CATI (Ed.). **Manual técnico das culturas**. 2.ed. Campinas: CATI, 1997. v. 2, p. 57-61.
- BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. Walled and wall-less eubacteria from plants: sieve-tube-restricted plant pathogens. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 52, p. 7-16, 1998.
- CARRARO, L.; FERRINI, F.; ERMACORA, P.; LOI, N. Role of wild *Prunus* species in the epidemiology of European stone fruit yellows. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, p. 513-517, 2002.
- CHOI, Y.H.; TAPIAS, E.C.; KIM, H.K.; LEFEBER, A.W.M.; ERKLENS, C.; VERHOEVEN, J.T.J.; BRAZIN, J.; ZEL, J.; VERPOOETE, R. Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. **Plant Physiology**, New York, v. 135, p. 2398-2410, 2004.
- CONSTABLE, F.E.; GIBB, K.S.; SYMONS, R.H. Seasonal distribution of phytoplasma in Australian grapevines. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, p. 267-276, 2003.
- 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, 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**, Landau, v. 37, p. 131-137, 1998.

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 and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 47, p. 262-269, 1997.

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

DENG, S.; HIRUKI, C. Amplification of 16S rRNA 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-like organisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry, dwarf, potato witches' broom, aster yellows and *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.

DUDUK, B.; BULAJIC, A.; DUDUK, N.; CALARI, A.; PALTRINIERI, S.; KRSTIC, B.; BERTACCINI, A. Identification of phytoplasmas belonging to aster yellows ribosomal group in vegetables in Serbia. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, p. 341-342, 2007.

ECKSTEIN, B.; 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.

ECKSTEIN, B.; BRITO, R.A.S.; BRUNELLI, K.; BEDENDO, I.P. Fitoplasma do grupo 16SrXIII associado ao enfezamento do brócolis. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 54, p. 54, 2009. Suplemento.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Hortifrutícolas. In: **AGRIANUAL 2009**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2009. p. 329-384.

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, p. 249-252, 2007.

- GARNIER, M.; FOISSAC, X.; GAURIVAUD, P.; LAIGRET, F.; RENAUDIN, J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. Mycoplasmas, plants, insect vectors : a matrimonial triangle. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series III - Sciences de La Vie**, Paris, v. 324, p. 923-928, 2001.
- 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**, Baltimore, v. 176, p. 5244-5254, 1994.
- GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.-M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. **Phytopathology Mediterranea**, Bologna, v. 35, p. 144-151, 1996.
- GUTHRIE, J.N.; WALCH, K.B.; SCOTT, P.T. RASMUSSEN, T.S. The phytopathology of Australian papaya dieback: a proposed role for the phytoplasma. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 58, p. 23-30, 2001.
- GOTTWALD, T.R.; CAMBRA, M.; MORENO, P.; CAMARASA, E.; PIQUER, J. Spatial and temporal analyses of citrus tristeza virus in eastern Spain. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 45-55, 1996.
- HANBOONSONG, Y.; CHOOSAI, C.; PANYIM, S.; DAMAK, S. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 11, p. 97-103, 2002.
- 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 palm lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 141, p. 183-193, 2002.
- HIRUKI, C.; WANG, K. Clover proliferation phytoplasma: '*Candidatus* Phytoplasma trifolii'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1349-1353, 2004.
- HUGHES, G.; MADDEN, L.V.; MUNKVOLD, G.P. Cluster sampling for disease incidence data. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 132-137, 1996.
- 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**, Reading, v. 54, p. 1243-1255, 2004.
- JARAUSCH, W.; DANET, J.L.; LABONNE, G.; DOSBA, F.; BROQUAIRE, J.M.; SAILLARD, C.; GARNIER, M. Mapping the spread of apricot chlorotic leaf roll (ACLR) in southern France and implication of *Cacopsylla pruni* as a vector of European stone fruit yellows (ESFY) phytoplasmas. **Plant Pathology**, London, v. 50, p. 782-790, 2001.

