

UFRRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

DISSERTAÇÃO

**TRANSMISSIBILIDADE DO FITOPLASMA DO
'SUPERBROTAMENTO DO CHUCHUZEIRO' (ChWBIII) E
VARIABILIDADE DE FITOPLASMAS ASSOCIADOS A
OUTRAS ESPÉCIES BOTÂNICAS**

NILDA ZULEMA ALBORNOZ JIMÉNEZ

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**TRANSMISSIBILIDADE DO FITOPLASMA DO ‘SUPERBROTAMENTO
DO CHUCHUZEIRO’ (ChWBIII) E VARIABILIDADE DE FITOPLASMAS
ASSOCIADOS A OUTRAS ESPÉCIES BOTÂNICAS**

NILDA ZULEMA ALBORNOZ JIMÉNEZ

Sob a orientação da Professora
Helena Guglielmi Montano

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Fitopatologia e Biotecnologia Aplicada a Fitopatógenos.

Seropédica, RJ
Outubro de 2008

579.328

A339t

T

Albornoz Jiménez, Nilda Zulema, 1954-
Transmissibilidade do fitoplasma
do 'superbrotamento do chuchuzeiro'
(ChWBIII) e variabilidade de
fitoplasmas associados a outras
espécies botânicas/ Nilda Zulema
Albornoz Jiménez. - 2008.
95f.

Orientador: Helena Guglielmi
Montano.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Instituto de Biologia.

Bibliografia: f. 85-95.

1. Micoplasmatales - Teses. 2.
Chuchu - Doenças e pragas - Teses.
I. Montano, Helena Guglielmi, 1964-
. II. Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Instituto de
Biologia. III. Título.

DEDICATÓRIA

A minha mãe, **Ninfa Angela**, pelo amor, apoio, confiança e pela força física e espiritual que permitiram meu crescimento como ser humano, **DEDICO**.

A meu pai **Francisco**, meu irmão **Nicomedes** e a minha avó **María Ursula**, pelo amor e os conselhos que me levaram a lutar por meus direitos e meus ideais, *In memoriam*.

A meus irmãos **Carlos, Francisca Ursula, Margoth, Maritza, Gaby** e, as meus sobrinhos **Charles, Kamelly, Renato, Luis, Frank Carlos, Marlon, Ian, Angela, Frank, Evelyn, Claudia, María de los Angeles**, pelo incentivo constante nas horas difíceis, e por ser parte da minha vida, **OFEREÇO**.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Helena Guglielmi Montano, pela valiosa colaboração, disposição e compreensão na elaboração de meu trabalho de pesquisa. Por todos os ensinamentos recebidos sobre o mundo dos fitoplasmas. Meu agradecimento especial por ter sido a força que me impulsionou a superar os momentos mais difíceis vividos durante o desenvolvimento de minha pesquisa. Minha gratidão pela valiosa ajuda para a culminação da minha dissertação.

Ao Prof. João Pedro Pimentel, pela ajuda, compreensão e sugestões técnicas para a condução da parte experimental de meu trabalho. Porque sempre teve o tempo e a paciência para compartilhar os resultados da parte experimental da minha pesquisa.

Ao Dr. Francisco Adriano de Souza, pela valiosa ajuda para a culminação de meu trabalho de dissertação.

Ao Molecular Plant Pathology Laboratory, Agricultural Research Service (ARS), United States Department of Agriculture (USDA), em Maryland pela valiosíssima e indispensável ajuda recebida no desenvolvimento da minha pesquisa.

À Dra. Enia Mara de Carvalho, pelas sugestões técnicas para a execução, condução da parte experimental e também pela ajuda na elaboração da minha dissertação.

Ao Dr. Jadier de Olivera Cunha Junior, pela ajuda para obtenção do valioso material fotográfico durante parte de meu trabalho e pelos momentos compartilhados durante a execução de minha pesquisa.

À Profa. Áurea Echevarria Aznar Neves Lima e à Profa. Sonia Regina de Souza, meus agradecimentos pelo auxílio recebido para a realização de parte de meus experimentos.

Aos meus amigos Dione de Carvalho, Cândido Barreto de Novais, Wardsson Lustrino Borges pela ajuda, amizade e porque sempre estiveram perto de mim nos momentos mais difíceis do desenvolvimento da minha pesquisa.

A todos os funcionários do setor de Fitopatologia, do Departamento de Entomologia e Fitopatologia da UFRRJ por sua valiosa ajuda.

Enfim a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização do meu trabalho.

Muito obrigada.

RESUMO

JIMÉNEZ, Nilda Zulema Albornoz. **Transmissibilidade do fitoplasma do ‘superbrotamento do chuchuzeiro’ (ChWBIII) e variabilidade de fitoplasmas associados a outras espécies botânicas.** 2008. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia. Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Fitoplasmas são procariotos sem parede celular associados com inúmeras enfermidades de espécies de plantas no mundo. Esses patógenos na natureza são transmitidos por insetos que se alimentam do floema das plantas. Como os fitoplasmas não podem ser cultivados *in vitro* empregam-se técnicas moleculares para sua diganose e caracterização. No Brasil, o ‘superbrotamento do chuchuzeiro’ é uma doença associada ao fitoplasma ChWBIII, que pode causar redução da qualidade de frutos de chuchu. O ChWBIII tem outras espécies hospedeiras naturais, da família *Cucurbitaceae*, sendo a principal dessas, melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia*).

O presente trabalho teve como objetivos: (a) determinar a transmissibilidade do ChWBIII por métodos experimentais para vinca (*Catharanthus roseus*); (b) estudar a sintomatologia exibida por *C. roseus* infectado com o fitoplasma ChWBIII; (c) avaliar duas diferentes estratégias de desidratação de tecido vegetal para a detecção de fitoplasmas de plantas naturalmente doentes de chuchuzeiro, melão-de-São-Caetano e vinca; (d) estudar a possível presença e a transmissão do fitoplasma ChWBIII às sementes de *M. charantia*; e, (e) verificar a variabilidade de fitoplasmas em milho, maracujá, poinsétia e *C. roseus*.

A patogenicidade e a transmissibilidade do ChWBIII, mediante *Cuscuta* e enxertia, foi verificada pela sintomatologia em *C. roseus* e por PCR usando *primers* universais específicos para o 16S rDNA de fitoplasmas. Posteriormente, a identidade do ChWBIII em plantas doadoras de melão-de-São-Caetano, em *Cuscuta* e em *C. roseus* foi confirmada por análise de seqüências.

Amostras de plantas doentes de melão-de-São-Caetano, vinca e chuchuzeiro submetidas à dessecação com sílica gel, continham 16S rDNA de fitoplasma, o qual foi amplificado por PCR com *primers* P1/P7 e reamplificado em *nested* PCR com os *primers* F2n/R2, fornecendo produtos de aproximadamente 1.2 kb.

Testes moleculares demonstraram a presença do fitoplasma ChWBIII em sementes de *M. charantia* de frutos sintomáticos, obtidos de plantas com ‘superbrotamento do melão-de-São-Caetano’. O emprego de *primers* específicos ao grupo 16SrIII confirmou a identificação do fitoplasma associado à sementes como pertencente a esse grupo, o que foi corroborado através do seqüenciamento. A análise das seqüências revelou que o fitoplasma associado a sementes de melão-de-São-Caetano é o ChWBIII.

A presença de fitoplasmas em plantas sintomáticas de milho, maracujá, poinsétia e *C. roseus* foi detectada através de PCR e *nested* PCR com iniciadores universais. Os fitoplasmas isolados de maracujá, poinsétia e *C. roseus* foram inseridos no grupo 16SrIII, de acordo com *nested* PCR com *primers* específicos a esse grupo. Análise das seqüências dos fitoplasmas de maracujá e de *C. roseus* confirmou a identidade dos mesmos, revelando 99% de homologia com o ChWBIII.

Com a presente pesquisa determinou-se: (a) a transmissibilidade de ChWBIII mediante a transmissão inversa por *Cuscuta* para a hospedeira experimental *C. roseus* e, também mediante a indexação biológica; (b) a sintomatologia exibida por *C. roseus* infectado com o fitoplasma

ChWBIII; (c) a viabilidade do uso de tecidos preservados de chuchuzeiro, melão-de-São-Caetano e vinca, para a detecção de fitoplasmas, indicando a possibilidade de uso desse tipo de amostras para outras espécies botânicas afetadas por fitoplasmoses; (d) a presença de fitoplasmas nas sementes de frutos sintomáticos provenientes de plantas de melão-de-São-Caetano infectadas com o ChWBIII, o que sugere a possível transmissão do fitoplasma da planta mãe para as sementes; (e) a diversidade de plantas hospedeiras de fitoplasmas no Brasil, que foi verificada em milho, maracujá, poinsetia e *C. roseus*.

Os resultados obtidos no presente estudo possibilitam o maior entendimento epidemiológico das enfermidades incitadas por fitoplasmas e podem auxiliar na descoberta de insetos vetores e de plantas hospedeiras alternativas, favorecendo o estabelecimento de estratégias de controle dessas doenças.

Palavras-chave: *Mollicutes*. PCR. Diagnose. Transmissão.

ABSTRACT

JIMÉNEZ, Nilda Zulema Albornoz. **Transmissibility of chayote witches' broom phytoplasma (ChWBIII) and variability of phytoplasmas associated with other plant species.** 2008. 95p. Dissertation (Master of Science in Phytosanitary and Applied Biotechnology). Instituto de Biologia. Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Phytoplasmas are wall-less prokaryotes associated with diseases in numerous plant species worldwide. In nature they are transmitted by phloem-sucking insects. Since phytoplasmas cannot be cultured *in vitro*, molecular techniques are needed for their diagnosis and characterization. In Brazil, chayote witches' broom is a disease associated with ChWBIII phytoplasma, which can reduce the quality of chayote fruits. ChWBIII has other natural plant hosts, in the family *Cucurbitaceae*, and bitter melon (*Momordica charantia*) is the major alternative host.

The present work aimed at (a) determine the transmissibility of ChWBIII to periwinkle (*Catharanthus roseus*) through experimental methods; (b) study the symptomatology exhibited by *C. roseus* infected with ChWBIII phytoplasma; (c) evaluate two different strategies of plant tissue dehydration, to detect phytoplasma in naturally diseased plants of chayote, bitter melon and periwinkle; (d) study the putative presence and transmission of ChWBIII phytoplasma to seeds of *M. charantia*; and (e) verify phytoplasma variability in corn, passionfruit, poinsetia and *C. roseus*.

Pathogenicity and transmissibility of ChWBIII through dodder and grafting was verified by the symptomatology developed in *C. roseus*, and by PCR with universal primer pairs specific to phytoplasmas 16S rDNA. Afterwards, the identity of ChWBIII in donor plants of bitter melon, in dodder and in *C. roseus* was confirmed by sequences analyses.

Samples from diseased plants of bitter melon, periwinkle and chayote, that were submitted to desiccation with silica gel showed phytoplasmal 16S rDNA that was amplified with P1/P7 in PCR and reamplified in nested PCR with F2n/R2 yielding products of approximately 1.2 kb.

Molecular assays demonstrated the presence of ChWBIII phytoplasma in seeds of symptomatic fruits of *M. charantia*, collected from plants with witches' broom symptoms. The use of primers specific to 16SrIII group confirmed the identification of the phytoplasma associated with seeds as belonging to this group, what was further confirmed through sequencing. Sequences analyses revealed that the phytoplasma associated with bitter melon seeds is ChWBIII.

The presence of phytoplasmas in symptomatic plants of corn, passionfruit, poinsetia and *C. roseus* was detected by PCR and nested PCR with universal primer pairs. Phytoplasmas isolated from passionfruit, poinsetia and *C. roseus* were classified as belonging to 16SrIII group, according to nested PCR with primers specific to this group. Analysis of the sequences of the phytoplasmas from passion fruit and *C. roseus* confirmed the identity of these organisms, revealing 99% homology with ChWBIII.

The results determined are the following: (a) the transmissibility of ChWBIII to the experimental host *C. roseus* by inverse transmission through dodder, as well as by graft transmission; (b) the symptomatology exhibited by *C. roseus* infected with ChWBIII phytoplasma; (c) the viability of preserved tissue from chayote, bitter melon and periwinkle to detect phytoplasma, indicating the possible use of this kind of sample, for other botanical species infected with phytoplasmas; (d) the presence of phytoplasma in seeds of symptomatic fruits, from

plants of bitter melon infected with ChWBIII, what suggests the putative transmission of the phytoplasma from the mother plants to the seeds; (e) the diversity of phytoplasma host plants, that was verified in corn, passionfruit, poinsetia and *C. roseus*.

The results obtained in the present study lead to a better epidemiological understanding of the diseases caused by phytoplasmas, and may help to search for insect vectors and alternate plant hosts, enabling the design of effective disease management strategies.

Keywords: *Mollicutes*. PCR. Diagnosis. Transmission.

RESUMEN

JIMÉNEZ, Nilda Zulema Albornoz. **Transmisión del fitoplasma del ‘superbrotamiento del chuchu’ (ChWBIII) y variabilidad de fitoplasmas asociados a otras especies botánicas.** 2008. 95p. Tese (Maestría en Ciencias, Fitosanidad y Biotecnología Aplicada). Instituto de Biología. Departamento de Entomología y Fitopatología, Universidad Federal Rural de Río de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Los fitoplasmas son procariotos que carecen de pared celular y se encuentran asociados con numerosas enfermedades en diferentes especies de plantas en el mundo. Estos patógenos son transmitidos por insectos que se alimentan del floema de las plantas. Como los fitoplasmas no pueden ser aislados *in vitro* se emplean técnicas moleculares para la diagnosis e caracterización. En Brasil el ‘superbrotamiento del chuchu’ es una enfermedad asociada con el fitoplasma ChWBIII, que puede causar reducción de la calidad de los frutos de chuchu (*Sechium edule*). El ChWBIII tiene otras especies huéspedes naturales de la familia de las *Cucurbitáceas*, siendo o melón de San Caetano (*Momordica charantia*) o principal huésped.

Los objetivos de la presente investigación fueron: (a) determinar la transmisibilidad del ChWBIII con métodos experimentales, para ‘isabelita’ (*Catharanthus roseus*); (b) estudiar la sintomatología manifestada en *C. roseus*, infectada con el fitoplasma ChWBIII; (c) evaluar dos métodos diferentes de deshidratación de tejido vegetal para la detección de fitoplasmas de plantas infectadas naturalmente de *S. edule*, *M. charantia* y *C. roseus*; (d) estudiar la posible presencia y la transmisión del fitoplasma ChWBIII en las semillas de *M. Charantia*; y, (e) verificar la variabilidad de fitoplasmas en maíz, maracuyá, *E. pulcherrima* e *C. roseus*.

La patogenicidad y la transmisibilidad del ChWBIII mediante *Cuscuta* e injerto fue verificada por la sintomatología en *C. roseus* y mediante PCR utilizando *primers* universales específicos para el 16S rADN de los fitoplasmas. Posteriormente a identidad del ChWBIII en las plantas donadoras de *M. charantia*, y en *Cuscuta* y *C. roseus* fue confirmada por el análisis de las secuencias.

Las muestras de las plantas enfermas de *M. charantia*, *Sechium edule* y *C. roseus* sometidas a deshidratación y secado con silica gel contenían el 16S rADN del fitoplasma, que fue amplificado mediante PCR con P1/P7 y reamplificado en *nested* PCR con el *primer* F2n/R2, generando productos de 1.2 kb.

Los testes moleculares demostraron la presencia del fitoplasma ChWBIII en semillas de *M. charantia* de frutos sintomáticos, obtenidos de plantas con el ‘superbrotamiento de *M. charantia*’. Utilizándose *primers* específicos al grupo 16SrIII se confirmó la identificación del fitoplasma asociado a las semillas como perteneciente a ese grupo, lo que fue verificado a través del análisis de las secuencias. Este análisis reveló que el fitoplasma asociado a las semillas de *M. charantia* es el ChWBIII.

La presencia de fitoplasmas en plantas sintomáticas de maíz, maracuyá (*Passiflora edulis*) poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) y *C. roseus* fue detectada a través de PCR y *nested* PCR con iniciadores universales. Los fitoplasmas aislados de maracuyá, poinsettia e *C. roseus* fueron inseridos en el grupo 16SrIII, conforme el *nested* PCR con *primers* específicos a ese grupo. Los análisis de las secuencias de los fitoplasmas de maracuyá y *C. roseus* confirmó su identidad, revelando una homología de 99% con el ChWBIII.

Con el presente trabajo de investigación, se determinó: (a) la transmisibilidad del fitoplasma ChWBIII mediante la transmisión inversa del fitoplasma por *Cuscuta* para *C. roseus*, huésped experimental y, también mediante indexación biológica; (b) la sintomatología exhibida por *C. roseus* infectado con el fitoplasma ChWBIII; (c) la viabilidad del uso de tejidos desecados de *S. edule*, *M. charantia* y *C. roseus*, para a detección de fitoplasmas, indicando la posibilidad del uso de este tipo de muestras para otras especies botánicas afectadas por fitoplasmosis; (d) la presencia de fitoplasmas en las semillas de frutos sintomáticos provenientes de *M. charantia* infectadas con el fitoplasma ChWBIII, lo que sugiere la transmisión de los fitoplasmas de la planta madre para las semillas; (e) la diversidad de plantas huéspedes de fitoplasmas en Brasil, que fue verificada en maíz, maracuyá, *E. pulcherrima* y *C. roseus*.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación posibilitan un mejor entendimiento de la epidemiología de las enfermedades causadas por los fitoplasmas, y puede ayudar en el descubrimiento de los insectos vectores y de las plantas huéspedes alternativas de estos microorganismos, posibilitando el establecimiento de estrategias para el control de esas enfermedades.

Palabras-claves: *Mollicutes*. PCR. Diagnósis. Transmisión.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
RESUMEN.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 CAPÍTULO I: Transmissão do fitoplasma ChWBIII associado a <i>Momordica charantia</i> L. por <i>Cuscuta</i> sp. e enxertia para <i>Catharanthus roseus</i> G. Don.....	14
Resumo.....	15
Abstract.....	16
2.1 Introdução.....	17
2.2 Material e Métodos.....	19
2.2.1 Plantas hospedeiras do fitoplasma ChWBIII.....	19
2.2.2 Transmissão experimental por <i>Cuscuta</i> sp.....	19
2.2.3 Transmissão experimental por enxertia.....	20
2.2.4 Extração de ácido nucléico total de material vegetal.....	21
2.2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR) e <i>nested</i> PCR.....	22
2.2.6 Seqüenciamento de DNA.....	23
2.3 Resultados.....	23
2.3.1 Transmissão por <i>Cuscuta</i> sp.....	23
2.3.2 Transmissão por enxertia.....	26
2.3.3 Amplificação do 16S rDNA de fitoplasma com PCR e <i>nested</i> PCR.....	28
2.3.4 Identificação de fitoplasma através da análise de seqüências de nucleotídeos.....	30
2.4 Discussão.....	31
2.5 Referências Bibliográficas.....	33
3 CAPÍTULO II: Detecção de fitoplasma em tecido dessecado de <i>Momordica charantia</i>, <i>Catharanthus roseus</i> e <i>Sechium edule</i>.....	35
Resumo.....	36
Abstract.....	37
3.1 Introdução.....	38
3.2 Material e Métodos.....	39
3.2.1 Material Vegetal.....	39
3.2.2 Extração de DNA.....	40
3.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR) e <i>nested</i> PCR.....	41
3.3 Resultados.....	41
3.4 Discussão.....	43
3.5 Referências Bibliográficas.....	45
4 CAPÍTULO III: Detecção e caracterização do fitoplasma ChWBIII em sementes de <i>Momordica charantia</i> L. no Brasil.....	48
Resumo.....	49
Abstract.....	50
4.1 Introdução.....	51
4.2 Material e Métodos.....	52
4.2.1 Coleta de amostras vegetais.....	52
4.2.2 Extração de DNA total.....	53
4.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR) e <i>nested</i> PCR.....	54

4.2.4	<i>Nested</i> PCR com oligonucleotídeos específicos ao grupo III.....	55
4.2.5	Seqüenciamento de DNA.....	55
4.3	Resultados	56
4.3.1	Sintomas do fitoplasma ChWBIII em frutos e sementes de <i>Momordica charantia</i>	56
4.3.2	Amplificação do 16S rDNA de fitoplasma com PCR e <i>nested</i> PCR.....	57
4.3.3	<i>Nested</i> PCR com oligonucleotídeos específicos ao grupo III.....	58
4.3.4	Identificação de fitoplasma através da análise de seqüências de nucleotídeos.....	59
4.4	Discussão	60
4.5	Referências Bibliográficas	63
5	CAPÍTULO IV: Variabilidade de fitoplasmas associados com outras espécies botânicas no Brasil	67
	Resumo	68
	Abstract	69
5.1	Introdução	70
5.2	Material e Métodos	72
5.2.1	Coleta de amostras vegetais.....	72
5.2.2	Extração de ácido nucléico total de material vegetal.....	72
5.2.3	Polymerase Chain Reaction (PCR) e <i>nested</i> PCR.....	73
5.2.4	<i>Nested</i> PCR com pares de oligonucleotídeos específicos aos grupos I e III.....	74
5.2.5	Seqüenciamento de DNA.....	74
5.3	Resultados	75
5.3.1	Deteção de fitoplasmas mediante PCR e <i>nested</i> PCR.....	75
5.3.2	<i>Nested</i> PCR com pares de oligonucleotídeos específicos aos grupos I e III.....	78
5.3.3	Identificação de fitoplasma através da análise de seqüências de nucleotídeos.....	79
5.4	Discussão	80
5.5	Referências Bibliográficas	82
6	CONCLUSÕES	84
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1 INTRODUÇÃO

Fitoplasmas (originalmente denominados organismos do tipo micoplasma, MLOs) são procariotos polimórficos unicelulares, parasitas intracelulares obrigatórios, sem parede celular e, portanto membros da classe *Mollicutes*. São fitopatógenos habitantes dos vasos do floema (células especializadas para transporte de nutrientes) em plantas infectadas (Lee *et al.*, 1992a; Davis, 1995), bem como o interior de insetos vetores. Podem sobreviver e reproduzir-se somente em habitats isotônicos, como o floema das plantas ou a hemolinfa dos insetos; portanto são estritamente dependentes de seus hospedeiros (planta e vetor). São de interesse para a agricultura e as ciências básicas, o estudo das vias metabólicas e as interações desses fitopatógenos com os hospedeiros (Bové & Garnier, 1998; Lee *et al.*, 2000; Hoshi *et al.*, 2007).

Segundo Hogenhout *et al.*, (2008) os fitoplasmas encontram-se classificados taxonomicamente no Super Reino *Prokaryota*, Reino *Monera*, Domínio *Bacteria*, Filo *Firmicutes*, Classe *Mollicutes*, Ordem *Acholeplasmatales*, Família *Acholeplasmataceae*, Gênero *Candidatus* (Ca.) *Phytoplasma*.

Filogeneticamente estão relacionados às bactérias Gram-positivas, e possuem DNA com baixo conteúdo de guanina e citosina (G+C), sendo ricos em adenina e timina (A+ T). O genoma de fitoplasmas é pequeno varia de 530 a 1350 kb (Neimark & Kirkpatrick 1993; Marcone *et al.*, 1999). O fitoplasma ‘Bermuda grass white leaf’ tem o menor genoma (530 kb) e pode representar o menor cromossomo de qualquer célula viva conhecida até hoje. Contem limitado número de vias metabólicas, presença de apenas um ou dois operons ribossomais e pequeno número de rRNA (Razin *et al.*, 1998; Garnier *et al.*, 2001).

Em geral, o genoma pequeno desta bactéria fitopatogênica tem perdido genes que codificam para muitas funções metabólicas; isto provavelmente porque muitos metabólitos estão disponíveis dentro do ambiente da célula hospedeira. Essas características do genoma sugerem que os fitoplasmas sejam altamente dependentes dos compostos metabólicos da célula hospedeira, consumindo metabólitos nas plantas infectadas o que pode causar grandes distúrbios no balanço metabólico, causando os sintomas das doenças (Hoshi *et al.*, 2007).

Os fitoplasmas são geneticamente distinguíveis dos micoplasmas que infectam humanos e animais, pela presença da região espaçadora (aproximadamente 300 pb), entre as regiões ribossomais dos genes 16S e 23S (Bertaccini, 2007). Os fitoplasmas contêm uma molécula

circular de dupla fita de DNA cromossômico e, o conteúdo de G+C situa-se entre 23 e 29 %. O baixo conteúdo de G+C confirma a relação filogenética desses fitopatógenos com membros da classe *Mollicutes* (Razin *et al.*, 1998; Razin *et al.*, 2007; Christensen *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2005). Estudos filogenéticos propuseram que o ancestral desses microrganismos é *Acholeplasma laidlawii*, cuja codificação para o triptofano é UGC, enquanto que para os outros procariontes, incluindo micoplasmas e espiroplasmas, o triptofano é codificado por UGA (Bertaccini, 2007).

Até o momento, somente dois genomas de fitoplasmas foram seqüenciados completamente, o ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ estirpe OY e a estirpe ‘aster yellows witches’ broom’ (AY-WB) (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006). Em geral o genoma pequeno desses fitopatógenos tem perdido genes para muitas vias metabólicas, isso é provável porque muitos metabólitos estão disponíveis no ambiente das células hospedeiras (Moran, 2002). Fitoplasmas e micoplasmas carecem de genes para o ciclo do ácido tricarbóxico, para a biossíntese do esteroide, para biossíntese dos ácidos graxos e, para a biossíntese da maioria dos aminoácidos (Razin *et al.*, 1998; Hoshi *et al.*, 2007). Essas características determinam que os fitoplasmas dependam dos compostos metabólicos da célula hospedeira.

Embora que os genes metabólicos sejam escassos, o genoma dos fitoplasmas contém muitos genes que codificam os sistemas de transporte, tal como íons e transportadores de aminoácidos, sugerindo que os fitoplasmas importam ativamente muitos metabólitos da célula hospedeira. O consumo desses metabólitos nos organismos infectados com fitoplasmas pode causar distúrbios no balanço metabólico da célula hospedeira, ocasionando os sintomas da doença. Os genomas dos fitoplasmas codificam muitas proteínas das membranas cujas funções são ainda desconhecidas (Hoshi *et al.*, 2007).

Após décadas de investigações sobre enfermidades conhecidas como “amarelos” (“yellows”), em 1967, cientistas japoneses descobriram microrganismos sem parede celular presentes no floema de plantas infectadas com ‘aster yellows’ e, propuseram que os “amarelos” eram causados por organismos do tipo micoplasma (MLOs) (Doi *et al.*, 1967, citado por Kitajima, 1994). A partir da descoberta de Doi *et al.* em 1967 até 1994, os fitoplasmas foram denominados MLOs, termo que designava o agente causal de muitas doenças conhecidas como ‘amarelos’. Em 1994, adotou-se oficialmente o termo fitoplasma (‘phytoplasma’) para identificar

esses procariontes (The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma taxonomy group 2004).

Plantas infectadas com fitoplasmas caracterizam-se por anormalidades no crescimento e desenvolvimento, os quais sugerem a ocorrência de distúrbios hormonais. Os sintomas nas plantas são virescência (desenvolvimento de flores verdes e a perda dos pigmentos normais das flores), filoidia (desenvolvimento das partes florais em estruturas foliares), esterilidade das flores, superbrotamento ou proliferação de brotações axilares dando a aparência de vassoura-de-bruxa, alongamento anormal dos entrenós resultando em brotações delgadas, enfezamento generalizado (flores, folhas e entrenós pequenos). Assim, também descoloração das folhas ou brotações, enrolamento das folhas, ramificação do caule, e declínio (Kitajima, 1994; Lee *et al.*, 2000; Bertaccini, 2007; Hogenhout *et al.*, 2008). Em plantas lenhosas ocasionam enfezamento, “die back” dos ramos jovens e amarelecimento ou avermelhamento das folhas e, declínio geral e morte das plantas (Namba, 2002). Os sintomas nas plantas variam com a espécie de fitoplasmas e o período da infecção. Internamente no tecido infectado, os fitoplasmas podem provocar necrose no floema e formação excessiva do tecido floemático, ocasionando o intumescimento dos vasos. Perdas causadas por esses microrganismos abrangem desde a diminuição parcial da produção e da qualidade, até quase a perda total das colheitas. Apenas em um caso raro, a infecção por fitoplasmas, em poinsetia (*Euphorbia pulcherrima*), induz sintomas que são benéficos para os produtores dessa planta ornamental (Lee *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000).

Por serem colonizadores de floema, os fitoplasmas são transmitidos naturalmente por insetos de alimentação floemática (Hibben *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1994; Mc Coy *et al.*, 1989; Tsai, 1979). A ordem Hemiptera é a ordem de insetos vetores de fitoplasmas, distribuídos nas subordens Heteroptera, Sternorrhyncha e Auchenorrhyncha e, pertencentes às famílias *Cicadellidae*, *Cixidae*, *Psyllidae*, *Delphacidae* e *Derbidae*. Outras formas de transmissão de fitoplasmas ocorrem devido à ação humana, através de práticas de enxertia e outras técnicas de propagação vegetativa (Boudon-Padieu *et al.*, 1989; McCoy *et al.*, 1989; Fos *et al.*, 1992; Sforza *et al.*, 1998; Maixner & Reiner 1999; Weintraub & Beanland 2006; Weintraub 2007; Wilson & Weintraub 2007).

