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

**Identificação de fitoplasmas associados à síndrome do amarelecimento
foliar da cana-de-açúcar e ao superbrotamento de primavera
(*Bougainvillea spectabilis*) no Estado de São Paulo**

Eliane Gonçalves da Silva

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

**Piracicaba
2008**

Eliane Gonçalves da Silva
Engenheiro Agrônomo

Identificação de fitoplasmas associados à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar e ao superbrotamento de primavera (*Bougainvillea spectabilis*) no Estado de São Paulo

Orientador:
Prof. Dr. IVAN PAULO BEDENDO

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

Piracicaba
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Silva, Eliane Gonçalves da

Identificação de fitoplasmas associados a síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar e ao superbrotamento de primavera (*Bougainvillea spectabilis*) no estado de São Paulo / Eliane Gonçalves da Silva. - - Piracicaba, 2008.
96 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar 2. Doenças de plantas 3. Fitoplasmas 4. Flores
5. Superbrotamento I. Título

CDD 632.32

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

À Deus , pela vida, pela força física e espiritual que me concede.

Aos meus pais, José e Ilide, pelo amor, afeto, carinho e ensinamentos da vida.

Aos meus irmãos, Everaldo, Eleandro, Gerson e Gilson (“in memoriam”), pelo amor, apoio e incentivo constante.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’ e ao Setor de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso;

Ao Professor Ivan Paulo Bedendo, pela valiosa orientação, disposição e compreensão na elaboração de meu trabalho e durante os anos de convívio;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos durante o desenvolvimento da minha tese;

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e aos pesquisadores Marcos Casagrande e Vicente Alberto de Moraes, pelo fornecimento das amostras e imensa colaboração na realização do trabalho;

Ao Maurício Katsurada e ao Teiji Terumi, pelo fornecimento das plantas de primavera e apoio prestado durante as visitas e coleta de amostras;

À Professora Siu Mui Tsai, pela imensa colaboração e por disponibilizar o laboratório para realização do sequenciamento das amostras;

Ao pesquisador Ricardo Harakava, pelo apoio prestado na etapa de sequenciamento e análise das seqüência;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos, Bárbara, Isolda, Raquel, Luciano, Ricardo, Luiz Fernando, Daniela, Alan, Samuel, Maria Cristina, Ana Paula e as estagiárias Renatinha (Trianon), Renata (Bock) e Renata (Ingrata), pela amizade, convivência agradável e disponibilidade de ajuda sempre;

Agradeço em especial ao José Fernando Guarin Montoya, pelo carinho, afeto e companheirismo sempre;

Aos amigos do laboratório de virologia, pela amizade e bons momentos juntos;

À todos os professores do Setor de Fitopatologia, pela disponibilidade e ensinamentos durante meu doutorado;

A todos os amigos e funcionários dos demais laboratórios do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, pela amizade e colaboração na realização de meus trabalhos;

Enfim, à todos que de alguma maneira contribuíram para a realização de meu trabalho.

Muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO GERAL	9
REFERÊNCIAS	11
2 DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO FITOPLASMA ASSOCIADO À SÍNDROME DO AMARELECIMENTO FOLIAR DA CANA – DE - AÇÚCAR	15
Resumo	15
Abstract	15
2.1 Introdução	16
2.2 Desenvolvimento	18
2.2.1 Revisão bibliográfica	18
2.2.1.1 Os Fitoplasmas	18
2.2.1.2 A Síndrome do Amarelecimento Foliar da Cana-de-Açúcar (SAFCA)	20
2.2.2 Material e métodos	22
2.2.2.1 Amostras e extração de DNA total	22
2.2.2.2 Detecção e condições de PCR	24
2.2.2.3 Eletroforese em gel de agarose	25
2.2.2.4 Identificação molecular através de PCR e RFLP	25
2.2.2.5 Sequenciamento do 16S rDNA do fitoplasma	26
2.2.2.6 Detecção de vírus em amostras de cana-de-açúcar	31
2.2.2.6.1 Amostras e extração do RNA viral	31
2.2.2.6.2 Detecção e condições do PCR	31
2.2.3 Resultados e discussão	32
2.2.3.1 Detecção de fitoplasma através de PCR	32
2.2.3.2 Detecção de vírus através de PCR	34
2.2.3.3 Identificação de fitoplasma por PCR e análise de RFLP	36
2.2.3.4 Sequenciamento, análise putativa de sítios de restrição e análise filogenética	40
Conclusões	42
Referências	42
3 IDENTIFICAÇÃO DE FITOPLASMAS ASSOCIADOS AO SUPERBROTAMENTO DE PLANTAS DE PRIMAVERA (<i>Bougainvillea spectabilis</i>)	49
Resumo	49

Abstract.....	49
3.1 Introdução	50
3.2 Desenvolvimento	51
3.2.1 Revisão Bibliográfica	51
3.2.1.1 A primavera (<i>Bougainvillea spectabilis</i> Willd).....	51
3.2.1.2 Aspectos econômicos gerais sobre a atividade de floricultura	52
3.2.1.3 Aspectos fitossanitários de plantas ornamentais	53
3.2.1.4 Doenças infecciosas da primavera.....	54
3.2.1.5 Fitoplasmas causadores de doenças de plantas.....	55
3.2.2 Material e métodos	57
3.2.2.1 Amostras de plantas de primavera.....	57
3.2.2.2 Extração de DNA total	58
3.2.2.2.1 Extração rápida.....	58
3.2.2.2.2 Extração completa	58
3.2.2.2.3 Extração com Kit comercial	60
3.2.2.3 Purificação do DNA total	60
3.2.2.4 Detecção de fitoplasmas por PCR	60
3.2.2.5 Identificação de fitoplasmas por PCR	61
3.2.2.6 Eletroforese em gel de agarose.....	62
3.2.2.7 Identificação de fitoplasmas por análise de RFLP	62
3.2.2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	62
3.2.2.9 Sequenciamento do 16S rDNA do fitoplasma.....	63
3.2.2.10 Análise filogenética e de sítios putativos de restrição.....	65
3.2.2.11 Teste de transmissão por cuscuta.....	67
3.2.3 Resultados e discussão	67
3.2.3.1 Sintomas e detecção através de PCR.....	67
3.2.3.2 Identificação através de PCR.....	70
3.2.3.3 Identificação através de RFLP.....	73
3.2.3.4 Análise filogenética e de sítios putativos de restrição.....	78
3.2.3.5 Transmissão através de cuscuta.....	84
Referências	87

RESUMO

Identificação de fitoplasmas associados à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar e ao superbrotamento de primavera (*Bougainvillea spectabilis*) no Estado de São Paulo

Os fitoplasmas são procariotos sem parede celular pertencentes à classe Mollicutes. Um grande número de doenças de plantas cultivadas estão associadas aos fitoplasmas, incluindo tanto aquelas que afetam grandes culturas como aquelas ocorrentes em diversas espécies de ornamentais. Em cana-de-açúcar, uma doença conhecida como síndrome do amarelecimento foliar ou amarelinho causou danos expressivos à cultura e provocou a substituição de uma cultivar muito produtiva e extensivamente plantada no estado de São Paulo. A doença também foi registrada em outros países e investigações sobre a etiologia evidenciaram a ocorrência de vírus e fitoplasma como agentes. Em primavera (*Bougainvillea spectabilis*), uma espécie de origem brasileira bastante apreciada como ornamental, foram observados sintomas de clorose foliar, superbrotamento de ramos, deformações foliares e florais e declínio, sintomas característicos de infecção causada por fitoplasmas. O presente trabalho teve como finalidade investigar a etiologia desta nova doença encontrada em primavera, denominada de superbrotamento, e identificar molecularmente o fitoplasma envolvido com a síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar. Para isso, amostras de plantas sintomática e assintomáticas de cana-de-açúcar e primavera foram submetidas à extração do DNA total. A partir deste DNA, a detecção molecular foi conduzida com PCR duplo usando-se os iniciadores P1/Tint na primeira reação e R16 F2n/R2 na segunda reação. Posteriormente à detecção, foi realizada a identificação através de PCR duplo com iniciadores específicos e análises de RFLP com as enzimas de restrição *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, e *MboI*. Análises filogenéticas foram baseadas nas sequências nucleotídicas do 16S rDNA dos fitoplasmas detectados na cana e na primavera, bem como nas sequências de outros fitoplasmas disponíveis em banco de dados. O teste de transmissão usou plantas infectadas de primavera e plantas sadias de vinca, interligados por filamentos de cuscuta. Os resultados mostraram que fragmentos genômicos de aproximadamente 1.2kb foram amplificados em 33% e 60% das amostras de DNA extraído de plantas sintomáticas de cana-de-açúcar e de primavera, respectivamente. O uso de iniciadores específicos demonstrou a presença de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII associados ao superbrotamento da primavera e de um fitoplasma do grupo 16SrI associado à síndrome do amarelecimento foliar. Análises de RFLP, confirmaram a ocorrência de fitoplasmas membros dos grupos 16SrI e 16SrIII em plantas de primavera, e revelaram que estes fitoplasmas poderiam ser classificados nos subgrupos 16SrI-B e 16SrIII-B. A identificação evidenciou que o fitoplasma encontrado em cana-de-açúcar é um representante do grupo 16SrI, sub-grupo B. Análises filogenéticas e de mapas de sítios putativos de restrição, confirmaram os resultados obtidos com os testes de PCR e com as análises de RFLP para os fitoplasmas relacionados às duas doenças estudadas. A transmissão dos fitoplasmas presentes em primavera para plantas de vinca através da cuscuta demonstrou, biologicamente, que ambos são agentes causais do superbrotamento. Em quase todas as amostras de cana-de-açúcar positivas para fitoplasma também foi detectada a presença de um luteovírus, através do uso de RT-PCR, demonstrando que o amarelecimento foliar da cana-de-açúcar no estado de São Paulo está associado a um complexo formado por fitoplasma e vírus. No caso da primavera, este trabalho se constituiu no primeiro relato da ocorrência de fitoplasmas como agente de doença nessa espécie.

Palavras-chaves: Mollicutes; Técnicas moleculares; Patógeno; Diagnose

ABSTRACT

Identification of phytoplasmas associated with sugarcane yellow leaf syndrome and bougainvillea proliferation in São Paulo state

Phytoplasmas are wall-less prokaryote belonging to class Mollicutes. Several hundred plant species, including food crops and ornamental species have been reported as hosts of phytoplasmas, which are associated with important diseases. In sugarcane, a disease known as yellow leaf syndrome caused serious damage and led to replacement of a cultivar with high yield and widely distributed in the São Paulo State. The syndrome has also been described in other countries and studies about etiology evidenced the occurrence of virus and phytoplasmas as causal agents. In bougainvillea (*Bougainvillea spectabilis*), a native specie from Brazilian territory, were observed typical symptoms of phytoplasmas, characterized by leaf chlorosis, proliferation of branches, deformation of leaves and flowers, decline, and death. The aim of this study was to investigate the etiology of the disease observed in bougainvillea and to identify molecularly the phytoplasma associated with sugarcane yellow leaf. Thus, DNA was extracted from samples collected of naturally symptomatic plants of sugarcane and bougainvillea. Nested PCR primed by P1/Tint-R16F2n/R2 was used for detection, while specific primers were used for identification. RFLP with restriction enzymes *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, *MboI* and phylogenetic analysis based on nucleotide sequences of 16S rDNA were also used to identify the phytoplasmas detected in sugarcane and bougainvillea. Transmission of phytoplasmas from bougainvillea to periwinkle by dodder was conducted to demonstrate the pathogenicity of this agents. Results showed that genomic fragments of 1.2kb were amplified, evidencing the presence of phytoplasmas in 33% and 60% of symptomatic sugarcane and bougainvillea plants, respectively. PCR with specific primer pairs demonstrated that phytoplasmas affiliated to groups 16SrI and 16SrIII were associated with bougainvillea proliferation, while a phytoplasma belonging to group 16SrI was present in sugarcane plants exhibiting symptoms of yellow leaf. RFLP and phylogenetic analysis revealed that phytoplasmas found in bougainvillea could be classified within subgroups 16SrI-B and 16SrIII-B, and that phytoplasma detected in sugarcane is a representative of subgroup 16SrI-B. Almost the totality of symptomatic sugarcane plants showed the presence of virus, by using RT-PCR, indicating that a coinfection of virus and phytoplasma could be responsible by inducing the disease. Positive results for transmission revealed that both phytoplasmas found in bougainvillea are causal agents of the disease. This is the first report of phytoplasma as agent of disease in that species.

Keywords: Mollicutes; Molecular techniques; Pathogen; Diagnoses

1 INTRODUÇÃO GERAL

Fitoplasmas são procariotos, unicelulares, pleomórficos pertencentes à classe Mollicutes, os quais incitam enfermidades em diversas espécies vegetais (MCCOY; CAUDWELL; CHANG, 1989; MARCONE et al., 1997; SEEMÜLER et al., 1998). Antes dos fitoplasmas serem descobertos por pesquisadores japoneses, no final da década de sessenta (DOI et al., 1967), as doenças de plantas conhecidas como ‘amarelos’ eram atribuídas aos vírus, no entanto, partículas virais nem sempre eram observadas em tecidos doentes (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). Em razão dos sintomas provocados por fitoplasmas serem semelhantes àqueles causados por vírus e pelo fato dos fitoplasmas não serem isolados em meio de cultura, a confirmação de diagnoses baseadas em sintomatologia exige a detecção destes procariotos nos tecidos da planta doente.

Um grande avanço nos estudos sobre fitoplasmas teve início no final da década de oitenta, com o desenvolvimento de métodos moleculares como a técnica de PCR-Polymerase Chain Reaction e as análises de RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). Este avanço levou à obtenção de informações genéticas, bioquímicas e fisiológicas, as quais permitiram maior compreensão sobre as relações patógeno/planta/vetor, além de revelar a diversidade genética existente entre os fitoplasmas (FIRRAO; GARCIA-CHAPA; MARCZACHI, 2007).

Atualmente, os fitoplasmas são classificados em 17 grupos e mais de 40 subgrupos (LEE et al., 1998), com base nas análises de RFLP e sequenciamento do gene 16S rRNA. Além desses grupos, existe a proposição de 24 espécies de “*Candidatus phytoplasma*” (AROCHA et al., 2005; LEE et al., 1998; LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000; LEE et al., 2004; VALIUNAS; STANIULIS; DAVIS, 2006) e uma proposta de classificação em 28 grupos, fundamentada em análise de sítios putativos de restrição (WEI et al., 2007). O grupo 16SrI (‘Aster yellows’) congrega mais de cem distintos fitoplasmas, sendo considerado o maior dos grupos conhecidos (JOMANTIENE et al., 1998; LEE et al., 2003; MARCONE et al., 2000). O segundo, é o grupo 16SrIII, que reúne fitoplasmas agentes de doenças relatadas em praticamente todas as regiões do mundo. No Brasil, representantes do grupo 16SrI e 16SrIII também são os fitoplasmas mais encontrados causando doenças em plantas. São exemplos o enfezamento do milho (BEDENDO; DAVIS; DALLY, 2000), superbrotamento do maracujazeiro (RIBEIRO; BEDENDO 2007),

superbrotamento do chuchu (MONTANO et al., 2000), cálice gigante do tomateiro (AMARAL MELLO et al., 2006), enfezamento da berinjela (BARROS, 2002; AMARAL MELLO et al., 2007), lenho mole da macieira (RIBEIRO; BEDENDO; SANHUEZA, 2007), amarelo da videira (NERONI; BEDENDO; KUNIYUKI, 2006), superbrotamento do hibisco (MONTANO et al., 2001), superbrotamento da primavera (SILVA et al., 2006a), superbrotamento da begônia (RIBEIRO et al., 2006), a síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (SILVA et al., 2006b), entre outras .

