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

Mostarda-do-campo (*Brassica rapa*) um hospedeiro alternativo e cigarrinhas da espécie *Agalia albidula* um potencial vetor de um fitoplasma do grupo 16SrIII encontrado em campos de couve-flor

Ticyana Carone Banzato

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2013**

Ticyana Carone Banzato
Engenheira Agrônoma

Mostarda-do-campo (*Brassica rapa*) um hospedeiro alternativo e cigarrinhas da espécie *Agalia albidula* um potencial vetor de um fitoplasma do grupo 16SrIII encontrado em campos de couve-flor

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2013

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

Banzato, Ticyana Carone

Mostarda-do-campo (*Brassica rapa*) um hospedeiro alternativo e cigarrinhas da espécie *Agalia albidula* um potencial vetor de um fitoplasma do grupo 16SrIII encontrado em campos de couve-flor / Ticyana Carone Banzato. - - Piracicaba, 2013.

51 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Fitoplasma 2. Grupo 16SrIII 3. Detecção 4. Brássicas 5. Hospedeiro alternativo
6. Mollicutes 7. Plantas daninhas I. Título

CDD 635.35
B218m

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

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

*Aos meus pais, pela vida
Ao Marcel, pelo amor e companheirismo*
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar ao meu orientador, professor Ivan Paulo Bedendo, pela confiança, respeito e amizade. Ótimo como orientador e como pessoa. A ele, minha sincera admiração!

Ao Professor João Roberto Spotti Lopes, pela orientação e ensinamentos sobre entomologia voltada à transmissão de fitoplasma por cigarrinhas.

Ao Professor José Otávio Menten, pela amizade e confiança.

Aos Professores que me acompanharam desde a primeira vez que freqüentei uma sala de aula, sem sua dedicação eu não estaria completando mais essa etapa da minha formação acadêmica.

Ao Professor Sinval Silveira Neto, pela atenção dada para identificar as espécies de cigarrinhas usadas nesse trabalho.

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

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Fitopatologia, pela estrutura e oportunidade oferecidas.

Às minhas amigas e amigos da Fitopatologia, pelos momentos de descontração: Ana Mello, Daniela Flôres, Viviana Camelo, Jaqueline Manzatti, Patrícia Kreycki, Flávia Rogério, Débora Liz, Maria Cristina e em especial à minha amiga Thays Pereira, pela amizade, ensinamentos, ajuda e companhia durante as coletas de material. E os meninos: o Luiz Rafael, Rodrigo Toloy, Victor Hugo, Pedro Córdova e Paulo César.

À Dr^a. Liliane do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, pela disposição, ajuda e ensinamentos sobre clonagem.

À todos os funcionários e professores do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Marcel, Selina, Isabella e à Leona pelos momentos de descontração e por me ensinarem diariamente a ser uma pessoa melhor.

À minha Família: Odagil, Marilene, Talyta e à Cacau, pela formação, educação, amor e pela compreensão em todos os momentos.

Muito obrigada!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Revisão Bibliográfica	17
2.1.1 A cultura da Couve-flor.....	17
2.1.2 Fitoplasmas	17
2.1.3 Enfezamento das brássicas	18
2.1.4 Plantas hospedeiras de fitoplasma.....	19
2.1.5 Transmissão de fitoplasmas por insetos	21
2.2 Material e Métodos.....	22
2.2.1 Amostragem de material vegetal.....	22
2.2.2 Amostragem de insetos.....	24
2.2.3 Extração de DNA total de plantas.....	26
2.2.4 Extração de DNA total dos insetos.....	26
2.2.5 Detecção de fitoplasmas por duplo PCR com iniciadores universais	27
2.2.6 Identificação de fitoplasmas por duplo PCR com iniciadores específicos	28
2.2.7 Sequenciamento da região 16S rDNA do fitoplasma	29
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1 Detecção de fitoplasmas nas amostras de mostarda-do-campo.....	31
3.2 Identificação do fitoplasma associado a plantas de mostarda-do-campo.....	33
3.3 Detecção e identificação de fitoplasmas em cigarrinhas	34
4 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS.....	43
APÊNDICE	49

RESUMO

Mostarda-do-campo (*Brassica rapa*) um hospedeiro alternativo e cigarrinhas da espécie *Agalia albidula* um potencial vetor de um fitoplasma do grupo 16SrIII encontrado em campos de couve-flor

Plantas de mostarda-do-campo (*Brassica rapa*) exibindo intenso superbrotamento de ramos finos, com folhas e flores de tamanho reduzido, foram observadas em campos cultivados com couve-flor. Como os sintomas se mostravam similares àqueles induzidos por fitoplasmas, suspeitou-se que esta espécie daninha estava infectada por este tipo patógeno. Visando confirmar a diagnose, plantas foram amostradas e seu DNA extraído para ser usado em ensaios de duplo PCR, conduzidos com os iniciadores R16mF2/mR1, SN910601/SN011119, 16F2n/R2 e R16(III)F2/16(III)R. As amplificações de fragmentos genômicos correspondentes ao 16S rRNA revelaram uma constante associação entre um fitoplasma do grupo 16SrIII com as plantas sintomáticas. A doença foi denominada de superbrotamento. Cigarrinhas da espécie *Agalia albidula* foram coletadas nas áreas marginais e no interior dos campos de couve-flor, onde cresciam plantas de mostarda-do-campo. O DNA total foi extraído e usado em duplo PCR desenvolvido com os mesmos iniciadores citados anteriormente. Os resultados mostraram que os insetos analisados eram portadores de um fitoplasma do grupo 16SrIII. Para alguns isolados do fitoplasma encontrado em plantas de mostarda-do-campo, os produtos amplicados em duplo PCR com os iniciadores R16(III)F2/16(III)R foram sequenciados e confirmaram que as sequências pertenciam a um representante do grupo 16SrIII. Mapas de sítios putativos de restrição foram elaborados com o emprego de diversas endonucleases, porém não se logrou sucesso em definir a identidade deste fitoplasma ao nível de classificação de subgrupo. Com base nos resultados obtidos no presente estudo, plantas de mostarda-do-campo servem como hospedeiro alternativo de um fitoplasma do grupo 16SrIII, o qual foi anteriormente associado à doença conhecida como enfezamento, ocorrente em outras espécies de brássica, como repolho, brócolis e couve-flor. Assim, é sugerido que esta espécie daninha possa abrigar o agente de doença, garantindo sua sobrevivência e atuando como fonte de inóculo para as culturas comerciais. Além disto, cigarrinhas da espécie *A. albidula* podem ser apontadas como potenciais vetores do fitoplasma relacionado ao superbrotamento da mostarda-do-campo, bem como ao agente causal do enfezamento em brássicas. A presente pesquisa contribuiu para melhor compreensão dos aspectos relacionados aos enfezamentos das brássicas, envolvendo diversidade de fitoplasmas, gama de hospedeiros alternativos destes agentes de doença e ocorrência de vetores deste tipo de patógeno.

Palavras-chave: Fitoplasma; Grupo 16SrIII; Detecção; Brássicas; Hospedeiro alternativo; Mollicutes; Plantas daninhas

ABSTRACT

Mustard-field (*Brassica rapa*) an alternative host and leafhoppers of *Agalia albidula* species a potential vector of a phytoplasma group 16SrIII found in fields of cauliflower

Mustard-field plants (*Brassica rapa*) showing intense shoots proliferation, small sized leaves and flowers, were observed in cauliflower production fields. Since the symptoms were similar to those induced by phytoplasmas, it was suspected that this weed was infected by this type of pathogen. To confirm the diagnosis, plants were sampled for DNA extraction to be used in nested PCR tests conducted with primers R16mF2/mR1, SN910601/SN011119, F6F2n/R2 and R16(III)F2/16(III)R. The amplification of genomic fragments corresponding to the 16S rRNA showed a constant association between a phytoplasma group 16SrIII with symptomatic plants. The disease was called witch's broom. Species of leafhopper, *Agalia albidula*, were collected in marginal areas and at cauliflower fields, where mustard-field plants grew. The total DNA was extracted and used in nested PCR carried out with the same primers mentioned above. The results showed that the insects analyzed were carriers of a phytoplasma group 16SrIII. For some isolates of phytoplasma found in mustard-field plants, the products obtained in nested PCR with primers R16(III)F2/16(III)R were sequenced and confirmed that belonged to a representative 16SrIII group. Putative restriction sites maps, were prepared using a many restriction endonucleases, but no success has been achieved in defining the identity of the phytoplasma subgroup classification level. Based on the results in the present study, mustard-field plants could be an alternative host of a phytoplasma group 16SrIII, which was previously associated with the disease known as stunting, occurring in other species of rapeseed such as cabbage, broccoli and cauliflower. Thus, it is suggested this weed could harbor the disease agent, ensuring their survival and acting as a source of inoculum for commercial crops. Moreover, the species of leafhoppers, *A. albidula*, could be identified as a potential vector of the phytoplasma associated with witch's broom mustard-field as well as the causal agent of stunting in brassicas. This research contributed to understanding the issues related to stunting in brassicas, involving a diversity of phytoplasmas, range of alternative hosts of these disease agents and occurrence of vectors of this pathogen type.