Os insetos da ordem Hemiptera possuem características que determinam que seus membros sejam eficientes vetores de fitoplasmas: (a) são hemimetábolicos, ou seja, ninfas e adultos alimentam-se de modo semelhante e se encontram no mesmo lugar físico e, ambos podem

transmitir fitoplasmas; (b) sua alimentação seletiva é específica nos tecidos das plantas, o que faz deles eficientes vetores de patógenos permanentes desses tecidos. Além disso, sua alimentação é não destrutiva, tendo sucesso na inoculação no sistema vascular da planta, sem danificar os tecidos condutivos e sem causar respostas defensivas da planta; (c) relação de propagação e persistência com os fitoplasmas; (d) têm simbiose com esses procariotos que passam à descendência, mediante transmissão transovariana (Weintraub & Beanland, 2006; Wilson & Weintraub, 2007).

Os insetos adquirem fitoplasmas passivamente quando se alimentam no floema das plantas infectadas. O período de tempo de alimentação do vetor, necessário à aquisição de fitoplasma, em concentração suficiente, consiste no período de aquisição; essa pode ter duração de poucos minutos, mas geralmente é medido em horas. Os vetores com períodos de aquisição mais longos têm maior possibilidade de transmissão dos patógenos (Purcell, 1982; Bai *et al.*, 2006). Entretanto, não é conhecido como a concentração dos fitoplasmas nas plantas afeta o período de aquisição dos vetores (Weintraub, 2007).

A transmissão dos fitoplasmas pelos insetos vetores é um processo ativo com várias ocorrências. Após a aquisição via alimentação, a movimentação do fitoplasma no intestino e na hemolinfa do inseto, a penetração e multiplicação nas glândulas salivares é um pré-requisito para a transmissão de fitoplasmas (Harris, 1980; D'Arcy & Nault, 1982; Boudon-Padieu *et al.*, 1989; Lherminier *et al.*, 1989; Lefol *et al.*, 1994; Seddas, *et al.*, 1995; Wayadande & Fletcher, 1995; Fletcher *et al.*, 1996). O período de tempo que decorre desde a aquisição inicial até a capacidade para transmitir o fitoplasma é conhecido como período latente e, algumas vezes refere-se como período de incubação. Durante esse período o patógeno se movimenta, e se reproduz no corpo do inseto vetor. Esse período depende da temperatura, e pode variar desde uns poucos dias até 80 dias (Lee *et al.*, 2000; Weintraub, 2007).

Portanto, a detecção dos fitoplasmas nos insetos é um passo a seguir para a identificação do vetor, mas não é uma evidência de sua capacidade transmissora. Muitos insetos de alimentação floemática são capazes de adquirir fitoplasmas de plantas doentes, mas não têm capacidade para transmissão dos mesmos (Vega *et al.*, 1993; Danielli *et al.*, 1996; Carraro *et al.*, 1998).

A natureza da colonização de fitoplasmas em plantas enfermas, os quais encontram-se restritos aos tecidos floemáticos, determina sua baixa concentração nas plantas infectadas.

A disseminação e o progresso de fitoplasmoses estão influenciados pela densidade do inóculo e pela atividade dos vetores. É necessária informação sobre os vetores potenciais e as possíveis fontes de inóculo para predizer o risco de novas infecções (em uma ou em colheitas múltiplas), para monitorar o progresso de doença e, desenvolver métodos de controle (Tanne *et al.*, 2001). A distribuição e a disseminação de doenças incitadas por fitoplasmas têm alta correlação com os hábitos alimentares e a biologia dos insetos vetores e, com a presença de plantas alternativas que são reservatórios de fitoplasmas (Lee *et al.*, 1993; Loi *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Alma *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998; Garnier, 2001).

A colonização dos fitoplasmas nos hospedeiros vegetais depende da estação do ano, do órgão vegetal colonizado, do hospedeiro e, das espécies desses patógenos, resultando em uma variedade de sintomas diferentes, com uma interferência complexa para a fisiologia do hospedeiro. Os fitoplasmas representam a principal ameaça para o cultivo de espécies economicamente importantes, como frutíferas, palmáceas e florestais. Dessa forma, a diagnose sensível e precisa desses microrganismos é uma condição prévia para o manejo das doenças associadas aos fitoplasmas. A detecção de fitoplasmas é muitas vezes difícil de realizar, devido à baixa concentração presente em hospedeiros lenhosos e a distribuição irregular no floema de plantas infectadas (Berges *et al.*, 2000; Dói *et al.*, 1967; Martinez *et al.*, 2000).

As interações vetor-hospedeiro apresentam importante função na restrição ou na disseminação dos fitoplasmas. Os vetores polípagos têm capacidade de inocular numerosas espécies de plantas, dependendo da suscetibilidade da planta hospedeira. Diversos estudos demonstraram que insetos que normalmente não se alimentavam em determinadas espécies de plantas podiam adquirir e transmitir os fitoplasmas a essas plantas, em condições de laboratório. Em muitos casos, a gama de plantas hospedeiras de um vetor se constitui em fator determinante à disseminação dos fitoplasmas, independentemente da presença de fitoplasmas específicos (Weintraub, 2007).

Fitoplasmas são fitopatógenos importantes associados a enfermidades em aproximadamente duzentas espécies botânicas distintas, muitas das quais podem ser letais às plantas infectadas (Lee *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2004; Bertaccini, 2007). Doenças associadas a fitoplasmas estão disseminadas mundialmente e, em diversos casos estão associadas a epidemias freqüentes, severas e de importância quarentenária. Por serem parasitas procariotos, os fitoplasmas não são cultivados em meio de cultura artificial e, dessa forma os postulados de Koch

são cumpridos, em alguns casos, com adaptações, utilizando-se enxertia, transmissão mediante *Cuscuta* sp. e/ou transmissão por insetos vetores.

Três mecanismos conhecidos veiculam os fitoplasmas nos tecidos vulneráveis das plantas hospedeiras: (a) propagação vegetativa de plantas ou enxertia com tecidos provenientes de plantas infectadas, (b) conexões vasculares entre plantas hospedeiras infectadas e não infectadas, mediante plantas parasitas como *Cuscuta* sp. e, (c) alimentação de insetos vetores sobre plantas hospedeiras não infectadas.

A *Cuscuta* (*Convolvulaceae*) é uma planta de hábito parasitário que através das suas ramificações filamentosas e tênues, penetra no sistema vascular do hospedeiro, do qual retiram nutrientes, mediante a formação de haustórios. Essa característica tem sido explorada experimentalmente, pois o estabelecimento dessa parasita numa planta infectada e posteriormente em outra planta sadia faz com que seus filamentos formem verdadeiras pontes biológicas, que possibilitam a passagem dos patógenos de uma planta para outra. Para essas transmissões geralmente é utilizada como planta receptora de fitoplasmas *Catharanthus roseus* L., planta experimental e hospedeira universal desses fitopatógenos (Bergamin-Filho *et al.*, 1995).

A indexação biológica com diferentes tipos de enxertia é realizada para a transmissão de fitoplasmas em plantas herbáceas e lenhosas. Muitos estudos dessa forma de transmissão têm sido realizados no mundo, com indexações de plantas monocotiledôneas em monocotiledôneas, de monocotiledôneas em eudicotiledôneas e de eudicotiledôneas em eudicotiledôneas. Também se obtiveram resultados positivos nas transmissões de plantas lenhosas a plantas lenhosas, de lenhosas a herbáceas e, de herbáceas a herbáceas.

Recentemente, resultados sugerem haver um outro possível mecanismo de transmissão de fitoplasmas, através de sementes. Como os componentes da seiva do floema carecem de qualquer conexão direta com sementes, esta forma de transmissão tem sido considerada improvável; no entanto o fitoplasma do ‘amarelecimento letal do coqueiro’ foi detectado em embriões de frutos de coqueiro de árvores infectadas (Cordova *et al.*, 2003). Além desse caso, o fitoplasma da ‘vassoura-de-bruxa da alfafa’ tem sido detectado em sementes de plantas infectadas (Khan *et al.*, 2002).

A diagnose das doenças associadas aos fitoplasmas é dificultada pela impossibilidade do isolamento dos mesmos em meio de cultura; a semelhança entre os sintomas incitados por fitoplasmas e alguns sintomas provocados por vírus e; devido à ocorrência de plantas portadoras

de infecção latente. Dessa maneira, a detecção de fitoplasmas em plantas e insetos vetores é um fator de grande importância para a diagnose de doenças e estudos epidemiológicos. A patogenicidade desses agentes tem sido demonstrada através de sua detecção na planta, da aplicação de testes biológicos e, da remissão de sintomas através de tratamento com antibióticos do grupo das tetraciclinas.

A identificação taxonômica de fitoplasmas é importante, pois permite demonstrar a presença de diferentes fitoplasmas numa mesma espécie vegetal ou relacionar fitoplasmas semelhantes que ocorrem em espécies vegetais diferentes. Fitoplasmas semelhantes podem causar diferentes sintomas em hospedeiros vegetais distintos, enquanto fitoplasmas distintos podem ser veiculados pela mesma espécie de vetor e provocar sintomas diferentes, em uma mesma espécie botânica. O conhecimento desse tipo de informação pode contribuir para um maior entendimento sobre a epidemiologia da doença, visando à adoção de medidas de controle mais eficientes.

Tradicionalmente, os fitoplasmas foram diferenciados e caracterizados, com base nas suas características biológicas, na gama de hospedeiros, nos sintomas das doenças nos hospedeiros naturais e, na especificidade dos insetos vetores. Posteriormente a detecção de fitoplasmas em plantas doentes foi durante longo tempo, realizada através de microscopia eletrônica, por métodos sorológicos e pela produção de sondas específicas ao DNA de alguns grupos de fitoplasmas (Fos *et al.*, 1992; Davis & Lee, 1993; Lee *et al.*, 1998; Firrao *et al.*, 2007; Bertaccini, 2007).

A diagnose de doenças causadas por fitoplasmas foi, durante muito tempo, dificultada pela impossibilidade de isolá-los em meios de cultura. Assim, a identificação de fitoplasmas se iniciou em anos mais recentes através de métodos sorológicos e pela produção de sondas específicas ao DNA de alguns grupos de fitoplasmas (Fos *et al.*, 1992; Davis & Lee, 1993; Lee *et al.*, 1998; Firrao *et al.*, 2007; Bertaccini, 2007).

A detecção e identificação molecular têm avançado, grandemente, nas últimas décadas, com o desenvolvimento e aplicação de testes moleculares, tais como hibridização dos ácidos nucléicos, PCR, *nested* PCR e RFLP, utilizando-se a região conservada do gene ribossomal 16S rDNA dos fitoplasmas (Lee *et al.*, 1991; Deng & Hiruki, 1991; Lee *et al.*, 1992b; Lee *et al.*, 1992c). O PCR- *real-time* (PCR em tempo real) é uma técnica mais eficiente do que o PCR, pois aliado à alta sensibilidade do teste e, a leitura direta dos resultados, o que reduz os riscos de contaminação das amostras, dispensa a realização de eletroforese. A detecção de fitoplasma

empregando-se o PCR- *real-time* é mais rápida e mais sensível, do que outros testes moleculares para a identificação e, quantificação de fitoplasmas (Bertacini, 1990; Schaad & Frederick, 2002; Torres *et al.*, 2005; Firrao *et al.*, 2007; Hren *et al.*, 2007).

O DNA para detecção e identificação de fitoplasmas é extraído, de amostras infectadas, principalmente a partir dos tecidos foliares. Nesse tipo de tecido o título dos fitoplasmas é maior, mas nunca excede a 1% do DNA extraído. Vários protocolos foram desenvolvidos, e usualmente os protocolos de extração empregando clorofórmio/fenol, seguido da precipitação do DNA com isopropanol, dão resultados muito bons para a maioria dos tecidos das diferentes espécies de plantas (Bertaccini, 2007; Boben, 2007).

O PCR é o método mais utilizado para detecção de fitoplasmas. Atualmente, nesse teste são utilizados *primers* universais e específicos de fitoplasmas, de regiões dos genes 16S rDNA, da região espaçadora 16S-23S e, 23S rDNA. Em muitos casos, contudo, é necessário o emprego de *nested* PCR, devido às baixas concentrações de fitoplasmas nas plantas e nos vetores (Gundersen & Lee, 1996; Marzachi *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007).

Comparações de seqüências do 16S rDNA de fitoplasmas e de seqüências de outros procariontes permitiram verificar a diversidade de fitoplasmas e analisar suas relações filogenéticas com outros procariontes, determinando-se que os fitoplasmas constituem um único grupo monofilético dos *Mollicutes*. Essas inter-relações filogenéticas permitiram estabelecer um esquema de classificação para os fitoplasmas (Gundersen *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1993b; Lee *et al.*, 1998).

A classificação e caracterização dos fitoplasmas está baseada principalmente na região conservada do gene 16S rDNA. O esquema de classificação proposto por Lee *et al.* (1993, 1998) é aceito e adotado mundialmente. Empregando-se a técnica de RFLP, nesse esquema os fitoplasmas estão classificados em 18 grupos (16Sr I a XVIII) e mais de 50 subgrupos (Lee *et al.* 2007).

A caracterização molecular por RFLP tem se mostrado extremamente útil e eficiente na identificação de fitoplasmas, permitindo a classificação dos mesmos em grupos reconhecidos internacionalmente. Nesse contexto, a biotecnologia tem sido uma importante ferramenta para a detecção e identificação molecular de fitoplasmas e tem contribuído de modo prático e confiável para a diagnose de inúmeras doenças associadas a esses fitopatógenos.

O teste de RFLP para a análise dos fragmentos de restrição do 16S rRNA de fitoplasma, amplificado por PCR, e submetido a digestão com enzimas de restrição, é o método para diferenciação e caracterização de fitoplasmas (Namba *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1993; Marcone *et al.*, 1996; Jomantiene *et al.*, 1998a; Jomantiene *et al.*, 1998b. Botti & Bertaccini, 2003). No entanto, há seqüências de genes ou outras regiões do DNA de fitoplasmas, além do 16S rRNA, que podem ser utilizadas para a classificação desses patógenos como a região espaçadora intergênica 16S-23S, o gene da proteína ribossomal (rp), e o gene do fator de alongamento EF-Tu (*tuf*) (Boudon-Padieu *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2007).

Recentemente Wei *et al.*, (2007) desenvolveram uma outra metodologia de análise em computador, mediante a simulação de digestões da seqüência do 16S *in silico*. Com essa técnica foi possível a identificação de 28 grupos 16Sr, assim como um maior número de subgrupos.

Todos esses testes moleculares são empregados na detecção e identificação de fitoplasmas e, são complementados com estudos epidemiológicos das doenças associadas à presença desses organismos (Lee *et al.*, 1998; Firrao *et al.*, 2007).

De acordo com as recomendações do Comitê Internacional de Bacteriologia Sistemática, subcomitê de Taxonomia de *Mollicutes*, novas espécies *Candidatus* podem ser descritas quando a seqüência do gene 16S rDNA (maior de 1200 pb) apresentar identidade inferior a 97.5%, com qualquer espécie *Candidatus*, já descrita. Da mesma forma, dois fitoplasmas que compartilham mais de 97.5% da seqüência do 16S podem ser designados como espécies *Candidatus* separadas, quando reúnem os seguintes critérios: (a) são transmitidos por diferentes vetores; (b) têm diferentes plantas hospedeiras naturais; e (c) há evidência da diversidade molecular entre os dois fitoplasmas (IRPCM, 2004; Bertaccini, 2007).

Com base na análise de seqüência do gene 16S-rRNA, demonstrou-se que os fitoplasmas representam um grupo distinto, para o qual se propôs a classificação no gênero “Phytoplasma”, que atualmente apresenta 30 espécies *Candidatus* diferentes (International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes, 1997; Lee *et al.*, 2000; Montano *et al.*, 2001b; IRPCM, 2004; Arocha *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2005). Entre algumas das *taxas* descritas temos ‘*Candidatus* (Ca.) *Phytoplasma aurantifolia*’ (Zreik *et al.*, 1995), ‘*Candidatus* *Phytoplasma australiense*’ (Davis *et al.*, 1997), ‘*Candidatus* *Phytoplasma australasia*’ (White *et al.*, 1998), ‘*Candidatus* *Phytoplasma fraxini*’ (Griffiths *et al.*, 1999), ‘*Candidatus* *Phytoplasma japonicum*’ (Sawayanagi *et al.*, 1999), ‘*Candidatus* *Phytoplasma brasiliense*’

(Montano *et al.*, 2001b), ‘*Candidatus* Phytoplasma castaneae’ (Jung *et al.*, 2002), ‘*Candidatus* Phytoplasma phoenicium’ (Verdin *et al.*, 2003), ‘*Candidatus* Phytoplasma ziziphi’ (Jung *et al.*, 2003a), ‘*Candidatus* Phytoplasma oryzae’ (Jung *et al.*, 2003b), ‘*Candidatus* Phytoplasma ulmi’ (Lee *et al.*, 2004), ‘*Candidatus* Phytoplasma pini’ (Schneider *et al.*, 2005), ‘*Candidatus* Phytoplasma cynodontis’ (Marcone *et al.*, 2004), ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’ (Lee *et al.*, 2004), ‘*Candidatus* Phytoplasma trifolii’ (Hiruki & Wang, 2004), ‘*Candidatus* Phytoplasma lycopersici’ (Arocha *et al.*, 2007), ‘*Candidatus* Phytoplasma graminis’ e ‘*Candidatus* Phytoplasma caricae’ (Arocha *et al.*, 2005).

Atualmente, o controle de fitoplasmas baseia-se, quando possível, no plantio de plantas livres de fitoplasmas, na remoção de focos de infecção, no controle de vetores, e no uso de variedades tolerantes. A remoção de fontes de inóculo é eficiente no caso de fitoplasmas disseminados por vetores monófagos, sendo dificultada quando existem plantas hospedeiras silvestres infectadas (reservatórios) visitadas por vetores polífagos e, quando esses reservatórios são desconhecidos. Há mais facilidade em se controlar insetos monófagos, reproduzidos nas culturas principais, do que os insetos que completam seus ciclos em plantas silvestres (Fos *et al.*, 1992; Garnier, 2001).

Os métodos de controle tradicional dos vetores de fitoplasmas são insuficientes para o controle das doenças causadas por esses patógenos (Weintraub & Beanland, 2006). Por outro lado o uso convencional de inseticidas no controle dos insetos vetores não impede o surgimento da doença, pois, a transmissão do patógeno pode ocorrer antes da aplicação de produtos químicos. Além disso, as aplicações de inseticidas reduzem as populações dos insetos apenas dentro da mesma cultura (Weintraub, 2007).

O desenvolvimento de variedades resistentes consiste em estratégia eficiente para o controle de doenças incitadas por fitoplasmas, mas variações na suscetibilidade dos cultivares têm sido relatadas e, poucos casos de resistência a fitoplasmas foram documentados. O uso de variedades resistentes teve sucesso para o controle do ‘amarelecimento letal do coqueiro’, na Flórida (Harries, 2001; Lee *et al.*, 2000; Been, 1995).

No futuro, os métodos de controle a serem adotados envolvem modificação genética de plantas, seja para prevenir a replicação do fitoplasma na planta como para prevenir/reduzir a alimentação dos vetores na planta (Weintraub, 2007).

No Brasil, fitoplasmas estão associados a diversas espécies vegetais cultivadas, daninhas ou silvestres. Dentre as espécies cultivadas, podem-se mencionar diversas doenças em hortaliças, em frutíferas, em cereais e em ornamentais, causadas por fitoplasmas, algumas das quais podem causar perdas nas culturas. Pesquisas desenvolvidas no Brasil revelam a presença desses organismos associados a enfermidades como ‘superbrotamento’ e ‘virescência’ de vinca e, ‘enfazamento da pimenteira’ (Bedendo *et al.*, 1999); ‘superbrotamento do maracujazeiro’ (Kitajima *et al.*, 1986; Bedendo, 2000, Ribeiro, 2008), ‘superbrotamento do chuchuzeiro’ (Kitajima *et al.*, 1981; Kitajima *et al.*, 1999; Montano, 2000; Montano *et al.*, 2000b), ‘enfazamento vermelho do milho’ (Bianchini, 2001), ‘enfazamento do tomateiro’ e ‘enfazamento da berinjela’ (Mello, 2003), ‘lenho mole da maçã’ (Ribeiro, 2003), ‘amarelo da videira’ (Neroni, 2004), ‘amarelecimento fatal do dendezeiro’ (Brioso *et al.*, 2003), ‘superbrotamento de *Hibiscus*’ (Montano *et al.*, 2001b), ‘superbrotamento da bucha’ (Montano *et al.*, 2007c), ‘superbrotamento da begônia’ (Ribeiro *et al.*, 2006), ‘envassouramento do ipê rosa’ (Pimentel *et al.*, 2007), ‘superbrotamento da fava d’anta’ (Montano *et al.*, 2007d), ‘witches’ broom da *Sicana odorifera* (Montano *et al.*, 2007b) dentre outras.

Dentre das enfermidades de importância econômica associadas a fitoplasmas encontra-se o ‘superbrotamento do chuchuzeiro’. O chuchu (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.), (*Cucurbitaceae*), é originário da América Central e produzido comercialmente no Brasil, na Costa Rica, na Itália, no México, em Porto Rico e no norte da Índia. Os frutos são nutritivos, com alto conteúdo de fibra e fonte de vitaminas e minerais. É uma hortaliça-fruto e, o meio mais comum e eficiente de propagação são utilizando-se o fruto-semente. O método de semeadura consiste na plantação de um ou mais frutos inteiros após a germinação da semente (Makishima, 1991; Lira, 1996).

O ‘superbrotamento do chuchuzeiro’, fitomoléstia também conhecida como ‘envassouramento’ ou ‘irizado do chuchuzeiro’ é uma enfermidade de natureza fitoplasmática, endêmico no Estado do Rio de Janeiro, que ocasiona redução da produtividade e da qualidade de frutos. A enfermidade também foi relatada nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Espírito Santo e Pernambuco (Costa *et al.*, 1993; Kitajima, 1994).

A investigação das características moleculares do fitoplasma associado ao ‘superbrotamento do chuchuzeiro’ demonstra que esse patógeno está afiliado ao grupo 16SrIII. Estudos mais avançados permitiram identificar e caracterizar o fitoplasma como um novo *taxon*, ‘chayote witches’ broom phytoplasma’ (ChWBIII), inserido no novo subgrupo 16SrIII-J, através

da análise de RFLP e da seqüência de nucleotídeos do 16S rDNA do fitoplasma (Montano *et al.*, 2000 b).

Estudos complementares, através da adoção de PCR e *nested* PCR, demonstraram a presença de fitoplasma do grupo 16SrIII em secções de chuchu-semente. Esse resultado representa um grande progresso ao entendimento da epidemiologia do ‘superbrotamento do chuchuzeiro’, por veicular um novo componente de importância na disseminação do fitoplasma associado à enfermidade (Montano *et al.*, 2001a).

O controle efetivo do ‘superbrotamento do chuchuzeiro’ depende da aquisição de informações que contribuam ao melhor conhecimento epidemiológico da enfermidade. A investigação da existência de outras espécies hospedeiras do fitoplasma, dos fatores climáticos e culturais que afetam o desenvolvimento da doença, mas, sobretudo, a identificação de espécies de cigarrinhas vetores do fitoplasma é fundamental ao controle e à erradicação do agente causal da enfermidade.

Nas condições do Brasil, o conhecimento epidemiológico das doenças atribuídas a fitoplasmas é quase inexistente, e há pouca informação a respeito dos insetos vetores e de plantas hospedeiras alternativas naturais desses fitopatógenos, o que se traduz num sério entrave ao controle das enfermidades. A utilização de técnicas moleculares na investigação de doenças associadas à fitoplasmas é de grande importância para futuros estudos taxonômicos, pois dada à diversidade de espécies botânicas cultivadas e silvestres, e em razão do clima dominante, é possível a existência de novas *taxa* de fitoplasmas no Brasil (Kitajima, 1994; Davis, 1995; Montano, 2000b).

Com a finalidade de reunir informações de natureza epidemiológica, sobre enfermidades associadas à fitoplasmas, em espécies de interesse econômico no Brasil e, que permitam auxiliar no estabelecimento de medidas de controle efetivo o presente trabalho teve como objetivo principal:

Estudar a transmissibilidade do fitoplasma do ‘superbrotamento do chuchuzeiro’ ChWBIII e a variabilidade de fitoplasmas associados a outras espécies botânicas.

Os objetivos específicos do trabalho consistiram em:

1. Avaliar métodos de transmissão do fitoplasma ChWBIII de plantas sintomáticas para *Catharanthus roseus* sadios, mediante ponte de *Cuscuta* sp. e enxertia.
2. Estudar a sintomatologia exibida por *C. roseus* infectado com o fitoplasma ChWBIII.

3. Avaliar duas diferentes estratégias de desidratação de tecido vegetal para a detecção de fitoplasmas.
4. Demonstrar a transmissão do fitoplasma ChWBIII para sementes de *Momordica charantia*.
5. Verificar a variabilidade dos fitoplasmas associados a outras espécies vegetais.

CAPÍTULO I

**TRANSMISSÃO DO FITOPLASMA ChWBIII ASSOCIADO A *Momordica charantia* L. POR *Cuscuta* sp. E ENXERTIA PARA *Catharanthus roseus* G.
Don.**

RESUMO

JIMÉNEZ, Nilda Zulema Albornoz. **Transmissão do fitoplasma ChWBIII associado a *Momordica charantia* L. por *Cuscuta* sp. e enxertia para *Catharanthus roseus* G. Don.** 2008. 95p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia. Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Fitoplasmas são procariotos sem parede celular associados com inúmeras enfermidades de espécies de plantas no mundo. Esses patógenos na natureza são transmitidos por insetos que se alimentam do floema das plantas. Como os fitoplasmas não podem ser isolados *in vitro* empregam-se técnicas moleculares para sua diagnose e caracterização. No Brasil, o ‘superbrotamento do chuchuzeiro’ é uma doença associada ao fitoplasma ChWBIII, que pode causar redução da qualidade de frutos de chuchu. O ChWBIII tem outras espécies hospedeiras naturais, da família *Cucurbitaceae*, sendo a principal dessas, melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia*). O presente trabalho teve como objetivo determinar a transmissibilidade do ChWBIII por métodos experimentais para vinca (*Catharanthus roseus*) e estudar a sintomatologia exibida por essa espécie hospedeira experimental. A patogenicidade e a transmissibilidade do ChWBIII, mediante *Cuscuta* e enxertia, foi verificada pela sintomatologia em *C. roseus* e por PCR usando *primers* universais específicos para o 16S rDNA de fitoplasmas. Posteriormente, a identidade do ChWBIII em plantas doadoras de melão-de-São-Caetano, em *Cuscuta* e em *C. roseus* foi confirmada por análise de seqüências. No presente trabalho determinou-se: (a) a transmissibilidade de ChWBIII para a hospedeira experimental *C. roseus*, sendo possível realizar a transmissão inversa do fitoplasma por *Cuscuta* e, também mediante enxertia; e (b) a sintomatologia do fitoplasma ChWBIII exibida em *C. roseus*, hospedeira experimental de fitoplasmas. Os resultados obtidos na presente pesquisa possibilitam o maior entendimento epidemiológico da enfermidade incitada por o fitoplasma ChWBIII.

Palavras-chave: *Mollicutes*. Testes biológicos. PCR.

ABSTRACT

JIMÉNEZ, Nilda Zulema Albornoz. **Dodder and grafting transmission of ChWBIII phytoplasma associated with *Momordica charantia* L. to *Catharanthus roseus* G. Don.** 2008. 95p. Dissertation (Master of Science in Phytosanitary and Applied Biotechnology). Instituto de Biologia. Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Phytoplasmas are wall-less prokaryotes associated with diseases in numerous plant species worldwide. In nature they are transmitted by phloem-sucking insects. Since phytoplasmas cannot be cultured *in vitro*, molecular techniques are needed for their diagnosis and characterization. In Brazil, chayote witches' broom is a disease associated with ChWBIII phytoplasma, which can reduce the quality of chayote fruits. ChWBIII has other natural plant hosts, in the family *Cucurbitaceae*, and bitter melon (*Momordica charantia*) is the major alternative host. The present work aimed at (a) determine the transmissibility of ChWBIII to periwinkle (*Catharanthus roseus*), through experimental methods and study the symptomatology exhibited by this experimental host. Pathogenicity and transmissibility of ChWBIII through dodder and grafting was verified by the symptomatology developed in *C. roseus*, and by PCR with universal primer pairs specific to phytoplasmas 16S rDNA. Afterwards, the identity of ChWBIII in donor plants of bitter melon, in dodder and in *C. roseus* was confirmed by sequences analyses. The present work enabled to determine: (a) the transmissibility of ChWBIII to the experimental host *C. roseus* by inverse transmission through dodder, as well as by graft transmission; and (b) the symptomatology by *C. roseus* infected with ChWBIII phytoplasma. The results obtained in the present study lead to a better epidemiological understanding of the disease caused by ChWBIII phytoplasma.

Keywords: *Mollicutes*. Biological tests. PCR.

2.1 Introdução

Fitoplasmas são fitopatógenos obrigatórios que causam grandes perdas em diversas culturas de valor econômico no mundo (Lee *et al.*, 2000; Bertaccini, 2007), e são disseminados na natureza por insetos vetores. (Hogenhout *et al.*, 2008).