As doenças causadas por esses agentes caracterizam-se por provocar anormalidades no desenvolvimento de plantas, as quais sugerem a ocorrência de distúrbios hormonais. Os sintomas mais comuns exibidos por plantas doentes são clorose foliar, superbrotamento de ramos, subdesenvolvimento da planta ou de suas partes, queda de folhas, flores e frutos jovens, enrolamento de folhas, alterações cromáticas nas flores, esterilidade de órgãos florais, filodia, virescência, necrose do floema e declínio generalizado (DAVIS, 1995).

No presente trabalho foram investigadas duas doenças causadas por fitoplasmas, ou seja, a síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar e o superbrotamento da primavera (*Bougainvillea spectabilis*). A síndrome do amarelecimento foliar é conhecida desde o início da década de noventa, sendo considerados como seus agentes etiológicos um vírus e um fitoplasma. Alguns trabalhos conduzidos por pesquisadores brasileiros demonstraram a presença freqüente de um luteovírus em tecidos de plantas sintomáticas (VEGA; SCAGLIUSI; ULIAN, 1997), além da transmissão deste vírus por espécies de afídeos (SCAGLIUSI; LOCKHART, 2000). No entanto, pesquisas também mostraram uma associação freqüente entre planta doente e fitoplasma, sem contudo identificar o fitoplasma envolvido com a síndrome (PALMA; BEDENDO; CASAGRANDE, 2001). Em plantas de primavera cultivadas comercialmente em Valinhos/SP foram observados, em 2005, sintomas típicos de fitoplasmas, sendo que danos foram constatados em função da ocorrência da doença. Tanto o aspecto prático como acadêmico deste achado levaram à presente investigação, na qual se buscou esclarecer a etiologia desta nova doença, aqui denominada de superbrotamento, uma vez que nenhum relato anterior foi encontrado na literatura especializada.

Com a finalidade de aumentar os conhecimentos sobre os fitoplasmas envolvidos com estas importantes doenças ocorrentes nestas duas relevantes espécies comerciais, foram definidos os seguintes objetivos para o presente trabalho: demonstrar que fitoplasmas são os agentes

causais do superbrotamento da primavera e identificar molecularmente tanto este fitoplasma como aquele associado à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar, relacionando-os filogeneticamente com outros fitoplasmas conhecidos.

REFERÊNCIAS

- AMARAL MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; CAMARGO, L.E.A. Identidade molecular dos fitoplasmas associados aos enfezamentos do tomateiro e da berinjela com base na análise do gene 16S rDNA. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p. 113-118, 2007.
- AMARAL MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; KITAJIMA, E. W.; RIBEIRO, L.F.C.; KOBORI, R. Tomato big bud associated with a phytoplasma belonging to group 16SrIII in Brazil. **International Journal of Pest Management**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 233-237, 2006.
- AROCHA, Y.; LÓPEZ, M.; PIÑOL, B.; FERNANDEZ, M.; PICORNELL, B.; ALMEIDA, R.; PALENZUELA, I. ‘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**, Reading, v.55, p. 2451–2463, 2005.
- BARROS, T.S.L. **Caracterização molecular de Mollicutes fitopatogênicos no Brasil**. Brasília, 2002. 105p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2002.
- BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E. ; DALLY, E. Detection and identification of the mayze bushy stunt phytoplasma in corn plants in Brazil using PCR and RFLP. **International Journal of Pest Management**, London, v. 46, n.1, p.73-76, 2000.
- BERTACCINI, A. Phytoplasmas diversity, taxonomy, and epidemiology. **Frontieres in Bioscience**, Washington, v.12, p. 673-689, 2007.
- DAVIS, R.E. Fitoplasmas: Fitopatógenos procarióticos sem parede celular habitantes de floema e transmitidos por artrópodos. **Revisão Anual de Patologia de Planta**, Passo Fundo, v.3, p.1-27, 1995.
- DOI, Y.; TERANAKA, M.; YORA, K.; ASUYAMA, H. 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. **Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v.33, p.259-266, 1967.
- FIRRAO, G.; GARCIA-CHAPA, M.; MARCZACHI, C. Phytoplasmas: genetics, Diagnosis and relationships with the plant and insect host. **Frontiers in Bioscience**, Washington, v. 12, p.1353-1375, 2007.

JOMANTIENE, R.; DAVIS, R. E.; MAAS, J.; DALLY, E. L. Classification of new phytoplasma associated with disease of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene operon sequence. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.48, p.269-277, 1998

KITAJIMA, E.W. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1986-1993). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, (Supl. Especial) p.92, 1995.

LANGER, M.; MAIXNER, M. Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. **Vitis**, Siebeldingen, v.43, p.191-199, 2004.

LAUER, U.; SEEMÜLLER, E. Physical map of the chromosome of the apple proliferation phytoplasma. **Journal of Bacteriology**, Washington v.182, p.1415-1418, 2000.

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

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

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

LEE, I.-M.; 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.; SEEMULLER, E. Detection and identification of phytoplasmas infecting vegetable, ornamental and forage crops in southern Italy. **Journal Plant Pathology**, Bari, v.79, p.211-217, 1997.

MARCONE, C.; LEE, I.-M.; DAVIS, R.E.; RAGOZZINO, A.; SEEMULLER, E. Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and tuf gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, p. 1703-1713, 2000.

MCCOY, R.E.; CAUDWELL, A.; CHANG, C.J.; et al. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: WHITCOMB, R.F.; TULLY, J.G. **The Mycoplasmas**. New York: Academic Press, p.545-640, v.5, 1989.

- MONTANO, H.G.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; PIMENTEL, J.P.; BRIOSO, P.S.T. Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, p.429-436, 2000
- NERONI, R.C.; BEDENDO, I.P.; KUNIYUKI, H. Fitoplasma associado com sintomas do tipo amarelo em videira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, p.45, 2006, suplemento.
- PALMA, F.M.S.; BEDENDO, I.P.; CASAGRANDE, M. Presença de fitoplasma em plantas de cana de açúcar com sintomas da síndrome do amarelecimento foliar. **Fitopatologia Brasileira**, Jaboticabal, v.26, p.507, 2001. suplemento.
- RIBEIRO, L. F. C.; BEDENDO, I.P. Associação constante de um fitoplasma do grupo III com o superbrotamento da maracujazeiro cultivado em diversas regiões brasileiras. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, p.60, 2007. suplemento.
- RIBEIRO, L.F.C.; BEDENDO, I.P.; SANHUEZA, R.M.V. Evidência molecular da ocorrência de um fitoplasma associado ao lenho mole da macieira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.1, p.30-33, 2007.
- RIBEIRO, L.F.C.; AMARAL MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; GIÓRIA, R. Phytoplasma associated with shoot proliferation in begônia. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.63, p.475-477, 2006.
- SCAGLIUSI, S.M. ; LOCKHART, B.E. Transmission, characterization and serology of sugarcane yellow leaf luteovirus. **Phytopathology**, Saint Paul, v.90, p.120-124, 2000.
- SEARS, B.B.; KIRKPATRICK, B.C. Uveiling the evolutionary relationship of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. **ASM News**, Ann Arbor, v.60, p.307-312, 1994
- SEEMULLER, E.; MARCONE, C.; LAUER, U.; RAGOZZINO, A.; GOSCHL, M. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 80, p. 3-26, 1998
- SILVA, E.G.; HAAS, I.C.R.; FLORES, D.; BEDENDO, I.P. Detecção de fitoplasma em plantas de primavera (*Bougainvillea spectabilis*) com sintomas de superbrotamento. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32. p.45, 2006a. Suplemento.
- SILVA, E.G.; BEDENDO, I.P.; HAAS, I.C.R.; CASAGRANDE, M. Identificação de um fitoplasma do grupo 16SrI em plantas de cana-de-açúcar com síndrome do amarelecimento foliar. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31. p.189-190, 2006b. Suplemento.
- VALIUNAS, D.; STANIULIS, J. ; DAVIS, R. E. ‘Candidatus phytoplasma fragariae’, a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry, *Fragaria* 6 ananassa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.56, p.277-281, 2006.

VEGA, J.; SCAGLIUSI, S.M.M.; ULIAN, E.C. Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: evidence of association with a luteovirus. **Plant Disease**, Saint Paul, v.81, p.21-26, 1997.

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

2 DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO FITOPLASMA ASSOCIADO À SÍNDROME DO AMARELECIMENTO FOLIAR DA CANA – DE - AÇÚCAR

Resumo

Na década de noventa, uma doença conhecida como síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar ou amarelinho causou danos expressivos à cultura e provocou a substituição de uma cultivar muito produtiva e extensivamente plantada no estado de São Paulo. A doença também foi registrada em outros países e investigações sobre a etiologia evidenciaram a associação da doença com vírus, com fitoplasma e, mesmo, com a presença conjunta destes dois agentes. No Brasil, alguns trabalhos também relataram a associação da síndrome com o vírus e uma única referência existe sobre a detecção de fitoplasma em plantas exibindo sintomas da doença. Com o objetivo de caracterizar molecularmente o fitoplasma associado com a doença presente no estado de São Paulo, relacionando-o com outros já caracterizados em diversas áreas canavieiras do mundo, foi conduzido o presente trabalho. Amostras de plantas sintomáticas foram coletadas nas regiões de Piracicaba, Jaú e Ribeirão Preto. Através de duplo PCR com primers P1/Tint ou P1/P7, na primeira reação, e o par R16 F2n/R2, na segunda, a presença do fitoplasma foi detectada em 33% das plantas, evidenciada pela amplificação de fragmentos de 1,2kb, correspondentes ao 16SrDNA. Ainda, usando duplo PCR com os primers específicos R16(I)F1/R1, foi demonstrado que o fitoplasma detectado pertencia ao grupo 16SrI. Análises de RFLP processadas com as enzimas *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, e *MboI* confirmaram a classificação do fitoplasma como um representante do grupo 16SrI, sub-grupo B. O sequenciamento da região do 16S rDNA deste fitoplasma revelou que as seqüências nucleotídicas apresentavam 99% de similaridade com aquelas presentes em fitoplasmas do grupo 16SrI-B, associados à doença em outras partes do mundo. Em quase todas as amostras positivas para fitoplasma também foi detectada a presença de um luteovírus, através do uso de RT-PCR, o que constituiu uma forte evidência de que o amarelecimento foliar da cana-de-açúcar no estado de São Paulo está associado a um complexo formado por fitoplasma e vírus.

Palavras-chaves: *Saccharum* spp.; Caracterização; Mollicutes; Técnicas moleculares

Abstract

In ninety decade, a disease named yellow leaf caused serious damage to sugarcane crop and led to replacement of the cultivar with high yield and widely distributed in the São Paulo State. The syndrome was also reported in other sugarcane-producing countries and investigations about etiology evidenced that phytoplasmas and/or virus were associated with the disease. In Brazil, studies also revealed the frequent association of virus with the disease, but only one work pointed the presence of phytoplasmas in plants exhibiting symptoms of yellow leaf. Thus, the present study was conducted to in order to confirm this results and to identify molecularly those phytoplasmas, allowing comparisons with others phytoplasmas agents of the disease. Samples from symptomatic plants belonging to three cultivars were collected in Piracicaba, Jaú and

Ribeirão Preto, in the São Paulo State. Using nested PCR with primer pairs P1/Tint or P1/P7 in the first reaction followed by R16F2n/R2, phytoplasmas were detected in 33% of symptomatic plants from the field, by amplification of a 16S rDNA fragment of 1.2kb. In nested PCR using group-specific primers R16(I)F1/R1, a product of 1.1kb was amplified indicating that a phytoplasma belonging to group 16SrI was associated with all diseased sugarcane plants. RFLP analysis conducted with restriction enzymes *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, and *MboI* confirmed the classification of the phytoplasma as a representative of group 16SrI and subgroup 16SrI-B. Sequencing of 16SrDNA region revealed that sequences found in the phytoplasma associated with sugarcane yellow leaf are 99% similar with those present in phytoplasmas affiliated to subgroup 16SrI-B. In almost the totality of positive samples for phytoplasma, virus was detected, by using RT-PCR, revealing that the sugarcane yellow leaf is associated with coinfection caused by phytoplasma and virus.

Keywords: *Saccharum* spp.; Characterization ; Mollicutes; Mollecular tecnicas

2.1 Introdução

A cana-de-açúcar é um híbrido multiespecífico, recebendo a designação *Saccharum* spp. Esta planta é originária do sudeste asiático e foi introduzida no Brasil por Martim Affonso de Souza, em 1532, sendo plantada, inicialmente, na Capitania de São Vicente.

A cultura da cana é uma das maiores e mais antigas do Brasil e do Estado de São Paulo, assumindo grande importância sócio-econômica, gerando aproximadamente R\$11,5 bilhões ao ano, e mais de cinco milhões de empregos diretos e indiretos. Nas últimas safras, o Estado de São Paulo contribuiu com 60% da moagem nacional, totalizando 255.140.812 toneladas de colmos processados, colocando a cultura como responsável por 35% do PIB (Produto Interno Bruto) do Estado. (FNP, 2006; UNICA, 2005).

Em relação à safra 2007/2008, 473.158 milhões de toneladas de cana-de-açúcar serão utilizadas pela indústria, sendo 221.989,8 milhões de toneladas para a produção de açúcar e 251.168,1 milhões para produção de álcool. Existem informações que apontam um aumento de 12% na área plantada, em relação à safra passada. Esses avanços se devem principalmente aos novos projetos desenvolvidos, sobretudo, nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná e São Paulo (FNP, 2007).

O setor canavieiro do Brasil despertou o interesse de diversos países, principalmente pelo baixo custo de produção de álcool e açúcar. O álcool tem sido cada vez mais importado por nações de primeiro mundo, que visam reduzir a emissão de poluentes na atmosfera e a dependência de combustíveis fósseis. Um estudo, publicado recentemente, revelou que em razão

da expansão na produção de etanol, as lavouras de cana-de-açúcar devem ocupar uma área 66,6% superior aos atuais 6,16 milhões de hectares nos próximos 12 anos. Ainda, o estudo "Projeções do Agronegócio no Brasil e no Mundo", recém-concluído pela Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura, também indicou que a fatia da cana sobre o total plantado no país saltará nada menos do que 42,2% nestes 12 anos, passando dos atuais 11,6% para 16,5% na safra 2017/18, correspondendo a 10,3 milhões de hectares. Com isso, a produção de etanol saltaria 120%, passando de 18,9 bilhões para 41,7 bilhões de litros (ÚNICA, 2007).