Keywords: Phytoplasma; 16SrIII group; Detection; Alternative hosts; Mollicutes; Weed plants

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – A) Planta de mostarda-do-campo sem os sintomas da doença: B) Planta de mostarda-do-campo apresentando superbrotamento de hastes e redução no tamanho das folhas e flores.....23
- Figura 2 – (A e C) Parte aérea de uma planta de mostarda-do-campo com sintomas acentuados de superbrotamento e redução do tamanho de folhas e flores. (B e D) Parte aérea de uma planta de mostarda-do-campo sem sintomas da doença.....23
- Figura 3 – Dois espécimes de *Agalia albidula* coletados no mesmo campo de amostragem das plantas de mostarda-do-campo25
- Figura 4 – Detecção de fitoplasmas em plantas de mostarda-do-campo. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16F2n/R2 na segunda reação. Colunas de 1-10: amostras de plantas analisadas; M: marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo assintomática; (+) controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma do grupo 16SrIII32
- Figura 5 – Detecção de fitoplasmas em plantas de mostarda-do-campo, As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16F2n/R2 na segunda reação. Colunas de 11-19: amostras de plantas analisadas; M: marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo assintomática; (+) controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma do grupo 16SrIII32
- Figura 6 – Identificação de fitoplasmas com o uso dos iniciadores específicos para representantes do grupo 16SrIII, em plantas de mostarda-do-campo. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16(III)F2/R16(III)R na segunda reação. Colunas de 1-10: amostras de plantas analisadas; (M): marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo assintomática;

(+): controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma de grupo 16SrIII 33

Figura 7 – Identificação de fitoplasmas com o uso dos iniciadores específicos para representantes do grupo 16SrIII, em plantas de mostarda-do-campo. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16(III)F2/R16(III)R na segunda reação. Colunas de 11-19: amostras de plantas analisadas; (M): marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo assintomática; (+): controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma de grupo 16SrIII 33

Figura 8 – Detecção de fitoplasmas com o uso dos iniciadores universais R16F2n/R2 em cigarrinhas da espécie *Agalia albidula*, coletadas no campo. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16F2n/R2 na segunda reação. Colunas de A-H: amostras de cigarrinhas; (M): marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta assintomática de mostarda-do-campo; (+) controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma de grupo 16SrIII 36

Figura 9 – Detecção de fitoplasmas com o uso dos iniciadores específicos para representantes do grupo 16SrIII, em cigarrinhas da espécie *Agalia albidula*, coletadas no campo. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16(III)F2/R16(III)R1 na segunda reação. Colunas de A-H: amostras de cigarrinhas; (M): marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo assintomática; (+) controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma de grupo 16SrIII 36

Figura 10 – Mapas de sítios putativos de restrição gerados por endonucleases, visando a comparação da sequência parcial do gene 16S rRNA do isolado 12 do fitoplasma encontrado em mostarda-do-campo, com sequências parciais do gene 16S rRNA de fitoplasmas pertencentes aos subgrupos 16SrIII-B e 16SrIII-J. 37

1 INTRODUÇÃO

A couve-flor é uma hortaliça de grande aceitação no mercado consumidor brasileiro. Originária da Ásia Menor, em regiões de climas amenos, atingiu ótima adaptação ao clima tropical brasileiro, devido aos programas de melhoramento genético. A disponibilidade de diversos cultivares possibilita seu cultivo durante todas as estações do ano.

A região sudeste é o principal centro de produção desta hortaliça, principalmente o estado de São Paulo, onde os cultivos estão concentrados nas cidades de Ibiúna, Porto Feliz, Itatiba, Jarinú e Sorocaba. O cultivo da couve-flor é feito na forma de agricultura familiar, pois as áreas plantadas são relativamente pequenas e os tratos culturais demandam muita mão de obra. No entanto, a cultura é bastante lucrativa, pois a demanda pelo produto ocorre durante o ano todo.

Nesse cenário, a rotação de culturas é pouco praticada, pois as propriedades são pequenas e a rentabilidade da cultura é alta. Consequentemente, muitas lavouras de couve-flor apresentam alta incidência de doenças devido ao plantio continuado da mesma cultura na mesma área.

Um dos principais problemas, dentre aqueles que afetam a cultura da couve-flor, é uma doença vascular chamada de “enfezamento”. O enfezamento é causado por fitoplasmas, organismos procarióticos desprovidos de parede celular e parasitas intracelulares obrigatórios de floema. Esses patógenos infectam várias espécies da família *Brassicaceae*, como a couve-flor, o repolho e o brócolis, causando sérios danos às culturas e prejuízos para os produtores.

Em geral, plantas de couve-flor infectadas ainda jovens têm seu desenvolvimento completamente comprometido, pois não formam as inflorescências (“cabeças”), justamente a parte comercializada desta hortaliça. Quando a infecção ocorre tardiamente, a doença provoca deformação da inflorescência e altera sua cor e seu aspecto, reduzindo seu valor comercial.

O estudo deste tipo de patossistema é dificultado pelo fato dos fitoplasmas não serem cultivados em meio de cultura, o que resulta em grandes lacunas sobre a compreensão da interação destes patógenos com seus hospedeiros e vetores.

Nos últimos cinco anos, trabalhos sobre a epidemiologia dessas doenças em culturas de brássicas evidenciaram que os patógenos são transmitidos por insetos e se mantém no campo mesmo na ausência da cultura, indicando a possível ocorrência de hospedeiros alternativos. Além disto, fitoplasmas foram encontrados

em associação com diversas espécies de plantas daninhas e silvestres ocorrentes nas proximidades de culturas de brássicas, as quais apresentavam ou não sintomas decorrentes da infecção. Nas culturas de repolho, brócolis e couve-flor ficou evidenciado que a infecção ocorria de fora para o interior da área cultivada, indicando que a fonte de inóculo seria externa e, provavelmente, representada por espécies hospedeiras não cultivadas. Estas espécies seriam responsáveis pela sobrevivência tanto do patógeno como do inseto vetor, durante a ausência da cultura no campo. Além das hospedeiras localizadas nas adjacências do campo, espécies presentes durante o ciclo da cultura e que permaneciam no campo após a colheita também poderiam favorecer a sobrevivência de patógenos e insetos até o próximo ciclo da mesma. Dentre estas espécies, uma espécie invasora conhecida por mostarda-do-campo (*Brassica rapa*) tem chamado a atenção por estar constantemente presente em áreas cultivadas com couve-flor.

Com base nestas informações, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de demonstrar a ocorrência de fitoplasmas em plantas sintomáticas desta erva daninha, visando identificá-la como hospedeira deste patógeno. Além deste objetivo, esse trabalho buscou evidenciar a presença de fitoplasma em cigarrinhas da espécie *Agalia albidula* comumente observadas nos campos cultivados com couve-flor, visando identificá-la como potencial vetor.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 A cultura da Couve-flor

A couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) pertence à família *Brassicaceae*. É uma variedade botânica da couve-silvestre (*B. oleracea* var. *silvestris*), possui folhas alongadas, com limbo elíptico, raízes concentradas na profundidade de 20 cm ciclo de produção de 90 a 120 dias (MAY et al., 2007).

A espécie é originária da Ásia Menor, foi levada à Europa no século XVI e introduzida no Brasil no século XIX (MAY et al., 2007). Sendo fonte de vitaminas e minerais, está constantemente presente na dieta do brasileiro (IBGE/POF) e a parte comercializada se constitui da inflorescência imatura inserida sobre um caule curto (MAY et al., 2007). As folhas, apesar de recomendadas para o consumo, são descartadas para a comercialização.

Como principais estados produtores destacam-se São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Paraná e Santa Catarina (IBGE/SIDRA, MAY et al., 2007). Estimativas da produção brasileira de couve-flor feita em meados da década passada indicavam em torno de 141,8 mil toneladas, sendo a região sudeste responsável por 56,3% dessa produção, seguida da região sul com 38% e das outras regiões com 5,6% (IBGE/SIDRA).

Na cidade de São Paulo, devido à variação da oferta, os preços na CEAGESP são menores nos meses de maio a outubro, por apresentarem maior oferta, e os maiores preços ocorrem nos meses de janeiro a abril, devido à oferta reduzida da hortaliça.