Apesar de não serem isolados em meio de cultura, a natureza infecciosa das doenças causadas por fitoplasmas pode ser demonstrada através de testes biológicos, envolvendo a transmissão por *Cuscuta*, enxertia ou insetos vetores.

Catharanthus roseus (L.) G. Don, conhecida popularmente como vinca, é adotada como planta hospedeira universal e experimental de fitoplasmas, nos testes biológicos de transmissão por *Cuscuta* sp., assim como por enxertia (Mc Coy *et al.*, 1989).

A *Cuscuta* sp (*Convolvulaceae*) é uma planta angiosperma de hábito parasitário. É uma planta trepadeira volúvel, com caule herbáceo, filiforme, muito ramificado. Suas folhas são reduzidas a pequenas escamas, imperceptíveis e com pouca clorofila ou desprovido desta e, portanto sem atividade fotossintética dependendo do hospedeiro para sobreviver. Esta planta, através das suas ramificações filamentosas e tênues, penetra no sistema vascular do hospedeiro do qual retiram nutrientes, mediante a formação de haustórios. Esta característica tem sido explorada experimentalmente, pois o estabelecimento desta parasita em uma planta infectada e, posteriormente, em outra planta sadia faz com que seus filamentos formem verdadeiras pontes biológicas, que possibilitam a passagem dos patógenos de uma planta para outra (Bergamin, 1995; Christensen *et al.*, 2003; Vaughn, 2003).

Muitos fitoplasmas podem ser transmitidos por *Cuscuta* às plantas de *C. roseus* em testes biológicos. As células do fitoplasma que estão presentes no floema da planta infectada penetram na *Cuscuta* através dos haustórios, e passam ao floema das plantas receptoras, completando-se a transmissão. Resultados positivos da transmissão de fitoplasmas mediante *Cuscuta* foram relatados por vários pesquisadores como Carraro *et al.* (1992, 1991 e 1988), Credi *et al.* (1992), Loi *et al.* (1995), Marcone *et al.* (1999) e Kaminska & Korbin (1999).

A transmissão biológica mediante *Cuscuta* muitas vezes é dificultada pela incompatibilidade entre esta planta e a planta hospedeira infectada, a qual não permite a formação dos haustórios para o estabelecimento das pontes biológicas, como no caso de *Euphorbia pulcherrima* (Christensen *et al.*, 2003). Ao testarem a transmissão do fitoplasma de Bermuda-

grass (monocotiledônea) por intermédio desta planta parasita a *C. roseus* (eudicotiledônea), Sarindu & Clark (1993) não obtiveram êxito.

A indexação biológica é outra alternativa na transmissão de fitoplasmas de plantas infectadas a plantas sadias e, a manifestação dos sintomas é mais rápida em comparação com os resultados obtidos na transmissão por *Cuscuta*. Técnicas de enxertia adequadas aos diferentes grupos de plantas monocotiledôneas e/ou eudicotiledôneas (lenhosas ou herbáceas) devem ser testadas e selecionadas. Muitas vezes a indexação para a transmissão de um patógeno é realizada em plantas da mesma espécie e, em outros casos em plantas de diferentes espécies.

Assim, em 2004, Wongkaew & Fletcher conseguiram a transmissão do fitoplasma do ‘sugarcane white leaf’ (SCWL), mediante enxertia, de cana-de-açúcar a cana-de-açúcar (monocotiledônea a monocotiledônea) e, de cana-de-açúcar a *C. roseus* (monocotiledônea a eudicotiledônea). Aldaghi *et al.* (2007) obtiveram resultados positivos para a transmissão do fitoplasma ‘apple proliferation’ da maçã, empregando enxertia de garfagem e borbúlia entre plantas da mesma espécie (lenhosas). Além disso, determinaram que a enxertia por garfagem foi a melhor técnica para a transmissão desse fitoplasma, de *C. roseus* para *C. roseus*. As indexações realizadas foram influenciadas pela idade das plantas e pelas condições climáticas.

No Brasil as doenças de importância econômica causadas por fitoplasmas em cultivos alimentícios são o ‘superbrotamento do chuchuzeiro’, o ‘superbrotamento do maracujazeiro’ e o ‘enfazamento vermelho do milho’ (Kitajima, 1994). Em plantas ornamentais o ‘superbrotamento do *Hibiscus*’ e ‘superbrotamento de begonia’ podem causar perdas (Montano *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2006).

O chuchu (*Sechium edule*) é uma das culturas de importância econômica nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Pernambuco, Minas Gerais e Paraná. Essa cultura é afetada pelo ‘superbrotamento’ ou ‘irizado’ do chuchuzeiro, doença que ocasiona redução da produtividade e da qualidade dos frutos do chuchu. Os sintomas manifestados nas plantas infectadas consistem em superbrotamento, clorose, deformação foliar, queda e má formação de frutos (Kitajima, 1994; Montano *et al.*, 2000b). Estudos posteriores determinaram que estirpes de fitoplasma do grupo 16SrIII (grupo do ‘X-disease’) encontrados em *S. edule* pertenciam a um novo subgrupo, designado como subgrupo III-J, sendo o fitoplasma denominado ChWBIII (Montano *et al.*, 2000b). O mesmo fitoplasma (grupo 16SrIII, subgrupo J) foi relatado em plantas de abóbora

(*Cucurbita moschata*) com sintomas de clorose nos brotos e folhas, folhas de tamanho reduzido e má formação de frutos (Montano *et al.*, 2006).

O melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.), da família *Cucurbitaceae*, é uma espécie trepadeira, monóica, de valor ornamental, alimentar e medicinal. No Brasil, o tipo selvagem é uma planta daninha bastante freqüente em pomares, hortas, cafezais, cercas, alambrados e terrenos baldios (Lorenzi, 2000).

Esta espécie botânica é hospedeira natural do fitoplasma ChWBIII, agente causal do ‘superbrotamento do chuchuzeiro’ e, plantas doentes de melão-de-São-Caetano consistem em fonte de inóculo para possível disseminação por insetos vetores, quando nas proximidades de cultivos comerciais de cucurbitáceas (Montano *et al.*, 2000b; Montano *et al.*, 2001b).

A sintomatologia do ‘superbrotamento do melão-de-São-Caetano’, induzida pelo ChWBIII consiste em clorose acentuada, proliferação de ramos ou superbrotamento, encurtamento de entre-nós, folhas e flores de tamanho reduzido e enfezamento das plantas (Kitajima, 1994; Montano *et al.*, 2000b; Ribeiro *et al.*, 2004).

Considerando a relevância do fitoplasma ChWBIII como agente causal de doenças em cucurbitáceas e, sendo melão-de-São-Caetano a hospedeira natural desse fitoplasma, objetivou-se, com a presente pesquisa:

1. Determinar a transmissibilidade do ChWBIII por *Cuscuta* e enxertia a *C. roseus*, hospedeira experimental de fitoplasmas.
2. Estudar a sintomatologia exibida em *C. roseus*, após a transmissão por *Cuscuta* e enxertia.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Plantas hospedeiras do fitoplasma ChWBIII

Plantas de melão-de-São-Caetano (*M. charantia*) naturalmente infectadas, mostrando os sintomas característicos do fitoplasma ChWBIII, no município de Seropédica, Estado de Rio de Janeiro, foram utilizadas como plantas doadoras do fitoplasma, na transmissão desse patógeno.

2.2.2 Transmissão experimental por *Cuscuta* sp.

Cuscuta sp. parasitando naturalmente plantas de pingo-de-ouro (*Duranta repens*) foi coletada e testada para a ausência de fitoplasmas, com testes de PCR. A *Cuscuta* foi, então,

multiplicada em plantas sadias de *C. roseus*, provenientes de sementes e, mantidas em condição de casa-de-vegetação. Essas plantas parasitas foram utilizadas no teste de transmissão do ChWBIII.

Seis plantas de *C. roseus* (receptoras) de três meses de idade, provenientes de sementes receberam hastes de *Cuscuta* (duas por planta) de 15 cm de comprimento. Aos 8 dias da colocação das hastes conseguiu-se a fixação dessas, que logo foram conduzidas e tutoradas para plantas de melão-de-São-Caetano (doadoras) naturalmente infectadas com ChWBIII, a fim de estabelecer as pontes biológicas. Esse tipo de ensaio caracteriza a transmissão inversa de fitoplasma, visto que a *Cuscuta* se estabeleceu primeiro nas plantas receptoras sadias (Carraro *et al.*, 1991). As pontes se mantiveram por 40 dias, havendo em seguida a interrupção das mesmas. As plantas de *C. roseus* foram transplantadas a vasos maiores com solo esterilizado e adubado e, submetidas periodicamente a aplicações de fungicidas e inseticidas. As plantas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação e monitoradas quanto ao surgimento dos sintomas da doença.

Ao término da transmissão experimental, amostras de *Cuscuta* foram submetidas a teste de PCR para detecção do fitoplasma.

2.2.3 Transmissão experimental por enxertia

Para confirmar a associação do agente infeccioso (fitoplasma) nas plantas de *C. roseus* utilizadas no teste de transmissão do ChWBIII, por *Cuscuta*, procedeu-se ao teste de transmissão por enxertia, utilizando-se *C. roseus* provenientes de sementes e mantidas em condições de casa-de-vegetação. Realizaram-se dois ensaios, mediante a técnica de garfagem.

No primeiro ensaio, utilizaram-se 20 plantas de dois meses e meio de idade, as quais foram enxertadas com fragmentos de caule de 6 cm de comprimento, retirados da parte apical de *C. roseus* infectada com fitoplasma ChWBIII, a partir da transmissão por *Cuscuta*. A região do enxerto foi coberta com saco plástico, objetivando-se a formação de câmara úmida para evitar a desidratação dos tecidos.

O segundo ensaio foi conduzido com 20 plantas de *C. roseus* de um mês de idade seguindo a metodologia descrita anteriormente.

Em cada ensaio utilizaram-se duas plantas como testemunhas (controles negativos), que foram enxertadas com garfos apicais provenientes de *C. roseus* sadio.

As plantas enxertadas foram monitoradas quanto ao surgimento dos sintomas da doença. As plantas dos dois ensaios foram testadas quanto à presença de fitoplasmas com base na sintomatologia e através de PCR.

2.2.4 Extração de ácido nucléico total de material vegetal

Tomaram-se amostras das plantas de *C. roseus* com sintomas de ChWBIII, provenientes dos testes de transmissão experimental por *Cuscuta* e por enxertia, e dos controles negativos. As amostras sintomáticas consistiram de ramos terminais, apresentando folhas pequenas e cloróticas. A extração de ácido nucléico total das amostras de tecido vegetal se realizou segundo o protocolo de Montano *et al.* (2000 b).

Um grama de tecido foliar de plantas infectadas foi macerado na presença de nitrogênio líquido e homogeneizado em 4 ml de tampão de maceração (100 mM K_2HPO_4 ; 31 mM KH_2PO_4 ; 10 % sacarose; 2 % PVP-40; 10 mM EDTA, pH 8). A solução foi filtrada com gaze e submetida à centrifugação a 2500 x g, por 5 minutos e, após a recuperação do sobrenadante, novamente centrifugada a 15000 x g, por 30 minutos, para formação do ‘pellet’. Os ácidos nucléicos foram extraídos a partir dos ‘pellets’ com 750 μ l de tampão de extração (2 % (p/v) ‘hexadecyltrimethyl ammonium bromide’ [CTAB], 100 mM Tris-HCl, pH 8; 20 mM EDTA, pH 8; 1,4 M NaCl; 2 % PVP-40), previamente aquecido a 60 °C, seguido de incubação a 60 °C, por 30 minutos. As amostras foram extraídas com 750 μ l da mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e centrifugadas a 15000 x g, por 5 minutos. A fase aquosa superior foi coletada e os ácidos nucléicos precipitados ‘overnight’ pela adição de 0,6 volume de isopropanol frio, a - 20 °C. Os ácidos nucléicos foram coletados mediante centrifugação de 15000 x g, por 30 minutos. O ‘pellet’ foi lavado com etanol 70 % frio, seco e ressuspenso em 200 μ l de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1mM EDTA, pH 8). Adicionou-se um volume igual da mistura fenol: clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). A amostra foi centrifugada a 15000 x g, por 30 minutos, ao final da qual se recuperou o sobrenadante, submetendo-o à extração com 1 volume de clorofórmio. A mistura sofreu centrifugação a 15000 x g, por 5 minutos, recuperando-se a fase aquosa. Os ácidos nucléicos foram precipitados mediante acréscimo de etanol absoluto frio, e posteriormente coletados por centrifugação a 15000 x g, por 30 minutos. O ‘pellet’ obtido foi lavado com etanol 70 % frio, seco e ressuspenso em 50 μ l de tampão TE e mantido a - 20 °C.

Os DNAs extraídos foram utilizados em reações de PCR, para amplificação de seqüências genômicas de fitoplasmas.

2.2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR) e *nested* PCR

Dois pares de oligonucleotídeos, P1/P7 (P1 = 5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3', e P7 = 5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3') (Deng & Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) e R16F2n/R2 (R16 F2n = 5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3', e R16 R2 = 5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3') (Gundersen & Lee, 1996), foram usados na amplificação das seqüências 16S rDNA (16S rRNA) de fitoplasma, em reações de *nested* PCR.

Amostras de DNA foram diluídas 1:10, utilizando-se como DNA molde uma alíquota correspondente a 1 µl. A reação foi efetuada em tubos de polipropileno de 0,2 ml, com um volume final de 25 µl, como descrito por Gundersen & Lee (1996). Os componentes da reação consistiram em dNTPs (concentração final de 200 µM), *primer sense* (concentração final de 0,4 µM), *primer anti-sense* (concentração final de 0,4 µM), tampão 10 X PCR e *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), na concentração final de 0,625 U. A reação de PCR foi realizada em termociclador programável, perfazendo um total de 35 ciclos nas seguintes condições: desnaturação 1 minuto (2 minutos no primeiro ciclo) a 94 °C, anelamento por 2 minutos a 55 °C, e extensão por 3 minutos (7 minutos no ciclo final) a 72 °C. Os controles negativos consistiram da mistura dos componentes da reação do PCR, desprovidos de DNA.

Produtos de PCR amplificados pelo par de oligonucleotídeos P1/P7 foram diluídos 1: 50 e utilizados como molde para a reação de *nested* PCR, usando-se o par de oligonucleotídeos R16F2n/R2, nas mesmas condições anteriormente descritas.

Os controles positivos nas reações de PCR e *nested* PCR consistiram na mistura de reação com DNA diluído de fitoplasma extraído de fava d'anta (*Dimorphandra gardneriana*). Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v), na presença de tampão de corrida TAE 1X, à voltagem constante de 65 volts, por 1,6 hora, à temperatura ambiente, adotando-se como padrão de tamanho molecular, o padrão 1 kb DNA "Ladder" (Invitrogen). Bandas de material amplificado foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.6 Seqüenciamento de DNA

Após os testes de transmissão do ChWBIII, de melão-de-São-Caetano para *C. roseus*, procedeu-se ao seqüenciamento do 16S rDNA dos fitoplasmas, obtido através de *nested* PCR.

O objetivo do seqüenciamento é a confirmação da identidade do fitoplasma nas amostras sintomáticas de *C. roseus* e, em *Cuscuta* sp. utilizada no teste biológico.

As amostras de DNA extraídas de plantas sintomáticas de *C. roseus* e, de *Cuscuta* sp. foram enviadas ao Molecular Plant Pathology Laboratory, Agricultural Research Service (ARS), United States Department of Agriculture (USDA), em Maryland.

Produtos oriundos de *nested* PCR com os *primers* PI/P7 e F2n/R2 (Gundersen & Lee, 1996) foram submetidos à limpeza com “Qiaquick PCR Purification Kit” (Qiagen, Valencia, CA).

Na reação de seqüenciamento utilizou-se “Perkin-Elmer/Applied biosystem’s AmpliTaq-FS DNA polymerase” e “big Dye terminators with Dntp” e, os seguintes pares de *primers*: R16F2n e R16R2 (Gundersen & Lee, 1996), e R16F4 (5’ – TGG TAG TCC ACG CCG TAA -3’) (Davis & Lee, 1993) e R16R4 (5’ –TTA CGG CGT GGA CTA CCA GGG -3’) (Gundersen *et al.*, 1994).

O sequenciamento do 16S rDNA de fitoplasmas foi realizado em seqüenciador automático, utilizando-se o “Applied Biosystems DNA sequencer” (modelo 3730), no “DNA Sequencing Facility”, localizado no “The Center for Biosystems Research, University of Maryland Biotechnology Institute, College Park, Maryland.

As seqüências obtidas foram comparadas entre si e com seqüências depositadas no *Gene Bank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), pelo alinhamento múltiplo, utilizando-se o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

2.3 Resultados

2.3.1 Transmissão por *Cuscuta* sp.

Plantas de *C. roseus* começaram a mostrar sintomas, passados 60 dias da interrupção das pontes biológicas. Os sintomas iniciaram-se nas folhas apicais dos ramos terminais das plantas. Basicamente, consistiam em clorose que, progressivamente, envolvia toda a folha, começando nas pontas e margens, com nervuras clareadas, alargadas, deformadas e proeminentes na região

próxima ao pecíolo foliar. Com o progresso da doença as folhas da parte apical mostravam um aspecto ondulado ou encarquilhado, e aquelas desenvolvidas depois da infecção eram menores, muito lanceoladas e deformadas. As plantas apresentavam proliferação de brotos e folhas na parte basal (Figura 1.E).



Figura 1. Ponte biológica com *Cuscuta* e sintomas do fitoplasma ChWBIII nas plantas receptoras de *C. roseus*, aos 60 dias da transmissão. **A:** Estabelecimento de *Cuscuta* em *C. roseus*. **B:** Ponte biológica da *Cuscuta* em *M. charantia*. **C:** Planta sadia de *C. roseus*. **D:** Sintomas iniciais de ChWBIII nas folhas apicais. **E:** Proliferação de brotos e folhas. **F:** Nervuras deformadas e clareadas, e flores de tamanho reduzido.

As primeiras flores que se desenvolveram depois da infecção eram pequenas, menos numerosas, e de cor pálida (Figura 1.F). As pétalas eram mais estreitas e pontudas, mas não se manifestaram casos de virescência nem filoidia. Observou-se uma redução drástica na formação das cápsulas e na quantidade de sementes. Com o avanço da infecção as plantas mostraram proliferação, witches' broom, encurtamentos dos entrenós, e enfezamento. Uma das características sintomatológicas surpreendentes é que nem todos os ramos da planta infectada

mostravam os sintomas e, inclusive alguns ramos assintomáticos continuavam formando flores normais (Figura 2.C).



Figura 2. Sintomas do fitoplasma do ChWBIII nas plantas receptoras de *C. roseus* após 175 dias da transmissão por *Cuscuta*. **A:** Envassouramento e clorose geral. **B:** Flores de tamanho reduzido sem presença de virescência ou filoidia. **C:** Planta receptora de ChWBIII exibindo ramo assintomático, com formação normal de flores. **D:** *C. roseus* receptor de ChWBIII mostrando declínio total e início da morte da planta.

Quatro plantas de *C. roseus* (receptoras) manifestaram sintomas iniciais da doença aos 60 dias da finalização das pontes biológicas e, amostras submetidas a análises de PCR e *nested* PCR três resultaram positivas quanto a presença do agente patogênico.

Aos 175 dias da transmissão observou-se envassouramento generalizado das plantas com clorose total das folhas e inibição da floração, e os tecidos floemáticos encontravam-se necrosados (dados não mostrados). A presença de fitoplasmas foi observada através do teste de PCR nas quatro plantas sintomáticas. Passados 200 dias da transmissão as plantas começaram a morrer (Figura 2.D).

Sementes das plantas de *C. roseus* infectadas com ChWBIII, após a transmissão por *Cuscuta*, quando testadas por PCR e *nested* PCR, com os primers universais, resultaram positivas.

Não se observaram sintomas da doença nas testemunhas, plantas de *C. roseus*. sadias (receptoras), as quais resultaram negativas quanto a presença de fitoplasmas nos testes de PCR e *nested* PCR.

As amostras de *Cuscuta* tomadas ao término das pontes biológicas resultaram positivas a presença do fitoplasma ChWBIII nos testes moleculares de *nested* PCR.

2.3.2 Transmissão por enxertia

Plantas sadias de *C. roseus* de dois meses e meio de idade que receberam enxerto de garfagem de *C. roseus* com ChWBIII, começaram a mostrar sintomas iniciais da doença em 15 dias depois da enxertia e, aos 21 dias, as vinte plantas mostraram os sintomas definidos da doença (Figura 3). Submetidas a testes de PCR doze plantas resultaram positivas, o que significa 60% de sucesso na transmissão mediante esse tipo de enxertia.



Figura 3. Sintomatologia da indexação biológica em *C. roseus* sadio de dois meses e médio de idade com *C. roseus* infectado com ChWBIII. **A:** planta com clorese após de 21 dias da enxertia. **B:** Formação de flores muito pequenas e ausência de formação das cápsulas e de sementes **C:** Deformação das folhas e nervuras foliares **D:** Superbrotamento, envassouramento e enfezamento da planta.

As plantas de *C. roseus* enxertadas com o fitoplama ChWBIII continuaram sendo monitoradas e, submetidas a testes de PCR aos 120 dias todas as plantas resultaram positivas a presença de fitoplasmas. Transcorridos 150 dias do enxerto as plantas começaram a morrer. As plantas sadias de *C. roseus* enxertadas com estacas sadias (testemunhas) não mostraram sintomas e resultaram negativas nos testes de PCR.

No segundo ensaio as vinte plantas de *C. roseus* de um mês de idade começaram a manifestar os sintomas da doença 7 dias depois da enxertia. Aos 12 dias da enxertia as plantas apresentaram sintomatologia definida e característica da doença (clorose, encurtamento dos entrenós e envassouramento geral das plântulas). Os sintomas foram mais severos nestas plantas, que apresentavam, inclusive, deformação das nervuras e do limbo foliar (Figura 4).

Algumas plantas com sintomas iniciais da infecção manifestaram remissão dos sintomas devido às altas temperaturas registradas na casa-de-vegetação, acima dos 38°C (dados não mostrados).



Figura 4. Indexação biológica do ChWBIII em plantas de *C. roseus* de um mês de idade. **A:** sintomas iniciais aos 7 dias da enxertia. **B:** Após 12 dias da enxertia, folhas cloróticas com as nervuras e o limbo foliar deformado. **C:** Formação de flores de tamanho reduzido. **D:** Sintomas severos da infecção por fitoplasmas, após de 30 dias da enxertia: encurtamento dos entrenós, envassouramento e deformação generalizada das folhas.

Segundo o avanço da infecção observou-se uma redução progressiva no tamanho de flores e de botões florais, e posteriormente ausência de flores, mas não apresentavam virescência nem filoidia.

Os sintomas observados nos dois ensaios de transmissão por enxertia foram os mesmos descritos anteriormente na transmissão do ChWBIII mediante *Cuscuta*. Porém, a agressividade do agente patogênico é mais evidente nas plantas mais jovens de *C. roseus*.

2.3.3 Amplificação do 16S rDNA de fitoplasma com PCR and *nested* PCR

A confirmação da presença do fitoplasma ChWBIII em *C. roseus*, após os testes de transmissão por *Cuscuta* e por enxertia, foi realizada com PCR e *nested* PCR.

Com relação à transmissão por *Cuscuta*, amostras de plantas sintomáticas de *C. roseus* (receptoras) apresentaram fragmentos amplificados de 1.2 kb, correspondente ao 16S rDNA de fitoplasmas. Três entre as quatro plantas de *C. roseus* sintomáticas resultaram positivas quanto a presença de fitoplasma (Figura 5). Novas extrações de DNA das quatro plantas sintomáticas foram realizadas, aos 175 dias da transmissão por *Cuscuta*, procedendo-se ao *nested* PCR, o qual revelou amplicons de 1.2 kb, para todas as quatro amostras testadas. Não foram observados produtos amplificados em amostras coletadas de *C. roseus* utilizadas como controle negativo.

Nested PCR a partir de amostras de *Cuscuta* utilizadas na formação da ponte biológica demonstrou a presença do fitoplasma ChWBIII nesta planta parasita, evidenciando a passagem de fitoplasma da planta doadora para a planta receptora (Figura 5).

Amostras das sementes das plantas receptoras sintomáticas de *C. roseus* amplificaram nos testes moleculares mediante *nested* PCR, evidenciando a transmissão dos fitoplasmas da planta mãe às sementes (Figura 5).

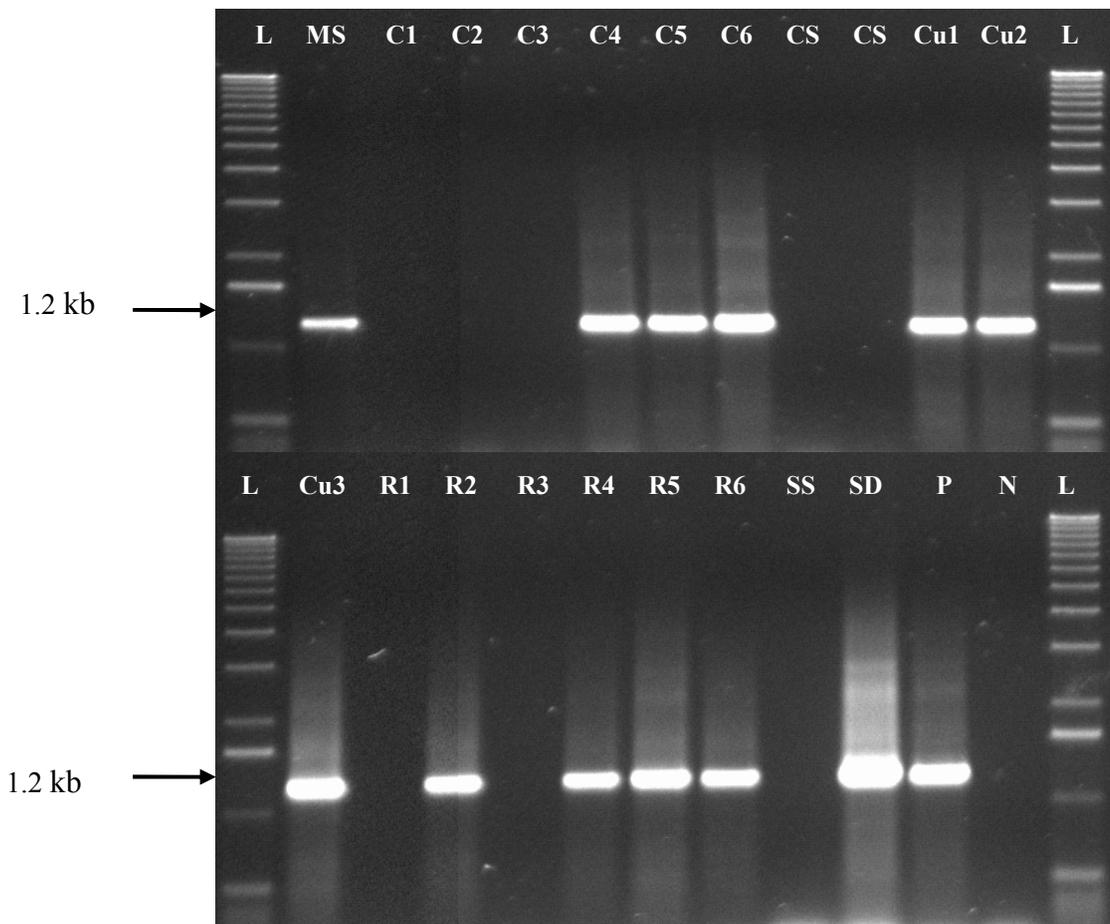


Figura 5. Amplificação do 16S rDNA do fitoplasma ChWBIII em amostras de *M. charantia*, de *Cuscuta*, de tecido foliar e de sementes de *C. roseus*, usando *nested* PCR com os *primers* PI/P7 e F2n/R2. **L:** 1 kb “ladder”. **MS:** *M. charantia*, planta doadora de ChWBIII. **C1-C6:** plantas receptoras de *C. roseus*, após 60 dias da transmissão biológica. **CS:** plantas saudias de *C. roseus* (controles). **Cu1-Cu3:** *Cuscuta* após a finalização das pontes biológicas. **R1-R6:** *C. roseus* após 175 dias da finalização da ponte biológica. **SS:** sementes de planta sadia de *C. roseus*. **SD:** sementes de planta sintomática receptora de *C. roseus*. **P:** controle positivo, DNA do fitoplasma de *Dimorphandra gardneriana*. **N:** controle negativo (mistura de reação desprovida de DNA).

Amostras de *C. roseus* sintomáticas provenientes do teste de transmissão por enxertia submetidas a *nested* PCR, confirmando a presença do mesmo fitoplasma (ChWBIII), em doze amostras (Figura 6).