É fato que toda essa expansão submete a cultura a uma ampla variedade de fatores de estresse capazes de reduzir sua produtividade, sendo as doenças um fator bastante relevante. As cinco principais doenças da cultura da cana-de-açúcar são a escaldadura, o raquistismo das soqueiras, o mosaico, o carvão e a síndrome do amarelecimento foliar (TOKESHI, RAGO, 2005). A síndrome do amarelecimento foliar, também conhecida por “amarelinho” foi relatada no Brasil em 1989, mas começou a se tornar problema sério a partir do início da década de 90 (VEGA; SCAGLIUSI; ULIAN, 1997). Plantações comerciais feitas com a variedade SP71-6163, no Estado de São Paulo, mostraram perdas de produção de até 50%. Nesta época, as investigações sobre a causa da doença, conduzidas no Brasil e no exterior, levantaram várias hipóteses, entre as quais fatores relacionados ao solo e clima ou mesmo a agentes bióticos, como fungos, nematóides, vírus e fitoplasmas. Alguns trabalhos demonstraram a presença freqüente de luteovírus em tecidos de plantas sintomáticas (VEGA; SCAGLIUSI; ULIAN, 1997) e alguns estudos revelaram que este vírus era transmitido por espécies de afídeos comumente encontradas em território brasileiro, tais como *Melanaphys sacchari*, *Sypha flava* (LOPES et al., 1997) e *Rhopalosiphum maidis* (SCAGLIUSI; LOCKHART, 2000). No entanto, pesquisas também mostraram uma associação freqüente entre planta doente e fitoplasma. Na África do Sul, a presença de fitoplasma foi detectada em plantas que apresentavam sintomas muito similares àqueles observados no Brasil (CRONJÉ et al., 1998). A associação da síndrome do amarelecimento foliar com fitoplasma foi relatada no Estado de São Paulo em 2001, sendo esta associação verificada em mais de 60% das plantas que exibiam sintomas típicos da doença (PALMA; BEDENDO; CASAGRANDE, 2001).

A partir da substituição gradual da variedade SP71-6163 por outras mais resistentes, a incidência da doença caiu drasticamente e passou a não ser pouco observada nos campos de cultivo. No entanto, a preocupação com a mesma tem se mantido ao longo do tempo, tanto que os

programas de melhoramento genético e o serviço de “roguing” em viveiros se mantêm alertas em relação ao problema. Atualmente, a doença pode ser considerada endêmica no estado de São Paulo e o seu potencial em causar dano foi recentemente comprovado através de um ensaio de campo, onde a produção de parcelas com plantas doentes foi reduzida em 31%, em comparação com parcelas de plantas assintomáticas (Casagrande¹, informação pessoal, 2007).

A importância econômica da cana-de-açúcar, os danos causados pela doença no passado recente, as novas observações sobre a ocorrência da doença em algumas áreas do Estado de São Paulo, se constituem em pontos que justificam novas pesquisas sobre o assunto. O presente trabalho teve como foco a associação entre fitoplasma e a síndrome do amarelecimento foliar, visando principalmente a sua caracterização molecular. Assim, os objetivos do presente trabalho foram detectar, identificar, classificar e sequenciar a região do 16S rDNA do fitoplasma encontrado em associação com plantas doentes, relacionando o fitoplasma presente no Estado de São Paulo com aqueles já caracterizados em outras regiões do mundo.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão bibliográfica

2.2.1.1 Os Fitoplasmas

A demonstração de que as doenças conhecidas como "amarelos" estavam associadas a organismos do tipo micoplasma (MLOs) e não aos vírus foi feita na final da década de sessenta (DOI et al., 1967). Investigações posteriores comprovaram a importância desses microrganismos como patógenos de plantas, sendo que no final da década de oitenta, centenas de doenças já eram creditadas a esses agentes (MCCOY et al., 1989). Em meados dos anos noventa, foi proposto o termo fitoplasma para designar os MLOs associados a doenças de plantas (SEARS; KIRKPATRICK, 1994).

Fitoplasmas são procariotos, unicelulares e sem parede celular, não cultiváveis em meio de cultura, habitantes dos vasos de floema, sendo também referidos na literatura especializada pelo termo mollicutes (DAVIS, 1995). Várias doenças associadas aos fitoplasmas têm se

¹ CASAGRANDE, M. Centro de Tecnologia Canavieira – CTC.

mostrado bastante destrutivas, causando perdas relevantes em espécies de importância econômica, tanto alimentícias como florestais e ornamentais. No âmbito mundial, são exemplos o enfezamento do milho, o superbrotamento da macieira, os amarelos da videira, o declínio da pereira, o nanismo do arroz, o amarelo do pessegueiro, entre muitas outras (DAVIS, 1995; GUMPF, 1988; LEE et al., 2004; SCOTT; ROSENKRANZ; NELSON, 1977). No Brasil, algumas doenças associadas a fitoplasmas têm sido registradas como o enfezamento do milho, o superbrotamento do maracujazeiro e da mandioca, o irisado do chuchuzeiro, o cálice gigante do tomateiro (AMARAL MELLO et al., 2006; KITAJIMA, 1995), o enfezamento da berinjela (BARROS, 2002; AMARAL MELLO et al., 2007), o lenho mole da macieira (RIBEIRO, BEDENDO, SANHUEZA, 2007), o superbrotamento da crotalária (AMARAL MELLO et al., 2004), o superbrotamento do hibisco (KITAJIMA, 1995, MONTANO et.al, 2001). Além das cultivadas, destaca-se a ocorrência de fitoplasmas em diversas silvestres e daninhas, o que pode ter implicações com a epidemiologia de diversas doenças (KITAJIMA, 1995).

A similaridade existente entre os sintomas associados aos fitoplasmas e aqueles provocados por patógenos de natureza viral, a dificuldade de se observar esses microorganismos nos tecidos da planta doente e o não cultivo dos mesmos em meio de cultura se constituem em obstáculos para uma diagnose segura e precisa. Portanto, a detecção deste tipo de organismo nos tecidos de plantas sintomáticas se constitui em fator de grande importância para fins de diagnose. Apesar de relevante para a diagnose de doenças, a detecção de fitoplasmas na planta não possibilita identificá-los. A identificação torna possível demonstrar a presença de diferentes fitoplasmas numa mesma espécie vegetal, caracterizando uma infecção mista, ou relacionar fitoplasmas similares que ocorrem em espécies vegetais diferentes (DAVIS, 1995). O entendimento desses aspectos epidemiológicos pode contribuir para a aplicação de medidas mais adequadas, visando um controle mais eficiente das doenças.

O advento da moderna biotecnologia tem projetado nova luz sobre a detecção e identificação de fitoplasmas e, ao mesmo tempo, tem contribuído de maneira prática para a diagnose de doenças associadas aos fitoplasmas (MILLER; MARTIN, 1988; DAVIS; PRINCE, 1994). A contribuição dos métodos moleculares, especialmente a técnica de PCR, para fins de diagnose pode ser reconhecida através do seu uso rotineiro nos modernos laboratórios de patologia vegetal de universidades, institutos de pesquisa e serviços de inspeção e quarentena de plantas de muitos países (GARCIA-CHAPA, et al., 2004). Para identificação, a técnica de RFLP

(Restriction Fragment Length Polymorphism) tem permitido separar por, similaridade genética baseada no gene 16S rDNA, os fitoplasmas em diversos grupos e subgrupos (LEE et al., 1998).

2.2.1.2 A Síndrome do Amarelecimento Foliar da Cana-de-Açúcar (SAFCA)

Existem suspeitas sobre a ocorrência de doenças associadas a fitoplasmas em várias espécies vegetais comercialmente importantes, no Brasil, para as quais a etiologia ainda não está totalmente esclarecida. Entre estas doenças se encontra a síndrome do amarelecimento foliar em cana de açúcar (SAFCA), também conhecida como “amarelinho da cana”.

No estado de São Paulo, os primeiros sintomas desta doença foram observados em 1989, na região de Ourinhos e em 1990 em Piracicaba, na variedade SP71-6163 (CASAGRANDE; SANGUINO; FERREZINI, 1997). Naquela época, esta variedade era plantada em mais de 50% das áreas de cultivo, tendo um papel relevante para a indústria sucro-alcooleira. Com o tempo, esses sintomas passaram a ser encontrados em praticamente todas as áreas onde se cultivava a variedade SP71-6163. Ainda, outras variedades comercialmente importantes também passaram a apresentar os mesmos sintomas presentes na SP71-6163, porém em menor intensidade (CASAGRANDE; SANGUINO; FERREZINI, 1997). A partir de 1994 teve início o declínio da variedade, ocorrendo redução constante da área plantada, sendo que no ano de 2000, a área comercial ocupada pela variedade era insignificante. Com a substituição da variedade suscetível, a doença não mais atingiu grandes proporções. Apesar disto, a doença continua ocorrendo com baixa intensidade em variedades atualmente plantadas e se constitui em problema potencial para novas variedades que possam vir a ser recomendadas para plantio. A preocupação com o amarelecimento foliar é evidenciada pelo fato desta doença fazer parte de programa de melhoramento genético.

Na África do Sul e nas Ilhas Maurício, a doença tem sido registrada desde 1994, em vários clones e variedades comerciais (BAILEY; BECHET; CRONJÉ, 1996). Pesquisas mostraram que a doença apresentava caráter sistêmico e que os primeiros sintomas apareciam após dois anos de ciclo de propagação vegetativa (IRVINE, 1993). Esta doença não apresenta sintomas específicos e isso pode levar a erros de diagnóstico. Alguns fatores como deficiência nutricional, injúrias causadas por insetos (broca da cana-de-açúcar), compactação do solo, estresse hídrico e até mesmo o processo de maturação natural podem estar envolvidos como

possíveis causas do aparecimento de sintomas que se confundem com aqueles da síndrome (CASAGRANDE; SANGUINO; FERREZINI, 1997).

Na SAFCA, inicialmente observa-se o amarelecimento intenso da porção abaxial da nervura central das folhas com correspondente avermelhamento da porção adaxial, sendo que com o decorrer do tempo, todo o limbo foliar pode tornar-se amarelado (SANGUINO, 1993; COMSTOCK; IRVINE; MILLER, 1994). As plantas afetadas, geralmente apresentam porte reduzido, colmos mais finos e entre-nós mais curtos. O sistema radicular normalmente apresenta-se subdesenvolvido. Na maioria dos casos, as plantas localizadas nas margens dos talhões são as primeiras a apresentarem os sintomas que normalmente surgem por volta dos seis meses de idade. A intensidade dos sintomas pode ser provocada por algumas condições adversas, como compactação do solo, encharcamento do solo, frio, seca, além de injúrias provocadas por insetos (COMSTOCK; IRVINE; MILLER, 1994; BAILEY; BECHET; CRONJÉ, 1996).

Além dos sintomas externos, foi verificada que as folhas da cultivar SP71-6163, presentes em plantas sintomáticas, apresentavam maior concentração de açúcar em relação àquelas produzidas em plantas assintomáticas (CASAGRANDE; SANGUINO; FERREZINI, 1997). Este mesmo tipo de observação foi feito por Irvine (1993), o qual determinou maior teor de açúcar em folhas doentes, atribuindo este fato a uma alteração no metabolismo de carboidrato. Em trabalho mais recente realizado por Fontaniella et al., (2003), foi verificado em plantas com sintoma da síndrome do amarelecimento foliar alterações na composição de polissacarídeos, fenóis e poliaminas. Avaliações do caldo extraído de nervuras de folhas afetadas mostraram que o brix de folhas velhas com sintomas foi mais elevado que os valores encontrados para folhas novas sem sintomas. O teor de amido na folha também foi maior em folhas mais velhas, e não havia variação diurna em brix ou teor de amido. Normalmente, o produto fotossintetizado em excesso é convertido em açúcar e, posteriormente, em amido durante o dia; à noite, o amido é convertido novamente em açúcar e exportado para o colmo. O acúmulo de açúcar nas folhas sugere a ocorrência de bloqueio do floema, a via de transporte do açúcar da folha para o colmo e raízes. O acúmulo de açúcar nas folhas pode diminuir a taxa de fotossíntese e a combinação deste bloqueio metabólico da fotossíntese com diminuição da área fotossintética, devido ao amarelecimento e avermelhamento dos tecidos, pode contribuir para o crescimento reduzido dos colmos, teores menores de açúcar no colmo e sistema radicular pouco desenvolvido. A redução

no volume radicular pode causar estresse hídrico e, conseqüentemente, aumento aparente do teor de fibra.

Até o momento, a etiologia da SAFCA não foi totalmente esclarecida. Dentre as causas bióticas, alguns pesquisadores acreditam se tratar de um luteovírus (SCHENCK; HU; LOCKHART, 1997; VEGA; SCAGLIUSI; ULIAN, 1997; SCAGLIUSI; LOCKHART, 2000), porém, existem outros que apontam para os fitoplasmas como provável agente causal (IRVINE, 1993; BAILEY; BECHET; CRONJE, 1996; DAVIS, 2000; AROCHA et al., 2000; PALMA; BEDENDO; CASAGRANDE, 2001; PARMESUR et al., 2003; AROCHA et al., 2005). Na Flórida (USA), o exame de amostras sintomáticas e assintomáticas de cana-de-açúcar coletadas no campo e em casa de vegetação demonstrou a associação entre a doença e fitoplasmas (DAVIS, 2000). Em Cuba, fitoplasmas foram detectados em tecidos de plantas que exibiam sintomas da síndrome, sendo a grande maioria destes fitoplasmas classificados dentro do grupo 16SrI (AROCHA et al., 2000). Um trabalho conduzido na África do Sul demonstrou ocorrência de fitoplasmas em 162 das 163 amostras de plantas que exibiam sintomas da doença (CRONJÉ et al. 1997). Posteriormente, um estudo complementar mostrou que somente fitoplasmas estavam associados à doença, uma vez não foi constatada a presença de luteovírus nas plantas sintomáticas de variedades comerciais (CRONJÉ et al., 1998). Em um trabalho visando associar os sintomas do amarelinho com presença de fitoplasma, este agente foi detectado em 63% das plantas doentes da variedade SP71-6163, amostradas em Piracicaba/SP (PALMA; BEDENDO; CASAGRANDE, 2001).

2.2.2 Material e métodos

2.2.2.1 Amostras e extração de DNA total

As amostras foram compostas de folhas obtidas de plantas sintomáticas e de plantas sadias das variedades SP71-6163, SP71-6180 e SP89-1115. Plantas apresentando sintomas foram coletadas em campos localizados nas regiões de Piracicaba, Ribeirão Preto e Jaú, no Estado de São Paulo (Tabela 1). Dez amostras de plantas sintomáticas foram coletadas em cada região, sendo essas amostras subdivididas em sub-amostras para melhor processamento das mesmas.