2.1.2 Fitoplasmas

Fitoplasmas são organismos procarióticos desprovidos de parede celular, com dimensões variáveis entre 200 a 800nm. Estas bactérias são parasitas intracelulares obrigatórios de floema, apresentam reprodução por fissão binária ou gemulação, mostram sensibilidade a antibióticos do grupo das tetraciclinas e são patogênicas às plantas (DAVIS, 1995; BERTACCINI, 2007; BEDENDO, 2011). Esses procariotos pleomórficos, pertencentes à classe Mollicutes, possivelmente divergiram de um ancestral Gram positivo do gênero *Acholeplasma*, *Clostridium* ou *Lactobacillus*

através da redução do genoma e perda da parede celular (STRETEN; GIBB, 2006; WEISBURG et al., 1989; WOESE, 1987).

Com seu genoma reduzindo ao longo da evolução, perderam muitas rotas metabólicas como aquelas relacionadas à síntese de ATP, aminoácidos e até nucleotídeos (BAI et al., 2006; OSHIMA et al., 2004). Dessa forma, o patógeno passou a consumir essas moléculas diretamente das células dos seus hospedeiros. Por esse motivo, os fitoplasmas ainda não dispõem de um meio de cultura que torne possível seu cultivo fora do hospedeiro, tornando inviável sua caracterização pelas técnicas usualmente empregadas para a identificação e classificação binomial de bactérias (BOVÉ; GARNIER, 1998). Isto dificulta os estudos relacionados a sua patogenicidade, uma vez que este patógeno apresenta grande dependência dos metabólicos sintetizados pela planta viva (BARBOSA, 2010).

Plantas colonizadas por fitoplasmas podem exibir, entre outros, sintomas como superbrotamento de ramos, clorose foliar, enfezamento da planta, filodia, virescência, e esterilidade (IRPCM, 2004). A microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a biotecnologia têm sido empregadas para a detecção desses fitopatógenos nos tecidos vegetais. O emprego da MET permite a detecção direta, mediante a visualização de corpúsculos pleomórficos nos vasos de floema (KITAJIMA; NAZARENO, 1985). Esta técnica evidenciou que os fitoplasmas apresentam uma organização celular muito simples, constituída por uma membrana citoplasmática de três camadas, material genético concentrado na região central do citoplasma e região citoplasmática com aspecto granuloso, devido ao grande número de ribossomos dispersos na mesma (STRETEN; GIBB, 2006). Desde a década de 80, as técnicas moleculares vêm se desenvolvendo e se popularizando no meio científico. Nos dias atuais, a detecção e a identificação dos fitoplasmas têm sido conduzidas pelo uso das técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction) e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). O sequenciamento dos nucleotídeos do gene 16S rDNA também é usado rotineiramente na identificação molecular desses patógenos, pois constitui a base das análises filogenéticas, que revelam a similaridade ou diversidade genética existente entre fitoplasmas (DAVIS, 1995).

2.1.3 Enfezamento das brássicas

O primeiro relato da ocorrência de enfezamento em brássicas foi feito na Itália, no início da década de 80, em plantas de brócolis e couve-flor, por meio da

detecção de fitoplasmas usando microscopia eletrônica de transmissão (BERTACCINI; PISI; MARANI, 1983).

Em diversas brássicas, como repolho, couve-flor, brócolis, nabo, acelga, colza, canola e couve-de-bruxelas, foram associados vários grupos de fitoplasma a plantas mostrando sintomas de enfezamento. Algumas vezes ocorreram infecções múltiplas, sugerindo uma inespecificidade em relação ao hospedeiro (AMARAL MELLO, 2007; ECKSTEIN, 2010; RAPUSSI-DA-SILVA, 2010; MARQUES, 2011).

Em couve-flor, já foram identificados, no Brasil, fitoplasmas afiliados aos grupos 16SrIII-J, 16SrXIII e 16SrXV-A (RAPUSSI-DA-SILVA, 2010). Em brócolis, foram relatados, na Itália (MARCONE; RAGAZZINO, 1995) e na Sérvia (DUDUK et al., 2007) fitoplasmas do grupo 16Srl, enquanto no Brasil (ECKSTEIN, 2010) foram encontrados fitoplasmas pertencentes aos grupos 16Srl-B, 16SrIII e 16SrXIII. Em repolho, distintos fitoplasmas foram identificados em diversos países, como membros dos grupos 16Srl e 16SrIII, no Brasil (AMARAL MELLO, 2007); nos Estados Unidos, subgrupo 16Srl-B (LEE et al., 2003); e grupo 16SrVI, no Irã (SALEHI; IZADPANA; SIAMPOUR, 2007). Fitoplasmas do grupo 16Srl-B foram relatados em nabo, na República Tcheca (BERTACCINI et al., 1998) e em acelga, na Polônia (KAMINSKA; BERNIAK; KAMINSKI, 2012). No Canadá, foram relatados fitoplasmas em colza e canola, pertencentes ao grupo 16Srl e subgrupo 16Srl-B (OLIVIER et al., 2006), enquanto na Sérvia, um fitoplasma do subgrupo 16SrXII-A foi revelado em associação com couve-de-bruxelas (TRKULJA et al., 2011).

2.1.4 Plantas hospedeiras de fitoplasma

Numerosas espécies vegetais silvestres e daninhas, pertencentes a diversas famílias botânicas, têm sido relatadas como hospedeiras alternativas de fitoplasmas, bem como hospedeiras de insetos vetores deste grupo de agentes patogênicos (ALHUDAIB et al., 2009). Estas plantas muitas vezes não apresentam sintomas externos, o que dificulta sua identificação como portadoras de fitoplasmas (HAAS, 2005). No entanto, podem atuar como fonte de inóculo, sendo responsáveis tanto pela sobrevivência de patógenos como pela sua introdução e permanência no interior da cultura.

Entre as plantas lenhosas, um exemplo clássico é uma espécie de videira silvestre (*Vitis riparia*). Em condições de campo, plantas afetadas não apresentam sintomas da doença conhecida como “amarelo”, causada por um fitoplasma, porém

a planta infectada serve como reservatório para o fitoplasma que induz severos sintomas em videiras cultivadas da espécie *Vitis vinifera* (DAVIS, 1995). No Brasil, uma diversidade de fitoplasmas foram identificados em espécies representantes de várias famílias botânicas, tais como *Amaranthaceae*, *Arecaceae*, *Asteraceae*, *Apocynaceae*, *Begoniaceae*, *Bignoniaceae*, *Brassicaceae*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Meliaceae*, *Nyctaginaceae*, *Passifloraceae*, *Poaceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae* e *Solanaceae* (RAPUSSI DA-SILVA, 2010; BEDENDO, 2010; ECKSTEIN et al., 2010). Especificamente no estado de São Paulo, pesquisas têm revelado a ocorrência de fitoplasmas em diversas ervas daninhas que frequentemente crescem nas adjacências e no interior de culturas de brócolis e couve-flor. Em brócolis, foi detectado fitoplasma de grupo 16SrIII em mentrasto (*Ageratum conyzoides*), crotalária (*Crotalaria lanceolata*), Mentrusz (*Lepidium virginicum*), Juá-de-capote (*Nicandra physalodes*), Erva-de-rato (*Paulicourea marcgravii*) e Serralha amarela (*Sonchus oleraceae*). Em buva (*Conyza bonariensis*), falsa serralha (*Emilia sonchifolia*), picão-preto (*Bidens pilosa*) e rubim (*Leonorus sibiricus*) além de fitoplasma de grupo 16SrIII, também foi identificado um fitoplasma de grupo 16SrVII (ECKSTEIN, 2010).

Gramíneas presentes em culturas de milho e empregadas para a formação de pastagens também se revelaram como portadoras de fitoplasmas, destacando-se capim colônia (*Panicum maximum*), capim marmelada (*Brachiaria plantaginea*) e capim braquiária (*Brachiaria decumbens*) (HAAS, 2005). Algumas espécies daninhas comumente encontradas em áreas cultivadas com citros, tais como picão preto (*Bidens pilosa*), rubim (*Leonorus sibiricus*) e maria-pretinha (*Solanum americanum*) foram identificadas em associação com fitoplasmas do grupo 16SrIII, enquanto buva (*Erigeron bonariensis*) e amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) foram associadas à presença de fitoplasmas de grupo 16SrVII, sugerindo sua atuação como reservatórios destes agentes de doença (BARBOSA, 2010).

Assim, plantas silvestres e daninhas têm sido consideradas peças chave para o entendimento de aspectos epidemiológicos relacionados a diversas doenças de etiologia fitoplasmática, principalmente no que se refere às fases de sobrevivência e disseminação destes agentes fitopatogênicos.