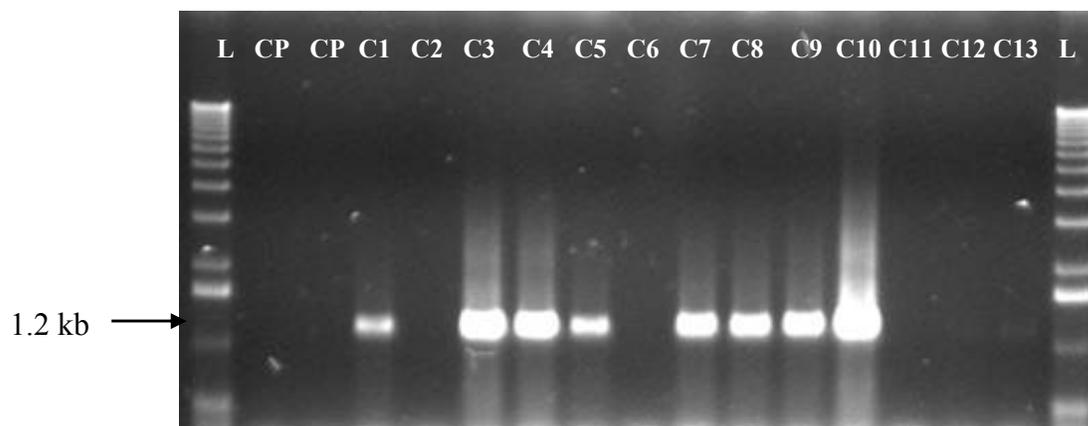


Figura 6. *Nested PCR* com *primers* P1/P7 e R16F2n/R2 da indexação biológica de *C. roseus* sadio com *C. roseus* infectado com o fitoplasma ChWBIII. **L:** 1 kb “ladder”. **CP:** *C. roseus* sadio. **C1-C13:** *C. roseus* após 21 dias da enxertia com *C. roseus* infectado.

2.3.4 Identificação de fitoplasma através da análise de seqüências de nucleotídeos

As seqüências obtidas no presente trabalho, com os *primers* adotados apresentam 1221 nucleotídeos. Essas seqüências foram comparadas entre si e com as seqüências ChWBIII estirpe Ch10 (AF47706) e ChWBIII, estirpe Mor 5 (AF47707), depositadas no *Gene Bank*. A porcentagem de similaridade entre as seqüências foi determinada, com alinhamento múltiplo (Tabela 1).

Tabela 1 - Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos do gene 16Sr DNA de fitoplasmas.

Estirpes	ChWBIII, Ch10 (AF47706)	ChWBIII, Mor 5 (AF47707)	<i>M. charantia</i> (presente trabalho)	<i>C. roseus</i> (presente trabalho)
ChWBIII, estirpe Ch10 (AF47706).	100	--	--	--
ChWBIII, estirpe Mor 5 (AF47707).	99	100	--	--
<i>M. charantia</i> (presente trabalho)	99	99	100	--
<i>C. roseus</i> (presente trabalho)	99	99	100	100

ChWBIII, estirpe Ch10(AF47706): fitoplasma ‘chayote witches’ broom’, estirpe isolada de chuchuzeiro com ‘superbrotamento do chuchuzeiro’.

ChWBIII, estirpe Mor 5 (AF47707): fitoplasma ‘chayote witches’ broom’, estirpe isolada de *Momordica charantia* com ‘superbrotamento de melão-de-São-Caetano’.

2.4 Discussão

O objetivo deste trabalho consistiu em comprovar se o fitoplasma ChWBIII associado ao ‘superbrotamento do chuchuzeiro’ e ao ‘superbrotamento do melão-de-São-Caetano’ poderia ser transmitido e incitar o desenvolvimento de sintomas em outra espécie de planta, ou seja *C. roseus*. Inoculação experimental através de *Cuscuta* e enxertia demonstraram, de forma evidente, que o fitoplasma ChWBIII causa doença em *C. roseus*.

A patogenicidade e a transmissão dos fitoplasmas a partir de plantas infectadas com o ChWBIII, mediante *Cuscuta* e enxertia, foi verificada pela sintomatologia em *C. roseus* e por PCR usando *primers* universais específicos para o 16S rDNA de fitoplasmas.

Os resultados alcançados no presente trabalho indicam que o fitoplasma ChWBIII foi transmitido, a partir de plantas infectadas de melão-de-São-Caetano, para *C. roseus*, mediante ponte de *Cuscuta*. A transmissão do fitoplasma foi observada através da sintomatologia desenvolvida nas plantas teste (receptoras). Posteriormente, a presença de fitoplasma foi confirmada por PCR e *nested* PCR e, pela análise da seqüência.

Graças ao seqüenciamento do DNA de fitoplasma isolado das plantas utilizadas nos testes de transmissão, pôde-se comprovar que o fitoplasma presente em plantas naturalmente infectadas de melão-de-São-Caetano apresenta 99% de semelhança com as estirpes Ch10 e Mor 5, do fitoplasma ChWBIII. Este porcentual de similaridade obtido demonstra que o fitoplasma em melão-de-São-Caetano, neste estudo, é o ChWBIII, pois porcentuais acima de 97,5% (IRPCM, 2004; Bertaccini, 2007) mostram tratar-se de um mesmo fitoplasma. A porcentagem de 100% de similaridade entre a seqüência de nucleotídeos do fitoplasma isolado de melão-de-São-Caetano e o de *C. roseus* revelou tratar-se do mesmo fitoplasma, e que este fitoplasma é o ChWBIII.

Sintomas exatamente iguais induzidos em todas as plantas de *C. roseus* que reagiram positivamente à infecção e, a presença contemporânea de fitoplasma nos tecidos (comprovado por PCR), assim como a transmissão positiva de fitoplasma por enxertia, de *C. roseus* para *C. roseus*, demonstra o êxito na transmissão do ChWBIII, a partir de melão-de-São-Caetano infectado.

Os dados obtidos demonstram que o fitoplasma ChWBIII, agente etiológico do ‘superbrotamento do chuchuzeiro’ e, também associado a *M. charantia*, causando o ‘superbrotamento do melão-de-São-Caetano’ pode ser transmitido por ponte de *Cuscuta*, através do teste de transmissão inversa para *C. roseus*, concordando com os resultados de Carraro *et al.*

(1991) com o fitoplasma da filoidia do trevo e, Loi *et al.* (1995) com o fitoplasma ‘leptonecrosis’ da ameixeira.

A distribuição irregular de fitoplasma nas plantas de *C. roseus* (receptoras) após a transmissão por *Cuscuta* foi observada pela presença de ramos de aspecto sadio e formação de flores de tamanho e coloração normal, concordando com os mesmos sintomas observados em melão-de-São-Caetano e *C. roseus*, naturalmente infectadas.

O sucesso obtido com a transmissão do fitoplasma ChWBIII, de *C. roseus* a *C. roseus*, utilizando a técnica de enxertia por garfagem encontra-se em consonância com os estudos realizados por Aldaghi *et al.* (2007), com o fitoplasma ‘apple proliferation’ da macieira.

A indexação biológica, utilizando *C. roseus* como hospedeira indicadora revelou resultados de diagnóstico mais precoce do que o *nested* PCR. Por exemplo, a infecção pelo fitoplasma ‘sugarcane white leaf’ em cana-de-açúcar ou em *C. roseus* enxertados foi inicialmente determinada por sintomatologia e, confirmada por PCR com *primers* universais para fitoplasmas, como também com *primers* específicos (Wongkaew & Fletcher, 2004).

Nos ensaios de transmissão por enxertia do ChWBIII, de *C. roseus* para *C. roseus*, os sintomas se desenvolveram mais prontamente nas plantas mais jovens, pois plantas de um mês de idade foram mais rapidamente colonizadas pelo patógeno, quando comparadas com plantas da mesma espécie, enxertadas aos dois meses e meio de idade.

Os testes de transmissão por enxertia são fundamentais para comprovar a patogenicidade de fitoplasmas, auxiliando os estudos de natureza etiológica e epidemiológica das enfermidades associadas. A transmissão por *Cuscuta* e por enxertia do fitoplasma ChWBIII para *C. roseus*, a partir de plantas doadoras consiste no ponto de partida para estudos mais detalhados, permitindo um melhor entendimento da etiologia real e da epidemiologia do ‘superbrotamento do chuchuzeiro’, no Brasil.

A disponibilidade de fitoplasmas na hospedeira experimental *C. roseus* oferece inúmeras vantagens, em particular para trabalhos em nível molecular. Por exemplo, essa planta é melhor fonte de DNA de fitoplasmas do que plantas lenhosas, pois a concentração desses organismos em *C. roseus* é mais alta, aliada à facilidade do isolamento de fitoplasma nessa espécie (Marcone *et al.*, 1999). No caso do fitoplasma ChWBIII, a transmissão desse organismo para *C. roseus* permite a manutenção do fitoplasma em condições controladas de casa-de-vegetação, facilitando

a realização de estudos experimentais, dada a facilidade de obtenção do DNA do patógeno, em qualquer época do ano.

Atualmente, no Brasil, não existem estudos de transmissibilidade experimental de fitoplasmas por *Cuscuta*, bem como a transmissão por enxertia utilizando a hospedeira experimental universal *C. roseus*. Ao que tudo indica, este é o primeiro trabalho envolvendo a transmissão de fitoplasma para *C. roseus* e, com resultados positivos.

2.5 Referências bibliográficas

BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 919 p.

CARRARO, L.; OSLER, R.; REFATTI, E.; FAVALI, M.A. Natural diffusion and experimental transmission of plum “leptoncrosis”. **Acta Horticulturae**, v.309, p.285-290, 1992.

CARRARO, L.; OSLER, R.; LOI, N.; FAVALI, M.A. Transmission characteristics of the clover phyllody agent by dodder. **Journal of Phytopathology**, v.133, p.15-22, 1991.

CARRARO, L.; OSLER, R.; REFATTI, E.; POGGI POLLINI, C. Transmission of the possible agent of apple proliferation to *Vinca rosea* by dodder. **Revista di Patologia Vegetale. S. IV**, Italia, v.24, p.43-52, 1988.

CREDI, R.; SANTUCCI, A. Dodder transmission of mycoplasma-like organisms (MLOs) from grapevines affected by a flavescence dorée-type disease to periwinkle. **Phytopathology Mediterranea**, Italia, v.31, p.154-162, 1992.

DAVIS, R.E.; LEE, I.-M. Cluster-Specific Polymerase Chain Reaction Amplification of 16S rDNA Sequences for Detection and Identification of Mycoplasma-like Organisms. **Phytopathology**, v.83, p.1008-1011, 1993.

GUNDERSEN, D.E. *et al.* Phylogeny of Mycoplasma-like Organisms (Phytoplasmas): a Basis for Their Classification. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.5244-5254, 1994.

KAMINSKA, M.; KORBIN, M. Graft and dodder transmission of phytoplasmas affecting lily to experimental hosts. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.21, n.1, p.21-26, 1999.

LOI, N.; CARRARO, L.; MUSETTI, R.; PERTOT, I.; OSLER, R. Dodder transmission of two different MLOs from plum trees affected by “leptoncrosis”. **Acta Horticulturae**, v.386, p.465-470, 1995.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 3ed. Brasil, Nova Odessa: Instituto Plantarum da Flora, 2000. 608p.

MARCONE, C.; HERGENHAHN, F.; RAGOZZINO, A.; SEEMÜLLER, E. Dodder Transmission of Pear Decline, European Stone Fruit Yellows, Rubus Stunt, Picris echioides Yellows and Cotton Phyllody Phytoplasmas to Periwinkle. **Journal of Phytopathology**, v.47, p.187-192, 1999.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T.; PIMENTEL, J.P.; FIGUEIREDO, D.V.; CUNHA Jr. J.O. *Cucurbita moschata*, new phytoplasma host in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v.88, n.2, p.226, 2006.

PAK, J.; PŘIBYLOVÁ, J.; KUBELKOVÁ, D.; PAKOVÁ, V. Transmission of phytoplasmas associated with full blossom disease in *Ribes rubrum*. **Acta Horticulturae**, v.780, p.67-70, 2008.

PASTORE, M.; PICCIRILLO, P.; TIAN, J.; SIMEONE, A.M.; PALTRINIERI, S.; BERTACCINI, A. Transmission by patch grafting of esfy phytoplasma to apricot (*Prunus armeniaca* L.) and japanese plum (*Prunus salicina* Lindl). **Acta Horticulturae**, v.550, p.339-344, 2001.

PEIL, R.M. A enxertia na produção de mudas de hortaliças. **Ciência Rural**, Santa Maria, Brasil, v.33, n.6, p.1169-1177, nov.-dez.2003.

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

CAPÍTULO II

DETECÇÃO DE FITOPLASMA EM TECIDO DESSECADO DE *Momordica charantia*, *Catharanthus roseus* E *Sechium edule*.

RESUMO

JIMÉNEZ, Nilda Zulema Albornoz. **Detecção de fitoplasma em tecido dessecado de *Momordica charantia*, *Catharanthus roseus* e *Sechium edule***. 2008. 95p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia. Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Fitoplasmas são procariotos floemáticos, sem parede celular, associados a enfermidades que podem ocasionar severas perdas na produção, em diversos cultivos de importância econômica, no mundo. Doenças associadas a fitoplasmas tem sido relatadas no Brasil, em espécies vegetais distribuídas em varias famílias botânicas. O superbrotamento do chuchuzeiro é considerado uma das principais enfermidades de natureza fitoplasmática e, melão-de-São-Caetano consiste em hospedeira alternativa natural do fitoplasma associado à doença. Vinca é uma planta ornamental, hospedeira natural de fitoplasmas, podendo atuar como reservatório desses patógenos. O presente trabalho objetivou detectar fitoplasma em tecido foliar dessecado, a partir de plantas naturalmente infectadas de chuchuzeiro, melão-de-São-Caetano e vinca. Através de amplificação, por PCR, do 16S rDNA de fitoplasma detectou-se a presença desse organismo em amostras dessecadas de chuchuzeiro e de melão-de-São-Caetano com superbrotamento, bem como de vinca apresentando clorose e folhas de tamanho reduzido. Os resultados obtidos demonstram o potencial da utilização de tecido vegetal dessecado na detecção de fitoplasmas associados a outras espécies botânicas, pois amostras de tecido seco apresentam facilidade de preservação e de transporte, além de fornecerem boa concentração de DNA.

Palavras-chave: *Mollicutes*. Desidratação. PCR.

ABSTRACT

JIMÉNEZ, Nilda Zulema Albornoz. **Detection of phytoplasma in desiccated tissue of *Momordica charantia*, *Catharanthus roseus* and *Sechium edule***. 2008. 95p. Dissertation (Master of Science in Phytosanity and Applied Biotechnology). Instituto de Biologia. Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Phytoplasmas are phloematic prokaryotes, lacking cell wall, associated with diseases, that can cause yield losses in several important crops worldwide. In Brazil, phytoplasma diseases have been reported in plant species, distributed among several botanical families. Chayote witches'-broom (ChWB) is reported as one of the diseases of economic importance, associated with phytoplasma in the country, and bitter melon is a natural alternative host of the phytoplasma associated with the disease. Periwinkle is an ornamental plant that can naturally host phytoplasmas and, thus, can play an important role as a reservoir. This work aimed at detecting phytoplasma in desiccated leaf tissues collected from naturally diseased chayote, bitter melon and periwinkle plants. On the basis of phytoplasma-specific DNA amplification in PCR, phytoplasma was detected in desiccated chayote and bitter melon samples affected by witches'-broom, as well as in desiccated periwinkle exhibiting chlorosis and small leaves. These results encourage trials in utilizing other dried plant tissues for the detection of phytoplasmas in other plant species, since dried samples are easy to preserve and transport, and yield good amounts of DNA.

Keywords: *Mollicutes*. Dehydration. PCR.

3.1 Introdução

Fitoplasmas são fitopatógenos que podem ocasionar perdas devastadoras na produção de diversas culturas, no mundo (Bertaccini, 2007). No Brasil, as doenças associadas a fitoplasmas foram relatadas em uma ampla gama de famílias botânicas, compreendendo espécies de importância econômica e da vegetação silvestre, embora poucos fitoplasmas tenham sido classificados taxonomicamente (Montano *et al.*, 2007).

As enfermidades de importância econômica associadas a fitoplasmas no Brasil são o ‘superbrotamento do chuchuzeiro’, o ‘superbrotamento do maracujazeiro’ e o ‘enfazamento vermelho do milho’ (Kitajima, 1994).

Momordica charantia L. (*Cucurbitaceae*) é uma trepadeira pantropical, nativa da Índia e da China, de valor ornamental, nutricional e medicinal. No Brasil, é conhecida popularmente como melão-de-São-Caetano, sendo facilmente encontrada vegetando sobre cercas, próximas a plantio comerciais. Melão-de-São-Caetano, no Brasil, é hospedeira alternativa natural do fitoplasma associado ao ‘superbrotamento do chuchuzeiro’(ChWB). Os sintomas da infecção por fitoplasma em melão-de-São-Caetano consistem em clorose, redução do tamanho de folhas e envassouramento (Montano *et al.*, 2000).

Catharanthus roseus (L.) G. Don (*Apocynaceae*) é uma ornamental herbácea, que apresenta importância medicinal, e, popularmente denominada vinca ou boa-noite. É conhecida como hospedeira natural de vários fitoplasmas, em nível mundial (Bertaccini, 2007). No Brasil, há diversos relatos de vinca naturalmente infectada por fitoplasmas (Barros *et al.*, 1998; Bedendo *et al.*, 1999; Montano *et al.*, 2001a, 2001b). Vinca é adotada como hospedeira experimental universal de fitoplasma (Bertaccini, 2007).

O chuchu (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) (*Cucurbitaceae*) é uma espécie olerícola de importância econômica, cultivada principalmente nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Pernambuco, Minas Gerais e Paraná (Makishima, 1991). Contudo, a produtividade de plantas e a qualidade dos frutos podem ser marcadamente reduzidas pelo ‘superbrotamento do chuchuzeiro’. Sintomas exibidos por plantas doentes incluem superbrotamento de ramos, declínio generalizado e clorose, má formação de folhas, queda de flores e frutos, assim com má formação de frutos (Robbs, 1972; Robbs & Kitajima, 1977; Kitajima *et al.*, 1981; Montano *et al.*, 2000).

No Brasil, as enfermidades associadas à fitoplasmas foram relatadas em espécies botânicas pertencentes a uma ampla diversidade de famílias (Montano *et al.*, 2007) e, há a possibilidade de ocorrência de novas doenças, determinada pela diversidade de espécies de plantas cultivadas e silvestres e, pelo favorecimento das condições climáticas (Kitajima, 1994; Davis, 1995). Em países tropicais, o maior número de gerações de insetos vetores, bem como a diversidade de plantas repositório de fitoplasmas, pode aumentar a incidência de enfermidades associadas a esses organismos, em diversas culturas (Cousin, 1995a, 1995b).

Por ser o Brasil um país de dimensões continentais, e devido a possibilidade de surtos de novas doenças em localidades remotas no país, amostras preservadas de plantas podem ser facilmente manipuladas e encaminhadas para a detecção de doenças associadas a fitoplasmas. O uso de material preservado poderia auxiliar a eventual detecção de fitoplasmas, em áreas acidentais longínquas, bem evitar a disseminação de doenças de etiologia fitoplasmática durante o transporte das amostras.

A informação concernente ao uso de tecido infectado preservado, para o isolamento do DNA de fitoplasmas, a partir de plantas com fitoplasmose é bastante escassa. Assim, o uso de tecido preservado para a detecção de fitoplasma em amostras sintomáticas e, a investigação de diferentes métodos de preservação de tecido vegetal consiste em tópicos interessantes a serem estudados.

Ao que tudo indica, pesquisas envolvendo a utilização de amostras preservadas de tecido infectado por fitoplasmas, para detecção e caracterização molecular desses organismos, não foram realizadas no Brasil.

A presente pesquisa objetivou:

Comparar a eficiência na produção de DNA fitoplasmal a partir de tecidos dessecados, provenientes de plantas de chuchuzeiro, melão-de-São-Caetano e vinca, naturalmente doentes.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material Vegetal

Colectaram-se folhas de melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) de plantas naturalmente doentes exibindo sintomas de superbrotamento, em Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.

Folhas sintomáticas de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) foram amostradas de plantas exibindo clorose, no *Campus* da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Amostras de tecido foliar de chuchu (*Secchium edule* Sw.) exibindo sintomas do ‘superbrotamento do chuchuzeiro’ foram coletadas na localidade de Mendanha, Estado do Rio de Janeiro.

As amostras de melão-de-São-Caetano (dez amostras), vinca (cinco amostras) e chuchu (dez amostras) foram submetidas à desinfestação com hipoclorito de sódio 1%, por 10 minutos e, em seguida submetidas a dois enxágües em água destilada esterilizada. Nervuras foliares e folhas pequenas foram excisadas e um grama de tecido foliar foi cortado em pedaços de aproximadamente 2 cm², com auxílio de tesoura estéril. O tecido seccionado foi transferido em placas de Petri esterilizadas e, submetido a vácuo (60 mm² Hg), por 2 minutos, em dessecador de vidro, contendo um extrato de 5 cm de sílica gel. Após 7 dias, as amostras foram removidas do dessecador, os tecidos desidratados foram reduzidos a pó, coletados em tubos de polipropileno de 1.5 ml tubos. Em seguida, os tubos foram armazenados a – 20°C, em frasco de vidro com uma camada de sílica gel. Tecido foliar de plantas assintomáticas de chuchuzeiro foram coletadas e submetidas ao mesmo procedimento.

Outras amostras utilizadas nesse trabalho consistiram de folhas sintomáticas de melão-de-São-Caetano e de vinca, coletadas nas mesmas localidades anteriormente mencionadas. Amostras foliares foram submetidas a um processo de desidratação, no qual o material vegetal coletado foi mantido entre folhas de papel jornal. No topo da pilha composta por jornal + amostras, colocou-se um peso, para assegurar a transferência de água, do tecido vegetal para o papel, em um processo semelhante ao verificado em procedimentos de herborização. As folhas de papel foram substituídas, sempre que saturadas com água. Amostras de vinca foram mantidas sob o processo de desidratação durante oito dias e as de melão-de-São-Caetano por 21 dias.

Amostras frescas de melão-de-São-Caetano e vinca naturalmente infectadas, foram utilizadas no presente trabalho. As amostras foram submetidas à desinfestação como anteriormente mencionado.

3.2.2 Extração de DNA

DNA total foi extraído das amostras, segundo Montano *et al.* (2000). As amostras foram pulverizadas na presença de nitrogênio líquido e os ácidos nucléicos foram extraídos com tampão

CTAB. A seguir, as amostras foram extraídas com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e, os DNAs foram precipitados com isopropanol. Os ácidos nucleicos foram coletados por centrifugação, lavados com etanol 70%, secos e ressuspensos em 200 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA, pH 8). Posteriormente, 200 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foi acrescentando à solução. Seguindo centrifugação, o líquido sobrenadante foi recuperado e extraído com um igual volume de clorofórmio. Etanol absoluto frio foi adicionado para precipitação dos ácidos nucleicos. Os DNAs foram coletados por centrifugação, lavados com etanol 70% frio, secos, ressuspensos em TE e, armazenados a -20°C.

3.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR) e *Nested* PCR

Os pares de *primers* universais P1/P7 (Deng & Hiruki, 1991; Schneider *et al.* 1995) e R16F2n/R2 (Gundersen & Lee, 1996) foram adotados para a amplificação da sequência do 16S rDNA de fitoplasma, em testes de *nested* PCR. Cada reação foi realizada em tubos de PCR de 0.2 ml, em um volume final de 25 µl da mistura de reação, conforme descrito por Gundersen & Lee (1996). Os PCRs foram realizados em 35 ciclos, nas seguintes condições: desnaturação a 94°C, por 1 min (2 min no primeiro ciclo), anelamento por 2 min, a 55°C, e extensão por 3 min (7min no ciclo final), a 72°C. Os controles negativos consistiram de mistura de reação desprovida de DNA e, DNA extraído de tecido foliar dessecado de plantas sadias de chuchuzeiro. Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e, as bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador de luz UV. O padrão de tamanho molecular usado foi 1 kb DNA “ladder” (Invitrogen).

Os produtos de DNA amplificados em PCR com os *primers* P1/P7 foram utilizados como molde para reamplificação em *nested* PCR com o par de *primers* R16(III)F2/R16(III)R1, específico para fitoplasmas do grupo 16SrIII (Lee *et al.* 1994). As análises de produtos amplificados foram conduzidas como descrito anteriormente.

3.3 Resultados

A presença de fitoplasmas foi detectada em todas as amostras dessecadas com sílica gel provenientes de plantas com sintomas de infecção por fitoplasmas, de acordo com o teste de PCR e *nested* PCR.

Amostras de plantas doentes de melão-de-São-Caetano, vinca e chuchuzeiro submetidas à dessecação com sílica gel, bem como amostras frescas coletadas de melão-de-São-Caetano e vinca continham 16S rDNA de fitoplasma, o qual foi amplificado por PCR com P1/P7 e reamplificado em *nested* PCR com o *primer* F2n/R2, fornecendo produtos de aproximadamente 1.2 kb. Amostras provenientes de chuchuzeiro assintomático não forneceram amplicons.

Eletroforese em gel de agarose dos produtos de *nested* PCR, amplificados com os pares de *primers* universais P1/P7 e F2n/R2, de amostras de melão-de-São-Caetano e de vinca, bem como dos controles pode ser observada na figura 1. MD1 e MD2 são amostras de melão-de-São-Caetano, dessecadas com sílica gel. O DNA de fitoplasma da amostra MD1 foi extraído de 0.5 gramas de tecido seco e, no caso da amostra MD2, o DNA de fitoplasma foi isolado a partir de 0.25 gramas de tecido. A amostra MF consiste de 1 grama de tecido fresco de melão-de-São-Caetano, de planta sintomática. CN corresponde a amostras de vinca doente, as quais foram dessecadas segundo o procedimento semelhante a herborização e, o DNA de fitoplasma foi extraído de 0.5 gramas de tecido seco. CS consiste de amostras de vinca infectada, dessecadas com sílica gel e, o DNA de fitoplasma foi extraído de 0.25 gramas de tecido. DNA de fitoplasma da amostra CF foi extraída de 1 grama de tecido fresco de vinca infectada.

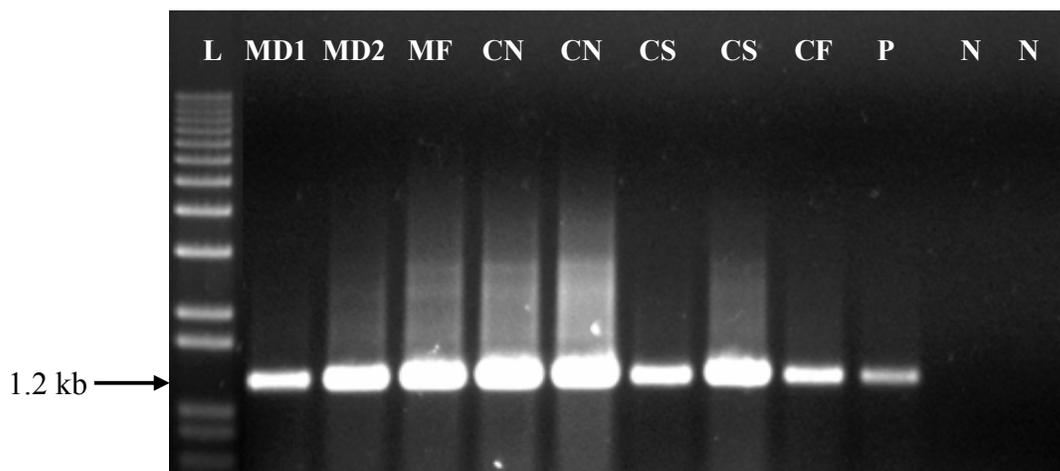


Figura 1. Detecção de fitoplasma em tecidos dessecados e frescos, mediante *nested* PCR com *primers* universais P1/P7 e R16F2n/R2. **L:** 1 kb “ladder”. **Momordica charantia:** **MD1** – 0.5 g de tecido dessecado com sílica gel; **MD2** – 0.25 g de tecido dessecado com sílica gel; **MF** – 1 g tecido fresco. **C. roseus:** **CN** – 0.5 g de tecido dessecado com procedimento semelhante a herborização; **CS** – 0.25 g tecido dessecado com sílica gel; **CF** – 1 g de tecido fresco. **P:** controle positivo, fitoplasma de *Dimorphandra gardneriana*. **N:** controle negativo, mistura de reação desprovida de DNA.

Figura 2 mostra eletroforese em gel de agarose de produtos de *nested* PCR, amplificados com os pares de *primers* universais P1/P7 e F2n/R2, de amostras de chuchuzeiro e controles. DNA de fitoplasma das amostras SE foi extraído a partir de 1 grama de tecido dessecado de chuchuzeiro doente.



Figura 2. *Nested* PCR com pares de *primers* universais P1/P7 and R16F2n/R2, para detecção de fitoplasma em tecidos dessecados de *Sechium edule*. **L:** 1 kb “ladder”. **H:** amostra de tecido dessecado de chuchu assintomático. **SE:** amostras dessecadas de chuchu infectado com fitoplasma. **N:** controle negativo, mistura de reação desprovida de DNA. **P:** controle positivo, fitoplasma ChWBIII.

Testes de PCR com par de *primer* R16 (III) F2/R1 forneceu produtos amplificados de aproximadamente 0.8 kb (dados não mostrados), para as amostras positivas de chuchuzeiro, com produtos de 1.2 kb.

3.4 Discussão

No presente trabalho, a utilização de tecido foliar desidratado permitiu a obtenção de DNA de fitoplasma de boa qualidade, para testes de PCR. A desidratação de melão-de-São-Caetano, vinca e chuchu infectados com fitoplasmas não mostrou efeitos detectáveis na estabilidade do DNA de fitoplasma.