JOMANTIENE, R.; DAVIS, R.E.; MAAS, J.; 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**, Washington, v. 48, p. 268-277, 1998.

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**, Netherlands, v. 108, p. 507-517, 2002.

JOVIC, J.; CVRKOVIC, M.; MITROVIC, S.; KRNJAJIC, S.; REDINBAUGH, M.G.; PRATT, R.C.; GINGERY, R.E.; HOGENHOUT, S.A.; TOSEVSKI, I. Roles of stolbur phytoplasma and *Reptalus panzeri* (Cixiinae, Auchenorrhyncha) in the epidemiology of maize redness in Serbia. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 118, p. 85-89, 2007.

JUNQUEIRA, A.; BEDENDO, I.P.; PASCHOLATI, S.F. Biochemical changes in corn plants infected by the maize stunt phytoplasma. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 65, p. 181-185, 2004.

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 stellatiformis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, p. 909-914, 2000.

KHAN, J.A.; SRIVASTAVA, P.; SINGH, S.K. Sensitive detection with little leaf symptoms in *Withania somnifera*. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 115, p. 401-408, 2006.

KNIGHT, W.J. Leafhoppers of the grass-feeding genus *Balclutha* (Homoptera, Cicadellidae) in the Pacific region. **Journal of Natural History**, London, v. 21, p. 1173-1224, 1987.

LAMBAIS, M.R. Biologia molecular e engenharia genética na fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia**, 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, v.1: Princípios e conceitos. cap. 26. p. 507-538.

LARANJEIRA, F.F. **Dinâmica espacial e temporal da clorose variegada dos citros**, 1997. 144 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; BERGER, R.D.; HAU, B. Análise espacial do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 397-403, 1998.

LEDERER, W.; SEEMÜLLER, E. Occurrence of mycoplasma-like organisms in diseased and non-symptomatic alder trees (*Alnus* spp.). **European Journal of Forest Pathology**, Netherlands, v. 21, p. 90-96, 1991.

LEE, I.-M.; HAMMOND, R.W.; DAVIS, R.E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 834-842, 1993.

- LEE, I.-M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; HAMMOND, R.W.; DAVIS, R.E. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested PCR assay to detect mixed MLO infections in a single host plant. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 559-566, 1994.
- LEE, I.-M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; DAVIS, R.E.; BARTOSZIK, I.M. Revised classification scheme of phytoplasma based on RFLP analysis of 16S rDNA and ribosomal protein gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 1153-1169, 1998.
- LEE, I.-M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; BERTACCINI, A. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. 1359-1366, 1998.
- LEE, I.-M.; DAVIS, R.E.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Phytoplasmas: phytopathogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 221-255, 2000.
- LEE, I.-M.; MARTINI, M.; BOTTNER, K.D.; DANE, R.A.; BLACK, M.C.; TROXCLAIR, N.; Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 1368-1377, 2003.
- 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, 2004.
- LEE, I.-M.; MARTINI, M.; MARCONE, C.; ZHU, S.F. 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, 2004.
- LEE, I.-M.; BOTTNER, K.D.; SECOR, G.; RIVERA-VARAS, V. '*Candidatus* Phytoplasma americanum', a phytoplasma associated with a potato purple top wilt complex. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1593-1597, 2006.
- MADDEN, L.V.; HUGHES, G. Plant disease incidence: distributions, heterogeneity, and temporal analysis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 529-564, 1995.
- MADDEN, L.V.; NAULT, L.R.; MURRAL, D.J.; APELT M.R. Spatial pattern analysis of the incidence of aster yellows disease in lettuce. **Population Ecology**, Sapporo, v. 37, p. 279-289, 1995.
- MARCONE, C.; RAGOZZINO, A. Detection of phytoplasmas in *Brassica* spp. in southern Italy and their characterization by RFLP analysis. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Stuttgart, v. 102, p. 449-460, 1995.
- MARINGONI, A.C. Doenças das crucíferas. 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. p. 285-292.