Mostarda-do-campo, a planta objeto de estudo da presente investigação, apresenta a parte aérea variando de 30 a 90 cm de altura. As ramificações são glabrasas, porém, às vezes apresentam o terço inferior dos ramos ligeiramente

pubescente. As folhas baixas são lobadas, com nervação pinada e bordos recortados, formando fendas que chegam até a metade do limbo. As folhas superiores são lanceoladas ou oblongas, sésseis, abraçando a haste, formando uma aurícula. As flores formam uma inflorescência amarela brilhante e seus pedicelos se espalham ascendentemente, podendo perdurar nas vagens (BRITTON; BROWN, 1913).

2.1.5 Transmissão de fitoplasmas por insetos

Na natureza, os fitoplasmas são disseminados por insetos sugadores de floema, principalmente as cigarrinhas pertencentes às famílias *Cicadellidae*, *Cixiidae*, *Delphacidae*, *Derbidae* e *Flatidae* e os psíldeos, da família *Psyllidae* (MARQUES, 2011). Dentro da família *Cicadellidae*, a subfamília *Deltocephalinae* é a mais importante, pois agrega 75% das espécies conhecidas de vetores. Outras subfamílias podem ser mencionadas, tais como *Agallinae*, *Aphrodinae*, *Cicadellinae*, *Coelidiinae*, *Idiocerinae*, *Macropsinae*, *Scarinae* e *Typhlocybinae* (MARQUES, 2011; WEINTRAUB; BEANLAND, 2005).

Os fitoplasmas são adquiridos pelos insetos vetores durante sua alimentação em plantas infectadas e, quando no interior do inseto, atravessam as células do trato digestivo, multiplicam-se nos órgãos internos e caminham para as glândulas salivares, que passam a produzir saliva contaminada, a qual pode transmitir o fitoplasma quando o inseto se alimenta em planta sadia (HOGENHOUT et al., 2008; IRPCM, 2004). É interessante destacar as evidências de transmissão transovariana de fitoplasmas por cigarrinhas da espécie *Hishimonoides sellatifomis*, associada ao nanismo da amoreira (KAWAKITA et al., 2000) e da espécie *Matsumuratettix hiroglyphicus*, relacionada ao agente do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (HANBOONSONG et al., 2002). Ainda, existem relatos de transmissão de fitoplasmas para a prole de psíldeos pertencentes à espécie *Cacopsylla melaneura* e *Cacopsylla pruni*, ambas associadas ao superbrotamento de plantas de macieira (TEDESCHI et al., 2006).

Em áreas de brássicas do estado de São Paulo, há relatos de várias espécies de cigarrinhas portadoras de fitoplasmas. Em plantios de brócolis, foram detectados fitoplasmas em cigarrinhas das espécies *Balchlutha hebe* (16Srl-B), *Planicephalus flaviscosta* (16SrlIII-B), *Atanus nitidus* (não identificado) e *Scaphytopius fuliginosus* (16SrlIII) (ECKSTEIN, 2010), além da presença de membros do grupo 16SrlIII em

Atanus nitidus, *Agalliana sticticollis*, *Balclutha hebe* e *Agallia albidula* (KREYCI, 2011). Em cigarrinhas coletadas em campos de repolho, foram identificados fitoplasmas dos subgrupos 16SrIII-J e 16SrI-B, os mesmos subgrupos detectados em plantas de repolho que apresentavam sintomas de enfezamento (AMARAL MELLO, 2007). Em culturas de couve-flor, fitoplasmas foram encontrados em cigarrinhas das espécies *Balclutha hebe* e *Exitianus obscurinervi* (RAPUSSI-DASILVA, 2010). Em ambas as espécies, a presença de fitoplasma foi revelada por duplo PCR, contudo foi possível identificar somente o fitoplasma presente em insetos de *Balclutha hebe*, como sendo afiliados ao grupo 16SrXIII.

Em campos de citros, Marques (2011) detectou e identificou um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrIX em *Scaphytopius marginelineatus* e Barbosa (2010) identificou um fitoplasma de grupo 16SrIII associado aos cicadelídeos da espécie *Agallia albidula*.

A identificação de uma espécie vetora, segundo Weintraub e Beanland (2006), tem início com o monitoramento da população do inseto constantemente presente na cultura de interesse. Esse monitoramento é feito principalmente pela captura dos insetos por meio de armadilhas, como, por exemplo, o uso de cartelas amarelas adesivas. No entanto, é interessante o uso de redes entomológicas e sugadores para capturar os insetos vivos no campo. Procedimentos relacionados à detecção e identificação do fitoplasma nos tecidos do inseto e transmissão do patógeno para plantas sadias da espécie cultivada complementam as evidências de que o inseto possa atuar como vetor. A detecção de fitoplasma em insetos coletados no campo tem sido usada não somente para evidenciar potenciais vetores como para estudos epidemiológicos relacionados à distribuição sazonal e geográfica de insetos infectivos, previsão de surtos de doenças e monitoramento da atividade populacional do vetor (HILL; SINCLAIR, 2000; RAHARDJA et al., 1992; CARRARO et al., 2001; GOODWIN et al., 1999; WEBER; MAIXNER, 1998; TEDESCHI et al., 2003).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Amostragem de material vegetal

Em plantas daninhas conhecidas como mostarda-do-campo, presentes com alta frequência em campos cultivados com couve-flor, foram observadas acentuadas

alterações morfológicas. As plantas afetadas exibiam intenso superbrotamento de ramos finos, com folhas e flores de tamanho reduzido, quando comparadas com plantas normais ocorrentes nos mesmos campos (Figuras 1 e 2).

Figura 1 – A) Planta de mostarda-do-campo sem os sintomas da doença: B) Planta de mostarda-do-campo apresentando superbrotamento de hastes e redução no tamanho das folhas e flores.

Figura 2 – (A e C) Parte aérea de uma planta de mostarda-do-campo com sintomas acentuados de superbrotamento e redução do tamanho de folhas e flores. (B e D) Parte aérea de uma planta de mostarda-do-campo sem sintomas da doença

Os sintomas observados eram similares àqueles induzidos por fitoplasmas, levando à suspeita de que esta espécie daninha estava infectada por patógenos deste grupo. Esta suspeita despertou interesse, pois numerosas plantas de couve-flor cultivadas nestes campos mostravam sintomas decorrentes da infecção por fitoplasmas, tais como redução de porte, avermelhamento de folhas, redução e deformação de inflorescência, além de necrose da região dos vasos de floema, evidenciada pelo aparecimento de um anel escuro quando a haste principal era seccionada transversalmente.

A área amostrada está localizada no município de Araçoiaba da Serra, situado a 117 km da cidade de São Paulo. As amostragens foram realizadas tanto no interior como nas áreas marginais de campos cultivados com couve-flor. Ainda, plantas desta invasora foram coletadas quando estes mesmos campos se encontravam em estado de pousio, ou seja, na ausência de plantas da espécie cultivada.

As amostras consistiram da parte aérea das plantas, compreendendo hastes, folhas e flores. Dezenove plantas foram coletadas, embaladas separadamente em sacos plásticos e levadas para laboratório, para posterior análise visando à detecção de fitoplasmas. Cada amostra, representada por uma planta, foi subdividida, sendo parte dela usada diretamente para extração de DNA total e a parte restante armazenada, sob congelamento, para futura obtenção de extrato, se assim fosse necessário.

2.2.2 Amostragem de insetos

Os insetos foram coletados por meio de rede entomológica, nos mesmos campos onde as plantas de mostarda-do-campo foram amostradas. As amostragens foram realizadas aleatoriamente nas entrelinhas das plantas de couve-flor recentemente colhidas e nos bordos da cultura, onde a infestação de plantas daninhas era alta. Em cada um dos 3 campos cultivados, 5 pontos foram amostrados, sendo que em cada um destes pontos foram realizadas 30 batidas de rede. Cada amostra de insetos, correspondente a cada ponto amostrado, foi acondicionada em saco plástico e trazida para laboratório.

No mesmo dia da coleta, os insetos componentes de cada amostra foram separados, em câmara de luz, usando-se uma fina mangueira de borracha acoplada a um tubo de vidro e ligados a um sugador mecânico. Como diversos tipos de

insetos foram coletados pela rede entomológica, estes exemplares foram separados das cigarrinhas, pois não tinham interesse para a pesquisa. Ao mesmo tempo, os diferentes tipos de cigarrinhas foram separados entre si, visando à obtenção de alguns morfotipos de interesse, que ocorriam de maneira frequente e abundante nos campos amostrados.