Os resultados obtidos demonstram que o processo de dessecação com sílica gel não alterou a estrutura do DNA de fitoplasma de melão-de-São-Caetano, vinca e chuchuzeiro,

possibilitando a amplificação de uma banda esperada de 1.2 kb (Gundersen & Lee, 1996), para cada amostra.

Para as amostras de vinca submetidas à desidratação por oito dias, empregando o procedimento de herborização, o DNA do fitoplasma manteve sua integridade, o que foi confirmado após o teste de PCR. Contudo, amostras de melão-de-São-Caetano submetidas ao mesmo tipo de dessecação, durante 21 dias, não forneceram amplicons. A ausência de produto amplificado poderia ser atribuída a modificações em nível molecular do DNA dessa espécie botânica (*Momordica charantia*), ou ao período de dessecação mais longo ao qual as amostras foram submetidas.

No caso de amostras de melão-de-São-Caetano e de vinca desidratadas com sílica gel, os amplicons para o DNA de fitoplasma foram semelhantes àqueles obtidos com DNA de amostras frescas, empregados como controles. De forma interessante, observou-se que, para amostras de melão-de-São-Caetano dessecadas com sílica gel, amplicons foram obtidos de 0.25 gramas, assim como de 0.5 gramas de amostras de tecido seco. A banda amplificada a partir de 0.25 gramas de tecido (MD2) é mais forte do que a banda observada para a amostra de 0.5 gramas (MD1). Tal resultado poderia ser explicado pelo fato de que o *pellet* de DNA da amostra MD2 foi diluído com o mesmo volume de tampão TE, que a amostra MD1, promovendo, dessa forma, uma suspensão de DNA mais diluída e, conseqüentemente, menor quantidade de inibidores da enzima *Taq* polimerase, em teste de PCR.

Desidratação com sílica gel forneceu bom DNA de fitoplasma, de amostras infectadas de chuchu, o que foi demonstrado após nested PCR com os pares de *primers* universais, bem como com *primers* específicos a fitoplasmas do grupo 16SrIII.

No Brasil, as doenças associadas a fitoplasmas foram relatadas em muitas famílias botânicas (Montano *et al.*, 2007) e, há a possibilidade de ocorrência de novas enfermidades em diferentes regiões do país e, em novas espécies de plantas hospedeiras.

A vantagem da utilização de material infectado seco, resulta no fato que, amostras suspeitas desidratadas poderiam ser facilmente manuseadas, enviadas e preservadas, para a detecção de doenças associadas a fitoplasmas, especialmente nos casos de locais remotos de amostragem. O uso de amostras preservadas infectadas com fitoplasma, para diagnose e análise molecular, foi relatado por Khadair *et al.* (1995), que adotaram tratamento térmico para desidratação de tecido infectado.

Os resultados obtidos no presente trabalho encorajam a realização de ensaios utilizando tecidos vegetais secos com sílica gel e, com o processo semelhante à herborização, para detecção de fitoplasmas em outras espécies botânicas, uma vez que amostras secas apresentam facilidade de preservação e transporte e, fornecem boa quantidade de DNA (Bult *et al.*, 1992; Thomson & Henry, 1993; Khadair *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996).

Em se tratando de diagnose e análise molecular de fitoplasmas, o uso de material vegetal fresco é difundido e, os registros relacionados à adoção de amostras secas de plantas parecem ser escassos. Amostras vegetais desidratadas permitiriam o intercâmbio de amostras infectadas por fitoplasmas entre pesquisadores e, a diagnose de enfermidades associadas em áreas remotas.

Em países tropicais, onde as temperaturas médias são elevadas, a preservação de tecido fresco infectado por fitoplasma é difícil de se alcançar, em temperatura ambiente, o que pode ocasionar a perda de amostras valiosas. Desse modo, a dessecação de tecidos vegetais é uma escolha interessante para a preservação de DNA de fitoplasma.

Ao que tudo indica, o presente trabalho consiste no primeiro relato do uso de tecido preservado para a detecção de fitoplasmas, no Brasil.

3.5 Referências bibliográficas

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

BEDENDO, I P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Detecção e caracterização de fitoplasmas em plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) e de pimenteira (*Capsicum frutescens*) através das técnicas de duplo PCR e de RFLP. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p.197-201, 1999.

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

BULT, C.; KÄLLERSJÖ, M.; SUH, Y. Amplification and sequencing of 16/18S rDNA from gel-purified total plant DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.10, p.273-284, 1992.

COUSIN, M.T. Phytoplasmes et phytoplasmoses. **Agronomie** v.15, p.245-264, 1995a.

COUSIN, M.T. Phytoplasmes et phytoplasmoses. 1. Classification, symptômes et vecton. **Phytoma, La Défense des Végétaux**, v.472, p.22-25, 1995b.

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

DENG, S.; HIRUKI, C. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. **Journal of Microbiological Methods**, v.14, p.53-61, 1991.

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

KHADAIR, A.-H.; MOMANI, F.; HIRUKI, C. Molecular stability of clover proliferation phytoplasma DNA in periwinkle plant tissues after thermal treatment under microwave conditions. **Proceedings of the Japan Academy**, v.71, p.265-268, 1995.

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

KITAJIMA, E.W.; ROBBS, C.F.; KIMURA, O.; WANDERLEY, L.J.G. O irizado do chuchuzeiro e o superbrotamento do maracujá – duas enfermidades associadas a microorganismos do tipo micoplasma constatadas nos Estados do Rio de Janeiro e Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.115-122, 1981.

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

MAKISHIMA, N. Situação das cucurbitáceas no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v.9, p.99-101, 1991.

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

MONTANO, H.G.; CURE, C.A.M.; CUNHA JÚNIOR, J.O.; BRIOSO, P.S.T. 16S rRNA III phytoplasma associated with *Catharanthus roseus* virescence in Rio de Janeiro. Resumos do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia. p.22, 2001a.

MONTANO, H.G.; DALLY, E.L.; DAVIS, R.E.; PIMENTEL, J.P.; BRIOSO, P.S.T. *Catharanthus roseus*, a new host for the *Hibiscus* witches' broom phytoplasma, *Candidatus Phytoplasma brasiliense*". **Plant Disease**, v.85, p.1209, 2001b.

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**, v.84, p.429-436, 2000.

ROBBS, C.F. Frutíferas e hortaliças cultivadas. Enfermidades e pragas nos Estados da Guanabara e do Rio de Janeiro. **A Lavoura**, v.75, p.21-30, 1972.

ROBBS, C.F.; KITAJIMA, E.W. "Envassouramento" do chuchuzeiro na Baixada Fluminense: moléstia de provável etiologia micoplasmática. **Fitopatologia Brasileira**, v.2, p.99-100, 1977.

SCHNEIDER, B; SEEMÜLLER, E.; SMART, C.D.; KIRKIPATRICK, B.C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin S, Tully JG (Eds.) **Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology**. Vol. 1. Academic Press, New York., p.369-380.

THOMSON, D.; HENRY, R. Use of DNA from dry leaves for PCR and RAPD analysis. **Plant Molecular Biology Reporter** 11: 202-206, 1993.

WANG, X.; WANH, Z.-P.; ZOU, Y.-P. An improved procedure for the isolation of nuclear DNA from leaves of wild grapevine dried with silica gel. **Plant Molecular Biology Reporter** 14: 369-373, 1996.

CAPÍTULO III

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FITOPLASMA ChWBIII EM SEMENTES DE *Mormordica charantia* L. NO BRASIL.

RESUMO

JIMÉNEZ, Nilda Zulema Albornoz. **Detecção e caracterização do fitoplasma ChWBIII em sementes de *Mormordica charantia* L. no Brasil.** 2008. 95p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia. Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Fitoplasmas são procariotos sem parede celular associados com inúmeras enfermidades de espécies de plantas no mundo. Esses patógenos na natureza são transmitidos por insetos que se alimentam do floema das plantas. Como os fitoplasmas não podem ser isolados *in vitro* empregam-se técnicas moleculares para sua diagnose e caracterização. No Brasil, há relatos de doenças associadas à fitoplasmas em espécies vegetais distribuídas em vinte e nove famílias botânicas. O ‘superbrotamento do chuchuzeiro’ é uma doença associada ao fitoplasma ChWBIII no Brasil, que pode causar redução da qualidade de frutos de chuchu. O ChWBIII tem outras espécies hospedeiras naturais, da família *Cucurbitaceae*, sendo a principal dessas, melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia*). O presente trabalho teve como objetivo estudar a possível presença e a transmissão do fitoplasma ChWBIII em sementes de *M. charantia*. Testes moleculares demonstraram a presença do fitoplasma ChWBIII em sementes de *M. charantia* de frutos sintomáticos, obtidos de plantas com ‘superbrotamento do melão-de-São-Caetano’. O emprego de *primers* específicos ao grupo 16SrIII confirmou a identificação do fitoplasma associado à sementes como pertencente a esse grupo, o que foi corroborado através do seqüenciamento. A análise das seqüências revelou que o fitoplasma associado a sementes de melão-de-São-Caetano é o ChWBIII. A presença de fitoplasma em sementes de frutos sintomáticos, provenientes de plantas de melão-de-São-Caetano infectadas com o ChWBIII demonstra a transmissão do fitoplasma da planta mãe para as sementes. Os resultados obtidos no presente estudo possibilitam o maior entendimento epidemiológico das enfermidades incitadas por fitoplasmas e podem auxiliar na descoberta de insetos vetores e de plantas hospedeiras alternativas, favorecendo o estabelecimento de estratégias de controle dessas doenças.

Palavras-chave: *Mollicutes*. Diagnose. PCR.

ABSTRACT

JIMÉNEZ, Nilda Zulema Albornoz. **Detection and characterization of ChWBIII phytoplasma in seeds of *Momordica charantia* L. in Brazil.** 2008. 95p. Dissertation (Master of Science in Phytosanity and Applied Biotechnology). Instituto de Biologia. Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Phytoplasmas are wall-less prokaryotes associated with diseases in numerous plant species worldwide. In nature they are transmitted by phloem-sucking insects. Since phytoplasmas cannot be cultured *in vitro*, molecular techniques are needed for their diagnosis and characterization. In Brazil, phytoplasma diseases have been reported in plant species, distributed among twenty-nine botanical families. Chayote witches' broom is a disease associated with ChWBIII phytoplasma in Brazil, which can reduce the quality of chayote fruits. ChWBIII has other natural plant hosts, in the family *Cucurbitaceae*, and bitter melon (*Momordica charantia*) is the major alternative host. The present work aimed at study of the putative presence and transmission of ChWBIII phytoplasma to seeds of *M. charantia*. Molecular assays demonstrated the presence of ChWBIII phytoplasma in seeds of symptomatic fruits of *M. charantia*, collected from plants with witches' broom symptoms. The use of primers specific to 16SrIII group confirmed the identification of the phytoplasma associated with seeds as belonging to this group, what was further confirmed through sequencing. Sequences analyses revealed that the phytoplasma associated with bitter melon seeds is ChWBIII. The presence of phytoplasma in seeds of symptomatic fruits, from plants of bitter melon infected with ChWBIII demonstrates the transmission of the phytoplasma from the mother plants to the seeds. The results obtained in the present study lead to a better epidemiological understanding of the diseases caused by phytoplasmas, and may help to search for insect vectors and alternate plant hosts, enabling the design of effective disease management strategies.

Keywords: *Mollicutes*. Diagnosis. PCR.

4.1 Introdução

Fitoplasmas, procariotos pertencentes à classe *Mollicutes*, estão associados a centenas de doenças em diferentes culturas, em plantas lenhosas ou herbáceas, em nível mundial. Em muitos casos, esses organismos estão associados a sérias epidemias de importância quarentenária (Bertaccini, 2007). Esses patógenos causam sintomas que interferem no desenvolvimento das plantas. Os sintomas típicos são virescência, filoidia, witches' broom, proliferação, encurtamento anormal dos entrenós, enfezamento, redução do tamanho das folhas e flores, esterilidade das flores, amarelecimento geral, declínio e necroses do floema (Lee *et al.*, 2000; Bertaccini, 2007; Firrao *et al.*, 2007; Hogenhout *et al.*, 2008).

Fitoplasmas são organismos unicelulares, procariotos, sem parede celular. Apesar de inúmeras tentativas, seu isolamento para meio de cultura ainda não foi possível.

Mormordica charantia L. (*Cucurbitaceae*), conhecida popularmente no Brasil como melão-de-São-Caetano é uma espécie daninha trepadeira, selvagem, bastante freqüente em pomares, hortas, cafezais, cercas, alambrados e terrenos baldios (Lorenzi, 2000).

Essa espécie botânica é hospedeira natural do fitoplasma ChWBIII, agente causal da doença 'superbrotamento do chuchuzeiro' (Montano *et al.*, 2001). Em *M. charantia*, o fitoplasma ChWBIII induz a doença conhecida como 'superbrotamento do melão-de-São-Caetano', cujos sintomas característicos consistem em clorose acentuada, proliferação de ramos ou superbrotamento, encurtamento de entre-nós, folhas e flores de tamanho reduzido e enfezamento das plantas (Kitajima, 1994; Montano *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2004).

O mesmo fitoplasma, pertencente ao grupo 16SrIII e subgrupo J, foi identificado em plantas de abóbora (*Cucurbita moschata*). As plantas apresentavam sintomas de amarelecimento nos brotos e folhas, folhas de tamanho reduzido e má formação de frutos (Montano *et al.*, 2006).

Fitoplasmas foram detectados na maioria dos órgãos das plantas sintomáticas, nas quais eles colonizam os tubos crivados do floema. Dollet (2002) relata que, das mais de 600 doenças causadas por fitoplasmas nenhuma delas é transmitida por sementes. Infecções de fitoplasmas no tecido floral de algumas espécies foram detectadas, mas é admitido que a transmissão por sementes não seja possível, por não existir conexão direta do floema com as sementes (Jiang *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2005; Pracos *et al.*, 2006; Kudela, 2007). Contudo, esses patógenos foram encontrados em sementes de diferentes espécies botânicas, indicando que a transmissão de

fitoplasmas por sementes é possível (Bertelli *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2002; Cordova *et al.*, 2003; Olfert *et al.*, 2004; Botti & Bertaccini, 2006; Gurr *et al.*, 2007; Nipah *et al.*, 2007a; Nipah *et al.*, 2007b; Jiang *et al.*, 2008; Necas *et al.*, 2008; Olivier *et al.*, 2008).

Muitas das doenças causadas por fitoplasmas causam anormalidades na morfologia floral das hospedeiras, que podem apresentar sintomas de hipertrofia de sépalas, virescência, filoidia, redução do tamanho das flores, aborto dos órgãos reprodutivos e diminuição na formação de sementes (Conci *et al.*, 1998; Uyemoto *et al.*, 1999; Serrone *et al.*, 2001; Leyva-López *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Pracos *et al.*, 2006; Bhat *et al.*, 2006).

Observações efetuadas em plantas de *M. charantia* revelaram que plantas saudáveis apresentam maior floração e formação de frutos de consistência macia, enquanto que as plantas de melão-de-São-Caetano com os sintomas característicos da infecção por fitoplasmas apresentam flores e frutos em menor quantidade e de tamanho reduzido, em comparação com as plantas saudáveis. A partir dessas observações, objetivou-se com a presente pesquisa:

Estudar a possível presença e a transmissão do fitoplasma ChWbIII às sementes de *M. charantia*.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Coleta de amostras vegetais

Frutos de plantas sintomáticas de melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.), como também de plantas saudáveis foram coletados no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

As sementes dos frutos (cápsulas carnosas deiscentes) provenientes de plantas saudáveis de *M. charantia* foram obtidas com a abertura natural dos mesmos e, em seguida promoveu-se a remoção do arilo.

Os frutos das plantas sintomáticas de *M. charantia* tiveram que ser, em sua maioria, seccionados com auxílio de bisturi, devido a sua consistência dura para a obtenção das sementes. Entretanto alguns frutos não precisaram ser seccionados.

Posteriormente, as sementes obtidas de frutos de plantas saudáveis e de plantas sintomáticas foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 0.5%, durante dez minutos e, logo enxaguadas, por duas vezes, com água destilada e esterilizada.

4.2.2 Extração de DNA total

Sementes de melão-de-São-Caetano provenientes de frutos de plantas sadias e de plantas infectadas com o fitoplasma ChWBIII foram utilizadas para a extração de ácido nucléico total. A extração do DNA total das sementes se realizou segundo o protocolo de Montano *et al.* (2000b).

Amostras de 0.5 g de sementes de plantas sadias e sintomáticas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e homogeneizadas em 4 ml de tampão de maceração (100 mM K_2HPO_4 ; 31 mM KH_2PO_4 ; 10 % sacarose; 2 % PVP-40; 10 mM EDTA, pH 8). A solução foi filtrada com gaze e submetida à centrifugação a 2500 x g, por 5 minutos e, após a recuperação do sobrenadante, novamente centrifugada a 15000 x g, por 30 minutos, para formação do 'pellet'. Os ácidos nucléicos foram extraídos a partir dos 'pellets' com 750 μ l de tampão de extração (2 % (p/v) 'hexadecyltrimethyl ammonium bromide' [CTAB], 100 mM Tris-HCl, pH 8; 20 mM EDTA, pH 8; 1,4 M NaCl; 2 % PVP-40), previamente aquecido a 60 °C, seguido de incubação a 60 °C, por 30 minutos. As amostras foram extraídas com 750 μ l da mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e centrifugadas a 15000 x g, por 5 minutos. A fase aquosa superior foi coletada e os ácidos nucléicos precipitados 'overnight' pela adição de 0,6 volumes de isopropanol frio, a - 20 °C. Os ácidos nucléicos foram coletados mediante centrifugação de 15000 x g, por 30 minutos. O 'pellet' foi lavado com etanol 70 % frio, seco e ressuspensão em 200 μ l de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1mM EDTA, pH 8). Adicionou-se um volume igual da mistura fenol: clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). A amostra foi centrifugada a 15000 x g, por 30 minutos, ao final da qual se recuperou o sobrenadante, submetendo-o à extração com 1 volume de clorofórmio. A mistura sofreu centrifugação a 15000 x g, por 5 minutos, recuperando-se a fase aquosa. Os ácidos nucléicos foram precipitados mediante acréscimo de etanol absoluto frio, e posteriormente coletados por centrifugação a 15000 x g, por 30 minutos. O 'pellet' obtido foi lavado com etanol 70 % frio, seco e ressuspensão em 50 μ l de tampão TE e mantido a - 20 °C.

Os DNAs extraídos foram utilizados em reações de PCR, para amplificação de seqüências genômicas de fitoplasmas.

4.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR) e *nested* PCR.

Dois pares de oligonucleotídeos, P1/P7 (P1 = 5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3', e P7 = 5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3') (Deng & Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) e R16F2n/R2 (R16 F2n = 5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3', e R16 R2 = 5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3') (Gundersen & Lee, 1996), foram usados na amplificação das seqüências 16S rDNA (16S rRNA) de fitoplasma, em reações de *nested* PCR.

Amostras de DNA foram diluídas 1:10, utilizando-se como DNA molde uma alíquota correspondente a 1 µl. A reação foi efetuada em tubos de polipropileno de 0,2 ml, com um volume final de 25 µl, como descrito por Gundersen & Lee (1996). Os componentes da reação consistiram em dNTPs (concentração final de 200 µM), *primer sense* (concentração final de 0,4 µM), *primer anti-sense* (concentração final de 0,4 µM), tampão 10 X PCR e *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), na concentração final de 0,625 U. A reação de PCR foi realizada em termociclador programável, perfazendo um total de 35 ciclos nas seguintes condições: desnaturação 1 minuto (2 minutos no primeiro ciclo) a 94 °C, anelamento por 2 minutos a 55 °C, e extensão por 3 minutos (7 minutos no ciclo final) a 72 °C. Os controles negativos consistiram da mistura dos componentes da reação do PCR, desprovidos de DNA.

Produtos de PCR amplificados pelo par de oligonucleotídeos P1/P7 foram diluídos 1: 50 e utilizados como molde para a reação de *nested* PCR, usando-se o par de oligonucleotídeos R16F2n/R2, nas mesmas condições anteriormente descritas.

Produtos de PCR amplificados pelo par de oligonucleotídeos P1/P7 foram diluídos 1: 50 e utilizados como molde para a reação de *nested* PCR, usando-se o par de oligonucleotídeos R16F2n/R2, nas mesmas condições anteriormente descritas.

Os controles positivos nas reações de PCR e *nested* PCR consistiram na mistura de reação com DNA diluído de fitoplasma extraído de fava d'anta (*Dimorphandra gardneriana*). Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v), na presença de tampão de corrida TAE 1X, à voltagem constante de 65 volts, por 1,6 hora, à temperatura ambiente, adotando-se como padrão de tamanho molecular, o padrão 1 kb DNA "Ladder" (Invitrogen). Bandas de material amplificado foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989).

4.2.4 *Nested* PCR com oligonucleotídeos específicos ao grupo III

Testes de *nested* PCR foram efetuados empregando-se como molde, o DNA amplificado pelo par de primers P1/P7, diluído 1: 50. Na reamplificação por *nested* PCR foi empregado o par de oligonucleotídeos R16 (III) F2/R1, específico para o grupo 16SrIII (fitoplasmas do grupo do “X-disease”) (Lee *et al.*, 1994f).

As condições adotadas para o teste de *nested* PCR e para a análise dos produtos amplificados foram as mesmas descritas no item anterior.

4.2.5 Seqüenciamento de DNA

O objetivo do seqüenciamento consistiu na confirmação da identidade do fitoplasma presente nas amostras de sementes sintomáticas de melão-de-São-Caetano.

As amostras de DNA extraídas de amostras foliares e de sementes sintomáticas de melão-de-São-Caetano foram enviadas ao Molecular Plant Pathology Laboratory, Agricultural Research Service (ARS), United States Department of Agriculture (USDA), em Maryland.

Produtos oriundos de *nested* PCR com os *primers* PI/P7 e F2n/R2 (Gundersen & Lee, 1996) foram submetidos à limpeza com “Qiaquick PCR Purification Kit” (Qiagen, Valencia, CA).

Na reação de seqüenciamento utilizou-se “Perkin-Elmer/Applied biosystem’s AmpliTaq-FS DNA polymerase” e “big Dye terminators with Dntp” e, os seguintes pares de *primers*: R16F2n e R16R2 (Gundersen & Lee, 1996), e R16F4 (5’ – TGG TAG TCC ACG CCG TAA -3’) (Davis & Lee, 1993) e R16R4 (5’ –TTA CGG CGT GGA CTA CCA GGG -3’) (Gundersen *et al.*, 1994).

O seqüenciamento do 16S rDNA de fitoplasmas foi realizado em seqüenciador automático, utilizando-se o “Applied Biosystems DNA sequencer” (modelo 3730), no “DNA Sequencing Facility”, localizado no “The Center for Biosystems Research, University of Maryland Biotechnology Institute, College Park, Maryland.

As seqüências obtidas foram comparadas entre si e com seqüências depositadas no *Gene Bank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), pelo alinhamento múltiplo, utilizando-se o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

4.3 Resultados

4.3.1 Sintomas do fitoplasma ChWBIII em frutos e sementes de *Momordica charantia*.

Plantas sintomáticas de melão-de-São-Caetano apresentaram reduzido número de flores e frutos e, esses frutos obtidos dessas plantas infectadas com o fitoplasma ChWBIII são de tamanho pequeno e, geralmente, de consistência dura. Esses frutos duros apresentam uma aparência externa normal, ou seja, o epicarpo é igual aquele dos frutos das plantas sadias. O mesocarpo apresenta um desenvolvimento anormal, formando uma camada grossa e dura e, de coloração branca a branca amarelada. As sementes desses frutos encontram-se fortemente aderidas ao mesocarpo, mas não apresentam arilo.

Com menor frequência se encontra frutos pequenos e, com as mesmas características externas do fruto sadio de uma planta assintomática. A coloração do epicarpo desses frutos varia de acordo com o amadurecimento do mesmo, de verde a laranja intenso. O mesocarpo apresenta uma camada delgada que se encontra aderida ao epicarpo e, de cor branca. O endocarpo (arilo) é de cor vermelho forte e encontra-se envolvendo as sementes. Essas sementes estão ocas ou vazias internamente e, geralmente, apresentam apenas o tegumento junto com restos de tecidos das demais partes constitutivas. O número de sementes nesses frutos é menor, em comparação com o que apresentam os frutos sadios. Algumas sementes ainda conservam parte do endosperma, e outras possuem apenas restos de tecido interno (Figura 1).

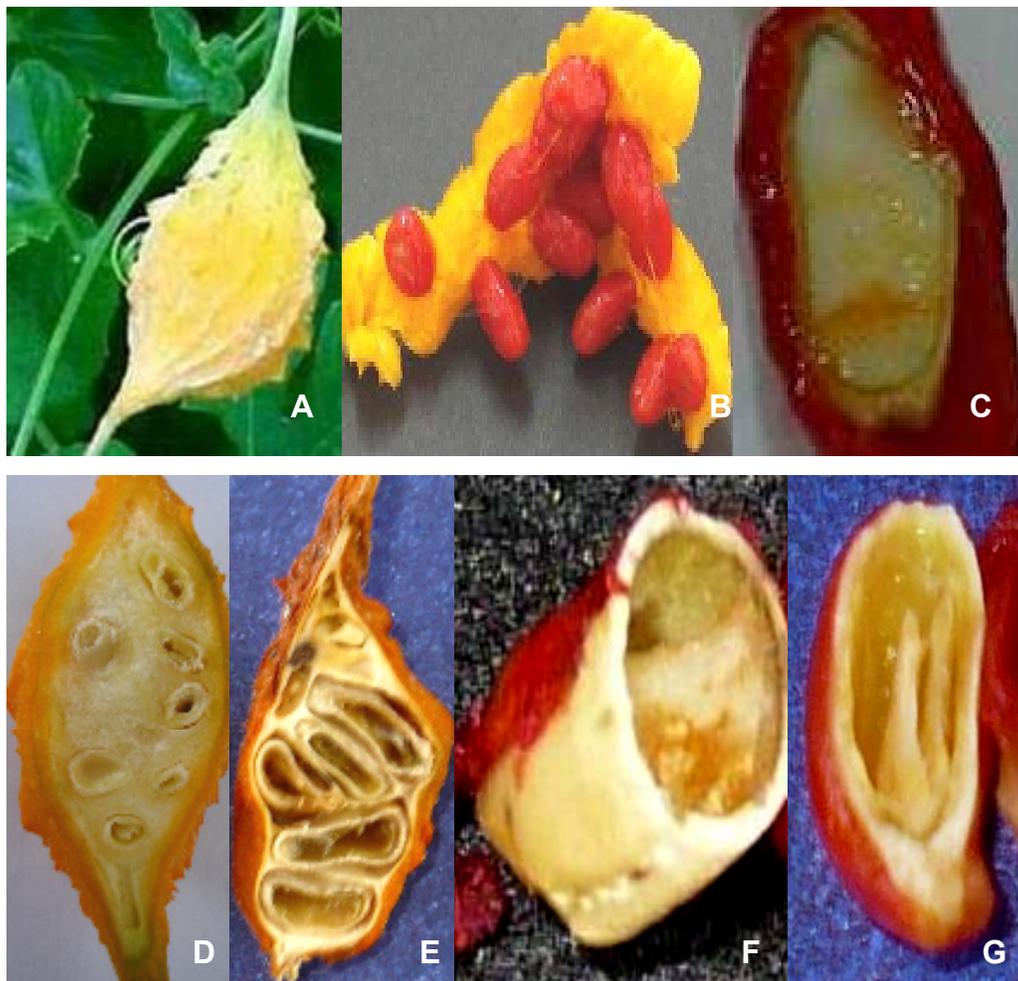


Figura 1. Frutos e sementes de *M. charantia* sadios e com sintomas da presença de fitoplasmas. **A:** fruto sadio de consistência macia. **B:** fruto sadio deiscente e, sementes com arilo vermelho. **C:** corte longitudinal de uma semente sadia. **D:** fruto sintomático com o mesocarpo engrossado e duro, e com sementes aderidas. **E:** fruto sintomático com o mesocarpo delgado e sementes sem arilo. **F:** corte transversal de semente com fitoplasma. **G:** corte longitudinal de semente doente, mostrando restos de suas partes internas.

Devido à presença do fitoplasma ChWBIII, essas sementes são inviáveis, impossibilitando a obtenção de novas plantas, pois, provavelmente, as sementes estão desprovidas de embrião.

4.3.2 Amplificação do 16S rDNA de fitoplasma com PCR and *nested* PCR

A detecção do fitoplasma ChWBIII em sementes de melão-de-São-Caetano de frutos provenientes de plantas sintomáticas foi realizada com PCR e *nested* PCR.

Amostras de folhas e de sementes sintomáticas de melão-de-São-Caetano apresentaram fragmentos amplificados de 1.2 kb, correspondentes ao 16S rDNA de fitoplasmas (Figura 2). Não foram observados produtos amplificados em amostras de folhas e sementes coletadas de plantas assintomáticas, utilizadas como controle negativo.