MAY, A.; TIVELLI, S.W.; VARGAS, P.F.; SAMRA, A.G.; SACCONI, L.V.; PINHEIRO, M.Q. **A cultura da couve-flor**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2007. 36p. (Série Tecnologia APTA, Boletim Técnico IAC, 200).

MELO, L.A.; VENTURA, J.A.; COSTA, H.; BEDENDO, I.P. Fitoplasma associado ao vira-cabeça do mamoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 45, 2007. Suplemento.

MELO, L.A. **Identificação molecular de fitoplasmas associados ao amarelo da abobrinha-de-moita e à filodia de frutos do morangueiro**. 2008. 88p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MELO, L.A.; BEDENDO, I.P.; YUKI, V.A. Abobrinha-de-moita: um novo hospedeiro de fitoplasma do grupo 16SrIII. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, p. 114-117, 2009.

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**, 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 Phytoplasma 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.

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. 222-226, 2006.

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

MUNYANEZA, J.E.; JENSEN, A.S.; HAMM, P.B.; UPTON, J.E. Seasonal occurrence and abundance of beet leafhopper in the potato growing region of Washington and Oregon Columbia Basin and Yakima Valley. **American Journal of Potato Research**, New York, v. 85, p. 77-84, 2008.

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

NAULT, L.R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges and vectors. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, p. 659-662, 1980.

NERONI, R.C. **Amarelos da videira: identificação e análise filogenética dos fitoplasmas, transmissão dos agentes causais e otimização da diagnose**. 2009. 96p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

ORENSTEIN, S.; ZAHAVI, T.; NESTEL, D.; SHARON, R.; BARKALIFA, M.; WEINTRAUB, G. Spatial dispersion pattern of potential leafhopper and planthopper (Homoptera) vectors of phytoplasma in wine vineyards. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 142, p. 341-348, 2003.

PARADELL, S.L.; VIRLA, E.G.; TOLEDO, A. Leafhoppers species richness and abundance on corn crops in Argentina (Insecta-Hemiptera-Cicadellidae). **Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas**, Madrid, v. 27, p. 465-474, 2001.

PILKINGTON, L.J.; GIBB, K.S.; GURR, G.M.; FLETCHER, M.J.; NIKANDROW, A.; ELLIOTT, E.; VAN de VEM, R.; READ, M.Y. Detection and identification of a phytoplasma from lucerne with Australian lucerne yellows disease. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, p. 754-762, 2003.

PILKINTON, L.J.; GURR, G.M.; FLETCHER, M.J.; NIKANDROW, A.; ELLIOTT, E. Vector status of three leafhopper species for Australian lucerne yellows phytoplasma. **Australasian Journal of Entomology**, Perth, v. 43, p. 366-373, 2004.

REVISTA RURAL. **Cinturão - o verde mar de São Paulo**. n. 82, nov. 2004. Disponível em: <<http://www.revistarural.com.br>>. Acesso em: 24 ago. 2009.

RIBEIRO, L.F. **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.

SALEHI, M.; IZADPANA, K.; SIAMPOUR, M. Characterization of a phytoplasma associated with cabbage yellows in Iran. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 625-630, 2007.

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

SHARON, R.; SOROKER, V.; WESLEY, S.; ZAHAVI, T.; HARARI, A.; WEINTRAUB, P. *Vitex agnus* is a preferred host plant for *Hyalesthes obsoletus*. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 31, p. 1051-1063, 2005.

SILVA, E.G. **Identificação de fitoplasmas associados à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar e ao superbrotamento de primavera (*Bougainvillea spectabilis*) no Estado de São Paulo**. 2008. 96p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SILVA, E.G.; BEDENDO, I.P.; MASSOLA JÚNIOR, N.S.; SILVA, R.F. *Candidatus* Phytoplasma brasiliense associado ao superbrotamento do hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) no Estado de São Paulo. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 35, p. 234-236, 2009.