Tabela 1 - Relação das amostras sintomáticas de variedades de cana-de-açúcar coletadas em três regiões canavieiras localizadas no estado de São Paulo

Amostras	Variedades	Data de coleta	Procedência
01	SP71-6163	20/06/2004	Piracicaba
02	SP71-6163	20/06/2004	Piracicaba
03	SP71-6163	20/06/2004	Piracicaba
04	SP71-6163	20/06/2004	Piracicaba
05	SP71-6163	20/06/2004	Piracicaba
06	SP71-6163	20/06/2004	Piracicaba
07	SP71-6163	20/06/2004	Piracicaba
08	SP71-6163	20/06/2004	Piracicaba
09	SP71-6163	03/10/2005	Piracicaba
10	SP71-6163	03/10/2005	Piracicaba
11	SP71-6180	25/06/2004	Jaú
12	SP71-6180	25/06/2004	Jaú
13	SP71-6180	25/06/2004	Jaú
14	SP71-6180	25/06/2004	Jaú
15	SP71-6180	25/06/2004	Jaú
16	SP71-6180	25/06/2004	Jaú
17	SP71-6180	25/06/2004	Jaú
18	SP71-6180	25/06/2004	Jaú
19	SP71-6180	26/06/2005	Jaú
20	SP71-6180	26/06/2005	Jaú
21	SP71-6180	7/02/2004	Ribeirão Preto
22	SP71-6180	7/02/2004	Ribeirão Preto
23	SP71-6180	7/02/2004	Ribeirão Preto
24	SP71-6180	7/02/2004	Ribeirão Preto
25	SP89-1115	20/07/2005	Ribeirão Preto
26	SP89-1115	20/07/2005	Ribeirão Preto
27	SP89-1115	16/09/2005	Ribeirão Preto
28	SP89-1115	16/09/2005	Ribeirão Preto
29	SP89-1115	16/09/2005	Ribeirão Preto
30	SP89-1115	16/09/2005	Ribeirão Preto

A partir destas sub-amostras foram feitas extrações de DNA total seguindo protocolo proposto por Lee et al., 1993. Para isso, pesou-se de 2g de material fresco de nervura de cada amostra e procedeu-se a maceração em nitrogênio líquido. Adicionou-se 14mL de solução Tampão de Extração I (5,42g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; 1,02g de K_2HPO_4 ; 25g de sucrose; 0,375g de BSA; 5,0g de PVP-10); adicionou-se 0,53g de ácido ascórbico para cada 100mL de tampão momentos antes de utilizá-lo, sendo o pH ajustado para 7,6. Essa mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 8mL de solução Tampão de Extração II (6g de Tris-base; 7,3g de NaCl; 18,6g de EDTA; volume para 500mL com água destilada e acerto de pH para 8,0). Volumes de 160 μ L de proteinase K e 880 μ L de sarkosyl 10% foram adicionados e os tubos foram mantidos por 2 horas a 55°C, em “banho-maria”. Após centrifugação a 8.000 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi

transferido para outros tubos, sendo adicionados 5,5mL de isopropanol. O material foi mantido a -20°C por uma noite. No dia seguinte, o material foi centrifugado por 15 minutos a 8.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em uma mistura de 3mL de solução tampão 1X TE, 75µL de SDS 20% e 60µL de proteinase K. Os tubos foram mantidos em “banho-maria” a 37°C por 1 hora e, em seguida, foram adicionados em cada tubo 525µL de NaCl 5M e 420µL de CTAB/NaCl, sendo feita uma nova incubação por 10 minutos a 65°C. Alíquota de 4mL de CIA (clorofórmio/álcool isoamílico 24:1) foi adicionada à mistura, sendo a mesma centrifugada a 6.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi removida para novos tubos, sendo acrescentados 4mL de CIA. Nova centrifugação foi conduzida 6.000 rpm por 5 minutos, salvando-se a fase aquosa para novos tubos, à qual foi adicionada 2mL de fenol e 2mL de CIA. A mistura foi centrifugada a 6.000 rpm por 5 minutos. Repetiu-se mais uma centrifugação a 6.000 rpm por 5 minutos acrescentando-se 4mL de CIA. Posteriormente, a fase aquosa foi transferida para novos tubos e acrescida de 2,5mL de isopropanol. Os tubos foram mantidos a -20°C por uma noite para ocorrer precipitação dos ácidos nucleicos. Após esse período, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 8mL de etanol 70%, mantendo-se a mistura a 4°C por 30 minutos. Fez-se nova centrifugação a 6.000 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. Os tubos foram invertidos sobre papel toalha e, após estarem devidamente secos, os precipitados foram ressuspendidos em 200-300µL de solução tampão TE 1X. O DNA total extraído foi armazenado a -20°C para servir de molde nas reações de PCR.

2.2.2.2 Detecção e condições de PCR

O DNA total extraído de cada amostra foi diluído em diferentes proporções em água deionizada autoclavada. Como controle negativo foi utilizado o DNA extraído de plantas sabidamente sadias. Os padrões positivos foram representados pelos DNA extraído de plantas de milho, comprovadamente infectadas por fitoplasma. Para a detecção de fitoplasmas foram utilizados os iniciadores universais P1/Tint (DENG; HIRUKI, 1991; SMART et al., 1996) e R16F2n/R2 (GUNDERSEE; LEE, 1996) em PCR duplo. Na primeira reação, foi usado o par P1/Tint, sendo o produto amplificado diluído em água deionizada na proporção 1:50 e usado como molde para a segunda reação com o par R16F2n/R2, sendo que, esses últimos iniciadores

amplificam uma sequência nucleotídica de aproximadamente 1.2kb do DNA genômico dos fitoplasmas, correspondente ao 16S rDNA.

Cada reação de PCR foi processada utilizando-se um volume final de 25 μ L, contendo: 1 μ L de extrato de DNA diluído de cada amostra utilizada, incluindo padrões positivos e negativos; 18,7 μ L de água destilada deionizada; 0,5 μ L de cada iniciador (concentração de 20 pmol/ μ L); 2 μ L de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo); 2,5 μ L de solução tampão 10X PCR e 0,17 μ L de Amplitaq 5U/ μ L. 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 minutos a 56°C para o anelamento e 2 minutos a 72°C para a extensão. 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.

2.2.2.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos gerados pelo duplo PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TAE 1X. A corrida eletroforética foi conduzida com voltagem constante de 65V por 90 min. A coloração dos produtos de amplificação foi feita utilizando-se Sybr safe® (1%) e a visualização foi processada em um transiluminador de ultravioleta. Utilizou-se o marcador molecular 1Kb Ladder (Life Technologies).

2.2.2.4 Identificação molecular através de PCR e RFLP

A identificação de fitoplasma por PCR foi feita a partir de produtos de PCR obtidos com os iniciadores P1/Tint. Estes foram diluídos em água deionizada na proporção 1:50 e submetidos à re-amplificação usando-se os iniciadores específicos R16(I)F1/R1, R16(III)F2/R1 e R16(V)F1/R1 (LEE et al., 1994). As condições de PCR e de eletroforese foram idênticas àquelas utilizadas para o par R16F2n/R2, descritas anteriormente. Como padrões positivos para os grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrV, foram utilizados DNA de plantas de milho, chuchu e crotalária, respectivamente, infectadas com fitoplasmas representantes dos grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrV. Água destilada deionizada foi utilizada como padrão negativo para as reações.

A identificação por RFLP foi conduzida a partir das seqüências amplificadas pelo PCR utilizando-se iniciadores universais R16 F2n/R2. Uma alíquota de 3-5 µl de cada produto de PCR foi digerida, separadamente, por diferentes enzimas de restrição, segundo as instruções do fabricante, durante um período de aproximadamente 24 horas a 37°C. As endonucleases, *AluI* (AG▼CT), *MseI* (T▼TAA), *MboI* (▼GATC), *HpaII* (C▼CGG), *HhaI* (GCG▼C), *RsaI* (GT▼AC) e *KpnI* (GGTAC▼C) foram utilizadas na identificação do fitoplasma presente nas amostras. Os produtos da digestão enzimática foram separados por eletroforese em géis de 4,5% de poliacrilamida. Estes foram coloridos com Sybr safe® (Invitrogen) e as bandas de DNA visualizadas em um transiluminador. O marcador molecular utilizado foi ΦX174RFHaeIII. O perfil eletroforético gerado pela digestão do 16S rDNA de fitoplasma presente em cada amostra foi comparado com padrões existentes na literatura (LEE et al., 1998), visando a sua classificação em grupos e subgrupos previamente estabelecidos.

2.2.2.5 Sequenciamento do 16S rDNA do fitoplasma

Os produtos do duplo PCR obtidos a partir das amostras de cana 18, 19, e 29 foram clonados em *Escherichia coli*, usando o “kit” de clonagem pGEM T Easy Vector System I (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos de 1,2 Kb clonados foram seqüenciados, e, através das seqüências nucleotídicas do 16S rDNA obtidas, foram comparados entre si e com seqüências de outros fitoplasmas.

Produtos de PCR obtidos foram purificados utilizando-se “kit” de purificação PureLink™ (Invitrogen), seguindo protocolo descrito pelo fabricante. Em um microtubo de 1,5mL foram adicionados 300 µL de tampão de captura (“binding buffer”) e 75 µL de produto do PCR obtido na reação com R16 F2n/R2. Após misturar a solução obtida com micropipeta (4 a 6 vezes), essa foi colocada em coluna (com filtro) acoplada ao tubo coletor e centrifugadas à 10000 rpm em temperatura ambiente. O produto que passou no tubo coletor foi descartado. A coluna foi recolocada no tubo coletor e adicionados 650 µL de tampão de lavagem (“Wash buffer”). Nova centrifugação foi conduzida a 10000 rpm, sendo o conteúdo do tubo coletor descartado e a coluna recolocada no mesmo tubo e submetida novamente à centrifugação em velocidade máxima (13000 rpm) por 3 minutos, para remover resíduos do tampão de lavagem. Essa mesma coluna foi colocada em um novo tubo e adicionados 50 µL de tampão de eluição (“elution buffer”) ou água destilada deionizada. A coluna contendo tampão de eluição e o DNA das amostras foi incubada à

temperatura ambiente por 1 min. Após esse período foi levada para a centrifugação à velocidade máxima (13000 rpm) por 2 min. Os produtos finais (DNAs purificados) foram armazenados a -20 °C, para posterior utilização na reação de sequenciamento. Antes da reação de sequenciamento, foi estimada a concentração de DNA das amostras. Para isso, uma alíquota de 1 µL do DNA purificado juntamente com 3 µL de tampão de carregamento foi aplicado em gel de agarose 1%, em tampão TE 0,5X, acrescido do corante Syber Safe (Invitrogen) e submetido à eletroforese. Os fragmentos de DNA purificados de aproximadamente 1,2 Kb de fitoplasma foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta juntamente com o marcador Lambda DNA.

Para a clonagem utilizou-se os produtos de PCR obtidos com R16F2n/R2 purificados e com concentração estimada de 400ng. A partir desse purificado foi feita a ligação em vetor pGEM®T Easy Vector System I (Promega), posteriormente clonado em *Escherichia coli* (estirpe DH5α) com choque térmico. A extração dos plasmídeos obtidos com a clonagem foi feita utilizando-se “kit” comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

Para a ligação do DNA purificado ao vetor plasmidial, com o uso do “kit” pGEM T Easy Vector System I (Promega), foram utilizados 3.0 µL do DNA purificado, 1 µL do vetor (25 ng.µL⁻¹), 5,0 µL de tampão ligase 2X e 1,0 µL de T4 DNA ligase (3 U.µL⁻¹), totalizando 10 µL da mistura para a ligação, que foi colocada em microtubo (1,5mL) e mantida por uma noite a 4 °C. Após esse período, a ligação estava pronta para ser transferida para células competentes de *E. coli*.

Na transformação foram adicionados 2 a 3µL do produto da ligação em 50µL de células competentes de *E. coli*, estirpe DH5α preparadas conforme Hanahan (1983), sendo a mistura colocada no gelo por 30 min. Após esse período, as células contendo a ligação foram submetidas a choque térmico por incubação a 42 °C por exatamente 50 segundos e, imediatamente, transferidas para o gelo por 2 min. A seguir foram adicionados 450 µL de meio SOC (1% de triptona; 0,5% extrato de levedura; 8,5 mM NaCl; 2,5 mM de KCl; 0,01 mM MgCl₂; 0,02 mM de glicose e água para completar volume de 1000 mL) pré-amornado à 37°C às células transformadas que foram incubadas a 37 °C por 2 horas em agitador moderado (200 rpm). Após o período de crescimento, foram plaqueados 100 µL das células transformadas em placas de Petri contendo 20 ml de meio LB (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,25% de NaCl; 4% de ágar), acrescidas de 20µL de ampicilina (100 mg.mL⁻¹), 20µL X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosida) na concentração de 50ng/ml e 20µL IPTG (isopropil-β-D-

tiogalactopiranosida) concentração de 50 mg.mL⁻¹. Os componentes X-gal e IPTG serviram para avaliar a atividade de β -galactosidase nos transformantes, permitindo diferenciá-los dos não transformantes. A placa foi mantida por uma noite em estufa a 37 °C para a quantificação de colônias e seleção das células transformadas com DNA plasmidial recombinante. As colônias recombinantes com o fragmento de DNA inserido no sítio de clonagem exibiram a cor branca (produzindo β -galactosidase não-funcional), enquanto as colônias não recombinantes mostraram-se azuis (produzindo β -galactosidase funcional). Os clones selecionados foram transferidos para tubos tipo “Falcon” contendo meio LB líquido com auxílio de palito estéril. Esses tubos foram incubados a 37°C sob agitação moderada, por cerca de 12 horas para a extração do DNA plasmidial. Foram selecionados 3 clones para cada amostra clonada. Para dois deles foi feita a extração do DNA plasmidial, e um foi preservado em glicerol (50%) e armazenado em freezer - 80°C. As extrações dos plasmídeos para posterior sequenciamento foi feita com uso de “kit” comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Antes do sequenciamento dos clones ou insertos obtidos, foi necessário fazer a confirmação desses no vetor plasmidial. Essa confirmação foi feita por PCR utilizando-se os iniciadores universais para o fitoplasma (R16F2n/R2) e um par de iniciadores para o vetor plasmidial pGEM T (M13F/M13R) e digestão com a enzima *EcoR*I.

Cada reação para sequenciamento continha 3 μ l de água Milli-Q autoclavada, 2 μ l de Buffer 2,5x (Save Money, 1M Tris-Hcl pH=9,0; 1M MgCl₂), 1 μ l de cada primer na concentração de 5pmoles/ μ l, 2 μ l de DYEnamic (GE) e 2 μ l de DNA de cada amostra clonada. O equipamento termociclador onde foram processadas as reações foi programado para um total de 30 ciclos, compreendendo as etapas de desnaturação por 20 segundos a 95°C, anelamento por 15 segundos a 50°C e extensão por 60 segundos a 60°C. A reação de sequenciamento dos clones foi feita utilizando os iniciadores M13F/M13R ou T7/SP6. Estes iniciadores flanqueiam o vetor pGEM T, com isso é possível obter o DNA de interesse clonado no plasmídeo utilizado.

A precipitação dos fragmentos foi feita utilizando-se 2 μ l sódio/EDTA, misturando-se com auxílio de vortex, seguido do acréscimo de 60 μ l de etanol 100% e centrifugação por 15 min. a 14.000 rpm. O sobrenadante foi retirado com auxílio de micropipeta. Sobre o precipitado resultante da centrifugação foi adicionado 150 μ l de etanol 70% e feita uma nova centrifugação por 5 min a 14.000 rpm à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi seco a 40 °C por 10 min. As amostras amplificadas

foram diluídas em 10µl de Hi-Di Formamida e dispostas nas placas do sequenciador (ABI 3100 - ABI Prism / Applied Biosystems). As seqüências geradas foram analisadas utilizando-se programas para construção e análise de seqüências (Bioedit, Phred phrap, MEGA e Multiple Sequence Alignment – CLUSTALW). Posteriormente, estas seqüências foram comparadas com seqüências de outros fitoplasmas depositados no “GenBank”, possibilitando demonstrar o nível de identidade genética existente entre o fitoplasma presente na cana com outros fitoplasmas que ocorrem nesta mesma espécie em outras áreas do mundo. Para as análises filogenéticas, foram utilizados seqüências de 14 diferentes grupos de fitoplasma , 6 subgrupos pertencente ao grupo 16SrI e o organismo *Acholeplasma laidlawii* (Tabela 2). Uma árvore filogenética foi construída pelo método Neighbour-joining e o “Bootstraping” foi processado por 1000 vezes.

Tabela 2 - Representantes de diversos grupos e subgrupos de fitoplasmas, utilizados neste trabalho, para estudos de relação filogenética entre eles e o fitoplasma encontrado em plantas de cana-de-açúcar apresentando sintomas de amarelecimento foliar.