Figura 3 – Dois espécimes de *Agalia albidula* coletados no mesmo campo de amostragem das plantas de mostarda-do-campo

As cigarrinhas selecionadas foram mantidas em tubos de vidro com tampa, contendo álcool 70%. Dentre os insetos armazenados, os diferentes morfotipos foram separados em microscópio estereoscópico, tomando-se como critérios alguns aspectos morfológicos. Como modelo, foram considerados representantes da espécie *Agalia albidula*, relatada em trabalhos anteriores como um inseto presente constantemente em plantios de couve-flor e portador de fitoplasma do mesmo grupo a que pertence o fitoplasma agente do enfezamento desta brássica. Os insetos similares àqueles pertencentes à espécie *A. albidula*, ilustrados na Figura 3, foram levados ao museu de entomologia existente no Departamento de Entomologia da ESALQ/USP e comparados com aqueles mantidos em coleções entomológicas para confirmação da espécie. Em seguida, os insetos identificados como pertencentes a esta espécie foram reunidos em um único tubo e usados nos ensaios para detecção de fitoplasmas em seus tecidos.

2.2.3 Extração de DNA total de plantas

Para a extração de DNA total das amostras de mostarda-do-campo foi usado o *kit* DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) (GREEN; THOMPSON; MACKENZIE, 1999). Seguindo as orientações do fabricante, partes (hastes, pedúnculos, nervuras centrais das folhas) do material coletado foram utilizadas para extração. Cerca de 2g de material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. Uma pequena quantidade do macerado foi transferida para um microtubo de 1,5mL. Foram adicionados 400µL do tampão AP1 e 4µL de RNase. Os tubos permaneceram a 65°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 130µL do tampão AP2 e o material foi incubado a -20°C por 5 minutos. A mistura foi aplicada em uma coluna montada sobre tubo coletor e centrifugada por 5 minutos a 20.800g. O filtrado foi recolhido em um novo microtubo, sendo adicionados 675µL do tampão AP3. Uma alíquota de 650µL dessa mistura foi aplicada em nova coluna, a qual foi centrifugada a 6.800g por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a coluna contendo o DNA foi transferida para um novo microtubo, adicionando-se ao centro da coluna 500µL do tampão AW. Nova centrifugação foi feita a 20.800g por 2 minutos para lavagem do DNA. A coluna foi transferida para um novo microtubo para diluição do DNA com 100µL de tampão AE. O DNA extraído foi armazenado a -20°C.

2.2.4 Extração de DNA total dos insetos

Para a extração de DNA total dos insetos coletados foi usado o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987) modificado por Marzachi, Veratti e Bosco (1998). Os insetos foram macerados em grupos de quatro indivíduos no interior de tubos de 1,5mL, contendo 500 µL do tampão CTAB a 60°C, com o auxílio de um pistilo de material plástico. O extrato obtido pela maceração foi incubado em banho-maria por 30 minutos a 60°C.

Após esta etapa, foram adicionados 350 µL de solução de clorofórmio e, em seguida, álcool isoamílico na proporção de 24:1. A mistura foi agitada e submetida à centrifugação a 6.800g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de 1,5mL, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado. Essa mistura foi incubada a -20°C por um período de 2h e centrifugada a 20.800g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo o DNA, foi lavado com álcool 70% duas vezes e submetido à

secagem à temperatura ambiente. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em 20 µL de água miliQ esterilizada e armazenado a -20°C.

2.2.5 Detecção de fitoplasmas por duplo PCR com iniciadores universais

O extrato de DNA total de cada amostra de planta ou inseto foi diluído ou não em água MiliQ autoclavada. Como controle negativo foi utilizado o DNA extraído de plantas assintomáticas de mostarda-do-campo, as quais se mostraram livres de fitoplasma após serem submetidas ao teste de PCR. O controle positivo foi representado pelo DNA extraído de plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) comprovadamente infectadas por fitoplasma do grupo 16SrIII.

Para a detecção de fitoplasmas foi empregado duplo PCR, sendo a primeira reação conduzida com os iniciadores universais R16mF2/mR1 (GUNDERSEN; LEE, 1996), SN910601/SN011119 (JUNG et al., 2003) ou o par P1/Tint (DENG; HIRUKI, 1991; SMART et al., 1996). Na segunda reação de PCR foram usados os iniciadores R16F2n/R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996), os quais amplificam uma sequência nucleotídica de aproximadamente 1,2 kb, a partir do DNA genômico de fitoplasmas, correspondente ao gene 16S rRNA.

As seqüência dos iniciadores utilizados encontram-se descritas a seguir:

R16 mF2 – 5'CAT GCA AGT CGA ACG GA 3'; (GUNDERSEN; LEE, 1996)

R16 mR1 – 5'CTT AAC CCC AAT CAT CGA C 3'; (GUNDERSEN; LEE, 1996)

SN910601 – 5' GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATT-3' (NAMBA et al., 1993)

SN011119 – 5' TCG CCG TTA ATT GCG TCC TT-3' (JUNG et al., 2003)

P1 – 5' AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T 3' (DENG; HIRUKI, 1991);

Tint – 5' TCA GGC GTG TGC TCT AAC CAG C 3' (SMART et al., 1996);

R16 F2n – 5' GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG 3'(GUNDERSEN; LEE, 1996);

R16R2– 5' TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G3'(GUNDERSEN; LEE,1996).

Cada reação de PCR, incluindo o DNA das amostras e dos controles negativo e positivo, foi conduzida com um volume final de 25 µL, contendo 1µL de extrato de DNA (diluído ou não), 18,7 µL de água deionizada; 0,5µL de cada iniciador (concentração de 20 pmol/µL); 2µL de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução de 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo); 2,5µL de solução tampão 10X PCR e 0,17 µL de Amplitaq 5U/µL.

Quando os iniciadores P1/Tint foram utilizados, o termociclador foi programado para 30 ciclos, compreendendo as etapas: 1 minuto a 94°C para a etapa de desnaturação do ácido nucléico, 1 minuto a 56°C para o anelamento e 2 minutos a 72°C para a extensão. Para os iniciadores R16mF2/mR1 e para os iniciadores R16F2n/R2, utilizou-se um programa de 35 ciclos, compreendendo as etapas: 1 minuto a 94°C para a etapa de desnaturação do ácido nucléico, 2 minutos a 50°C para o anelamento e 3 minutos a 72°C para a fase de extensão dos iniciadores, uma única etapa inicial de 1 minuto a 94°C e uma final de 7 minutos a 72°C. Para SN910601/SN011119, o termociclador foi programado para: 1 ciclo de 2 min a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturação do ácido nucléico, 30 segundos a 55°C para o anelamento e 90 segundos a 72°C para a extensão, com um ciclo final de 7 min a 72°C.

Os produtos gerados pelo duplo PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TBE 0,5X. A corrida eletroforética foi conduzida com voltagem constante de 65V por 60 minutos. A coloração dos produtos de amplificação foi feita utilizando-se Sybr safe® (1%) e a visualização foi processada em um transiluminador de ultravioleta. Como marcador molecular foi utilizado o 1 Kb Ladder (Life Technologies).

2.2.6 Identificação de fitoplasmas por duplo PCR com iniciadores específicos

A identificação dos fitoplasmas detectados nas reações de duplo PCR, tanto para as plantas de mostarda-do-campo como para os insetos da espécie *A. albibula*, foi feita a partir de produtos amplificados pelos iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119. Estes produtos foram diluídos 1:50 em água MiliQ autclavada e submetidos à reamplificação, empregando-se os iniciadores R16(III)F2/16(III)R1, os quais são específicos para a identificação de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII (LEE et al., 1994). As reações de PCR e a análise por eletroforese foram processadas nas mesmas condições utilizadas para a detecção de fitoplasmas conduzidas com os iniciadores R16F2n/R2, descritas anteriormente. O controle positivo foi representado pelo DNA extraído de plantas de vinca infectadas por fitoplasma pertencente ao grupo 16SrIII. Como controle negativo foi utilizada uma amostra de mostarda-do-campo, cujos resultados de PCR foram negativos para todos os iniciadores utilizados, inclusive aquele específico para fitoplasmas do grupo 16SrIII.

As seqüência dos iniciadores específicos estão descritas a seguir:

R16(III)F2 – 5´AAG AGT GGA AAA ACT CCC 3´ (LEE et al., 1994)

R16(III)R1 – 5´TCC GAA CTG AGA TTG A 3´ (LEE et al., 1994)

2.2.7 Sequenciamento da região 16S rDNA do fitoplasma

O fragmento genômico, correspondente ao 16S rRNA do fitoplasma detectado nas amostras de mostarda-do-campo foi submetido ao sequenciamento de bases nucleotídicas. O referido fragmento foi amplificado nas reações de PCR conduzidas com iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 e posteriormente reamplificado com o emprego do par de iniciadores R16F2n/R2. O sequenciamento foi realizado pela empresa Macrogen, localizada na Coreia do Sul.