SMART, C.D.; SCHNEIDER, B.; BLOMQUIST, C.L.; GUERRA, L.J.; HARRISON, N.A.; AHRENS, U.; LORENK, K.-H.; SEEMÜLLER, E.; KIRKPATRICK, B.C. Phytoplasma-specific

- PCR primers based on sequence of the 16S-23S rRNA spacer region. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 2988-2993, 1996.
- STRETEN, C.; GIBB, K.S. Phytoplasma diseases in sub-tropical and tropical Australia. **Australasian Plant Pathology**, Sydney, v. 35, p. 129-146, 2006.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Molecular evolutionary analysis (MEGA) version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p.1596-1599, 2007.
- TAYLOR, L.R. Assessing and interpreting the spatial distributions of insect populations. **Annual Review of Entomology**, Urbana-Champaign, p. 321-357, 1984.
- TEDESCHI, R.; VISENTIN, C.; ALMA, A.; BOSCO, D. Epidemiology of apple proliferation (AP) in northwestern Italy: evaluation of the frequency of AP-positive psyllids in naturally infected populations of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 142, p. 285-290, 2003.
- TEDESCHI, R.; FERRATO, V.; ROSSI, J.; ALMA, A. Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. **Plant Pathology**, Bari, v. 55, p. 18-24, 2006.
- 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**, 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.L.; MANILOFF, J.; WOESE, C.R. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, p. 6455-6467, 1989.
- WEINTRAUB, P.; BEANLAND, L. Insect vectors of phytoplasmas. **Annual Review of Entomology**, Urbana-Champaign, v. 51, p. 91-111, 2006.
- WEINTRAUB, P.G. Insect vectors of phytoplasmas and their control - an update. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, p. 169-173, 2007.
- ZHOU, X.; HOY, C.W.; MILLER, S.A.; NAULT, L.R. Spatially explicit simulation of aster yellows epidemics and control on lettuce. **Ecological Modelling**, Amsterdam, v.151, p. 293-307, 2002.

APÊNDICES

Amostra Sr3 - 1243 pares de bases

TGCTAAGACTGGATAGGAAAAAGTAAAGCATCTTTACTTTTTTAAAAAGACCTTCTTTGAAGGTATGCTTAAGGAGGGG
 CTTGCGACACATTAGTTAGTTGGCAGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAG
 CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGACTTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTG
 ACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTACCTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTAAGGAAGAAAAAAGAGTGGAAAA
 ACTCCCTTGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAATTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAAGGGGCGAGCG
 TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTTAATAAGTCTATAGTTTAATTTTCAGCGCTTAACGCTGT
 TGTGCTATAGAACTGTTTTACTAGAGTGAGTTAGAGGCAAGCGGAATTCATGTGTAGCGGTAATAATGCGTAAATAT
 ATGGAGGAACACCCGAAGGCGTAGGCGGCTTGTGGGACTTTACTGACGCTGAAGCACGAAGGCGTGGGGAGCAAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCTGGGTAAAACCGGTACTGAAGTTAACACA
 TTAAGTACTTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTAAAAGGAATTTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGA
 TCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATTTTCTTGCGAAGTTATAGAAATATAAT
 GAAGGTTATCAGGAAAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAAGTTAGGTTAAGTTCTAAAACGA
 GCGCAACCTTGTGCTTAATTTGCCAGCATGTAATGATGGGGACTTTAACGAGACTGCCAATGAAAAATTTGGAGGAAGG
 TGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGTTGATACAAAGAGTAGCT
 GAAACGCGAGTTCTTAGCCAATCTCACAAAATCAATCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTG
 GAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCTCGGTTGAATACGTTGACGGGGTTTGTACACACCCGCCCGTCAAA