Fitoplasma	Doença	Nº de acesso GenBank	Referências
ScYL-BrI	Yellow leaf syndrome	EU423900	Presente estudo
16SrI: Aster yellows			
I-A	Chrysanthemum yellows (AY)	AY180956	GenBank
I-B	Maize bushy stunt (MBS)	AY265208	LEE et al.,(2004)
I-C	Clover phyllody (CPh)	AF222065	LEE et al.,(1998)
I-D	Paulownia witches'-broom (PaWB)	AY265206	LEE et al.,(1998)
I-E	Blueberry stunt (BBs)	AY265213	LEE et al.,(1998)
I-F	Apricot chlorotic leaf roll (ACLR - AY)	AY265211	SCHNEIDER et al., (1993)
16SrII: Peanut WB			
II-A	Peanut witches'-broom (PnWB)	L33765	GUNDERSEN et al., (1994)
16SrIII: X Disease			
III-A	Canada peach X-disease (CX)	L33733	GUNDERSEN et al., (1994)
16SrIV: Coconut lethal yellows			
IV-A	Coconut lethal yellowing (LYJ-C8)	AF498307	HARRISON et al.,(2002)
16SrV: Elm yellows			
V-A	Elm yellows(EY1)	AY197655	LEE ET AL.,(2004)
16SrVI: Clover proliferation			
VI-A	Clover proliferation (CP)	AY390261	HIRUKI; WANG (2004)
16SrVII: Ash yellows			
VII-B	Erigeron witches'-broom (EriWB)	AY034608	BARROS et al., 2002
16SrVIII: Loofah witche's broom			
VIII-A	Loofah witche's broom (LFWB)	AF353090	GenBank
16SrIX: Pigeon pea witches' broom group			
IX-A	Pigeon pea witches' broom (PPWB)	AF248993	MARTINI et al., (2007)
16SrX: Apple proliferation			
X-A	Apple proliferation (AP)	AJ542541	SEEMULLER; SCHNEIDER, (2004)
16SrXI: Rice yellow dwarf			
XI-A	Rice yellow dwarf (RYD)	D12581	NAMBA et al.,(1997)
16SrXII:Stolbur group			
XII-D	Hydrangea phyllody (JHP)	AB010425	SAWAYANAGI et al., (1999).
16SrXIII: Mexican Periwinkle virescence			
XIII-A	Mexican Periwinkle virescence (MPV)	AF248960	DAVIS; DALLY, 2001
16Sr XV: Hibiscus witches' broom group			
XV	Hibiscus witches' broom (HibWB26)	AF147708	MONTANO et al., (2000)
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	M23932	WEISBURG et al., (1989)

2.2.2.6 Detecção de vírus em amostras de cana-de-açúcar

2.2.2.6.1 Amostras e extração do RNA viral

As amostras positivas para a presença do fitoplasma foram processadas para avaliar a possível presença do luteovírus, previamente relatado como possível agente causal da síndrome do amarelecimento foliar da cana.

Utilizando-se o protocolo de Trizol fornecido pela empresa Invitrogen. Uma alíquota de 50 a 100g de tecido foliar foi macerado em nitrogênio líquido. Após a maceração adicionou-se 1 ml de Trizol e agitou-se a mistura. Para a separação das fases, a mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente (15 a 30°C). Ao término do tempo, centrifugou-se a 10000 rpm por 15 minutos a 5°C. A precipitação do RNA foi iniciada com a transferência da fase aquosa resultante da centrifugação para um novo tubo, com a adição de 0,5ml de álcool isopropílico. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos à temperatura de 5°C. O precipitado de RNA resultante foi lavado com 1 ml de etanol 75%. A mistura foi homogeneizada em agitador e centrifugada a 10000 rpm por 5 minutos a 5°C. Os tubos contendo o precipitado foram invertidos sobre papel toalha até que o precipitado estivesse totalmente seco. Esse precipitado de RNA foi dissolvido em 100µl de água destilada deionizada ('miliq') e armazenado em a - 80°C para servir de molde nas reações de PCR.

2.2.2.6.2 Detecção e condições do PCR

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se "kit" Ready-to-Go (GE). Foram utilizados 0,5µl de cada um dos iniciadores: P1f (GCTAACCGCTCACGAAGGAATGT) P2f (GAAGGGGGCCGGGAAGACT) fornecidos pelo Instituto Biológico de São Paulo (GONÇALVES et al., 2002). Um volume final de 50µl de reação foi utilizada, contendo 4µl de RNA de cada amostra e 46µl dos demais componentes. O termociclador foi programado para 40 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 60°C por 1 minuto para o anelamento dos iniciadores e 72°C por 1 minuto para a extensão. Ainda, fizeram parte do programa, duas etapas iniciais, sendo uma de 30 minutos a 42°C e outra de 5 minutos a 94°C e uma etapa final de 72°C por 7 minutos. A observação dos resultados foi feita em gel de agarose (1%) corado em Syber Safe (Invitrogen), com auxílio de um transluminador de UV.

2.2.3 Resultados e discussão

2.2.3.1 Detecção de fitoplasma através de PCR

As plantas de cana-de-açúcar, amostradas nas três regiões do Estado de São Paulo e suspeitas de estarem infectadas por fitoplasma apresentavam típicos sintomas da síndrome do amarelecimento foliar, caracterizados por amarelecimento intenso da porção abaxial da nervura central das folhas, com correspondente avermelhamento da porção adaxial, além de redução no porte. Os sintomas da síndrome do amarelecimento foliar podem ser visualizados na Figura 1, gentilmente cedida pelo Centro de Tecnologia Canavieira –CTC- Piracicaba, SP. Sintomas idênticos àqueles relatados no presente estudo também foram descritos para a mesma doença reportada em outros países (COMSTOCK; IRVINE; MILLER, 1994; ALJANABI et al., 2001; AROCHA et al., 2005). Em trabalhos realizados anteriormente no Brasil ou com algumas variedades de cana-de-açúcar originárias do Brasil, também foram descritos estes mesmos tipos de sintomas (VEGA; SCAGLIUSI; ULIAN, 1997; SCAGLIUSI; LOCKHART, 2000; GONÇALVES et al., 2002).

Figura 1 - Sintomatologia presente em cana-de-açúcar portadora da síndrome do amarelecimento foliar. A= plantas com sintomas de amarelecimento da nervura central; B= detalhe de folhas coletadas, à esquerda folha assintomática, à direita folha com sintoma típico da doença; C= vista de campo com incidência da doença em linhas alternadas, plantadas com cultivar suscetível e resistente (Fonte CTC/Piracicaba)

Os resultados demonstraram que o fitoplasma foi detectado em 33% das plantas sintomáticas, sendo 2 delas originárias da região de Jaú, 3 provenientes da região de Ribeirão Preto e 5 amostradas em Piracicaba (Tabela 3). A ocorrência do fitoplasma nos tecidos doentes foi evidenciada pela amplificação de fragmentos genômicos de aproximadamente 1,2kb, da região do 16S rDNA, visualizados através da presença de bandas no gel de agarose, após a corrida eletroforética. O mesmo padrão de banda constatado para o fitoplasma encontrado nas amostras de cana foi obtido para o controle positivo, representado pelo DNA extraído de plantas de milho, comprovadamente infectadas por fitoplasma. No entanto, não houve amplificação para o controle negativo, representado pelo DNA de plantas cana-de-açúcar sabidamente sadias (Figura 2).

Tabela 3 - Relação de amostras de cana-de-açúcar nas quais foi detectada a presença de fitoplasmas e vírus, através da aplicação da técnica de PCR e RT-PCR

Amostras	Variedades	Regiões	Fitoplasma	Vírus
01	SP71-6163	Piracicaba	PCR positivo	PCR positivo
03	SP71-6163	Piracicaba	PCR positivo	PCR positivo
04	SP71-6163	Piracicaba	PCR positivo	PCR positivo
06	SP71-6163	Piracicaba	PCR positivo	PCR positivo
07	SP71-6163	Piracicaba	PCR positivo	PCR positivo
14	SP71-6163	Jaú	PCR positivo	PCR negativo
18	SP71-6163	Jaú	PCR positivo	PCR positivo
19	SP71-6180	Ribeirão Preto	PCR positivo	PCR positivo
27	SP89-1115	Ribeirão Preto	PCR positivo	PCR positivo
29	SP89-1115	Ribeirão Preto	PCR positivo	PCR positivo

Figura 2 - Amplificação do 16S rDNA (1,2 kb) do fitoplasma encontrado em amostras representativas de cana-de-açúcar com sintomas do amarelecimento foliar, usando-se PCR duplo com os iniciadores P1/Tint e F2n/R2. Coluna M= marcador molecular; Colunas 18, 19, 29 e 01= amostras sintomáticas de cana-de-açúcar; Coluna Cs= amostra sadia de cana-de-açúcar; Coluna MI= padrão positivo representado pelo milho

2.2.3.2 Detecção de vírus através de PCR

Todas as amostras positivas para o fitoplasma foram submetidas ao teste de RT-PCR utilizando os iniciadores específicos P1f e P2f para a detecção do vírus associado ao amarelecimento foliar (Yellow Leaf Virus -YLV). Este luteovírus foi detectado em 90% das amostras, nas quais já havia sido detectada a ocorrência do fitoplasma (Tabela 3). A presença do vírus foi evidenciada pela observação de bandas correspondentes a fragmentos de 352bp, típicos para amplificações geradas pelo par de iniciadores específico para este vírus (Figura 3).

Figura 3 - Amplificação de fragmentos de 352kb, com RT-PCR usando iniciadores específicos P1f e P2f, evidenciando a presença do luteovírus associado ao amarelecimento foliar em amostras de cana-de-açúcar positivas para presença de fitoplasma. Coluna M= marcador molecular; Coluna C+= amostra controle positivo do vírus; Coluna C- =controle negativo reação; Colunas 01, 03, 04, 06, 07, 14, 18, 19, 27, 29= amostras de cana-de-açúcar; Cs= cana sadia

A associação dos sintomas de amarelecimento foliar com a presença de fitoplasma tem sido reportada em diferentes regiões produtoras do mundo, incluindo Austrália, Ilha Mauritius, Cuba e África do Sul (AROCHA et al., 2005; ALJANABI et al., 2001; PALMA; BEDENDO; CASAGRANDE, 2001; TRAN-NGUYEN et al., 2000; CRONJÉ et al., 1998). A ocorrência de um luteovírus também tem sido frequentemente associada aos sintomas da síndrome em plantas sintomáticas pertencentes a diversas cultivares de cana produzidas em diversos países, incluindo o Brasil (VEGA; SCAGLIUSI; ULIAN, 1997; CRONJÉ et al., 1998; SCAGLIUSI; LOCKHART, 2000; ALJANABI et al., 2001; GONÇALVES et al., 2002).

A detecção do fitoplasma em 33% das plantas sintomáticas amostradas para o presente estudo pode ser considerada bastante apropriada, pois, tanto fatores relacionados à planta como à metodologia de extração, podem dificultar a obtenção de DNA, seja em termos quantitativos ou

qualitativos. A presença de substâncias inibidoras e a distribuição irregular do patógeno na planta têm sido apontados como os principais fatores responsáveis pelos resultados negativos em testes de PCR aplicados para inúmeras espécies de plantas exibindo sintomas típicos provocados por fitoplasmas (PILKINGTON, 2003; BERTACCINI et al., 1995; DAVIS, SCHNEIDER, GIBB, 1997). Também, pode-se inferir que a concentração de polissacarídeos em plantas sintomáticas de cana-de-açúcar pode estar interferindo negativamente com a detecção de fitoplasma através do teste de PCR. Isto pode ser suposto com base no trabalho de Andersern e colaboradores (1998), os quais concluíram que a presença de polissacarídeos em rizomas de plantas de linho infectadas com fitoplasma afetou os resultados de PCR, gerando possíveis falsos negativos.

Ao longo do tempo, o estudo da etiologia da doença tem focado os fitoplasmas e o luteovírus. Um aspecto interessante é que em algumas regiões do mundo os fitoplasmas são registrados como predominantes, enquanto em outras, o luteovírus é apontado como de ocorrência mais freqüente. Apesar da doença ser conhecida no Brasil desde o início da década de noventa, somente uma referência existe sobre a associação de fitoplasma com plantas afetadas pelo amarelecimento foliar (PALMA; BEDENDO; CASAGRANDE, 2001). Neste trabalho, fitoplasma foi detectado por duplo PCR em 63% das plantas sintomáticas coletadas no campo, porém não foram realizados estudos sobre a identificação deste fitoplasma. Em outras pesquisas sobre este assunto, conduzidas no Brasil ou utilizando material brasileiro, ficou evidenciado que um luteovírus estava associado à doença, no entanto nenhum dos trabalhos sobre vírus investigou a presença de fitoplasma no material estudado (VEGA; SCAGLIUSI; ULIAN, 1997; SCAGLIUSI; LOCKHART, 2000; GONÇALVES et al., 2002).

Quando se analisa os resultados de pesquisas sobre o amarelecimento foliar da cana-de-açúcar, fica claro que fitoplasma e luteovírus ocorrem conjuntamente em plantas afetadas pela síndrome. No presente trabalho, em das plantas nas quais fitoplasmas estavam associados aos sintomas, o luteovírus foi detectado em 90% das mesmas, demonstrando a ocorrência de um complexo formado pelos dois agentes. A infecção por ambos os agentes é comum e foi encontrada em 85% do material de cana amostrado na Ilha Mauritius (ALJANABI et al., 2001). No entanto, este estudo também relata que em nenhum destes agentes foi encontrado em 48% das plantas que apresentavam sintomas da doença. Em trabalhos realizados na África do Sul, fitoplasma e vírus se mostraram presentes, sendo que o fitoplasma foi detectado em todas as amostras sintomáticas, enquanto o vírus foi encontrado em aproximadamente 20% das plantas

(CRONJÉ et al., 1998). Resultados semelhantes foram obtidos em pesquisas conduzidas em Cuba, onde o fitoplasma foi altamente predominante, sendo o vírus detectado em pequena porcentagem das plantas que apresentavam sintomas da doença (AROCHA et al., 1999). Embora as investigações feitas na África do Sul e em Cuba tenham indicado que o fitoplasma era prevalecente em plantas que exibiam sintomas típicos da doença, considerando os países produtores de cana-de-açúcar, o vírus parece estar mais amplamente distribuído do que o fitoplasma (ABU AHMAD et al., 2007). O envolvimento de fitoplasma e vírus com a síndrome do amarelecimento foliar tem sido demonstrado não somente através da detecção destes agentes em plantas afetadas pela doença, mas também através de transmissão dos mesmos de plantas doentes para plantas saudáveis, realizada através de insetos vetores (SCAGLIUSI; LOCKHART, 2000; AROCHA et al., 2005; ZHOU et al., 2006; LEHRER, et al., 2007).

2.2.3.3 Identificação de fitoplasma por PCR e análise de RFLP

A identificação molecular conduzida pela aplicação de duplo PCR, com os iniciadores específicos, indicou que o fitoplasma associado à síndrome do amarelecimento foliar em plantas amostradas no estado de São Paulo é um membro do grupo 16SrI, de acordo com Lee et al., (1994). A partir do DNA de todas as amostras de cana-de-açúcar positivas para fitoplasma foram amplificados fragmentos genômicos de 1,1kb, observados em gel de agarose (1%), revelando claramente a presença de um fitoplasma do grupo 16SrI (Figura 4). As reações de PCR processadas com DNA extraído de plantas de milho geraram um produto de 1.1kb, típico para fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrI (Figura 4). Não houve amplificação quando primers específicos para grupos os 16SrIII e 16SrV foram utilizados nas reações de PCR, demonstrando a ausência de fitoplasmas destes grupos nas plantas sintomáticas de cana-de-açúcar (dados não demonstrados). No entanto, os padrões positivos usados para estes dois grupos deram resultados positivos, comprovando a validade do teste de PCR.