As seqüências nucleotídicas encontradas no fitoplasma presente nas amostras de mostarda-do-campo foram comparadas com aquelas pertencentes aos fitoplasmas dos subgrupos 16SrIII-B e 16SrIII-J, que representam os fitoplasmas de grupo 16SrIII mais frequentemente identificados em plantas de brássicas cultivadas em áreas do estado de São Paulo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Detecção de fitoplasmas nas amostras de mostarda-do-campo.

Os resultados revelaram a presença de fitoplasmas em 12 das 19 plantas de mostarda-do-campo analisadas por duplo PCR, representando 63% de amostras positivas entre aquelas que apresentavam típicos sintomas da doença. A ocorrência de fitoplasmas nestas amostras foi demonstrada pela amplificação de fragmentos genômicos de, aproximadamente, 1,2 kb nas reações conduzidas com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119, seguidas das reações realizadas com o emprego dos iniciadores R16F2n/R2. Os produtos de duplo PCR foram visualizados na forma de bandas presentes em gel de agarose, após o processo de eletroforese (Figura 4 e Figura 5). Os mesmos resultados foram obtidos para as reações de PCR conduzidas com o extrato de plantas de vinca, sabidamente infectadas por um fitoplasma do grupo 16SrIII e usadas como controle positivo. Contrariamente, não houve amplificação, quando o DNA extraído de plantas assintomáticas de mostarda-do-campo, usado como controle negativo, foi empregado nas misturas de reação.

A detecção de fitoplasmas em 63% dos hospedeiros sintomáticos revelou uma consistente associação do patógeno com os sintomas de alteração no porte das plantas, resultantes do superbrotamento de ramos e da redução no tamanho de folhas e flores.

Apesar da alta sensibilidade da técnica de PCR, a não detecção de fitoplasmas em parte das amostras de plantas sintomáticas pode ser justificada por dois fatores muito comuns relacionados a doenças deste tipo, ou seja, a ocorrência de baixa concentração e a distribuição irregular deste procarioto nos tecidos do hospedeiro. Este tipo de evento foi descrito para várias associações fitoplasmas-hospedeiros, como nos casos da batata inglesa associada ao fitoplasma da doença conhecida como topo roxo (SANTOS-CERVANTES et al., 2010), fitoplasmas relacionados aos amarelos da cenoura, repolho e cebola (LEE et al., 2003) e plantas de couve-flor portadoras do fitoplasma associado ao enfezamento (RAPUSSI et al., 2012).

Figura 4 – Detecção de fitoplasmas em plantas de mostarda-do-campo. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16F2n/R2 na segunda reação. Colunas de 1-10: amostras de plantas analisadas; M: marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo assintomática; (+) controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma do grupo 16SrIII

Figura 5 – Detecção de fitoplasmas em plantas de mostarda-do-campo, As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16F2n/R2 na segunda reação. Colunas de 11-19: amostras de plantas analisadas; M: marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo assintomática; (+) controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma do grupo 16SrIII

É interessante ser mencionado que algumas plantas que não exibiam sintomas externos foram submetidas à análise de duplo PCR. Em algumas delas foi constatada a presença de fitoplasmas nos seus tecidos. Achados desta natureza não são raros e foram relatados para outras espécies da família das brássicas infectadas por fitoplasmas associados a doenças do tipo amarelo em repolho, brócolis e nabo (WANG; HIRUKI, 2011) e em plantas de canola (OLIVIER; GALK; SEGUIN-SWARTZ, 2010) Ainda, em outro trabalho usando amostras da mesma região geográfica do patossistema estudado na presente investigação, foi encontrado fitoplasma do grupo 16SrIII em associação com plantas de couve-flor

que não mostravam sintomas aparentes de infecção por este tipo de patógeno (RAPUSSI et al., 2012).

3.2 Identificação do fitoplasma associado a plantas de mostarda-do-campo

Dentre as 12 amostras de plantas sintomáticas positivas para a presença de fitoplasmas, 10 revelaram a ocorrência de fitoplasma do grupo 16SrIII, quando seus respectivos DNAs foram submetidos aos testes de duplo PCR, conduzidos com os iniciadores específicos para fitoplasmas deste grupo (Figura 6 e Figura 7). Estes iniciadores geraram fragmentos genômicos de 0,8 kb, visualizados em gel de agarose, os quais são esperados para amplificações do 16S rRNA de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII.

Figura 6 – Identificação de fitoplasmas com o uso dos iniciadores específicos para representantes do grupo 16SrIII, em plantas de mostarda-do-campo. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16(III)F2/R16(III)R na segunda reação. Colunas de 1-10: amostras de plantas analisadas; (M): marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo assintomática; (+): controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma de grupo 16SrIII

Figura 7 – Identificação de fitoplasmas com o uso dos iniciadores específicos para representantes do grupo 16SrIII, em plantas de mostarda-do-campo. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16(III)F2/R16(III)R na segunda reação. Colunas de 11-19: amostras de plantas analisadas; (M): marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo assintomática; (+): controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma de grupo 16SrIII

Fitoplasmas detectados nas duas amostras restantes não foram identificados nas reações desenvolvidas com o par de iniciadores R16(III)F2/R16(III)R1, indicando claramente a ocorrência de um fitoplasma distinto daquele do grupo 16SrIII, em associação com as plantas sintomáticas de mostarda-do-campo. Além das 10 amostras positivas simultaneamente para os iniciadores R16F2n/R2 e R16(III)F2/R16(III)R, o DNA da amostra de número 9 foi amplificado somente pelos iniciadores específicos, constituindo mais uma amostra positiva para a presença de fitoplasma, além daquelas 12 inicialmente amplificadas pelos iniciadores universais R16F2n/R2.

Considerando este resultado, das 19 amostras sintomáticas analisadas, 13 se apresentaram positivas, ou seja, 68% do total, reforçando a associação da doença com fitoplasmas e, mais especificamente, com aqueles pertencentes ao grupo 16SrIII. Fragmentos genômicos de 0,8 kb também foram gerados nas reações de PCR contendo DNA de plantas de vinca, as quais foram usadas nos ensaios como controle positivo.

3.3 Detecção e identificação de fitoplasmas em cigarrinhas

As amostragens reuniram um total de 32 cigarrinhas identificadas como pertencentes à espécie *A. albidula*. Os insetos foram subdivididos em 8 amostras constituídas de 4 insetos por amostra. Assim, o DNA usado nas reações de PCR para detecção de fitoplasmas foi obtido a partir de 4 indivíduos.

Nas reações conduzidas com os iniciadores universais R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119, seguido de R16F2n/R2, apenas uma das oito amostras apresentou resultado positivo (Figura 8). A presença de fitoplasmas foi demonstrada pela amplificação de fragmentos genômicos de 1,2 kb, os quais foram revelados por uma banda presente em gel de agarose, após o procedimento de eletroforese dos produtos gerados pelo duplo PCR. Neste caso, somente a amostra designada pela letra H se mostrou portadora de fitoplasmas (Figura 8). O mesmo tipo de resultado foi obtido para as reações de PCR, nas quais o DNA extraído de plantas de vinca infectadas foi usado como controle positivo. Para o controle negativo, representado por extrato de plantas assintomáticas de mostarda-do-campo, não ocorreu amplificação.

Quando as amostras de insetos foram analisadas em ensaios de PCR desenvolvidos com os pares de iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119, seguidos pelos iniciadores R16(III)F2/R16(III)R1, fitoplasmas foram identificados em todas as 8 amostras de cigarrinhas (Figura 9). Fragmentos de DNA de 0,8 kb foram amplificados a partir do 16S rRNA dos fitoplasmas encontrados nestas amostras, confirmando a ocorrência de representantes do grupo 16SrIII. Amplificações também ocorreram nas reações contendo DNA extraído de plantas de vinca portadoras de fitoplasmas do grupo 16SrIII, usadas como controle positivo. No entanto, não ocorreu a detecção de fitoplasmas em plantas assintomáticas de mostarda-do-campo, as quais serviram de controle negativo.

A detecção mais frequente de fitoplasmas com os iniciadores específicos para grupos em comparação com aqueles universais, representados por R16F2n/R2, também já foi relatada para fitoplasmas associados com outros hospedeiros. Assim, o agente do enfezamento vermelho foi mais eficientemente detectado em plantas de milho e de algumas gramíneas nas reações de PCR processadas com iniciadores específicos para fitoplasmas do grupo 16SrI do que naquelas conduzidas com o par de iniciadores R16F2n/R2 (HAAS, 2005).