Amostra Sr5 - 1241 pares de bases

TGCTAAGACTGGATAGGAAAAATAAGGGCATCTTTACTTTTTTAAAAAGACCTTCTTTGAAGGTATGCTTAAGGAGGGG
 CTTGCGACACATTAGTTAGTTGGCAGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAG
 CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTG
 ACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTACCTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTAAGGAAGAAAAAAGAGTGGAAAA
 ACTCCCTTGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAAGGGGCGAGCG
 TTATCCGGAATTATAGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTTAATAAGTCTATAGTTTAATTTTCAGCGCTTAACGCTGT
 TGTGCTATAGAACTGTTTTACTAGAGTGAGTTAGAGGCAAGCGGAATTCATGTGTAGCGGTAATAATGCGTAAATAT
 ATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTTGTGGGACTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCTGGGTAAAACCGGTACTGAAGTTAACACAT
 TAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATC
 ATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATTTTCTTGCGAAGTTATAGAAATATAATGA
 AGGTTATCAGGAAAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAAGTTAGGTTAAGTTCTAAAACGAGC
 GCAGCCCTTGTGCTTAATTTGCCAGCATGTAATGATGGGGACTTTAACGAGACTGCCAATGAAAAATTTGGAGGAAGGTG
 GGGATTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGTTGATACAAAGAGTAGCTGA
 AACGCGAGTTCTTAGCCAATCTCACAAAATCAATCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGGAGTTGGA
 ATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCTCGGTTGAATACGTTGACGGGGTTTGTACACACCCGCCCGTCAAA

Amostra Mb2 - 1244 pares de bases

AAACGACTGCTAAGACTGGTAGGAGATAAGAAGGCATCTTCTTATTTTTTAAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAAGG
 AGGGGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGCTG
 AACGGCCACATTGGAAGTACGACACGGTCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAA
 CTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGATACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAAAAGATGGTG
 GAAAAACCATTATGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGC
 GAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTTAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTTAAC
 ATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTGACTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTA
 AATATATGGAGGAACACCATGAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAGGCGTGGGGAGCA
 AACAGGATTAGATACCCTGGTTGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAGACGTTGGGTAAACCAGTGTGCAAGTTAA
 CACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGT
 GGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAATAC
 AGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
 CGAA
 CGAGCGCAACCCCTTGTTGTTAATTGCCATCATTAAAGTTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAG
 GTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATAACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGC
 TGAAGCGCAAGCTTTTGGCAAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTT
 GGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTGCGGGTGAATACGTTTACGGGGTTTGTACACACCCCGGTCATG

Amostra Mb3 - 1240 pares de bases

AAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGATAAGAAGGCATCTTCTTATTTTTTAAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAAG
 GAGGGGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGCT
 GAACGGCCACATTGGTACTGAGACACGGTCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAA
 ACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGATACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAAAAGATGGT
 GGAAAAACCATTATGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGG
 CGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTTAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTTAA
 CATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTGACTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTA
 ATATATGGACGAACACCATGAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGAGCAACA
 GGGATTAGATACCCTGTAGTCCAACGCCGTAAACGATGAGTACTAGACGTTGGGTAAACCAGTGTGCAAGCTAACAC
 ATAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGTCGGGACTCCGCACAAGCGGTGGAT
 CATGTTGTTTAAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTG
 GAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
 CGCAACCCCTTGTTGTTAATTGCCATCATTAAAGTTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGG
 GGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATAACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAA
 GCGCAAGCTTTTGGCAAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGTAACCTCGACTTCATGAAGTTGGAA
 TCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTGCGGGTGAATACGTTTCTCGGGGTTTGTACACACCCCGGTCAAA

Amostra Mb5 - 1221 pares de bases

GAATTCAGTAGTGATTGAAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAAAAGTAAGGGCATCTTTACTTTTTTTAAAAAGACCTTC
 TTTGAAGGTATGCTTAAGGAGGGGCTTGCACACATTAGTTAGTTGGCAGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTG
 TAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
 TTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTACCTCGGTATGTAAAGTTCTTTTAT
 TAAGGAAGAAAAAGAGTGGAAAAACTCCCTTGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCC
 GCGGTAATACATAAGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTTGATAAGTCTATAG
 TTTAATTTTACAGCGCTTAACGCTGTTGTGCTATAGAACTGTTTTACTAGAGTGAGTTAGAGGCAAGCGGAATTCCATG
 TGTAGCGGTAAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTTGCTGGGACTTTACTGACGCTGAGG
 CACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCCGGGTA
 AAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGAC
 GGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATTTTCT
 TGCGAAGTTATAGAAAATATAATGAAGGTTGTGAGGAAAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGAT
 GTTAGGTTAAGTTCTAAAAACGAGCGCAACCTTGTGCTTAATTTGCCAGCATGTAATGATGGGGACTTTAACGAGACTG
 CCAATGAAAAATTTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATCTGGGCTACAAAACGTGATACA
 ATGTTGATACAAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTCTTAGCCAATCTCACAAAATCAATCTCAGTTTCGGATTGAAGTCT
 GCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAAGTAATCTGCGTAATCAAG

Amostra Mb6 - 1287 pares de bases

GAATTCAGTAGTGATTGAAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAAAAGTAAGGGCATCTTTACTTTTTTTAAAAAGACCTTC
 TTTGAAGGTATGCTTAAGGAGGGGCTTGCACACATTAGTTAGTTGGCAGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTG
 TAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
 TTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTACCTCGGTATGTAAAGTTCTTTTAT
 TAAGGAAGAAAAAGAGTGGAAAAACTCCCTTGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCC
 GCGGTAATACATAAGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTTAATAAGTCTATAG
 TTTAATTTTACAGCGCTTAACGCTGTTGTGCTATAGAACTGTTTTACTAGAGTGAGTTAGAGGCAAGCGGAATTCCATG
 TGTAGCGGTAAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTTGCTGGGACTTTACTGACGCTGAGG
 CACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCCGGGTA
 AAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACATACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGAC
 GGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATTTTCT
 TGCGAAGTTATAGAAAATATAATGAAGGTTATCAGGAAAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGAT
 GTTAGGTTAAGTTCTAAAAACGAGCGCAACCTTGTGCTTAATTTGCCAGCATGTAATGATGGGGACTTTAACGAGACTG
 CCAATGAAAAATTTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATCTGGGCTACAAAACGTGATACA
 ATGTTGATACAAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTCTTAGCCAATCTCACAAAATCAATCTCAGTTTCGGATTGAAGTCT
 GCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTTCGCGGGGTTTGT
 ACACACCGCCCGTCAAATCGAATTTCCCGCGGCCCATG

Amostra Nb1 - 1273 pares de bases

ATTCCGATTGAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAAAAGAAAGGCATCTTTCTTTTTTTAAAAAGACCTAGTAATAGG
 TATGCGTTAGGAGGGGCTTGCGCCATATTAGTTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGA
 CTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGC
 AATGGAGGCAACTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAACGACGAAGTACTTCCGGTATGTAAAGTTCTTTTATCAAAGAAG
 AAAAGCAAATGGCGAACCATTTGTCTGCCGGTATTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCCGGTA
 AGACATAAGGGGCAAGAGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGCAGAGTAAGTCAGTGGTGTAAAT
 GGCAACGCTTAACGTTGTCAGGCTATTGAACTACTTTGCTAGAGTTGGATAGAGGCGAGTGAATTCATGTGTAGC
 GGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTCGCTGGGTCTTAAGTACTGACGCTGAGGCACGAA
 AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCCGGTCAAACC
 GGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGAC
 TCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTACCAGGTCTTGACATGTTCTTGCGA
 AACGGTAGTAATATCGTGGAGGTTATCAGGAACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTAG
 GTTAAAGTCTTAAACGAGCGAAACCCTTATCGTTAGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTTTAATGAGACTGCCAAT
 GATAAATTGGAGGAAGGTGAGGATCACGTCAAATCAGCGTGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGC
 TGCTACAAAGGGTAGCTGAAACGCAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAGCAGTCTCAGTCCGGATTGAAGTCTGCAACT
 CGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTGCGGGTGAATACGTTCCGCGGGTTTGTACACAC
 CGCCCGTCAAATCACTAGTGAATTC