Figura 4 - Amplificação do 16S rDNA (1,1 kb) do fitoplasma associado a plantas sintomáticas de cana-de-açúcar, através de PCR duplo com primers específicos para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrI. Coluna M= marcador; Colunas 18; 19 e 29= amostras de cana-de-açúcar; Coluna MI= amostra de milho infectada por fitoplasma do grupo 16SrI (padrão)

Nas análises de RFLP, três amostras foram selecionadas como representativas das demais amostras de cana, nas quais foi detectado o fitoplasma associado aos sintomas da doença. Os resultados mostraram que os perfis eletroforéticos obtidos para as três amostras foram indistinguíveis entre si, considerando cada enzima de restrição. A comparação entre os perfis coletivos apresentados pelo fitoplasma presente nas amostras de cana com os padrões relatados na literatura para classificação de fitoplasmas (LEE et al., 1998) revelou que o fitoplasma associado ao amarelecimento foliar pertencia ao grupo 16SrI. Os perfis exibidos pelo fitoplasma presente nas três amostras de cana foram idênticos aos perfis apresentados pelo fitoplasma do enfezamento do milho, típico representante do grupo 16SrI, usado como padrão neste trabalho (Figuras 5A e B). A classificação do fitoplasma presente nas amostras de cana como um representante do grupo 16SrI, feita com base na análise de RFLP, confirmou os resultados obtidos com PCR usando-se primers específicos para fitoplasmas deste grupo.

As digestões enzimáticas dos produtos de PCR amplificados pelos primers 16F2n/R2 conduzidas com as endonucleases *AluI*, *KpnI*, *HpaII*, *MboI*, e *RsaI* geraram perfis típicos de fitoplasmas representantes do grupo 16SrI, porém não permitiram a distinção ao nível de subgrupos (Figura 5 e Tabela 4). No entanto, a análise dos perfis eletroforéticos obtidos com as enzimas *HhaI* e *MseI* revelaram claramente que o fitoplasma presente nas amostras de cana pertencia ao subgrupo B, dentro do grupo 16SrI (Figura 5 e Tabela 4), de acordo com a classificação aceita para fitoplasmas (LEE et al., 1998).

Figuras 5A e 5B - Análise de RFLP do 16S rDNA do fitoplasma associado à síndrome do amarelecimento foliar da cana, amplificado em PCR duplo com P1-Tint /F2n-R2 e digerido por diversas enzimas de restrição (Géis A e B). Coluna M= marcador molecular; Coluna MI= amostra de milho (padrão de grupo 16SrI); Colunas 18, 19, 29 = amostras de cana-de-açúcar

Tabela 4 - Padrões de perfis eletroforéticos dos fitoplasmas encontrados nas amostras de cana-de-açúcar e de fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrI, obtidos através de análise de RFLP

Fitoplasma – 16SrI (subgrupo)	Padrões de restrição obtidos com as enzimas						
	AluI	MboI	HpaII	MseI	RsaI	HhaI	KpnI
Cana 18	1	1	1	1	1	2	1
Cana 19	1	1	1	1	1	2	1
Cana 29	1	1	1	1	1	2	1
AY ^a (A)	1	1	1	1	1	1	1
MBS ^a (B)	1	1	1	1	1	2	1
CPh ^a (C)	2	1	1	2	1	1	1
PaWB ^a (D)	1	1	1	3	1	2	1
BBs ^a (E)	3	1	2	1	1	1	1
ACLR-AY ^b (F)	4	1	3	4	2	1	2

Os números representam os diferentes tipos de padrões obtidos para cada enzima de restrição. Abreviações : AY = Chrysanthemum yellows; MBS= Maize bushy stunt ; CPh= clover phyllody; PaWB= Paulownia witches' broom; BBs= Blueberry stunt; ACLR-AY= Apricot chlorotic leaf roll. a = descritos por LEE et al (1998); b= descrito por SCHNEIDER et al., (1993)

A ocorrência de fitoplasma do grupo 16SrI em associação com o amarelecimento foliar também foi reportada em Cuba (AROCHA et al., 1999), no entanto, este fitoplasma foi identificado como um representante do subgrupo 16SrI-A, diferentemente do fitoplasma do 16SrI-B, encontrado no estado de São Paulo. Pesquisas conduzidas na África do Sul revelaram a presença de um fitoplasma do grupo 16SrIII em plantas de cana exibindo sintomas típicos da doença, o qual se mostrou molecularmente distinto de outros fitoplasmas encontrados em cana e relacionados com as doenças conhecidas como folha branca e perfilhamento (CRONJÉ et al., 1998). Na Ilha Mauritius, inicialmente um fitoplasma afiliado ao grupo 16SrIII também foi encontrado em associação com plantas portadoras da síndrome do amarelecimento foliar (ALJANABI et al., 2001), no entanto, pesquisas posteriores confirmaram a presença de representante do grupo 16SrIII e demonstraram a ocorrência de fitoplasmas pertencentes a outros dois grupos, ou seja, representantes dos grupos 16SrI, 16SrIV (PARMESSUR et al., 2003).

A associação de fitoplasmas distintos com a mesma doença e, por consequência, com o mesmo quadro sintomatológico, não se constitui em fato raro. Um exemplo clássico é a doença do tomateiro conhecida por cálice gigante, para a qual foram identificados diversos fitoplasmas em diferentes regiões do mundo. Neste caso, como citado por Amaral Mello et al., (2006), fitoplasma pertencente ao grupo 16SrI foi reportado nos Estados Unidos, ao grupo 16SrIII no Brasil, ao grupo 16SrVI na Jordânia, e aos grupos 16SrI, 16SrIII, 16SrV e 16SrXII na Itália. A demonstração de que um fitoplasma do grupo 16SrI-B se encontra associado ao amarelecimento

foliar da cana-de-açúcar no estado de São Paulo vem se somar como informação inédita à lista dos fitoplasmas até agora identificados em plantas portadoras da síndrome.

2.2.3.4 Sequenciamento, análise putativa de sítios de restrição e análise filogenética

Para o sequenciamento, um clone do fitoplasma foi selecionado para cada uma das amostras representativas de cana-de-açúcar, identificadas pelos números 18, 19 e 29. Cada clone foi sequenciado por pelo menos três vezes. Não havendo diferença de nucleotídeos entre as sequências obtidas dos clones, duas sequências consenso foram adotadas para representar o fitoplasma presente nas amostras. As sequências nucleotídicas foram determinadas para fragmentos de DNA clonados de 1,2 kb e estas foram depositadas no GenBank de acordo com a seguinte identificação: sequência número EU423900 (clone ScYL-Br1) e sequência número EU423901 (clone ScYL-Br2).

A análise filogenética foi feita com base nas sequências do 16S rDNA do fitoplasma encontrado em amostras de cana, de 14 fitoplasmas representantes de grupos distintos, de 6 fitoplasmas representantes de subgrupos do grupo 16SrI e o procarioto *Acholeplasma laidlawii*.

Os resultados mostraram uma similaridade de 99% entre as sequências do fitoplasma associado à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar e as sequências pertencentes aos demais fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrI. Uma árvore filogenética demonstrou a estreita relação existente entre o fitoplasma encontrado em plantas de cana-de-açúcar com os fitoplasmas membros do grupo 16SrI (Figura 6), assim como relatado em Cuba e Ilha Mauritius (AROCHA et al., 1999; PARMESSUR et al., 2003). Dentro do grupo 16SrI, o fitoplasma encontrado na cana-de-açúcar apresentou maior proximidade com os fitoplasmas afiliados aos subgrupos D e B, sendo este último o fitoplasma do enfezamento do milho, usado como padrão no presente trabalho. Este tipo de análise mais uma vez revelou que o fitoplasma associado ao amarelecimento foliar presente no estado de São Paulo é pertencente ao subgrupo 16SrI-B, diferentemente do fitoplasma identificado no território cubano, que apesar de ser afiliado ao grupo 16SrI, foi caracterizado como sendo do subgrupo 16SrI-A (AROCHA, 1999).

Figura 6 - Árvore filogenética construída a partir de seqüências do 16S rDNA depositadas no GenBank e seqüência do fitoplasma presente em amostras de cana-de-açúcar, utilizando o método de “Neighbor-Joining” (SAITOU; NEI, 1987), do programa CLUSTALW. Os números nos ramos representam valores de confiança baseados no “Bootstrapping”

A demonstração de que um fitoplasma está associado à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar no estado de São Paulo e que um luteovírus está simultaneamente presente nas plantas portadoras de fitoplasma complementa trabalhos anteriores, os quais revelaram a presença isolada de fitoplasma ou vírus em plantas de cultivares brasileiras com sintomas de amarelecimento foliar (PALMA; BEDENDO; CASAGRANDE, 2001; VEGA; SCAGLIUSI; ULIAN, 1997; SCAGLIUSI; LOCKHART, 2000). A detecção conjunta de fitoplasma e vírus em plantas que exibiam a doença revelou que um complexo formado por estes agentes pode estar relacionado com a indução dos sintomas presentes em plantas afetadas pela

síndrome, nas condições brasileiras. A identificação de um fitoplasma do grupo 16SrI-B, conduzida no presente trabalho, se constitui numa informação inédita, sendo o primeiro relato de um fitoplasma deste subgrupo associado ao amarelecimento foliar da cana-de-açúcar.

Conclusões

Com base nos estudos desenvolvidos neste trabalho, visando a detecção e identificação do fitoplasma associado à uma espécie de grande importância econômica, foi possível concluir que:

- um fitoplasma do grupo 16SrI, subgrupo B está associado à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo.
- um complexo formado por fitoplasma e vírus é provável responsável pela síndrome no Estado de São Paulo.

Referências

- ABU AHMAD, Y.; GIRARD, J.C.; FERNANDEZ, E.; FERNANDEZ, E.; PAUQUET, J.; LOCKHART, B. E.L.; LETOURMY, P.; ROTT, P. Variation in virus populations and growth characteristics of two sugarcane cultivars naturally infected by Sugarcane yellow leaf virus in different geographical locations. **Plant pathology**, Oxford, v. 56, p. 743-754, 2007.
- ALJANABI, S. M.; PARMESSUR, Y.; MOUTIA, Y.; SAUMTALLY, S.; DOOKUN, A. Further evidence of the association of a phytoplasma and a virus with yellow leaf syndrome in sugarcane. **Plant Pathology**, Oxford, v. 50, p. 628-636, 2001.
- AMARAL MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; CAMARGO, L.E.A. Identidade molecular dos fitoplasmas associados aos enfezamentos do tomateiro e da berinjela com base na análise do gene 16S rDNA. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p. 113-118, 2007.
- AMARAL MELLO, A.P.O.; RIBEIRO, L.F.C.; MASSOLA JUNIOR, N.S.; BEDENDO, I.P. Um fitoplasma do grupo 16SrV associado ao superbrotamento da crotalária. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 432-435, 2004.
- AMARAL MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; KITAJIMA, E. W.; RIBEIRO, L.F.C.; KOBORI, R. Tomato big bud associated with a phytoplasma belonging to group 16SrIII in Brazil. **International Journal of Pest Management**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 233-237, 2006.
- ANDERSERN, M.T.; BEEVER, R.E; GILMAN, A.C.; LIEFTING, L.W.; BALMORI, E.; BECK, D.L.; SUTHERLAND, P.W.; BRYAN, G. T.; GARDER, R.C.; FORSTER, R.L. Detection of phormium yellow leaf phytoplasma in New Zealand flax (*Phormium tenax*) using nested PCRs. **Plant Pathology**, Oxford v.47, p. 188-196, 1998.

AROCHA, Y.; GONZALEZ, L.; PERALTA, E.L. First report of virus and phytoplasma pathogens associated with yellow leaf syndrome of sugarcane in Cuba. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p.1177, 1999.

AROCHA, Y.; PERALTA, E.L.; JONES, P. In: SUGARCANE PATHOLOGY WORKSHOP, 6. Thailand, 2000. **Genetic diversity of phytoplasmas associated to sugarcane yellow leaf syndrome (YLS) in Cuba**. Thailand, 2000. p. 6.

AROCHA, Y.; LÓPEZ, M.; PIÑOL, B.; FERNANDEZ, M.; PICORNELL, B.; ALMEIDA, R.; PALENZUELA, I. '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**, Inglaterra, v. 55, p. 2451–2463, 2005.

BAILEY, R.; BECHET, G.; CRONJÉ, P. Notes on the occurrence of yellow leaf syndrome of sugarcane in Southern Africa. In: SOUTH AFRICAN SUGAR TECHNOLOGISTS ASSOCIATION, 1996. Mount Edgecombe, **Proceedings...** Mount Edgecombe, 1996. v.70, p. 3–6,

BARROS, T.S.L. **Caracterização molecular de Mollicutes fitopatogênicos no Brasil**, 2002. 105p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

BARROS, T. S. L.; DAVIS, R. E.; RESENDE, R. O.; DALLY, E. L. Erigeron witches'-broom phytoplasma in Brazil represents new subgroup VII-B in 16S rRNA gene group VII, the ash yellows phytoplasma group. **Plant Disease**, Saint Paul, v.86, p.1142-1148, 2002.

BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; GENNARI, F.; LEE, I.-M.; GUERRINI, A.; BENNI, A. Detection of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas) in rubus by nested polymerase chain reaction (PCR). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 386, p. 126-131, 1995.

CASAGRANDE, M.V.; SANGUINO, A.; FERREZINI, E. Considerações sobre a síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (SAFCA). In: SEMINÁRIO COPERSUCAR DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA, 1997. Piracicaba, **Trabalhos...** Piracicaba. 1997. 153-172 p.

COMSTOCK, J.C.; IRVINE, J.E.; MILLER, J.D. Yellow leaf syndrome appears on the United States Mainland. **Sugar journal**, New Orleans, v.56, n.11, p. 33-35, 1994.

CRONJÉ, C.P.R.; BAILEY, R.A.; TYMON, A.; JONES, P. In: SOUTH AFRICAN SUGAR TECHNOLOGISTS ASSOCIATION ANNUAL CONGRESS, 71., 1997. Durban and Mount Edgecombe, 1997. Preliminary evidence for the association of a phytoplasma with yellow leaf syndrome of sugarcane in Africa. **Proceedings....** Mount Edgecombe: SASTA, 1997. p. 102-105.

CRONJÉ, C.P.R.; BAILEY, R.A.; McFARLANE, K. In: SOUTH AFRICAN SUGAR TECHNOLOGISTS ASSOCIATION ANNUAL CONGRESS, 72., Durban, 1998. Up date the occurrence of yellow leaf syndrome in the South African sugar industry and evidence for the causal organism. Durban, 1998. **Proceedings....** Mount Edgecombe: SASTA. 1998. p.81-84.

DAVIS, R.E. Fitoplasmas: Fitopatógenos procarióticos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodos. **Revisão anual de Patologia de Planta**, Passo Fundo, v. 3. p. 1-27, 1995.

DAVIS, R.E.; PRINCE, J.L. Molecular diagnosis of mycoplasma-like organisms (MLOs) in plants. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.48, p. 23-26, 1994.

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

DAVIS, R.I.; SCHNEIDER, B.; GIBB, K.S. Detection and differentiation of phytoplasma in Australia. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 48, p. 535-544, 1997.