Em trabalho mais recente, a presença de um fitoplasma do grupo 16SrIII, associado ao enfezamento do brócolis, foi mais frequentemente evidenciada em cigarrinhas, com o uso de iniciadores específicos em relação aos iniciadores universais (KREYCI, 2012). Como demonstrado, o emprego de iniciadores grupo-específicos pode se constituir numa ferramenta útil para a detecção de fitoplasmas, quando a finalidade é evidenciar a associação deste tipo de patógeno com hospedeiros suspeitos de infecção.

A sequência de nucleotídeos do 16S rRNA gerada pelo duplo PCR, processado com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 seguidos pelos iniciadores R16F2n/R2, foi analisada para quatro isolados do fitoplasma detectado nas plantas de mostarda-do-campo. Mapas de sítios putativos de restrição foram elaborados com diversas endonucleases, com base na sequência parcial do 16S rRNA do isolado 12, com 992 pares de base, e nas sequências parciais deste mesmo gene presente nos fitoplasmas representativos dos subgrupos 16SrIII-B (Genbank: AF175304) e 16SrIII-J (Genbank: AF147706), ambas com 988 pares de base (Figura 10). Considerando as sequências parciais, os representantes dos subgrupos 16SrIII-B e 16SrIII-J podem ser distinguidos com base nos sítios de

restrição encontrados nas posições 343 (*HhaI*), 345 (*MseI*), 345 (*MseI*), 376 (*BfaI*), 399 (*EcoRI*), 645 (*HinfI*) e 982 (*BstUI*).

Figura 8 – Detecção de fitoplasmas com o uso dos iniciadores universais R16F2n/R2 em cigarrinhas da espécie *Agalia albidula*, coletadas no campo. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16F2n/R2 na segunda reação. Colunas de A-H: amostras de cigarrinhas; (M): marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta assintomática de mostarda-do-campo; (+) controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma de grupo 16SrIII

Figura 9 – Detecção de fitoplasmas com o uso dos iniciadores específicos para representantes do grupo 16SrIII, em cigarrinhas da espécie *Agalia albidula*, coletadas no campo. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16(III)F2/R16(III)R1 na segunda reação. Colunas de A-H: amostras de cigarrinhas; (M): marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo assintomática; (+) controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma de grupo 16SrIII

Quando a sequência do isolado 12 foi confrontada com a sequência pertencente ao subgrupo 16SrIII-B, foram encontrados três distintos sítios de restrição, nas posições 21 (*AluI*), 965 (*HinfI*) e 986 (*BstUI*). Três sítios de restrição também distinguíram a sequência do isolado 12 da sequência pertencente ao subgrupo 16SrIII-J, sendo os mesmos encontrados nas posições 21 (*AluI*), 345

(MseI) e 965 (HinfI). Deste modo, a tentativa de se associar o fitoplasma encontrado em mostarda-do-campo com representantes dos subgrupos 16SrIII-B ou 16SrIII-J, os subgrupos mais frequentemente identificados no território brasileiro, não logrou o efeito esperado. Assim, a classificação do fitoplasma, ao nível de subgrupo, deverá ser conduzida com fragmentos genômicos de maior peso molecular, gerados pelos iniciadores R16F2n/R2, de acordo com os critérios propostos por Wei et al. (2008).

Figura 10 – Mapas de sítios putativos de restrição gerados por endonucleases, visando a comparação da sequência parcial do gene 16S rRNA do isolado 12 do fitoplasma encontrado em mostarda-do-campo, com sequências parciais do gene 16S rRNA de fitoplasmas pertencentes aos subgrupos 16SrIII-B e 16SrIII-J.

A suspeita inicial da associação de fitoplasmas com plantas sintomáticas de mostarda-do-campo, ocorrentes em áreas cultivadas com couve-flor, foi confirmada pelos resultados de PCR. Assim, a doença foi denominada de superbrotamento, sendo revelada a constante presença de um fitoplasma do grupo 16SrIII nos tecidos desta espécie daninha. Fitoplasma deste mesmo grupo foi encontrado em plantas de couve-flor, sendo este procarioto associado a uma doença muito comum na cultura, conhecida com enfezamento (RAPUSSI et al., 2012). No presente trabalho, fitoplasma do grupo 16SrIII também foi identificado em cigarrinhas da espécie *Agalia albidula* coletadas em campos cultivados com couve-flor, nos quais se observava alta frequência de mostarda-do-campo. Os resultados da presente investigação sugerem fortemente que a espécie daninha é um possível hospedeiro alternativo do fitoplasma agente do enfezamento da couve-flor. Além disto, indica que cigarrinhas da espécie estudada são potenciais vetores do fitoplasma, as quais talvez possam introduzir este agente nas plantas de couve-flor, a partir das plantas de mostarda-do-campo existentes nas adjacências da área cultivada, bem como a partir daquelas plantas que permanecem no campo após a colheita da cultura principal.

O patossistema brócolis-fitoplasma do enfezamento apresenta características similares às aquelas encontradas para o patossistema couve-flor-fitoplasma do enfezamento. Assim, fitoplasma do grupo 16SrIII foram identificados em plantas de brócolis, em algumas espécies invasoras comumente observadas nesta cultura e em cigarrinhas representantes da subfamília *Agalliinae* (ECKSTEIN, 2010). Posteriormente, foi demonstrado que insetos da espécie *Agalia albidula* eram hospedeiros de fitoplasma do grupo 16SrIII, também caracterizado em plantas de brócolis naturalmente infectadas (KREYCI, 2012). A continuidade destas pesquisas revelou que insetos portadores deste fitoplasma transmitiram o mesmo para plantas de brócolis, em ensaios conduzidos em condições controladas (KREYCI, 2012).

A região geográfica onde foi coletado o material para o presente estudo é reconhecida como um polo importante na produção de brássicas, incluindo o repolho, a couve-flor e o brócolis. Assim como para a couve-flor e o brócolis, também em repolho foi identificado um fitoplasma do grupo 16SrIII, o qual foi associado a uma doença também conhecida por enfezamento (AMARAL MELLO, 2007). Diante destas informações é possível aventar à hipótese de que o mesmo fitoplasma esteja associado aos enfezamentos das três espécies de brássicas. Ainda, em termos especulativos, pode-se considerar que cigarrinhas da espécie

Agalia albidula estejam envolvidas com a transmissão deste fitoplasma para plantas de repolho, brócolis e couve-flor. Ao mesmo tempo, pode-se inferir que as plantas de mostarda-do-campo, aqui reveladas como hospedeiras de fitoplasma do grupo 16SrIII, possam contribuir para a sobrevivência do fitoplasma e atuar como fontes de inóculo para as culturas de repolho, brócolis e couve-flor.

As informações resultantes do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa se constituem em mais uma contribuição para melhor compreensão dos aspectos relacionados aos enfezamentos das brássicas, envolvendo diversidade de fitoplasmas, gama de hospedeiros alternativos destes agentes de doença e ocorrência de vetores deste tipo de patógeno.

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, foi demonstrado que plantas sintomáticas de mostarda-do-campo estão associadas com fitoplasma do grupo 16SrIII. A doença foi denominada de superbrotamento. Além disto, foi revelado que cigarrinhas da espécie *Agalia albidula* podem abrigar fitoplasma do grupo 16SrIII, sendo sugerida sua atuação como potencial vetor do agente causal da doença enfezamento da couve-flor.

REFERÊNCIAS

ALHUDAIB, K.; AROCHA, Y.; WILSON, M.; JONES, P. Molecular identification, potential vectors and alternative hosts of the phytoplasma associated with a lime decline disease in Saudi Arabia. **Crop Protection**, Guildford, v. 28, p. 13-18, 2009.

AMARAL MELLO, A.P.O. **Identificação de fitoplasmas associados ao Enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença**. 2007. 64 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

BAI, X.; ZHANG, J.; EWING, A.; MILLER, S.A.; RADEK, A.J., SCHEVCHENKO, D.V.; TSUKERMAN, K.; WALUNAS, T.; LAPIDUS, A.; CAMPEBELL, J.W.; HOGENHOUT, S. Living whit genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant host. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 188, n. 10, p. 3682-2696, 2006.

BARBOSA, J.C. **Caracterização molecular e diversidade de fitoplasmas em pomares de citros no Estado de São Paulo**. 2010. 101 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BEDENDO, I.P. Fitoplasmas e espiroplasmas. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p. 255-270.

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

BERTACCINI, A.; PISI, A.; MARANI F. Virescenza e fillodia del cavolfiore e del broccolo. **Informatore Fitopatológico**, Bologna, v. 33, p. 57-60, 1983.

BERTACCINI, A.; VORÁCKOVÁ, Z.; VIBIO, M.; FRÁNOVÁ, J.; NAVRÁTIL, M.; SPAK, J.; NEBESÁROVÁ, J. Comparison of phytoplasmas infecting winter oilseed rape in the Czech Republic with Italian Brassica phytoplasmas and their relationship to the aster yellows group. **Plant Pathology**, Oxford, v. 47, p. 317-324, 1998.