Amostra Nb2 - 1298 pares de bases

TCCCGGCCCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAAAAGAAAGGCATCTTTC
 TTTTTTTAAAAAGACCTAGTAATAGGTATGCGTTAGGAGGGGCTTGCGCCATATTAGTTAGTTGGTAAGGTAACGGCTT
 ACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGCAACTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAACGACGAAGTACTTCCGGT
 ATGTAAAGTTCTTTTATCAAAGAAGAAAAGCAAATGGCGAACCATTTGTCTGCCGGTATTTGATGAATAAGCCCCGGC
 TAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTGAGACATAAGGGGCAAGTGTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGG
 CGGCAGAGTAAGTCAGTGGTGTAAATGGCAACGCTTAACGTTGTCAGGCTATTGAACTACTTTGCTAGAGTTGGATAG
 AGGCGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTCGCTGG
 GTCTTAAGTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
 GAGTACTAAGTGTCCGGTCAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTA
 TGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTT
 ACCAGGTCTTGACATGTTCTTGCGAAACGGTAGTAATATCGTGGAGGTTATCAGGAACACAGGTGGTGCATGGTTGTC
 GTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTAGGTTAAGTCTTAAACGAGCGAAACCCTTATCGTTAGTTGCCAGCACGTTATGG
 TGGGGACTTTAACGAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGAGGATCACGTCAAATCAGCATGCCCTTATGACC
 TGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGCTACAAAGGGTAGCTGAAACGCAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAGCAGTC
 TCAGTCCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTGCGGGTGA
 ATACGTTACGCGGGTTTGTACACACCCCGCCGTCAAATCACTAGTGAATTC

Amostra Pr1 - 1281 pares de bases

GAATTCACTAGTGATTGAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAAAGTAAGGGCATCTTTACTTTTTTAAAAAGACCTTC
 TTTGAAGGTATGCTTAAGGAGGGGCTTGCACACATTAGTTAGTTGGCAGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTG
 TAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
 TTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTACCTCGGTATGTAAAGTTCTTTTAT
 TAAGGAAGAAAAGAGAGTGGAAAAACTCCCTTGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCC
 GCGGTAATACATAAGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTTAATAAGTCTATAG
 TTTAATTTCTGCGCTTAACGCTGTTGTGCTATAGAACTGTTTTACTAGAGTGAGTTAGAGGCAAGCGGAATTCCATG
 TGTAGCGGTAAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTTGCTGGGACTTTACTGACGCTGAGG
 CACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTGCGGGTA
 AAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGAC
 GGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATTTTCT
 TGCGAAGTTATAGAAAATATAATGAAGGTTATCAGGAAAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTAGAT
 GTTAGGTTAAGTTCTAAAAACGAGCGCGACCCCTTGTCGTTAATTGCCAGCATGTAATGATGGGGACTTTAACGAGACTG
 CCAATGAAAAATTTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATACA
 ATGGTTGATACAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTCTTAGCCAATCTCACAAAATCAATCTCAGTTCGGATTGAAGTCT
 GCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTGCGGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGT
 ACACACCGCCCGTCAAATCGAATTCGCCGCGCC

Amostra *B. hebe* - 1245 pares de bases

AAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGATAAGAAGGCATCTTCTTATTTTTTAAAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAAG
 GAGGGGCTTGCCTCACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGCT
 GAACGGCCACATTGGAACCTGAGACACGGTCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAA
 ACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTGATACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAAAAGATGGT
 GGAAAAACCATTATGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAATACATAGGGGG
 CGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTTAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTTAA
 CATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTACTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTAAAAATGCGT
 AAATATATGGAGGAACACCATGAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGC
 AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAGACGTTGGGTAAAACAGTGTGCAAGTTA
 ACACATTAAGTACTCCGCCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGG
 TGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAAATA
 CAGTGGAGGTCATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
 ACGAGCGCAACCCCTGTTGTTAATTCGCAATCATTAAGTTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTTGGAGGAA
 GGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAG
 CTAAAGCGCAAGCTTTTTGGCAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGT
 TGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTGCGGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCAA

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](#)