DAVIS, M.J. In: SUGARCANE PATHOLOGY WORKSHOP, 6., Thailand, 2000. **Detection of phytoplasmas in sugarcane in Florida**. Thailand, 2000. p.12.

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

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

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Cana-de-açúcar. In: _____. **Agrianual 2006**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: 2006. p.241-242.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Cana-de-açúcar. In: _____. **Agrianual 2007**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: 2007. p.237-268.

FONTANIELLA, B.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E.; ARMAS, R.; RODRIGUES, C.W.; MARTINEZ, M.; PINON, D.; ACEVEDO, R.; SOLAS, M.T. Yellow leaf síndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 41, n.11, p. 1027-1036, 2003.

GARCIA-CHAPA, M.; BATLLE, A.; REKAB, D.; ROSQUETE, M.R.; FIRRAO, G. PCR-mediated whole genome amplification of phytoplasmas. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 56, p. 231-242, 2004.

GONÇALVES, M.C; KLERKS, M. M.; VERBEEK, M. VEGA, J.; VAN DEN HEUVEL, J.F. J.M. The use of molecular beacons combined with NASBA for the sensitive detection of sugarcane yellow leaf virus. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 401-407, 2002.

GUMPF, D.J. Stubborn disease of citrus caused by *Spiroplasma citri*. In: MARAMOROSCH, K.; RAYCHAUDHURI, S.P. (Ed.). *Mycoplasma diseases of crops: basic and applied aspects*. New York: Springer-Verlag, 1988. p.327-342.

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

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

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, London, v.166, n.4, p.557-580, 1983.

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

HIRUKI, C.; WANG, K. Clover proliferation phytoplasma: 'Candidatus Phytoplasma trifolii'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, n.4, v. 54, p.1349-1353, 2004.

IRVINE, J.E. **Relatório de consultoria à Copersucar sobre a síndrome do amarelecimento foliar da cana de açúcar no Brasil**. Welasco: Texas Agricultural Experiment Station, 1993. p.8.

KITAJIMA, E.W. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1986-1993). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, (Supl. Especial) p.92, 1995.

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

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

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

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

LEHRER, A.T.; SCHENCK, S.; YAN, S.L.; KOMOR, E. Movement of aphid-transmitted sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) within and between sugarcane plants. **Plant Pathology**, Oxford, v.56, p. 711-717, 2007.

LOPES, J.R.S.; GONCALVES, M.C.; VEGA, J.; KRÜGNER, R.; NAVAS, S.M. Aphid transmission of a virus associated with sugarcane yellow leaf. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.335-335, 1997.

MCCOY, R.E.; CAUDWELL, A.; CHANG, C.J.; et al. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: WHITCOMB, R.F.; TULLY, J.G. **The Mycoplasmas**. New York: Academic Press, 1989. v. 5 p.545-640.

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

MILLER, S.A.; MARTIN, R.R. Molecular diagnosis of plant disease. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.26, p.409-432, 1988.

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

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

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

PALMA, F.M.S.; BEDENDO, I.P.; CASAGRANDE, M. Presença de fitoplasma em plantas de cana de açúcar com sintomas da síndrome do amarelecimento foliar. **Fitopatologia Brasileira**, Jaboticabal, v.26. p.507, 2001, suplemento.

PARMESSUR, Y. ALJANABI, S. DOOKUN-SAUTALLY, A. Identification and characterization of pathogens associated with sugarcane yellow leaf syndrome. Réduit, Mauritius: AMAS - Food and agricultural research Council, , 2003. 6p,

PILKINGTON, L.J. **Australian Lucerne Yellows: pathogen, vector and control.**, 2003. 216p. Thesis (Magister Science)- The University of Sydney, Sydney , 2003.

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

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, p. 406-425, 1987.

SANGUINO, A. **Orientações sobre a síndrome do amarelecimento na SP71-6163**. Piracicaba-SP: Copersucar, 1993. p. 4.

SAWAYANAGI, T.; HORIKOSHI, N.; KANEHIRA, T.; SHINOHARA, M.; BERTACCINI, A.; COUSIN, M.T.; HIUKI, C.; NAMBA, S. 'Candidatus Phytoplasma Japonicum', a new phytoplasma taxon associated with Japanese hydrangea phyllody. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.49, p. 1275-1285, 1999.

SCAGLIUSI, S.M.; LOCKHART, B.E. Transmission, characterization and serology of sugarcane yellow leaf luteovirus. **Phytopathology**, Saint Paul, v.90, p.120-124, 2000.

SCOTT, G.E.; ROSENKRANZ, E.E.; NELSON, L.R. Yield loss of corn due to corn stunt disease complex. **Agronomy Journal**, Madison, v.69, p. 69-92, 1977.

SCHENCK, S.; HU, J.S.; LOCKHART, B.E. Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of sugarcane yellow leaf virus in Hawaii. **Sugar Cane**, High Wycombe, v. 4, p. 5-8, 1997.

SCHNEIDER B.; AHRENS U.; KIRKPATRICK, B.C.; SEEMULLER, E. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. **Journal of General Microbiology**, London, v.139, p. 519-527, 1993.

SEARS, B.B.; KIRKPATRICK, B.C. Unveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. **ASM News**, Michigan, v.60, p.307-312, 1994.

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

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

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KITMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CARMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005, v.2, cap. 21, p.185-196.

TRAN-NGUYEN, L.; BLANCHE, K.L.; EGAN, B.; GIBB, K.S. Diversity of phytoplasma in northern Australian sugarcane and other grasses. **Plant Pathology**, Oxford, v.49, p.666-679, 2000.

UNICA. Sociedade: Desenvolvimento sustentável e mercado de trabalho. Disponível em: <http://www.unica.com.br/pages/sociedades_mercados.asp>. Acesso em: 30 out. 2005.

UNICA. Sociedade: Desenvolvimento sustentável e mercado de trabalho. Disponível em: <http://www.unica.com.br/pages/sociedades_mercados.asp>. Acesso em: 16 de nov. 2007.

VEGA, J.; SCAGLIUSI, S.M.M.; ULIAN, E.C. Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: evidence of association with a luteovirus. **Plant Disease**, Saint Paul, v.81, p.21-26, 1997.

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

ZHOU, G.; LI, J.; XU, D.; SHEN, W.; DENG, H. Occurrence of Sugarcane yellow leaf virus in South China and its transmission by the sugarcane-colonizing aphid *Ceratovacuna lanigera*. **Scientia Agricultura Sinica**, Pequim, v. 39, p. 2023-2027, 2006.

3 IDENTIFICAÇÃO DE FITOPLASMAS ASSOCIADOS AO SUPERBROTAMENTO DE PLANTAS DE PRIMAVERA (*Bougainvillea spectabilis*)

Resumo

A primavera (*Bougainvillea spectabilis*), é uma planta de origem brasileira bastante apreciada como ornamental. No ano de 2005, em uma propriedade agrícola localizada no município de Valinhos/SP, foram observados em plantas comerciais sintomas de clorose foliar, superbrotamento de ramos, deformações foliares e florais, declínio e, às vezes, morte de plantas. Estes sintomas são característicos de infecção causada por fitoplasmas e, por esta razão, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de demonstrar que a etiologia da doença estava relacionada com este tipo de patógeno. Amostras de folhas, ramos e raízes foram coletadas e submetidas à extração de DNA total. As reações de duplo PCR foram conduzidas com os iniciadores P1/Tint-16F2n/R2 para a detecção e com R16(I)F1/R1 e R16(III)F2/R1 para identificação de fitoplasmas representantes dos grupos 16SrI e 16SrIII, respectivamente. Fragmentos genômicos de aproximadamente 1.2kb foram amplificados em 60% das amostras de DNA extraído de plantas sintomáticas. O uso de iniciadores específicos demonstrou a presença de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII associados ao superbrotamento da primavera. Análises de RFLP, usando as enzimas *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII* e *MboI*, e análises filogenéticas baseadas nas seqüências nucleotídicas do 16S rDNA confirmaram que estes fitoplasmas poderiam ser classificados nos subgrupos 16SrI-B e 16SrIII-B. A transmissão experimental dos fitoplasmas da primavera para plantas de vinca através da cuscuta demonstrou, biologicamente que ambos os fitoplasmas estão associados à doença. Este trabalho se constituiu no primeiro relato da ocorrência de fitoplasmas em associação com uma doença da primavera.

Palavras chaves: Planta Ornamental; Mollicutes; Análise Filogenética; Patógeno

Abstract

Bougainvillea (Bougainvillea spectabilis) is an ornamental species native from Brazilian territory. In 2005, in a commercial area located in Valinhos/SP, were observed plants exhibiting symptoms characterized by leaf chlorosis, proliferation of branches, leaves and flowers deformed, decline and death. These symptoms are typically induced by phytoplasmas and, for this reason, the present work was carried on to demonstrate that the etiology was related to this kind of agent. From diseased plants were sampled leaves, branches and roots, which were submitted to DNA extraction. Nested PCR reactions were primed by P1/Tint-16F2n/R2 for detection. Nested PCR carried on specific primers R16(I)F1/R1 and R16(III)F2/R1 were used to identify phytoplasmas representatives of groups 16SrI and 16SrIII. Amplifications of DNA fragments of 1.2kb evidenced the presence of phytoplasmas in 60% of symptomatic plants. PCR with specific primers pairs revealed phytoplasmas affiliated to groups 16SrI and 16SrIII in association with affected plants. RFLP analysis conducted with restriction enzymes *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, and *MboI*, and phylogenetic analysis based on nucleotide sequences of 16S rDNA confirmed that phytoplasmas could be classified within the subgroups 16SrI-B and 16SrIII-B. Experimental transmission of phytoplasmas from bougainvillea to periwinkle through dodder

demonstrated that both phytoplasmas were associated with disease. This study is the first report about the occurrence of phytoplasmas in association with bougainvillea diseases.

Keywords: Ornamental plants; Mollicutes; Phylogenetical analysis; Pathogen

3.1 Introdução

Fitoplasmas são organismos procariotos unicelulares, membros da classe Mollicutes, habitantes do floema de plantas, os quais provocam doenças em diversas espécies vegetais. São microrganismos ainda não cultiváveis em meio de cultura o que dificulta a comprovação de diagnoses de doenças feitas com base na sintomatologia. A patogenicidade destes agentes tem sido demonstrada através da sua associação constante com planta doente, transmissão de planta doente para planta sadia e remissão de sintomas através de tratamento com o antibiótico.

A detecção de fitoplasmas em plantas doentes tem sido realizada através de microscopia eletrônica e métodos moleculares, especialmente PCR (“Polymerase Chain Reaction”). Técnicas moleculares também são utilizadas para identificação de fitoplasmas, destacando-se, entre elas, a RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”). A caracterização molecular por RFLP tem se mostrado extremamente útil e eficiente, permitindo a classificação dos fitoplasmas em grupos e subgrupos reconhecidos internacionalmente. Em adição, a análise de seqüências do gene 16S rDNA ou da região espaçadora localizada entre este gene e o gene 23S rDNA, também tem sido muito importante para a caracterização molecular destes microrganismos e para estudos de filogenia.

A identificação de fitoplasmas é relevante dentro da Fitopatologia, pois permite demonstrar a presença de diferentes fitoplasmas numa mesma espécie vegetal, ou relacionar aqueles que ocorrem em espécies vegetais diferentes. Além disto, a identificação pode contribuir para estudos relacionados à transmissão por insetos vetores, bem como, para um melhor conhecimento da epidemiologia da doença, auxiliando na adoção de medidas de controle mais eficientes.

Um grande número de doenças de plantas cultivadas estão associadas a fitoplasmas, incluindo aquelas ocorrentes em diversas espécies ornamentais. Considerando estas espécies, fitoplasmas estão associados ao amarelo em crisântemo (*Crysanthemum parthenium*), virescência, filodia e superbrotamento em vinca (*Catharantus roseus*), filodia em hortências (*Hydrangea macrophylla*), proliferação de ramos em bico-de-papagaio ou poinsettia (*Euphorbia*

pulcherrima), superbrotamento em begônia (*Begônia* spp), superbrotamento em rainha-margarida (*Collistephus chinensis*), superbrotamento em sempre-viva (*Helichrysum bracteatum*), entre outras.

A primavera (*Bougainvillea spectabilis* Willd), também conhecida popularmente como três-marias, buganvília ou flor-de-papel, é bastante apreciada como ornamental, exibindo um dossel vistoso onde podem ser encontradas flores de coloração branca, rosa, vermelha, laranja e de diversos matizes. Em plantas desta espécie botânica, cultivadas comercialmente na região de Valinhos/SP, foram observados sintomas de superbrotamento de pequenos ramos, redução no tamanho de folhas e flores, enrolamento dos bordos das folhas e aparecimento de áreas verdes nas flores. Estas alterações inviabilizavam as plantas para comércio e, em função do aumento gradativo na incidência desta síndrome, investigações passaram a ser conduzidas na tentativa de se determinar a possível causa do problema. Alguns destes sintomas estão bastante relacionados à ocorrência de fitoplasmas e as suspeitas sobre a associação da doença com fitoplasmas passou a ser considerada. Assim, visando esclarecer a etiologia da doença, o presente trabalho teve por objetivos: detectar nos tecidos de plantas afetadas a presença de fitoplasmas, através de PCR; identificar molecularmente estes fitoplasmas, pela aplicação da técnica de RFLP; analisar filogeneticamente estes fitoplasmas, através do sequenciamento de bases nucleotídicas do gene 16S rDNA; e demonstrar a patogenicidade destes fitoplasmas através da sua transmissão por *Cuscuta subinclusa*.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Revisão Bibliográfica

3.2.1.1 A primavera (*Bougainvillea spectabilis* Willd)

O gênero *Bougainvillea* inclui 14 espécies, sendo que a maior parte destas espécies possui hábito de crescimento do tipo arbóreo. As áreas de ocorrência natural de plantas pertencentes a esse gênero incluem regiões tropicais e sub-tropicais da América do Sul.

De origem brasileira, a primavera, também conhecida como buganvília, três-marias ou flor-de-papel, é uma planta rústica, cultivada em diferentes partes do mundo. Seu nome foi dado em homenagem ao francês Louis Antoine Bougainville, que a descobriu no território brasileiro,

por volta de 1790. A planta foi levada para a Europa e se difundiu para o resto do mundo. As belas e coloridas "flores" da primavera não são botanicamente flores, mas sim brácteas (folhas modificadas) que envolvem as flores verdadeiras, estas relativamente insignificantes e de coloração amarelada. O conjunto das flores resulta numa aparência exótica, encontrada nas cores branca, rosa, vermelho intenso ou laranja. Por ser uma espécie muito hibridizada, já foram obtidas brácteas (flores) com dezenas de formas e cores, inclusive bicolores e variegadas. Quando adulto, este arbusto escandente e espinhento pode atingir de 5 a 10 metros de altura (LORENZI E SOUZA, 2001).

A planta, além de ser bastante apreciada como espécie ornamental, vem sendo estudada por apresentar alguns compostos benéficos. Alguns relatos evidenciaram a ação do extrato de folhas no controle de patógenos causadores de doença em plantas, como no caso de vírus. Duarte (2004) demonstrou que extratos foliares de primavera, quando aplicados previamente à inoculação do vírus, foram eficientes no controle do agente do mosaico amarelo da abobrinha de moita. Algumas proteínas purificadas e caracterizadas quimicamente foram extraídas de raízes e folhas de *B. spectabilis*, e apresentaram ação antiviral (BALASARASWATHI et al., 1998).