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

BRITTON, N.L.; BROWN, H.C. **An illustrated flora of the Northern United States and Canada**. New York: Charles Scribner's Sons, 1913. v. 2: Amaranthaceae to Loganiaceae.

CARRARO, L.; LOI, N.; EMARCORA, P. The "life cycle" of pear decline phytoplasma in the vector *Cacopsylla pyri*. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 83, p. 87-90, 2001.

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

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

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

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

ECKSTEIN, B. **Enfezamento do brócolis: identificação de fitoplasmas, potenciais insetos vetores e hospedeiros alternativos e epidemiologia da doença**. 2010. 103 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

GOODWIN, P.H.; MAHUKU, G.S.; LIU, H.; XUE, B.G. Monitoring phytoplasma in populations of aster leafhoppers from lettuce fields using the polymerase chain reaction. **Crop Protection**, Guildford, v. 18, v. 91-99, 1999.

GREEN, M.J.; THOMPSON, D.A.; MacKENZIE, D.J. Easy and eficiente DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasma by polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 482-485, 1999.

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

HAAS, I.C.R. **Gramíneas forrageiras como potenciais hospedeiros alternativos para o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho**. 2005. 38 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

HILL, G.T.; SINCLAIR, W.A. Taxa of leafhoppers carrying phytoplasmas at site of aster yellows occurrence in New York state. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 134-138, 2000.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **POF**: Pesquisa de Orçamentos Familiares. Disponível em: <<http://ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/>>. Acesso em: 13 out. 2013.

_____. **SIDRA**: Sistema IBGE de Recuperação Automática. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 13 out. 2013.

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

JUNG, H.Y.; HHAM, Y.I.; LEE, J.T.; HIBI, T.; NAMBA, S. Characterization of a phytoplasma associated with potato witches' broom disease in Korea. **Journal of General Plant Pathology**, Reading, v. 69, p. 87-89, 2003.

KAMINSKA, M.; BERNIAK, H.; KAMINSKI, P. Detection and identification of '*Candidatus Phytoplasma asteris*' in *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* in Poland. **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 11/12, p. 723-727, 2012.

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

KITAJIMA, E.W.; NAZARENO, N.R.X. Levantamento de vírus e mollicutes do milho no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, p. 613-625, 1985.

KREYCI, P.F. **Transmissão de um fitoplasma associado ao enfezamento do brócolis por cigarrinhas de diferentes espécies**. 2012. 53 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

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

LEE, I.M.; MARTINI, M.; BOTTNER, K.D.; DANE, R.A.; BLACK, M.C.; TROXCLAIR, N. Ecological Implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 1368-1377, 2003.

MARCONE, C.; RAGOZZINO, A. Detection of phytoplasmas in *Brassica* spp. in Southern Italy and their characterization by RFLP analysis. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Stuttgart, v. 102, p. 449-460, 1995.

MARQUES, R.N. **Cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) potenciais vetoras de um fitoplasma (grupo 16SrIX) associado a sintomas de Huanglongbing dos citros, suas plantas hospedeiras e quantificação do patógeno**. 2011. 86 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

MARZACHI, C.; VERATTI, F.; BOSCO, D. Direct PCR detection of phytoplasmas in experimentally infected insects. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 133, p. 45-54, 1998.

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

NAMBA, S.; KATO, S.; IWANAMIS, S.; OYAIZU, H.; SHIOZAWA, H.; TSUCHIZAKI, T. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organism using polymerase chain reaction. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 786-791, 1993.

OLIVIER, C.Y.; GALKA, B.; SEGUIN-SWARTZ, G. Detection of aster yellows phytoplasma DNA in seed and seedlings of canola (*Brassica napus* and *B. rapa*) and AY strain identification. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 32, p. 298-305, 2010.

OLIVIER, C.Y.; SÉGUIN-SWARTZ, G.; HEGEDUS, D. First report of "Candidatus phytoplasma asteris"-related strains in *Brassica rapa* in Saskatchewan, Canada. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 832-832, 2006.

OSHIMA, K.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; JUNG, H.-I.; WEI, W.; SUZUKI, S.; ARASHIDAL, R.; NAKATA, D.; MIYATA, S.-I.; UGAKI, M.; NAMBA, S. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. **Nature Genetics**, London, v. 36, n. 1, p. 27-29, 2004.

RAHARDJA, U.; WHALON, M.E.; GARCIA-SALAZAR, C.; TANG, Y.T. Field detection of X-disease mycoplasma-like organism in *Paraphlepsius irroratus* (Say) (Homoptera: Cicadellidae) using a DNA probe. **Environmental Entomology**, College Park, v. 21, p. 81-88, 1992.

RAPUSSI, M.C.C.; ECKSTEIN, B.; FLORES, D.; HAAS, I.C.R.; AMORIM, L.; BEDENDO, I.P. Cauliflower stunt associated with a phytoplasma of subgroup 16SrIII-J and the spatial pattern of disease. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, p. 829-830, 2012.

RAPUSSI-DA-SILVA, M.C.C. **Enfezamento da couve-flor: identificação molecular de fitoplasma, evidência de potencial vetor e análise epidemiológica da doença**. 2010. 106 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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

SANTOS-CERVANTES M. E.; CHÁVEZ-MEDINA J. A.; ACOSTA-PARDINI J.; FLORES-ZAMORA G. L.; MÉNDEZ-LOZANO J.; LEYVA-LÓPEZ N. E. Genetic diversity and geographical distribution of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p. 388-395, 2010.

SMART, C.D.; SCHNEIDER, B.; BLOMQUIST, C.L.; GUERRA, L.J.; HARRISON, N.A.; AHRENS, U.; LORENZ, K.H.; SEEMULLER, E.; KIRKPATRICK, B.C. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequence of the 16 S-23 S rRNA spacer region. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, n. 8, p. 2998-2993, 1996.

STRETEN, C.; GIBB, K.S. Phytoplasma diseases in sub-tropical and tropical Australia. **Australasian Plant Pathology**, Sydney, v. 35, p. 129-146, 2006.

TEDESCHI, R.; FERRATO, V.; ROSSI, J.; ALMA, A. Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. **Plant Pathology**, Bari, v. 55, p. 18-24, 2006.

TEDESCHI, R.; VISENTIN, C.; ALMA, A.; BOSCO, D. Epidemiology of Apple proliferation (AP) in northwestern Italy: evaluation of the frequency of AP-positive psyllids in naturally infected populations of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 142, p. 285-290, 2003.

TRKULJA, N.; ZARKO IVANOVIC Z.; DOLOVAC E. P.; DOLOVAC N.; ZIVKOVIC S.; JOVIC J.; MITROVIC M. Stolbur phytoplasma infection of kale crops (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* L.) in Serbia. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 64, p. S81-S82, 2011.

WANG, K.; HIRUKI, C. Molecular characterization and classification of phytoplasmas associated with canola yellows and a new phytoplasma strain associated with dandelions. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 76-79, 2001.

WEBER, A.; MAIXNER, M. Survey of populations of the planthopper *Hyalestes obsoletus* Sign. (Auchenorrhyncha, Cixiidae) for infection with the phytoplasma causing grapevine yellows in Germany. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 122, p. 375-381, 1998.

WEI, W.; LEE, I-M.; DAVIS, R.E.; SUO, X.; ZHAO, Y. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient for rapid deliniation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 2368-2377, 2008.

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

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

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, p. 221-271, 1987.

APÊNDICE

>Sequencia parcial do gene 16S rDNA do fitoplasma presente na amostra 12 de plantas de mostarda-do-campo

>Isolado 12

TACCAAAGACTATGATGTGTAGGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGG
ACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCA
ATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTACCTCGGTA
TGTAAGTTCTTTTATTAAGGAAGAAAAAGAGTGGAAAACTCCCTTGACGGTA
CTTAATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAAG
GGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTTAAT
AAGTCTATAGTTTAATTTAGTGCTTAACGCTGTTGTGCTATAGAACTGTTTTAC
TAGAGTGAGTTAGAGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAAT
ATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTTGCTGGGACTTTACTGACGCTG
AGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGAGTACTAAGTGTCTGGGTAAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTA
AGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGG
GACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCTGAAGATACACGAAAAACC
TTACCAGGTCTTGACATTTTCTTGCGAAGTTATAGAAATATAATGGAGGTTATCA
GGAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTAGGG
TTAAGTCCTAAAACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAATTGACAGCCTGTAATGATG
GGGACTTTAACGAGACTGCCAATGAAAAATTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCA
AATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGTTGATTCAA
AGAGTAGCTGACACGCGAGAT