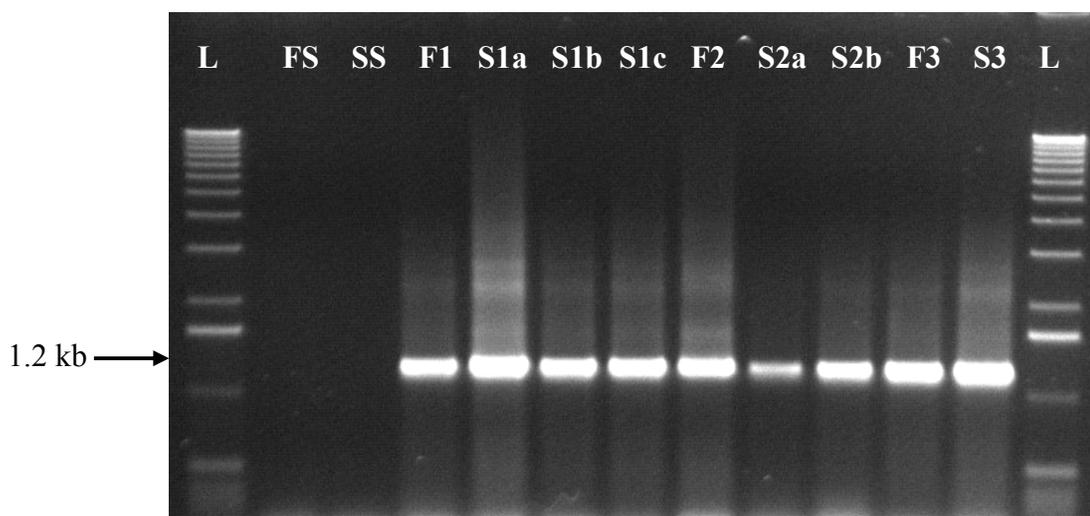


Figura 2. *Nested* PCR com *primers* universais P1/P7 e F2n/R2. **L:** 1 kb “ladder”. **FS:** tecido foliar de planta sadia. **SS:** sementes de plantas sadias. **F1:** tecido foliar da planta sintomática 1. **S1a-S1b-S1c:** sementes de frutos sintomáticos da planta 1, com ChWBIII. **F2:** tecido foliar da planta doente 2, com ChWBIII. **S2a-S2b:** sementes de frutos doentes da planta sintomática 2. **F3:** tecido foliar da planta sintomática 3, com ChWBIII. **S3:** sementes de frutos doentes da planta sintomática 3.

4.3.3 *Nested* PCR com oligonucleotídeos específicos ao grupo III

Amostras de folhas e de sementes de plantas sintomáticas que resultaram positivas em *nested* PCR com os *primers* universais foram testadas quanto à presença de fitoplasma do grupo 16SrIII.

Na reamplificação por *nested* PCR com *primers* específicos ao grupo 16SrIII, observaram-se produtos amplificados de aproximadamente 0,8 kb, característicos de fitoplasmas do referido grupo (Figura 3).

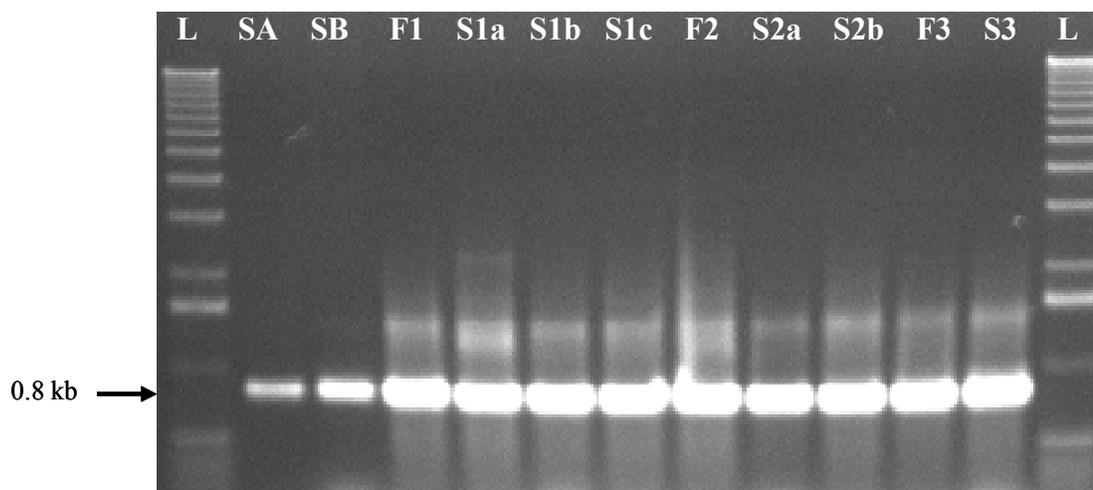


Figura 3. *Nested PCR* com *primers* P1/P7 e R16(III)F2/R1 em sementes e tecido foliar de *M. charantia*, de plantas com ChWBIII. **L:** 1 kb “ladder”. **SA:** semente de fruto infectado da planta A. **SB:** sementes de planta B. **F1:** tecido foliar da planta sintomática 1. **S1a-S1b-S1c:** sementes de frutos sintomáticos da planta 1, com ChWBIII. **F2:** tecido foliar da planta 2, com ChWBIII. **S2a-S2b:** sementes de frutos doentes da planta sintomática 2. **F3:** tecido foliar da planta 3, com ChWBIII. **S3:** sementes de frutos doentes da planta sintomática 3.

A presença de produto amplificado não foi observada para fitoplasma associado ao ‘superbrotamento da fava d’anta’ utilizado em *nested PCR*, conforme esperado, visto tratar-se de fitoplasma de grupo taxonômico distinto (resultado não mostrasdo).

4.3.4 Identificação de fitoplasma através da análise de seqüências de nucleotídeos

As seqüências obtidas no presente trabalho, com os *primers* adotados apresentam 1221 nucleotídeos. Essas seqüências foram comparadas entre si e com as seqüências ChWBIII estirpe Ch10 (AF47706) e ChWBIII, estirpe Mor 5 (AF47707), depositadas no *Gene Bank*. A porcentagem de similaridade entre as seqüências foi determinada, com alinhamento múltiplo (Tabela 1).

Tabela 1 - Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos do gene 16Sr DNA de fitoplasmas.

Estirpes	ChWBIII, Ch10 (AF47706)	ChWBIII, Mor 5 (AF47707)	<i>M. charantia</i> - folha (presente trabalho)	<i>M. charantia</i> -semente (presente trabalho)
ChWBIII, estirpe Ch10(AF47706).	100	--	--	--
ChWBIII, estirpe Mor 5 (AF47707).	99	100	--	--
<i>M. charantia</i> - folha (presente trabalho)	99	99	100	--
<i>M. charantia</i> - semente (presente trabalho)	99	99	100	100

ChWBIII, estirpe Ch10(AF47706): fitoplasma ‘chayote witches’ broom’, estirpe isolada de chuchuzeiro com ‘superbrotamento do chuchuzeiro’.

ChWBIII, estirpe Mor 5 (AF47707):): fitoplasma ‘chayote witches’ broom’, estirpe isolada de *Momordica charantia* com ‘superbrotamento de melão-de-São-Caetano’.

4.3 Discussão

O resultados obtidos nesse trabalho, através de testes moleculares, demonstram a presença do fitoplasma ChWBIII em sementes de *M. charantia* de frutos sintomáticos, obtidos de plantas com ‘superbrotamento do melão-de-São-Caetano’, o que se encontra em consonância com relatos de outros autores (Bertelli *et al.*, 2002; Khan *et al.*2002; Cordova *et al.* 2003; Khan *et al.*2003; Gurr *et al.*, 2007; Olivier *et al.*, 2007 e 2008). A amplificação de fragmentos genômicos do 16 S rDNA de fitoplasmas por PCR e *nested* PCR, com os primers universais específicos para fitoplasmas, resultando em amplicons de 1,2 kb, nas amostras de sementes sintomáticas de melão-de-São-Caetano comprova a presença de fitoplasma em associação com as sementes. Esse resultado obtido com as amostras positivas para a presença de fitoplasmas foi corroborado com PCR e *nested* PCR, empregando-se os *primers* específicos para fitoplasmas do grupo 16SrIII, ao qual o ChWBIII encontra-se afiliado.

Nas observações realizadas em campo e em laboratório, verificou-se que os frutos de melão-de-São-Caetano obtidos das plantas infectadas com o fitoplasma ChWBIII são de tamanho pequeno. Nesses frutos, o mesocarpo apresenta desenvolvimento e coloração anormal, com sementes fortemente aderidas e, desprovidas de arilo. Segundo Galvis-Garcia (2001), plantas de café afetado por fitoplasmas apresentam redução ou nenhuma formação de frutos. Ainda que

esses patógenos não afetem o aspecto externo dos frutos, nem causem muita redução do tamanho desses, uma porcentagem muito alta são frutos monospermicos, diferentes dos frutos normais. A formação desse tipo de frutos pode alcançar até 70%. A germinação das sementes monospermicas é igual ao das sementes normais, originando plantas normais.

Em frutos sintomáticos de melão-de-São-Caetano, as sementes apresentam-se ocas e, de modo geral, apresentam apenas o tegumento junto com restos de tecidos das demais partes constitutivas. O número de sementes nesses frutos é reduzido, em comparação aos frutos sadios. Algumas sementes ainda conservam parte do endosperma, e outras possuem apenas restos de tecido interno. Em alfafa, observou-se que o fitoplasma '*Ca. Phytoplasma australiense*' reduz a qualidade das sementes nas plantas infectadas. Um alto número de sementes pequenas e descoloridas, da segunda geração, resultaram positivas à presença do patógeno, em testes moleculares. Além disso, sementes coletadas de plantas sintomáticas apresentaram significativa redução do peso, da porcentagem de germinação, e da taxa de emergência de plântulas provenientes de sementes infectadas (Gurr *et al.*, 2007).

Devido à presença do ChWBIII, as sementes de melão-de-São-Caetano são inviáveis, possivelmente por estarem desprovidas de embrião, coincidindo com os dados observados por Gurr *et al.* (2007), que relataram a morte dos embriões das sementes de alfafa infectadas por fitoplasma. Além disso, os autores atribuem à infecção por fitoplasma, a baixa taxa de germinação/emergência.

A detecção do fitoplasma ChWBIII em sementes de melão-de-São-Caetano mediante testes de PCR e *nested* PCR evidencia a possibilidade da transmissão do patógeno a partir de plantas infectadas às sementes. Em virtude da distribuição irregular de fitoplasma na planta é possível que o organismo alcance os frutos no início da formação, produzindo sementes inviáveis, porém infectadas. No presente estudo, a detecção do fitoplasma em sementes de melão-de-São-Caetano foi realizada em sementes incompletas e inviáveis, oriundas de plantas completamente infectadas.

No entanto, a presença de ChWBIII em sementes foi evidenciada, por PCR e *nested* PCR, em sementes completas de *C. roseus* coletadas de plantas infectadas com ChWBIII, após transmissão por *Cuscuta* (Jiménez, comunicação pessoal). Esses dados coincidem com os dados obtidos por Montano *et al.* (2001), que detectaram a presença de ChWBIII em embriões de chuchu-semente, através de testes moleculares.

A comparação entre as seqüências de fitoplasmas de folha de plantas doentes de melão-de-São-Caetano e de sementes de frutos sintomáticos oriundos dessas plantas, revelou tratar-se do mesmo fitoplasma, com percentual de similaridade de 100%. Ao se comparar as seqüências de nucleotídeos de fitoplasma obtidas no presente trabalho e, as seqüências ChWBIII, estirpe Ch10 e ChWBIII, estirpe Mor 5, observou-se 99% de similaridade entre as mesmas. Esses dados permitem afirmar que o fitoplasma isolado de folha de plantas doentes de melão-de-São-Caetano, bem como de sementes de frutos sintomáticos oriundos dessas plantas é o fitoplasma ChWBIII.

Embora a transmissão dos fitoplasmas por sementes não seja aceita pela maioria dos fitopatologistas porque, esses microorganismos encontram-se localizados nos tecidos do floema das plantas hospedeiras, e, não existe uma conexão direta entre os tecidos do floema da planta mãe e o embrião em desenvolvimento da semente (McCoy, 1979; Cordova *et al.*, 2003), Bertelli *et al.* (2002) detectaram o fitoplasma ‘elm yellows’ (EY) em flores e sementes de arvores sintomáticas de olmo e, resultados preliminares sugeriram que o patógeno não fosse transmitido das sementes infectadas às plântulas obtidas de sementes sintomáticas. Porém, recentes relatos da descoberta do fitoplasma do ‘amarelecimento letal do coqueiro’, nos embriões dessa planta (Cordova *et al.*, 2003) e, do fitoplasma ‘witches’ broom’ da alfafa, em sementes e plântulas obtidas de sementes infetadas (Gurr *et al.*, 2007), evidenciam a possibilidade de transmissão por semente.

A possibilidade da transmissão de fitoplasmas por sementes foi também relatada por Khan *et al.* (2002 e 2003), em sementes e mudas de alfafa e, em sementes e mudas de limão azedo com o fitoplasma ‘*Ca. Phytoplasma aurantifolia*’, confirmando a capacidade da passagem de fitoplasmas de sementes a mudas, em diferentes espécies.

Esses resultados obtidos desafiam as afirmações sobre a impossibilidade da transmissão desses fitopatógenos por sementes. Geralmente acreditou-se que os fitoplasmas só habitassem os tecidos floemáticos e, que a colonização dos tecidos da planta hospedeira por esses microorganismos ocorresse passivamente, quando os fitoplasmas se movimentam com os fluxos da fotossíntese (Kuske & Kirkpatrick, 1992). Portanto, a ausência de uma via de conexão entre os tecidos do floema da planta mãe e o embrião das sementes em desenvolvimento impediriam que os fitoplasmas alcançassem o embrião em formação, desde os tecidos do floema da planta mãe.

A evidência para a restrição dos fitoplasmas aos tecidos do floema não é convincente. Amici & Favali (1972) relataram a presença de fitoplasmas nas células de parênquima. Todavia,

McCoy (1979) rejeitou essa descoberta por considerar uma identificação equivocada das células imaturas do floema, com as células do parênquima ou, a identificação inexata das vesículas citoplasmáticas da planta hospedeira, com os corpos dos fitoplasmas. Outro argumento para refutar a presença de fitoplasma no parênquima consistiu no tamanho desses organismos, que impossibilitaria sua movimentação através do plasmodesma de células do parênquima (McCoy 1979).

Fitoplasmas colonizam muitos tecidos e órgãos de seus vetores (Lee *et al.* 2000), provavelmente usando o mesmo mecanismo dos begomovírus. Recentemente, semelhanças entre os fitoplasmas e capas protéicas de begomovírus foram observadas (Marzachi *et al.*, 2000). Em begomovírus, o movimento de célula a célula e a movimentação sistêmica na planta, assim como no inseto vetor, é realizada pela presença de transporte nuclear e de proteínas de movimento (Brown, 2001). Em alguns begomovírus, por exemplo, o vírus do mosaico do *Abutilon*, o qual é limitado ao floema, a perda de uma ou de ambas as capas protéicas resultou na perda da habilidade do vírus em ativar a movimentação célula a célula e, na transmissibilidade pelos vetores (Avner & Czosnek 2003). Se o mesmo mecanismo acontecesse na infecção celular e sistêmica e dos fitoplasmas, poderia explicar que nem todos os fitoplasmas estão limitados ao floema.

Os resultados desse trabalho, em detecção do fitoplasma ChWBIII em sementes de *M. charantia* permitem contribuir com o entendimento da transmissão de fitoplasmas por sementes e, na sintomatologia destes patógenos nas sementes, assim, como o estudo da epidemiologia das doenças de cucurbitáceas associadas a fitoplasmas.

O presente trabalho de pesquisa é o primeiro realizado no mundo, quanto à detecção, caracterização e sintomatologia do fitoplasma ChWBIII, pertencente ao sub-grupo J (16SrIII-J), infectando sementes de *M. charantia*. No Brasil, este trabalho consiste no primeiro relato da presença desse fitoplasma em sementes de melão-de-São-Caetano.

4.4 Referências bibliográficas

AMICI, A.; FAVALI, M.A. Thymidine-3H labeling of mycoplasma-like bodies in roots of rice plants affected by a yellows-type disease. **Protoplasma**, v.75, p.37-43, 1972.

BAILEY, K.L.; GOSSEN, B.D.; GUGEL, R.K.; MORRALL, R.A. (Eds). Diseases caused by phytoplasmas. In **Diseases of Field Crops in Canada**, 3rd Edition. CPS, Ottawa, 2003. p.136-137.

BERTELLI, E.; TEGLI, S.; SFALANGA, A.; SURICO, G. Detection of phytoplasmal DNA in flowers and seeds from elm trees infected with Elm Yellows. **Phytopathologia Mediterranea**, Italia, v.41, p.259-265, 2002.

BHAT, A.I.; MADHUBALA, R.; HAREESH, P.S.; ANANDARAJ, M. Detection and characterization of the phytoplasma associated with a phyllody disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in India. **Scientia Horticulturae**, v.107, p.200–204, 2006.

BOTTI, S.; BERTACCINI, A. Phytoplasma infection through seed transmission: Further observations. In 16th. International Organization of Mycoplasma Congress, 2006, Cambridge, UK. p.76.

BROWN, J.H. The molecular epidemiology of begomoviruses. In: KHAN, J.A.; DYKSTRA, J. **Trends in Plant Virology**, Eds. Haworth Press, New York, 2001. p.279-316.

CONCI, V.C.; GOMEZ, G.G.; DOCAMPO, D.M.; CONCI, L.R. Phytoplasma associated with symptoms of 'tristeza del ajo' (Garlic Decline) in garlic (*Allium sativum* L.). **Journal of Phytopathology**, v.146, p.473-477, 1998.

DOLLET, M. CIRAD. Concepts: toward a global research programme on integrated control of lethal yellowing-like phytoplasma diseases of the coconut palm. In: **Proceedings of the Expert Consultation on Sustainable Coconut Production through Control of Lethal Yellowing Disease**, Kingston, Jamaica, 2002. CFC Technical Paper N.18.

FAVALI, M.A.; SANITÀ DI TOPPI, L.; VESSANA, C.; FOSSATI, F.; MUSETTI, R. Phytoplasmas associated with tomato stolbur disease. **Acta Horticulturae** (ISHS), v.551, p.93-100, 2001.

FRÁNOVÁ, J.; PETRZIK, K. Strawberry sterility – what is the causal agent(s)?. **Acta Horticulturae** (ISHS), v.780, p.27-34, 2008.

FRÁNOVÁ, J.; PRIBYLOVÁ, J.; SIMKOVÁ, M.; NAVRÁTIL, M.; VÁLOVÁ, P. Electron microscopy and molecular characterization of phytoplasmas associated with strawflower yellows in the Czech Republic. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v.109, p.883–887, 2003.

GALVIS-GARCIA, C.A. Estudio de seis especies de la familia *Cicadellidae* como posibles vectores del fitoplasma agente causante de la crespada del cafeto. 2001. 70p. (Ingeniero Agrónomo). Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas, Manizales, Colombia. 2001.

GURR, G.M.; GETACHEW, M.A.; FLETCHER, M.J.; MITCHELL, A.; NIKANDROW, A.; PILKINGTON, L.J. *Candidatus* Phytoplasma australiense in seeds and seedlings of lucerne (*Medicago sativa* L.): evidence of seed transmission. In: GURR, G.M. *et al.* **Australian Lucerne Yellows Disease: Testing and extension of disease management strategies**. Australia: Rural Industries Research and Development Corporation Publication, 2007. n.07/120, p.33-38.

JIANG, H.; WEI, W.; SAIKI, T.; KAWAKITA, H., WATANABE, K.; SATO, M. Distribution patterns of mulberry dwarf phytoplasma in reproductive organs, winter buds, and roots of mulberry trees. **Journal Gen Plant Pathology**, v.70, p.168-173, 2004.

KHAN, A.J.; BOTTI, S.; PALTRINIERI, S.; AL-SUBHI, A.M.; BERTACCINI, A.F. Phytoplasmas in alfalfa seedlings: Infected or contaminated seeds?. In 14th. International Organization of Mycoplasma Congress, 2002, Viena, Áustria. p.148.

KHAN, A.J., LEE, R.F., HARTUNG, J. Confirming seed transmission of witches' broom disease of lime. In **8th International Congress of Plant Pathology**, 2003, v.2, p.281.

KUDELA, V. Inflorescence Blast and Flower Bud Abnormalities of *Spiraea* × *vanhouttei* and their Causes. **Czech Journal of Genetic Plant Breeding**, Checoslovaquia, v.43, n.4, p.135–143, 2007.

KUSKE, C.R.; KIRKPATRICK, B.C. Distribution and Multiplication of Wessarn Aster Yellows Mycoplasma-like Organisms in *Catharanthus-Roseus* as Determined by DNA Hybridization Analysis. **Phytopathology**, v.82, p.457-462, 1992.

LEYVA-LÓPEZ, N.E.; OCHOA-SÁNCHEZ, J.C.; LEAL-KLEVEZAS, D.R.; MARTÍNEZ-SORIANO, K.P. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. **Canadian Journal of Microbiology**, Canada, v.48, n.12, p.1062–1068, 2002.

McDONALD, M.B.; COPELAND, L. **Seed Production – Principles and practices**. New York, Chapman & Hall, 1997. 749p.

MONTANO, H.G.; PIMENTEL, J.P.; BRIOSO, P.S.T. Detecção de fitoplasma afiliado ao grupo 16S rRNA III em chuchu-semente proveniente de plantas com superbrotamento do chuchuzeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasil (Jaboticabal), v.26 (supl), p.508, 2001.a.

NEČAS, T.; MAŠKOVÁ, V.; KRŠKA, B. The Possibility of ESFY Phytoplasma transmission: Through Flowers and Seeds. **Acta Horticulturae**, v.781, p.443-448, 2008.

NIPAH, J.O.; JONES, P.; DICKINSON, M. Detection of lethal yellowing phytoplasma in embryos from coconut palms infected with Cape St Paul wilt disease in Ghana. **Plant Pathology**, p.1-8, 2007a.

NIPAH, J.O.; JONES, P.; HODGETTS, J.; DICKINSON, M. Detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms in Ghana, and kernels from maize in Peru. **Bulletin of Insectology**, Italia, v.60, n.2, p.385-386, 2007b.

OLIVIER, C.Y.; GALKA, B.; ROTT, M.; JOHNSON, R. Molecular detection of *Candidatus* Phytoplasma asteris' in seeds of *Brassica napus* in Saskatchewan, Canada. **Cruciferae Newsletter**, Francia, v.27, p.22-23. jan. 2008. Disponível em: <<http://www.brassica.info/information/cn/newsletter/htm>>. Acesso em: 27 ago. 2008.

OLIVIER, C.Y.; SÉGUIN-SWARTZ, G.; BARASUBIYE, T.; HEGEDUS, D. First report of 'Candidatus Phytoplasma asteris'-related strains in *Brassica rapa* in Saskatchewan, Canada. **Plant Disease**, v.90, n.6, p.832, 2007.

OLFERT, O.O.; SÉGUIN-SWARTZ, G.; OLIVIER, C.Y. Transmission of Phytoplasmas. Part 4. *In* Pest status of leafhoppers and their impact on aster yellows disease in canola. **Final Report to the Saskatchewan Agriculture Development Fund**, Canada, p.17-22, 2004.

PRACROS, P.; RENAUDIN, J.; EVEILLARD, S.; MOURAS, A.; HERNOULD, M. Tomato Flower Abnormalities Induced by Stolbur Phytoplasma Infection Are Associated with Changes of Expression of Floral Development Genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.19, n.1, p.62-68, 2006.

SERRONE, P.; MARZACHÌ, C.; BRAGALONI, M.; GALEFFI, P. Phytoplasma infection of tomato in central Italy. **Phytopathologia Mediterranea**, Italia, v.40, p.137-142, 2001.

UYEMOTO J.K.; ASAI, W.K.; KIRPATRICK, B.C. Etiology of almond shriveled kernel disease. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, New Zealand, v.27, p.225-228, 1999.

ZHANG, J.; HOGENHOUT, S.A.; NAULT, L.R.; HOY, C.W.; MILLER, S.A. Molecular and symptom analyses of phytoplasma strains from lettuce reveal a diverse population. **Phytopathology**, v.94, n.8, p.842-849, 2004.

CAPÍTULO IV

VARIABILIDADE DE FITOPLASMAS ASSOCIADOS A DIFERENTES ESPÉCIES BOTÂNICAS NO BRASIL

RESUMO

JIMÉNEZ, Nilda Zulema Albornoz. **Variabilidade de fitoplasmas associados a diferentes espécies botânicas no Brasil**. 2008. 95p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia. Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Fitoplasmas são procariotos sem parede celular associados a inúmeras enfermidades que podem causar severas perdas na produção, em diversos cultivos de importância econômica, no mundo. No Brasil, há relatos de doenças associadas à fitoplasmas em espécies vegetais pertencentes a mais de vinte e nove famílias botânicas. Algumas dessas doenças causam redução da qualidade e da produção. O objetivo da presente pesquisa foi verificar a variabilidade de fitoplasmas associadas a milho (*Zea mays*), maracujá (*Passiflora edulis*), poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) e *Catharanthus roseus*. A presença de fitoplasmas em plantas sintomáticas de milho, maracujá, poinsettia e *C. roseus* foi detectada através de PCR e *nested* PCR com iniciadores universais P1/P7 e F2n/R2. Os fitoplasmas isolados de maracujá, poinsettia e *C. roseus* foram inseridos no grupo 16SrIII, de acordo com *nested* PCR com *primers* específicos a esse grupo. Análise das seqüências dos fitoplasmas de maracujá e de *C. roseus* confirmou a identidade dos mesmos, revelando 98 % e 99% de homologia, respectivamente, com o ChWBIII. A diversidade de plantas hospedeiras de fitoplasmas foi verificada em milho, maracujá, poinsettia e *C. roseus*. Os resultados obtidos no presente estudo possibilitam o maior entendimento epidemiológico das enfermidades incitadas por fitoplasmas e podem auxiliar na descoberta de insetos vetores e de plantas hospedeiras alternativas, favorecendo o estabelecimento de estratégias de controle dessas doenças.

Palavras-chave: *Mollicutes*. Diagnose. *Nested* PCR.

ABSTRACT

JIMÉNEZ, Nilda Zulema Albornoz. **Variability of phytoplasmas associated with different plant species in Brazil.** 2008. 95p. Dissertation (Master of Science in Phytosanitary and Applied Biotechnology). Instituto de Biologia. Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Phytoplasmas are prokaryote, lacking cell wall, associated with diseases that can cause yield losses in several crops worldwide. In Brazil, phytoplasma diseases have been reported in plant species, distributed among twenty-nine botanical families. The present work aimed at verify phytoplasma variability in corn (*Zea mays*), passion fruit (*Passiflora edulis*), poinsetia (*Euphorbia pulcherrima*) and *Catharanthus roseus*. The presence of phytoplasmas in symptomatic plants of corn, passionfruit, poinsetia and *C. roseus* was detected by PCR and nested PCR with universal primer pairs. Phytoplasmas isolated from passionfruit, poinsetia and *C. roseus* were classified as belonging to 16SrIII group, according to nested PCR with primers specific to this group. Analysis of the sequences of the phytoplasmas from passion fruit and *C. roseus* confirmed the identity of these organisms, revealing 98% and 99% homology, respectively, with ChWBIII. Diversity of phytoplasma host plants was verified in corn, passionfruit, poinsetia and *C. roseus*. The results obtained in the present study lead to a better epidemiological understanding of the diseases caused by phytoplasmas, and may help to search for insect vectors and alternate plant hosts, enabling the design of effective disease management strategies.

Keywords: *Mollicutes*. Diagnosis. Nested PCR

5.1 Introdução

Fitoplasmas são procariotos sem parede celular, associadas a doenças de espécies botânicas de importância econômica. As infecções por fitoplasmas alteram o nível de hormônios endógenos da planta, causando sintomas como a proliferação de ramos axilares, nanismo, virescência ou filoidia.

No Brasil as principais doenças de etiologia fitoplasmática e de importância econômica são o ‘superbrotamento do maracujazeiro’, o ‘superbrotamento do chuchuzeiro’ e o ‘enfazamento vermelho do milho’ (Kitajima, 1994). Entretanto, até o momento têm-se caracterizado várias doenças causadas por esses microrganismos, como ‘enfazamento do tomateiro’ e ‘enfazamento da berinjela’ (Mello, 2003), ‘amarelo da videira’ (Neroni, 2004), ‘amarelecimento fatal do dendezeiro’ (Brioso *et al.*, 2003), ‘superbrotamento de *Hibiscus*’ (Montano *et al.*, 2001b), ‘superbrotamento da bucha’ (Montano *et al.*, 2003), ‘superbrotamento de begônia’ (Ribeiro *et al.*, 2006), ‘envassouramento do ipê rosa’ (Pimentel *et al.*, 2007), ‘superbrotamento da fava d’anta’ (Montano *et al.*, 2007d), dentre outras.

Uma das doenças mais importantes do milho e de natureza fitoplasmática é o ‘enfazamento vermelho do milho’, que no Brasil causa grandes perdas, ocasionando muitas vezes reduções de até 100% da produção. Os sintomas da infecção por fitoplasma consistem em avermelhamento dos bordos foliares, proliferação de espigas mal formadas, enfazamento (nanismo) generalizado e perfilhamento na base da planta. Essa doença ocorre com maior frequência e, é mais destrutiva do que o ‘enfazamento pálido’, nas regiões de clima quente e úmido (Oliveira *et al.*, 1998; Massola, 1998). Em variedades e híbridos cultivados no Brasil, o fitoplasma associado ao ‘enfazamento vermelho do milho’ é afiliado ao grupo I-B (Bedendo *et al.*, 1997; Bedendo *et al.*, 2000).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de maracujá (*Passiflora edulis*), sendo o maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* D.) o mais cultivado e responsável por aproximadamente 95% da produção brasileira. O ‘superbrotamento do maracujazeiro’ associado a fitoplasmas é uma das doenças mais importantes desta cultura, tendo sido relatada pela primeira vez no Estado de Rio de Janeiro em 1981 por Kitajima. As plantas de maracujá infectadas com esse fitopatógeno exibem sintomas de clorose generalizada, superbrotamento de ramos, aumento do cálice floral, esterilidade e rachadura de frutos. As folhas se apresentam de tamanho pequeno,

aspecto coreáceo, quebradiças e com as nervuras visivelmente mais grossas. O crescimento dos ramos é reduzido, tornando-se eretos e com os internódos curtos. A produção é afetada visivelmente pelo abortamento floral e pela queda prematura dos frutos formados. Segundo Ribeiro (2008), o fitoplasma associado ao ‘superbrotamento do maracujazeiro’ pertence ao grupo 16SrIII.

Euphorbia pulcherrima Wild. Klotz (*Euphorbiaceae*) é popularmente conhecida como bico-de-papagaio ou poinsettia, no Brasil. É uma espécie muito utilizada para fins decorativos e ornamentais. Nos Estados Unidos da América, *E. pulcherrima* é uma das principais espécies ornamentais, com produção total estimada em US\$ 325 milhões, em 1997 (Lee, 2000).

Na condição de planta nativa, as poinsettias apresentam-se como árvores altas e de crescimento ereto. Dois morfotipos de poinsettia são cultivados comercialmente: um deles é caracterizado por forte dominância apical e presença de poucos ramos axilares e flores (brácteas, na realidade); o outro tem como características a fraca dominância apical e a produção de muitos ramos axilares e flores (Lee *et al.*, 1997).

A proliferação de ramos axilares em poinsettia está diretamente relacionada com a presença de fitoplasma (Nicolaisen, 2001), tornando as plantas mais atrativas. Lee *et al.* (1997; 1998) estudaram o DNA ribossomal de fitoplasmas, a partir de vinte cultivares de poinsettia, observando que o fitoplasma predominante encontra-se inserido no grupo 16SrIII, subgrupo H.

No Estado do Rio de Janeiro, a presença de fitoplasma foi observada em plantas envasadas de bico-de-papagaio com proliferação de ramos axilares, constatando-se a presença do organismo através de PCR e *nested* PCR (Pereira *et al.*, 2006).

Outra espécie de uso ornamental é *Catharanthus roseus* (*Apocynaceae*), conhecida popularmente como vinca ou boa-noite. É utilizada, além disso, para obtenção de metabólitos secundários, com finalidade medicinal.

C. roseus é considerada hospedeira experimental universal de fitoplasmas, sendo também hospedeira natural de diferentes fitoplasmas (Bertaccini, 2007). No Brasil, há relatos de infecção natural de fitoplasma em *C. roseus*, em plantas exibindo sintomas de envassouramento ou virescência (Barros *et al.*, 1998; Bedendo *et al.*, 1999; Montano *et al.*, 2001a, Montano *et al.*, 2001b).

Objetivou-se com o presente trabalho:

Estudar a variabilidade de fitoplasmas em diferentes espécies botânicas mediante a detecção e identificação molecular de fitoplasmas em plantas sintomáticas de milho, maracujá, poinsétia e *C. roseus*.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Coleta de amostras vegetais

Amostras de diferentes espécies botânicas apresentando sintomas de fitoplasmoses foram coletadas em diferentes cidades do Brasil, para detecção de fitoplasmas mediante análise do PCR e *nested* PCR. Essas amostras consistiram de maracujá (Araruama, RJ), *C. roseus* (Saquarema, RJ), milho (Brasília, DF) e poinsétia (Nova Iguaçu, RJ).

O material vegetal coletado foi armazenado à - 20 °C, e posteriormente, submetido à extração de ácido nucléico total.

5.2.2 Extração de ácido nucléico total de material vegetal

A extração de ácido nucléico total das amostras de tecido vegetal se realizou segundo o protocolo de Montano *et al.* (2000b).

Um grama de tecido foliar de plantas infectadas foi macerado na presença de nitrogênio líquido e homogeneizado em 4 ml de tampão de maceração (100 mM K₂HPO₄; 31 mM KH₂PO₄; 10 % sacarose; 2 % PVP-40; 10 mM EDTA, pH 8). A solução foi filtrada com gaze e submetida à centrifugação a 2500 x g por, 5 minutos e, após a recuperação do sobrenadante, novamente centrifugada a 15000 x g, por 30 minutos, para formação do 'pellet'. Os ácidos nucléicos foram extraídos a partir dos 'pellets' com 750 µl de tampão de extração (2 % (p/v) 'hexadecyltrimethyl ammonium bromide' [CTAB], 100 mM Tris-HCl, pH 8; 20 mM EDTA, pH 8; 1,4 M NaCl; 2 % PVP-40), previamente aquecido a 60 °C, seguido de incubação a 60 °C, por 30 minutos. As amostras foram extraídas com 750 µl da mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e centrifugadas a 15000 x g, por 5 minutos. A fase aquosa superior foi coletada e os ácidos nucléicos precipitados 'overnight' pela adição de 0,6 volumes de isopropanol frio, a - 20 °C. Os ácidos nucléicos foram coletados mediante centrifugação de 15000 x g, por 30 minutos. O 'pellet' foi lavado com etanol 70 % frio, seco e ressuspenso em 200 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1mM EDTA, pH 8). Adicionou-se um volume igual da mistura fenol:

clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). A amostra foi centrifugada a 15000 x g, por 30 minutos, ao final da qual se recuperou o sobrenadante, submetendo-o à extração com 1 volume de clorofórmio. A mistura sofreu centrifugação a 15000 x g, por 5 minutos, recuperando-se a fase aquosa. Os ácidos nucléicos foram precipitados mediante acréscimo de etanol absoluto frio, e posteriormente coletados por centrifugação a 15000 x g, por 30 minutos. O 'pellet' obtido foi lavado com etanol 70 % frio, seco e ressuspenso em 50 µl de tampão TE e mantido a - 20 °C.

Os DNAs extraídos foram utilizados em reações de PCR, para amplificação de seqüências genômicas de fitoplasmas.

5.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR) e nested PCR

Dois pares de oligonucleotídeos, P1/P7 (P1 = 5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3', e P7 = 5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3') (Deng & Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) e R16F2n/R2 (R16 F2n = 5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3', e R16 R2 = 5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3') (Gundersen & Lee, 1996), foram usados na amplificação das seqüências 16S rDNA (16S rRNA) de fitoplasma, em reações de *nested* PCR.

Amostras de DNA foram diluídas 1:10, utilizando-se como DNA molde uma alíquota correspondente a 1 µl. A reação foi efetuada em tubos de polipropileno de 0,2 ml, com um volume final de 25 µl, como descrito por Gundersen & Lee (1996). Os componentes da reação consistiram em dNTPs (concentração final de 200 µM), *primer sense* (concentração final de 0,4 µM), *primer anti-sense* (concentração final de 0,4 µM), tampão 10 X PCR e *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), na concentração final de 0,625 U. A reação de PCR foi realizada em termociclador programável, perfazendo um total de 35 ciclos nas seguintes condições: desnaturação 1 minuto (2 minutos no primeiro ciclo) a 94 °C, anelamento por 2 minutos a 55 °C, e extensão por 3 minutos (7 minutos no ciclo final) a 72 °C. Os controles negativos consistiram da mistura dos componentes da reação do PCR, desprovidos de DNA.

Produtos de PCR amplificados pelo par de oligonucleotídeos P1/P7 foram diluídos 1: 50 e utilizados como molde para a reação de *nested* PCR, usando-se o par de oligonucleotídeos R16F2n/R2, nas mesmas condições anteriormente descritas.

Produtos de PCR amplificados pelo par de oligonucleotídeos P1/P7 foram diluídos 1: 50 e utilizados como molde para a reação de *nested* PCR, usando-se o par de oligonucleotídeos R16F2n/R2, nas mesmas condições anteriormente descritas.

Os controles positivos nas reações de PCR e *nested* PCR consistiram na mistura de reação com DNA diluído de fitoplasma extraído de fava d'anta (*Dimorphandra gardneriana*). Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v), na presença de tampão de corrida TAE 1X, à voltagem constante de 65 volts, por 1,6 hora, à temperatura ambiente, adotando-se como padrão de tamanho molecular, o padrão 1 kb DNA "Ladder" (Invitrogen). Bandas de material amplificado foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989).

5.2.4 Nested PCR com pares de oligonucleotídeos específicos aos grupos I e III

Testes de *nested* PCR foram efetuados empregando-se como molde, o DNA amplificado pelo par de primers P1/P7, diluído 1: 50. Na reamplificação por *nested* PCR foram empregados os pares de oligonucleotídeos específicos aos grupos 16SrI e 16SrIII (Lee *et al.*, 1994). Os *primers* específicos para o grupo 16SrI (fitoplasmas do grupo do "aster yellows") são R16(I)F1 (5'-TAAAAGACCTAGCAATAGG-3') e R16(I)R1 (5'-CAATCCGAACTGAGACTGT-3'), os quais foram utilizados em *nested* PCR para amostras sintomáticas de milho.

Para o grupo 16SrIII (fitoplasmas do grupo do "X-disease"), os *primers* específicos são R16(III)F2 (5'-AAGAGTGGAAAACTCCC-3') e R16(III)R1 (5'-TCCGAACTGAGATTGA-3'), empregados em *nested* PCR para amostras sintomáticas de maracujá, poinsettia e *C. roseus*.

As condições adotadas para o teste de *nested* PCR e para a análise dos produtos amplificados foram às mesmas descritas no item anterior.

5.2.5 Seqüenciamento de DNA

O objetivo do seqüenciamento consistiu na confirmação da identidade do fitoplasma nas amostras sintomáticas de maracujá e *C. roseus*.

As amostras de DNA extraídas de plantas sintomáticas de *C. roseus* e, de *Cuscuta* sp. foram enviadas ao Molecular Plant Pathology Laboratory, Agricultural Research Service (ARS), United States Department of Agriculture (USDA), em Maryland.

Produtos oriundos de *nested* PCR com os *primers* PI/P7 e F2n/R2 (Gundersen & Lee, 1996) foram submetidos à limpeza com “Qiaquick PCR Purification Kit” (Qiagen, Valencia, CA).

Na reação de seqüenciamento utilizou-se “Perkin-Elmer/Applied biosystem’s AmpliTaq-FS DNA polymerase” e “big Dye terminators with Dntp” e, os seguintes pares de *primers*: R16F2n e R16R2 (Gundersen & Lee, 1996), e R16F4 (5’ – TGG TAG TCC ACG CCG TAA -3’) (Davis & Lee, 1993) e R16R4 (5’ –TTA CGG CGT GGA CTA CCA GGG -3’) (Gundersen *et al.*, 1994).

O seqüenciamento do 16S rDNA de fitoplasmas foi realizado em seqüenciador automático, utilizando-se o “Applied Biosystems DNA sequencer” (modelo 3730), no “DNA Sequencing Facility”, localizado no “The Center for Biosystems Research, University of Maryland Biotechnology Institute, College Park, Maryland.

As seqüências obtidas foram comparadas entre si e com seqüências depositadas no *Gene Bank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), pelo alinhamento múltiplo, utilizando-se o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

5.3 Resultados

5.3.1 Detecção de fitoplasmas mediante PCR e *nested* PCR

Demonstrou-se a presença de fitoplasmas em plantas sintomáticas de milho, maracujá, poinsetia e *C. roseus* (Figura 1), pela obtenção de fragmentos de 1,2 kb, correspondente à seqüência amplificada do 16S rDNA desses organismos, em reação de PCR com os iniciadores universais (Figura 2, Figura 3 e Figura 4).



Figura 1. Plantas sintomáticas de *C. roseus* e *Euphorbia pulcherrima* infectadas com fitoplasmas. **A:** *C. roseus* com sintoma de envassouramento e clorose. **B:** Poinsettia com proliferação de ramos.

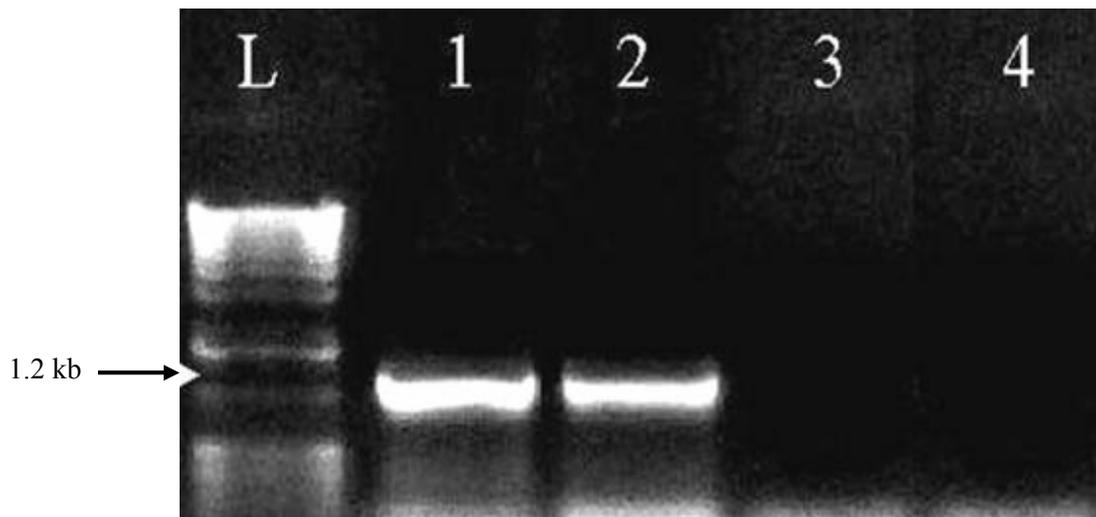


Figura 2. *Nested* PCR com *primers* P1/P7 e R16F2n/R2 em amostra poinsettia, naturalmente infectada por fitoplasma, com produto amplificado de 1,2 kb.. **L:** 1kb DNA “ladder”. **1:** chuchu com ChWBIII (controle positivo). **2:** poinsettia com proliferação de ramos. **3-4:** produto de PCR sem DNA molde, controle negativo.

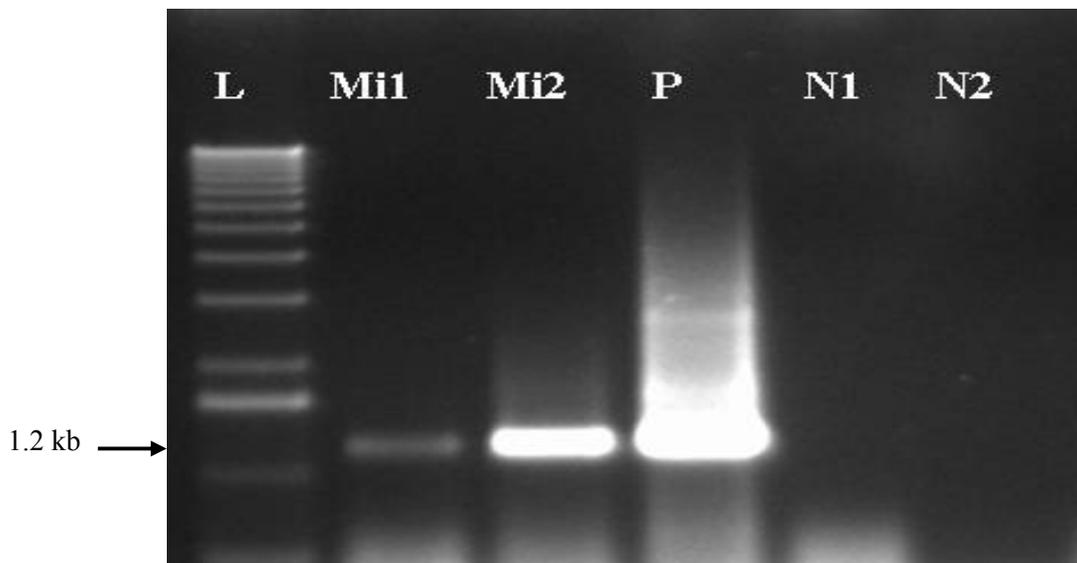


Figura 3. *Nested* PCR com *primers* universais P1/P7 e F2n/R2. de amostras de milho com sintomas do ‘enfazamento vermelho’ **L:** 1 kb “ladder” **Mi1, Mi2:** tecido foliar de milho infectado **P:** controle positivo, DNA do fitoplasma de *Dimorphandra gardneriana*. **N1, N2:** controle negativo (mistura de reação desprovida de DNA).

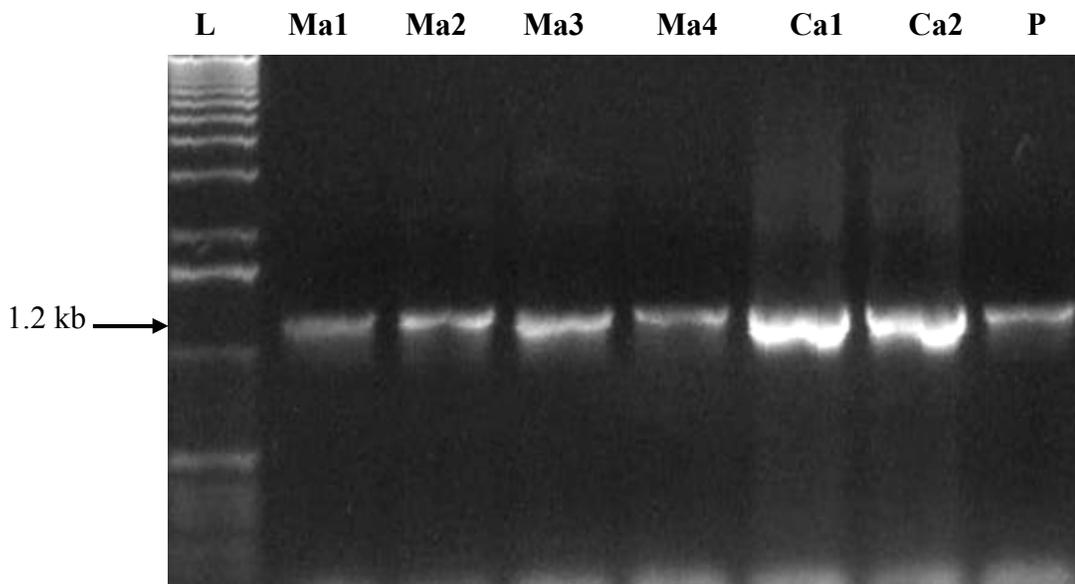


Figura 4. *Nested* PCR com *primers* universais P1/P7 e F2n/R2. de amostras de maracujá e de *C. roseus*. infectadas com fitoplasmas **L:** 1 kb “ladder” **Ma1-Ma4:** amostras de maracujá. **Ca1, Ca2.** amostras de *C.roseus*. **P:** controle positivo, DNA do fitoplasma de *Dimorphandra gardneriana*.

5.3.2 *Nested* PCR com pares de oligonucleotídeos específicos aos grupos I e III

Amostras de plantas sintomáticas de milho que resultaram positivas em *nested* PCR com os *primers* universais foram testadas quanto à presença de fitoplasma do grupo 16SrI. Na reamplificação por *nested* PCR com *primers* específicos ao grupo 16SrI, não se observaram produtos amplificados (dados no mostrados).

As amostras sintomáticas de maracujá, poinsettia e *C. roseus* que resultaram positivas em *nested* PCR com os *primers* universais, a reamplificação, por *nested* PCR com *primers* específicos ao grupo 16SrIII, mostrou amplicons de aproximadamente 0,8 kb, característicos de fitoplasmas pertencentes a esse grupo (Figura 5 e Figura 6).

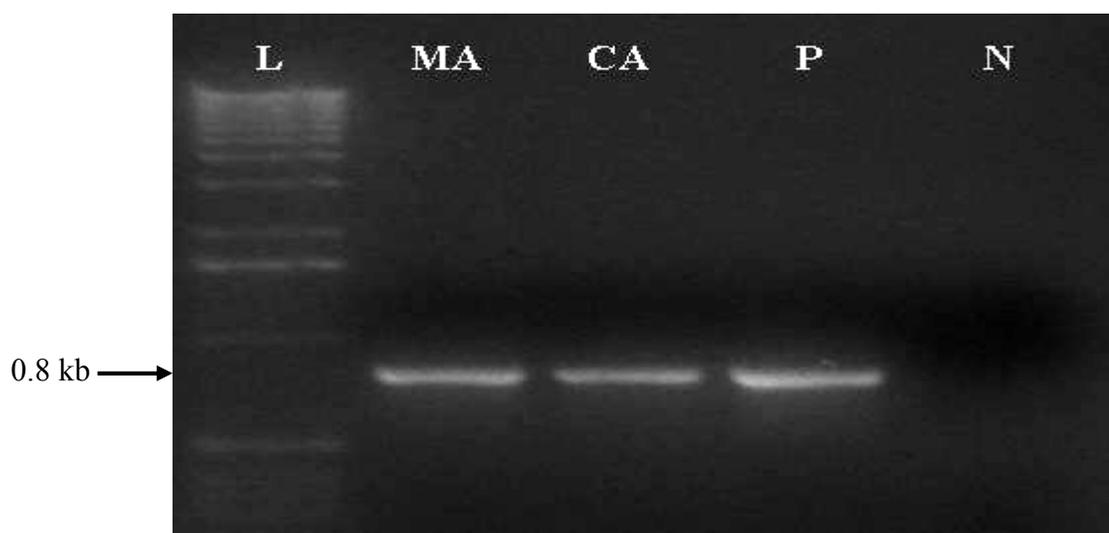


Figura 5. *Nested* PCR com *primers* P1/P7 e R16(III)F2/R1 em amostras de maracujá e *C. roseus* com fitoplasma, com produto amplificado de 0,8 kb L: 1 kb “ladder”. MA: amostra de maracujá infectado com fitoplasma. CA: amostras de *C. roseus* com sintomas de envassouramento P: controle positivo, DNA do fitoplasma de *Dimorphandra gardneriana*. N: controle negativo (mistura de reação desprovida de DNA).

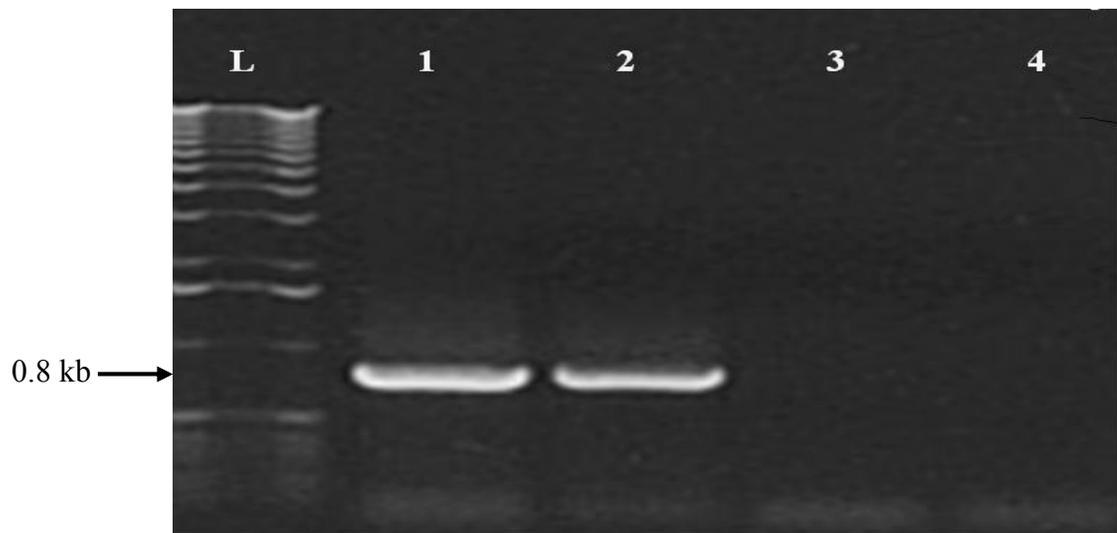


Figura 6. *Nested* PCR com *primers* P1/P7 e R16(III)F2/R1 em amostra de poinsettia naturalmente infectada por fitoplasma, com produto amplificado de 0,8 kb. **L:** 1kb “ladder”. **1:** chuchu com ChWBIII (controle positivo). **2:** poinsettia com proliferação de ramos. **3-4:** produto de PCR sem DNA molde, controle negativo

5.3.3 Identificação de fitoplasma através da análise de seqüências de nucleotídeos

As seqüências obtidas no presente trabalho, com os *primers* adotados apresentam 1221 pares de base. Essas seqüências foram comparadas entre si e com as seqüências de ‘chayote witches’ broom phytoplasma’ (ChWBIII estirpe Ch10 (AF47706)) e ‘passion fruit proliferation phytoplasma’ (EU499627), ambos afiliados ao grupo 16SrIII, depositadas no *Gene Bank*. A porcentagem de similaridade entre as seqüências foi determinada, com alinhamento múltiplo (Tabela 1).

A comparação entre as seqüências de fitoplasmas de maracujá e de *C. roseus* resultou em 99% de similaridade. O mesmo percentual (99%) foi obtido com as seqüências de fitoplasmas de maracujá e de *C. roseus*, quando comparadas isoladamente com seqüência do fitoplasma ChWBIII, estirpe Ch10 (AF 47706) (Tabela 1).

Ao se comparar, isoladamente, as seqüências de nucleotídeos dos fitoplasmas obtidas em maracujá e *C. roseus* (presente trabalho) e, a seqüência de ‘passion fruit proliferation phytoplasma’ (EU499627), depositada no *GenBank*, a porcentagem de similaridade foi de 98% (Tabela 1).

Tabela 1 - Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos do gene 16Sr DNA de fitoplasmas de maracujá e *C. roseus* (presente trabalho).

Estirpes	ChWBIII, estirpe Ch10 (AF47706)	'Passion fruit' (EU 499627)	Maracujá (presente trabalho)
'Passion fruit' (EU 499627)	99	--	--
Maracujá (presente trabalho)	99	98	--
<i>C. roseus</i> (presente trabalho)	99	98	99

No presente trabalho, a comparação de seqüências do fitoplasma isolado de maracujá mostrou que o referido isolado apresenta maior similaridade com o fitoplasma ChWBIII (99%) do que com o fitoplasma de 'passion fruit proliferation' (98%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos do gene 16Sr DNA de fitoplasma de maracujá (presente trabalho) e de outros fitoplasmas.

Estirpes	ChWBIII, estirpe Ch10(AF47706)	'Passion fruit' (EU 499627)
'Passion fruit' (EU 499627)	99	--
Maracujá (presente trabalho)	99	98

5.4 Discussão

A amplificação de fragmentos genômicos do 16 S rDNA de fitoplasmas por PCR e *nested* PCR, com os primers universais específicos para fitoplasmas, resultou em amplicons de 1,2 kb, nas amostras de plantas de milho, maracujá, poinsettia e *C. roseus* com sintomas de fitoplasmoses.

Esses resultados comprovam a presença de fitoplasmas em associação às plantas doentes, e encontram-se em consonância com relatos de outros autores, quanto a presença de fitoplasmas associados a tais espécies botânicas (Bedendo *et al.*, 1997; Barros *et al.*, 1998; Montano *et al.*, 2001a; b; Pereira *et al.*, 2006; Ribeiro & Bedendo, 2006; Ribeiro, 2008a).

Amostras foliares de maracujazeiro com sintomas típicos do ‘superbrotamento do maracujazeiro’ exibiram produtos amplificados de aproximadamente 0,8 kb, em *nested* PCR com os *primers* específicos ao grupo 16SrIII. Esse resultado foi confirmado pela análise da seqüência do fitoplasma, quando comparado com seqüências conhecidas de fitoplasmas do grupo III. Estudos realizados por Ribeiro (2008a) demonstraram que o fitoplasma associado ao maracujazeiro pertence ao grupo 16SrIII, coincidindo com os dados obtidos no presente trabalho.

O fitoplasma presente em plantas de poinsettia com proliferação de ramos foi identificado como pertencente ao grupo 16SrIII, através do teste de *nested* PCR com os *primers* específicos. O efeito bem conhecido da infecção por fitoplasma em poinsettia, denominado de “free-branching”, que é manifestado pela fraca dominância apical, resultando na formação de gemas axilares e plantas altamente ramificadas, as quais apresentam entre-nós curtos, faz com que seja considerado o único fitoplasma que induz qualidades benéficas para a exploração comercial dessa espécie (Lee *et al.*, 1997; Bradel *et al.*, 2000).

Outro fitoplasma identificado no presente estudo, isolado de amostras de *C. roseus* apresentando envassouramento e clorose, pertence ao grupo 16SrIII, de acordo com *nested* PCR com *primers* específicos. A análise da seqüência do fitoplasma associado a *C. roseus* doente corroborou que o agente causal encontra-se afiliado ao grupo III. Fitoplasmas pertencentes ao mesmo grupo ou subgrupo podem induzir sintomas diferentes na mesma espécie botânica. Assim, em *C. roseus* detectou-se fitoplasma do grupo 16SrIII em amostras provenientes de plantas com envassouramento (esse trabalho), bem como em amostras de plantas com virescência (Montano *et al.*, 2001a).

As seqüências de fitoplasmas de maracujá e de *C. roseus* apresentaram 99% de similaridade, quando comparadas entre si e, quando comparadas isoladamente com a seqüência do ChWBIII, estirpe Ch10. Esses resultados demonstram que os fitoplasmas de maracujá e de *C. roseus*, no presente trabalho, estão afiliados ao grupo 16SrIII e, corroboram os dados provenientes de *nested* PCR com *primers* específicos ao grupo 16SrIII.

Comparação entre as seqüências de nucleotídeos dos fitoplasmas de maracujá e *C. roseus* e, o ‘passion fruit proliferation phytoplasma’, revelou uma porcentagem de similaridade igual a 98% e, portanto, menor do que a similaridade existente entre os fitoplasmas mencionados e o ChWBIII, estirpe Ch10.

Em países tropicais, como no caso do Brasil, observa-se a predominância de fitoplasmas afiliados aos grupos 16SrI e 16SrIII, associados a diferentes espécies botânicas (Lee *et al.*, 2000b).

No presente estudo, a identificação de fitoplasma em maracujá, poinsetia e *C. roseus* (16SrIII) corrobora que a distribuição desse grupo no país encontra-se em distintas espécies de plantas.

Os resultados obtidos nesse trabalho contribuem com futuros estudos epidemiológicos relacionados a essas doenças associadas a fitoplasmas.

5.5 Referências bibliográficas

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

BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Molecular evidence for the presence of maize bushy stunt phytoplasma in corn in Brazil. **Plant Disease**, v.81, p.957, 1997.

BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Detecção e caracterização de fitoplasma em plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) e de pimenta (*Capsicum frutescens*) através das técnicas de duplo PCR e de RFLP. **Summa Phytopathologica** v.25, p.197-201, 1999.

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

BRADEL, B. G.; PREIL, W. & JESKE, H. Remission of the free-branching pattern of *Euphorbia pulcherrima* by tetracycline treatment. **Journal of Phytopathology**, v.148, p.587-590, 2000.

KITAJIMA, E.W. O irizado do chuchuzeiro e o superbrotamento do maracujá: duas enfermidades associadas a microorganismos do tipo micoplasmas constatadas nos Estados de Rio de Janeiro e Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, p.155-122, 1981.

LEE, I.-M. Phytoplasma casts a magic spell that turns the fair poinsettia into a Christmas showpiece. **Plant Health Progress**. 2000. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/poinsettia/>>. Acesso em: 20 abr. 2007.

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

LEE, I. -M.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E.; DAVIS, R. E. & BARTOSZYK, I. M.; Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.1153-1169, 1998.

MASSOLA JÚNIOR, N.S. **Avaliação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido na cultura do milho**. 1998, 75p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

MONTANO, H. G.; CURE, C. A. M.; CUNHA JUNIOR, J. O. & BRIOSO, P. S. T. 16S rRNA III phytoplasma associated with *Catharanthus roseus* virescence in Rio de Janeiro. *In*: Resumos do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, p.22, 2001a.

MONTANO, H. G.; DAVIS, R. E.; DALLY, E. L.; PIMENTEL, J. P. & BRIOSO, P. S. T. First report of natural infection by ‘*Candidatus* Phytoplasma brasiliense’ in *Catharanthus roseus*. **Plant Disease**, v.85, p.1209, 2001b.

NICOLAISEN, M. Report on a literature study on *status quo* of the knowledge on phytoplasma with the focus on *Euphorbia pulcherrima* and other ornamental plants. Community Plant Variety Office (CPVO), Angers, France. 31p. Report. 2001.

OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J.M.; FERNANDES, F.T.; PAIVA, E.; RESENDE, R.O.; KITAJIMA, E.W. Enfezamento pálido e enfezamento vermelho na cultura do milho no Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p.45-47, 1998.

PEREIRA, R. C.; JIMÉNEZ, N. Z. A.; NASCIMENTO, R. R. S.; BRIOSO, P. S. T. & MONTANO, H. G. Fitoplasma associado à “proliferação de poinsettia” em plantas envasadas de *Euphorbia pulcherrima*. XVI Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ. Em CD. 2006.

RIBEIRO, L. F. C. **Fitoplasma do superbrotamento do maracujazeiro: identificação molecular, análise filogenética e prova de patogenicidade**. 2008. 59p. Tese (Doutorado em Agronomia, Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Piracicaba, 2008.

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

6 CONCLUSÕES

Com base no estudo desenvolvido na presente pesquisa, envolvendo a investigação da transmissibilidade do fitoplasma do ‘superbrotamento do chuchuzeiro’ (ChWBIII) e a variabilidade de fitoplasmas associados a diferentes espécies botânicas incitando enfermidades de importância econômica, foi possível traçar as seguintes conclusões:

- (a) Determinou-se transmissibilidade de ChWBIII para a hospedeira experimental *C. roseus*, sendo possível realizar a transmissão inversa do fitoplasma por *Cuscuta* e, também mediante enxertia.
- (b) A adoção de tecido desidratado preservado demonstrou-ser viável para a detecção de fitoplasma, sugerindo a possibilidade de uso desse tipo de amostras para outras espécies botânicas afetadas por fitoplasmoses
- (c) A presença de fitoplasma em sementes de frutos sintomáticos, provenientes de plantas de melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia*) infectadas com o ChWBIII demonstra a transmissão do fitoplasma da planta mãe para as sementes.
- (d) A diversidade de plantas hospedeiras de fitoplasmas foi verificada em milho, maracujá, poinsétia e *C. roseus*, o que revela a importância dessas plantas como repositório de fitoplasmas que podem causar perdas nas culturas.
- (e) Os resultados obtidos no presente estudo possibilitam o maior entendimento epidemiológico das enfermidades incitadas por fitoplasmas e podem auxiliar na descoberta de insetos vetores e de plantas hospedeiras alternativas, favorecendo o estabelecimento de estratégias de controle dessas doenças.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDAGHI, M. *et al.* Study on diverse grafting techniques for their capability in rapid and efficient transmission of apple proliferation disease to different host plants. **Bulletin of Insectology**, Italia, v.60, n.2, p.381-382, 2007.

ALMA, A. *et al.* Mixed infection of grapevines in northern Italy by phytoplasmas including 16S rRNA RFLP subgroup 16SrI-B strains previously unreported in this host. **Plant Disease**, v.80, p.418–421, 1996.

AROCHA, Y. *et al.* ‘*Candidatus* Phytoplasma lycopersici’, a phytoplasma associated with ‘hoja de perejil’ disease in Bolivia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.57, p.1704–1710, 2007.

AROCHA, Y. *et al.* ‘*Candidatus* Phytoplasma graminis’ and ‘*Candidatus* Phytoplasma caricae’, two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.55, p.2451–2463, 2005.

BAI, X. *et al.* Living with Genome Instability: the Adaptation of Phytoplasmas to Diverse Environments of Their Insect and Plant Hosts. **Journal of Bacteriology**, v.188, n.10, p.3682-3696, May. 2006.

BEDENDO, I.P. Vírus. *In*: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. 3ra. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1. p.132-160.

BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Detecção e identificação molecular de fitoplasmas associados ao superbrotamento e virescência de vinca e ao enfezamento de pimenteira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasil, v.24, p.365, 1999.

BEDENDO, I.P. *et al.* Detecção molecular de fitoplasma associado ao superbrotamento do maracujazeiro. **Summa Phytopathologica**, Brasil (Jaboticabal), v.26, n.1, p.134, 2000.

BEEN, B.O. Integrated pest management for the control of lethal yellowing: quarantine, cultural practices and optimal use of hybrids. *In* OROPEZA, C. *et al.* **Lethal Yellowing: Research & Practical Aspects**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995, p.101-109.

BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 919 p.

BERGES, R.; ROTT, M.; SEEMÜLLER, E. Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. **Phytopathology**, v. 90, p.1145-1152, 2000.

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

BERTACCINI, A. *et al.* Detection of chrysanthemum yellows mycoplasma-like organism by dot hybridization and Southern blot analysis. **Plant Disease**, v.74, p.40–43, 1990.

BIANCHI, L. **Identificação molecular de isolados do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho coletados no estado de São Paulo**. 2001. 44p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.

BOBEN, J.; MEHLE, N.; RAVNIKAR, M. Optimization of extraction procedure can improve phytoplasma diagnostics. **Bulletin of Insectology**, Italia, v.60, n.2, p.249-250, 2007.

BOTTI, S.; BERTACCINI, A. Variability and functional role of chromosomal sequences in 16SrI-B subgroup phytoplasmas including aster yellows and related strains. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.103–110, 2003.

BOUDON-PADIEU, E.; LARRUE, J.; CAUDWEL, A. ELISA and dot blot detection of Flavescence dorée-MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative state. **Current Microbiology**, v.9, p.357-364, 1989.

BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. Walled and wall-less eubacteria from plants: sieve-tube-restricted plant pathogens. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.52, p.7–16, 1998.

BRIOSO, P.S.T. *et al.* Fitoplasma do grupo 16S rRNA I associado ao amarelecimento fatal de *Elaeis guineensis*. **Summa Phytopathologica**, Brasil, (Jaboticabal), v.29, n.1, p.81, 2003.

CARRARO, L. *et al.* Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. **Journal of Plant Pathology**, v.80, p.233-239, 1998.

CHRISTENSEN, N.M. *et al.* Phytoplasmas and their interactions with hosts. **Plant Science**, v.10, n.11, p.526-535, Nov. 2005.

CHRISTENSEN, N.M. *et al.* Distribution of Phytoplasmas in Infected Plants as Revealed by Real-Time PCR and Bioimaging. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, n.11, p.1175–1184, 2004.

CHRISTENSEN, N.M. *et al.* Development of *Cuscuta* species on a partially incompatible host: induction of xylem transfer cells. **Protoplasma**, Áustria, v.220, p.131–142, 2003.

CORDOVA, I. *et al.* *In situ* PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. **Molecular Plant Pathology**, v.4, n.2, p.99–108, 2003.

COSTA, H.; MATSUOKA, K.; VENTURA, J.A. Superbrotamento do chuchuzeiro no estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasil (Brasília), v.18, p. 329, ago. 1993.

DANIELLI, A. *et al.* Detection and molecular characterization of phytoplasmas in the planthopper *Metcalfa pruinosa* (Say) (Homoptera: Flatidae). **Phytopathologia Mediterranea**, Italia, v.35, p.62-75, 1996.

D'ARCY, C.J.; NAULT, L.R. Insect transmission of plant viruses and mycoplasma-like and rickettsia-like organisms. **Plant Disease**, v.66, p.99-104, 1982.

DAVIES, D.L. *et al.* Parry's disease of pears is similar to pear decline and is associated with mycoplasma-like organisms transmitted by *Cacopsylla pyricola*. **Plant Pathology**, v.41, p.195-203, 1992.

DAVIS, M.J. *et al.* Cloning of chromosomal and extrachromosomal DNA of the mycoplasma-like organism that causes maize bushy stunt disease. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.1, p.295-302, 1988.

DAVIS, R.E. Fitoplasmas: Fitopatógenos procarióticos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodes. Tradutor BEDENDO, I.P. *In Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Brasil, v.3, 1995. p.1-24.

DAVIS, R.E.; LEE, I.-M. Cluster-Specific Polymerase Chain Reaction Amplification of 16S rDNA Sequences for Detection and Identification of Mycoplasma-like Organisms. **Phytopathology**, v.83, p.1008-1011, 1993.

DAVIS, R.E. *et al.* Phytoplasmas associated with grapevine yellows in Virginia belong to group 16SrI, subgroup A (tomato big bud phytoplasma subgroup), and group 16SrII, new subgroup I. **Vitis**, v.37, p.131-137, 1998.

DAVIS, R.E. *et al.* "*Candidatus* Phytoplasma australiense," a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Great Britain, v.47, p.262-269, 1997.

DENG, S.; HIRUKI, C. Genetic relatedness between two non-culturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. **Phytopathology**, v.81, p.1475-1479, 1991.

DOI, Y.-M. *et al.* Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. **Annual Phytopathology Society of Japan**, Japon, v.33, p.259-266, 1967.

FRÁNOVÁ, J. *et al.* Experiences with phytoplasma detection and identification by different methods. **Bulletin of Insectology**, Italia, v.60, n.2, p.247-248, 2007.

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

FLETCHER, J. Interactions of Phytopathogenic *Mollicutes* with insect and plant hosts. *In: First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes*, 2000, Londres, p.37-40.

FOS, A. *et al.* Use of a monoclonal antibody to detect stolbur mycoplasma-like organism in plants and insects and to identify a vector in France. **Plant Disease**, v.76, p.1092-1096, 1992.

FOX, G.E.; WISOTZKEY, J.D.; JURTSUK, P.Jr. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Great Britain, v.42, p.166–170, 1992.

GARNIER, M. *et al.* Mycoplasmas, plants, insect vectors: a matrimonial triangle. **Life Sciences**, Paris, n.324, p.923-928, 2001.

GRIFFITHS, H.M. *et al.* The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches'-broom: 'Candidatus Phytoplasma fraxini'. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Great Britain, v.49, p.1605–1614, 1999.

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

GUNDERSEN, D.E. *et al.* Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.5244-5254, 1994.

HARRIES, H.C. Coconut varieties and lethal yellowing: A regional perspective for the Americas. **PALMS**, v.45, n.3, p.148-150, 2001.

HARRIS, K.F. Aphids, leafhoppers and planthoppers. *In*: HARRIS, K.F.; MARAMOROSCH, K. **Vectors of Plant Pathogens**. New York: Academic Press, 1980. p.1-13.

HARRISON, N.A.; TSAI, J.H.; RICHARDSON, P.A. Etiological and epidemiological investigations of periwinkle witches'-broom disease in Florida. **IOM Letters**, v.4, p.197-198, 1996.

HIBBEN, C.R. *et al.* Relatedness of mycoplasma-like organisms associated with ash yellows and lilac witches'-broom. **Plant Disease**, v.75, p.1227–1230, 1991.

HIRUKI, C.; WANG, K. Clover proliferation phytoplasma: 'Candidatus Phytoplasma trifolii'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.54, p.1349–1353, 2004.

HOGENHOUT, S.A. *et al.* Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. **Molecular Plant Pathology**, v.9, n.4, p.403-423, 2008.

HOSHI, A. *et al.* Host-parasite interaction of phytoplasmas from a molecular biological perspective. **Bulletin of Insectology**, Italia, v.60, n.2, p.105-107, 2007.

HREN, M. *et al.* Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. **Plant Pathology**, v.56, p.785–796, 2007.

International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. Minutes of the interim meetings, 12 and 18 July, 1996, Orlando, Florida, USA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Great Britain, v.47, p.911-914, 1997.

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**, Great Britain, v.54, p.1243–1255, 2004.

JAGOUEIX-EVEILLARD, S. *et al.* *Catharanthus roseus* Genes Regulated Differentially by Mollicute Infections. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, n.2, p.225–233, 2001.

JOMANTIENE, R. *et al.* The distinctive morphology of ‘*Fragaria multicipita*’ is due to phytoplasma. **HortScience**, v.33, p.1069–1072, 1998.a.

JOMANTIENE, R. *et al.* 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**, Great Britain, v.48, p.269–277, 1998.b.

JUNG, H-Y. *et al.* ‘Candidatus Phytoplasma ziziphi’, a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches’-broom disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.53, p.1037–1041, 2003.a.

JUNG, H-Y. *et al.* ‘Candidatus Phytoplasma oryzae’, a novel phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.53, p.1925–1929, 2003.b.

JUNG, H-Y. *et al.* ‘Candidatus Phytoplasma castaneae’, a novel phytoplasma taxon associated with chestnut witches’ broom disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.52, p.1543–1549, 2002.

KHAN, A.J. *et al.* Molecular Identification of a New Phytoplasma Associated with Alfalfa Witches’-Broom in Oman. **Phytopathology**, v.92, n.10, p.1038-1047, 2002.

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

KITAJIMA, E.W., CHAGAS, C.M.; CRESTANI, O.A. Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiros no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasil (Brasília), v.11, n.3, p.409-432, out. 1986.

KITAJIMA, E.W.; ROBBS, C.F.; KIMURA, O. O ‘irizado do chuchuzeiro’ e o ‘superbrotamento do maracujá’: Duas enfermidades associadas a microrganismos do tipo micoplasma constatadas nos estados do Rio de Janeiro e Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasil (Brasília), v.6, p.115-122, fev. 1981.

KITAJIMA, E.W. *et al.* Ocorrência do irizado do chuchuzeiro na região de Amparo, São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasil (Brasília), v.24, p.467. 1999.

LEE, I-M.; DAVIS, R.E. Mycoplasmas which infect plants and insects. *In* MANILOFF, J. *et al.* **Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis**. Washington, DC: American Society Microbiology, 1992. p.379–390.a.

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

LEE, I-M.; DAVIS R.E.; HIRUKI C. Genetic relatedness among clover proliferation mycoplasma-like organisms (MLOs) and other MLOs investigated by nucleic acid hybridization and restriction fragment length polymorphism analyses. **Apply Environmental Microbiology**, v.57, p.3565–3569, 1991.

LEE, I-M. *et al.* Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Great Britain, v.48, p.1153–1169, 1998.

LEE, I-M. *et al.* Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. **Phytopathology**, v.85, p.728–735, 1995.a.

LEE, I-M. *et al.* Detection and characterization of phytoplasmas associated with disease in *Ulmus* and *Rubus* in Northern and Central Italy. **Phytopatologia Mediterranea**, Italia, v.34, p.174-183, 1995. b.

LEE, I-M. *et al.* Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. **Phytopathology**, v.84, p.559–566, 1994.

LEE, I-M. *et al.* Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. **Phytopathology**, v.83, p.834-842, 1993.a.

LEE, I-M. *et al.* Identification and analysis of a genomic strain cluster of mycoplasma-like organisms associated with Canadian peach (eastern) X-disease, western X-disease, and clover yellow edge. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.6694–6698, 1992.b.

LEE, I-M. *et al.* Prospects of DNA-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas. **Bulletin of Insectology**, Italia, v.60, n.2, p.239-244, 2007.

LEE, I-M. *et al.* Genetic relatedness of mycoplasma-like organisms detected in *Ulmus* spp. in USA and Italy by means of DNA probes and polymerase chain reactions. **Phytopathology**, v.83, p.829–833, 1993.b

LEE, I-M. *et al.* ‘Candidatus Phytoplasma asteris’, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.54, p.1037–1048, 2004.

LEE, I-M. *et al.* Phytoplasma induced free branching in commercial poinsettia cultivars. **Nature Biotechnology**, v.15, p.178–82, fev. 1997.

- LEE, I-M. *et al.* A genotype-based system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. **Phytopathology**, v.82, p.977–986, 1992.c.
- LEFOL, C. *et al.* Propagation of Flavescence dorée MLO (mycoplasma-like organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kbm. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.63, p.285–293, 1994.
- LHERMINIER, J. *et al.* Immunolabelling of grapevine Flavescence dorée MLO in salivary glands of *Euscelidius variegatus*: A light and electron microscopy study. **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, v.38, p.79–85, 1990.
- LIRA, R.S. **Chayote, *Sechium edule* (Jacq.) Sw.** Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 8. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research/International Plant Genetic Resources Institute, Rome (Italy), 1996. p.1–58.
- LOI, N. *et al.* Dodder transmission of two different MLOs from plum trees affected by a “leptoncrosis”. **Acta Horticulturae**, v.386, p.465–470, 1995.
- MAIXNER, M.; REINERT, W. *Oncopsis alni* (Schrank). Schneider, B.; Caudwell, (Auchenorrhyncha: Cicadellidae) as a vector of the alder yellows phytoplasma of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Eur. **Journal of Plant Pathology**, v.105, p.87–94, 1999.
- MAKISHIMA, N. Situação das cucurbitáceas no Brasil. **Horticultura Brasileira**. v.9, p.99–101, 1991.
- MARCONE, C.; SCHNEIDER, B.; SEEMÜLLER, E. ‘*Candidatus* Phytoplasma cynodontis’, the phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.54, p.1077–1082, 2004a.
- MARCONE, C. *et al.* Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. **Phytopathology**, v.89, p.805–810, 1999.
- MARCONE, C. *et al.* Genetic characterization and classification of two phytoplasmas associated with spartium witches’-broom disease. **Plant Disease**, v.80, p.365–371, 1996.
- MARTINEZ, S. *et al.* Is abscisic acid responsible for abnormal stomatal closure in coconuts palms showing lethal yellowing? **Journal of Plant Pathology**, v.156, p.319–322, 2000.
- MARZACHI, C.; VERATTI, F.; BOSCO, D. Direct PCR detection of phytoplasmas in experimentally infected insects. **Annals of Applied Biology**, Great Britain, v.133, p.45–54, 1998.
- McCOY, R.E. *et al.* Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In WHITCOMB, R.F.; TULLY, J.G. **The Mycoplasmas**. New York: Academic, 1989. v.5, p.545–560.
- MELLO, A.P.A. **Identificação molecular de fitoplasma associado ao enfezamento do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) e da berinjela (*Solanum melongena*).** 2003. 52p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

MONTANO, H.G. **Detecção, identificação e análise filogenética de fitoplasmas**. 2000. 123p. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2000.a.

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

MONTANO, H.G.; PIMENTEL, J.P.; BRIOSO, P.S.T. Detecção de fitoplasma afiliado ao grupo 16S rRNA III em chuchu-semente proveniente de plantas com superbrotamento do chuchuzeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasil (Jaboticabal), v.26 (supl), p.508, 2001.a.

MONTANO, H.G. *et al.* *Sicana odorifera* (Cucurbitaceae) a new phytoplasma host. **Bulletin of Insectology**, Italia, v.60, n.2, p.287-288, 2007.b.

MONTANO, H.G. *et al.* First report of group 16SrIII phytoplasma in loofah (*Luffa cylindrica*). **Bulletin of Insectology**, Italia, v.60, n.2, p.277-278, 2007.c.

MONTANO, H.G. *et al.* Identification and Phylogenetic Analysis of a New Phytoplasma from Diseased Chayote in Brazil. **Plant Disease**, v.84, n.4, p.429-436, avr. 2000.b.

MONTANO, H.G. *et al.* Phytoplasma in “fava d’anta” tree (*Dimorphandra gardneriana*) in Brazil. **Bulletin of Insectology**, Italia, v.60, n.2, p.147-148, 2007.d.

MONTANO, H.G. *et al.* ‘*Candidatus* Phytoplasma brasiliense’, a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches’ broom disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.51, p.1109–1118, 2001.b.

MORAN, N. A. Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. **Cell**, v.108, p.583-586, 2002.

NAMBA, S. Molecular Biological Studies on Phytoplasmas. **Journal of Genetic Plant Pathology**, v.68, p.257-259, 2002.

NAMBA, S. *et al.* Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Great Britain, v.43, p.461-467, 1993.

NERONI, R.C. **Detecção e identificação molecular de fitoplasmas associados ao amarelo da videira**. 2004. 46p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

NIELSON, M.W. Taxonomic relationships of leafhopper vectors of plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, p. 3–27, 1979.

NIEMARK, H; KIRKPATRICK, B.C. Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant pathogenic mycoplasma-like organisms. **Molecular Microbiology**, v.7, p.21–28, 1993.

OSHIMA, K.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; JUNG, H. Y.; WEI, W.; SUZUKI, S.; ARASHIDA, R.; NAKATA, D.; MIYATA, S.; UGAKI, M.; NAMBA, S. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. **Nature Genetics**, 36: 27-29, 2004.

OSLER, R. *et al.* First results to the trials in progress to identify the agent of a grapevine yellows in Italy. **Phytopathologia Mediterranea**, Italia, v.31, p.175-181, 1992.

PIMENTEL, J.P. *et al.* Envassouramento do ipê rosa (*Tabebuia pentaphylla*) enfermidade associada à fitoplasma no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasil, v.32, p.250, 2007.a.

PURCELL, A.H. Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.20, p.397-417, 1982.

RACCAH, B.; KLEIN, M. Transmission of the safflower phyllody mollicute by *Neolaiturus fenestratus*. **Phytopathology**, v.72, p.230-232, 1982.

RAZIN, S. Molecular biology and genomics of *Mollicutes*. **Bulletin of Insectology**, Italia, v.60, n.2, p.101-103, 2007.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathology of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.1094–1156, dez. 1998.

RIBEIRO, L. F. C. **Fitoplasma do superbrotamento do maracujazeiro: identificação molecular, análise filogenética e prova de patogenicidade**. 2008. 59p. Tese (Doutorado em Agronomia, Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Piracicaba, 2008.

RIBEIRO, L.F.C. *et al.* Phytoplasma associated with shoot proliferation in begonia. **Sci. Agric. Brasil (Piracicaba)**, v.63, n.5, p.475-477, Set./Out. 2006.

RIBEIRO, L.F.C. **Deteção e identificação molecular de um fitoplasma do grupo 16SrIII em plantas de maçã com sintomas de lenho mole**. 2003. 51p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SARINDU, N.; CLARK, M.F. Antibody production and identity of MLOs associated with sugarcane white leaf disease and Bermuda-grass white leaf disease in Thailand. **Plant Pathology**, v.42, p.396-402, 1993.

SAWAYANAGI, T. *et al.* 'Candidatus Phytoplasma japonicum', a new phytoplasma taxon associated with Japanese Hydrangea phyllody. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Great Britain, v.49, p.1275–1285, 1999.

SCHAAD, N.W.; FREDERICK, R.D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Canada, v.24; p.250-258, 2002.

SCHNEIDER, B. *et al.* 'Candidatus Phytoplasma pini', a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.55, p.303-307, 2005.

SCHNEIDER, B.; GIBB, K.S.; SEEMÜLLER, E. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor *Tu* gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. **Microbiology**, v.143, p.3381–89, 1997.

SCHNEIDER, B. *et al.* Classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. **Journal of Genetic Microbiology**, v.139, p.519–27, 1993.

SEDDAS, A. *et al.* Evidence for the physical integrity of flavescence dorée phytoplasmas purified by immunoaffinity from infected plants or leafhoppers and the plant pathogenicity of phytoplasmas from leafhoppers. **Plant Pathology**, v.44, p.971-978, 1995.

SEEMÜLLER, E. *et al.* Current status of molecular classification of the phytoplasmas. **Journal of Plant Pathology**, v.80, n.1, p.3-26, 1998.

SFORZA, R. *et al.* The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of bois noir of grapevine in France. **Journal of Phytopathology**, v.146, p.549-556, 1998.

TANNE, E. *et al.* Detection of Phytoplasma by Polymerase Chain Reaction of Insect Feeding Medium and Its Use in Determining Vectoring Ability. **Phytopathology**, v.91, n.8, p.741-746, 2001.

TORRES, E. *et al.* Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. **Molecular and Cellular Probes**, v.19, p.334–340, 2005.

TSAI, J.H. Vector transmission of mycoplasmal agents of plant diseases. *In*: WHITCOMB, R.F.; TULLY, J.G. **The Mycoplasmas**. New York: Academic. 1979. v.3, p.265–307.

VAUGHN, K.C. Dodder hyphae invade the host: a structural and immunocytochemical characterization. **Protoplasma**, Áustria, v.220, p.189–200, 2003.

VEGA, F.E. *et al.* Detection of a plant pathogen in a nonvector insect species by the polymerase chain reaction. **Phytopathology**, v.83, p.621-624, 1993.

VERDIN, E. *et al.* ‘*Candidatus* Phytoplasma phoenicium’, a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.53, p.833–838, 2003.

WAYADANDE, A.C.; FLETCHER, J. Transmission of *Spiroplasma citri* lines and their ability to cross gut and salivary gland barriers within the leafhopper vector *Circulifer tenellus*. **Phytopathology**, v.85, p.1256-1259, 1995.

WEI, W. *et al.* Computer simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.57, p.1855-1867, 2007.

WEINTRAUB, P.G. Insect vectors of phytoplasmas and their control – an update. **Bulletin of Insectology**, Italia, v.60, n.2, p.169-173, 2007.

WEINTRAUB, P.G.; BEANLAND, L. Insect Vectors of Phytoplasmas. **Annual Review of Entomology**, v.51, p.91-111, 2006.

WHITE, D.T. *et al.* Phylogenetic positions of phytoplasmas associated with dieback, yellow crinkle and mosaic diseases of papaya, and their proposed inclusion in ‘*Candidatus* Phytoplasma australiense’ and a new taxon, ‘*Candidatus* Phytoplasma australasia’. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Great Britain, v.48, p.941–951, 1998.

WILSON, M.R.; WEINTRAUB, P.G. An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors. **Bulletin of Insectology**, Italia, v.60, n.2, p.177-178, 2007.

WONGKAEW, P.; FLETCHER, J. Sugarcane white leaf phytoplasma in tissue culture: long-term maintenance, transmission, and oxytetracycline remission. **Plant Cell Rep**, v.23, p.426-434, 2004.

ZREIK, L. *et al.* Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches’-broom disease of lime and proposition of a ‘‘*Candidatus*’’ taxon for the organism, ‘‘*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia’’. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Great Britain, v.45, p.449–453, 1995.

Baseada na NBR-6023/2002. da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)