3.2.1.2 Aspectos econômicos gerais sobre a atividade de floricultura

A floricultura começou a se destacar no Brasil como atividade agrícola de importância econômica há pouco mais de 30 anos. Antes disso, era caracterizada como empreendimento amadorístico, com cultivo de flores nos arredores das capitais do país, apenas para abastecer o mercado nas datas comemorativas, como finados, dias das mães e dia dos namorados. O grande impulso na floricultura ocorreu a partir de 1970, com a chegada de grupos de imigrantes holandeses no Brasil, trazendo diversas espécies novas de flores e o conhecimento de produção em estufas (FARIA, 2005).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Floricultura - IBRAFLOR (2004), a área de produção de flores e plantas ornamentais no Brasil soma cerca de 4.000 ha, dos quais 630 ha são ocupados por estufas. Desses 4.000 ha, 80% estão localizados no estado de São Paulo, principalmente nos municípios de Atibaia, Mogi das Cruzes, Piedade, Ibiúna e Holambra, este último representando 35% da produção brasileira de ornamentais. Áreas produtoras também se acham distribuídas nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Pernambuco, Paraná e Goiás.

A localização da área de produção e dos centros de comercialização são fatores importantes neste tipo de atividade agrícola. De modo geral, a comercialização e a distribuição de flores e plantas ornamentais são feitas através das centrais de comercialização. Segundo Castro (1998), existem centrais onde somente entram plantas de produtores, como é o caso do Veiling Holambra e do Mercaflor-SC (Mercado do Profissional da Floricultura e do Paisagismo), existem aquelas onde entram plantas de produtores e de atacadistas, como a CEAGESP-SP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo) e a CEASA-Campinas (Central de Abastecimento S/A.) e, ainda, aquelas onde somente se comercializam produtos de atacadistas, como o CADEG-Rio de Janeiro (Companhia Abastecimento do Estado da Guanabara) e a CEASA- Porto Alegre.

Em se tratando do estado de São Paulo, os principais centros se resumem ao Veiling Holambra, a CEAGESP-São Paulo e a CEASA- Campinas. Claro (1998), relatou que o Veiling Holambra é uma unidade da cooperativa Agropecuária Holambra, responsável por 40% da comercialização nacional. O Veiling conta com uma forte preocupação com a padronização e com normas de qualidade e atende principalmente atacadistas e floriculturas. O CEAGESP concentra a produção de várias regiões.

Dados apontam para um crescimento em torno de 23% ao ano para a floricultura brasileira, gerando com isso cerca 480 mil empregos (FARIA, 2005). Hoje são cultivadas mais de 300 espécies para a comercialização, incluindo plantas para vasos, flores para corte, aquáticas, arbustos ornamentais, arbustos para cercas vivas, herbáceas ornamentais, plantas para locais sombreados, palmeiras, árvores, trepadeiras e gramas (LORENZI; SOUZA, 2001).

3.2.1.3 Aspectos fitossanitários de plantas ornamentais

Plantas ornamentais são atacadas por diversos tipos de patógenos, incluindo fungos, bactérias, nematóides, vírus e fitoplasmas.

Dentre os principais fungos de ocorrência em espécies ornamentais estão as espécies *Botrytis cinerea*, *Oidium* spp, *Phytophthora* spp, *Cylindrocladium* spp, *Fusarium* spp, *Pythium* sp, *Puccinia* sp, *Diplocarpon* sp, *Alternaria* spp e *Colletotrichum gloesporioides* (SOLOGUREN, JULIATTI, 2007). Entre as doenças bacterianas mais importantes estão as murchas, crestamentos, podridões moles, galhas, manchas e queimas foliares, causadas principalmente

pelos gêneros, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia* e *Agrobacterium*. As viroses relatadas em plantas ornamentais causam principalmente sintomas do tipo mosaico (KIMATI, et al., 2005).

As doenças causadas por fitoplasmas em ornamentais caracterizam-se por incitar anormalidades no crescimento e desenvolvimento das plantas, sugerindo a ocorrência de distúrbios hormonais. Os sintomas mais comuns se expressam através de clorose, superbrotamento, redução no tamanho de folhas e flores, virescência, filodia e esterilidade de flores. Um aspecto importante da presença de fitoplasmas e vírus nas plantas é a perpetuação da doença, sobretudo quando as plantas são propagadas vegetativamente, prática esta muito comum em ornamentais.

3.2.1.4 Doenças infecciosas da primavera

A primavera é uma planta muito rústica, não exigindo muitos cuidados. Apresenta fácil adaptação a diversos tipos de clima, sendo bastante resistente às mudanças bruscas de temperatura e à presença de pragas e doenças.

Dentre as doenças já relatadas podem ser destacadas a podridão de raízes causada por *Rosellinia necatrix* (PITTA, 1989), a mancha foliar provocada pelo fungo *Passalora bougainvillea* (SOLOGUREN, JULIATTI, 2007), a mancha e o avermelhamento das margens das folhas incitada pelo fungo *Pseudocercospora*.

Entre as doenças de etiologia viral, a primavera tem sido relatada como hospedeira natural de vírus dos gêneros Tospovirus e Badnavirus. No Brasil, uma doença conhecida como clareamento de nervuras tem sido atribuída a um Badnavirus, tanto na espécie *B. spectabilis* (CHAGAS et al., 2001) como em *B. glabra* (YAMASHITA et al., 2004). Em 2005, foi relatado um novo Badnavirus (*Bougainvillea bacilliform virus*) causando sintomas de manchas cloróticas em folhas de *B. spectabilis* (RIVAS et al., 2005). Há relatos na literatura da ocorrência de vírus (Impatiens necrotic spot vírus) causando sintomas de amarelecimento e manchas nas folhas, bem como clareamento e necrose de nervuras (SHAHRAEEN, GHOTBI, MEHRABAN, 2002). Ainda, o aparecimento de folhas retorcidas tem sido creditado à presença na planta do *Cucumber mosaic virus*.

Até o presente momento, não foram encontrados na literatura relatos sobre a ocorrência de fitoplasmas causando doenças em plantas de primavera.

3.2.1.5 Fitoplasmas causadores de doenças de plantas

Os fitoplasmas foram inicialmente denominados de MLOs (Mycoplasma Like Organisms) pelas características morfológicas semelhantes aos micoplasmas causadores de doenças em animais (SMART et al., 1996; DAVIS, SCHENEIDER, GIBB, 1997).

Esses organismos foram descobertos em 1967 por pesquisadores japoneses, os quais demonstraram que as doenças de plantas conhecidas como amarelos (“aster yellows”) estavam associadas a organismos unicelulares do tipo micoplasma (DOI et al., 1967; NAMBA et al., 1993). Somente a partir de 1994, o termo trivial fitoplasma passou a ser empregado para designar estes patógenos vegetais (SEARS; KIRKPATRICK, 1994). Fitoplasmas são procariotos pertencentes à classe Mollicutes (SCHEIDER et al., 1993; TSAI, 1979). São sensíveis à tetraciclina, habitam os vasos do floema e são transmitidos, em condições naturais, por cigarrinhas. Até o momento, não se obteve sucesso para o isolamento destes microrganismos em meio de cultura, o que dificulta os estudos das doenças associadas a estes patógenos. A associação constante entre fitoplasmas e planta doente, a transmissão por insetos vetores, enxertia ou planta parasita (*Cuscuta* spp), bem como a remissão da doença por antibiótico do grupo das tetraciclina têm sido usadas como ferramentas úteis para demonstrar a patogenicidade.

Os fitoplasmas são classificados em 17 grupos e mais de 40 subgrupos, havendo propostas de 24 candidatos à espécie – *candidatus Phytoplasma* spp, com base em análises de RFLP e análises de seqüências do gene 16S rDNA (AROCHA et al., 2005, LEE et al., 2000; VALIUNAS; STANIULIS; DAVIS, 2006; LEE et al., 2006). A maior parte das doenças associadas á fitoplasmas já relatadas em todo o mundo, caracterizadas pelos mais variados tipos de sintomas, estão associadas a fitoplasmas pertencentes a seis grandes grupos, ou seja 16SrI, 16SrIII, 16SrV, 16SrX, 16SrXI e 16SrXII.

O grupo denominado “aster yellows” (AY) congrega o maior número de fitoplasmas já identificados, com mais de 100 variantes já caracterizados pela análise da seqüência do gene 16S rDNA. Mesmo assim, Marcone e colaboradores (2000) relatam que entre os representantes deste grupo não ocorre diferença maior do que 2,6% nas posições dos nucleotídeos. Apesar desta baixa variação, há vários subgrupos já descritos dentro do grupo 16SrI.

Recentemente, pesquisas envolvendo o sequenciamento do genoma de fitoplasmas começaram a ser desenvolvidas. Esses estudos têm permitido uma maior compreensão dos mecanismos de patogenicidade do organismo, sua evolução, expressão de genes de resistência da

planta em resposta às infecções e mecanismos de transmissão por insetos vetores. Em termos evolutivos, fitoplasmas e espiroplasmas possuem várias características em comum, sendo patógenos de plantas, habitantes do floema e transmitidos por insetos vetores. No entanto, os espiroplasmas podem ser cultivados em meios de cultura, o mesmo não ocorre para os fitoplasmas. Uma das explicações é que em função da evolução, os fitoplasmas perderam grande parte de genes relevantes para seu metabolismo básico, porém mantiveram um conjunto de funções necessárias para a sua sobrevivência no floema e para colonização de tecidos de insetos vetores (FIRRAO, GARCIA-CHAPA, MARZACHI, 2007).

No Brasil, uma ampla diversidade de gêneros e espécies vegetais são afetadas por doenças associadas aos fitoplasmas. Os sintomas, de maneira geral, se expressam por clorose foliar, proliferação de brotos extra-numerários, clareamento ou avermelhamento das nervuras, enfezamento, deformação dos órgãos florais, esterilidade, filodia, virescência, entre outros (KITAJIMA; COSTA, 1970; KIRKPATRICK, 1992; DAVIS, 1995). Entre as doenças associadas a este tipo de fitopatógeno no Brasil podem ser citadas o enfezamento do milho, o superbrotamento do maracujazeiro, da mandioca, do feijoeiro e da soja, o superbrotamento irisado do chuchuzeiro, o cálice gigante do tomateiro (KITAJIMA, 1995; AMARAL MELLO, et al., 2006), o enfezamento da berinjela (BARROS, 2002; AMARAL MELLO; BEDENDO; CAMARGO, 2007), o lenho mole da macieira (RIBEIRO; BEDENDO; SANHUEZA, 2007), o superbrotamento da crotalária (AMARAL MELLO et al., 2004). Além destas plantas, destacam-se algumas espécies de plantas ornamentais, a maioria delas trazendo prejuízos consideráveis em função do valor agregado em cada espécie. É o caso do superbrotamento do hibisco, (MONTANO E BRIOSO, 1997; MONTANO et. al, 2001), da proliferação de ramos da poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) (RIBEIRO, BEDENDO, 2006), do superbrotamento da begônia (RIBEIRO et al., 2006), da virescência, filodia e superbrotamento em vinca (*Catharantus roseus*) (BEDENDO; DAVIS; DALLY, 1999), da filodia e virescência em lisiantus (RIVAS et al., 2000). Ainda, podem ser destacados alguns relatos de Kitajima (1994) em crista-de-galo (*Celosia* sp), margaridinha (*Crystanthemum parthenium*), rainha margarida (*Callistephus chinensis*) e sempre viva (*Helychrisia bracteatum*).

3.2.2 Material e métodos

3.2.2.1 Amostras de plantas de primavera

Amostras de folhas e ramos novos foram retirados de 17 plantas sintomáticas, naturalmente infectadas (Tabela 1), cultivadas em vasos por, aproximadamente, 2-3 anos após a estaquia. Estas plantas foram produzidas em uma área localizada no município de Valinhos/SP e estavam em idade ideal para serem comercializadas. O material amostrado foi trazido para laboratório, onde foram conduzidas as extrações de DNA total, o qual foi, posteriormente, usado nos testes de PCR. Amostra foliar de planta assintomática de primavera coletada em local diferente da área comercial foi usada como padrão negativo. Sete plantas, do total de 17, foram transferidas da área comercial para o campo experimental do Setor de Fitopatologia (ESALQ), sendo identificadas por BSr11, BSr12, BSr13, BSr14, BSr15, BSr16 e BSr17. Partes de raízes destas plantas foram removidas e submetidas à extração de DNA total, para emprego em PCR visando à detecção de fitoplasmas.

Tabela 1- Relação das amostras obtidas de plantas de primavera (BS) usadas para a detecção de fitoplasmas associados aos sintomas de superbrotamento

Amostras	Tipo de Extração	Tipo de amostra	Local de manutenção
BS1	Completa	Folhas e ramos	Campo Valinhos
BS2	Completa	Folhas e ramos	Campo Valinhos
BS3	Completa	Folhas e ramos	Campo Valinhos
BS4	Completa	Folhas e ramos	Campo Valinhos
BS5	Completa	Folhas e ramos	Campo Valinhos
BS6	Completa	Folhas e ramos	Campo Valinhos
BS7	Completa	Folhas e ramos	Campo Valinhos
BS8	Completa	Folhas e ramos	Campo Valinhos
BS9	Completa	Folhas e ramos	Campo Valinhos
BS10	Completa	Folhas e ramos	Campo Valinhos
BS11	Completa/rápida/kit	Folhas e ramos	ESALQ-USP
BS12	Completa/rápida/kit	Folhas e ramos	ESALQ-USP
BS13	Completa/rápida/kit	Folhas e ramos	ESALQ-USP
BS14	Completa/rápida/kit	Folhas e ramos	ESALQ-USP
BS15	Completa/rápida/kit	Folhas e ramos	ESALQ-USP
BS16	Completa/rápidakit	Folhas e ramos	ESALQ-USP
BS17	Completa/rápida/kit	Folhas e ramos	ESALQ-USP
BSr11	Rápida	Raízes	ESALQ-USP
BSr12	Rápida	Raízes	ESALQ-USP
BSr13	Rápida	Raízes	ESALQ-USP
BSr14	Rápida	Raízes	ESALQ-USP
BSr15	Rápida	Raízes	ESALQ-USP
BSr16	Rápida	Raízes	ESALQ-USP
BSr17	Rápida	Raízes	ESALQ-USP

3.2.2.2 Extração de DNA total

A extração de DNA total das amostras foi processada usando-se três metodologias, aqui denominadas de extração rápida (DOYLE; DOYLE, 1987), extração completa (LEE et al., 1993) e extração com kit comercial (Dneasy Plant Mini kit – Qiagen).

3.2.2.2.1 Extração rápida

Material vegetal fresco (0,2g) foi macerado em nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. O extrato obtido foi transferido para microtubos de 1,5mL, sendo adicionados 800µL de tampão de extração 2X CTAB a 60°C. Os tubos foram incubados em “banho-maria” a 65°C por 60 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos para homogeneizar a suspensão. A cada tubo foi adicionado 600µL de CIA (clorofórmio/álcool isoamílico 24:1). A mistura foi centrifugada por 15 minutos a 14.000 rpm. A fase superior (aquosa) foi retirada e transferida para outro tubo de 1,5mL, no qual foram adicionados 540µL de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos por uma noite a -20°C. Após centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm, descartou-se o sobrenadante. Ao precipitado foi adicionado 1mL de etanol 80%, sendo a mistura incubada por 10 minutos. Em seguida, o álcool foi descartado e esta operação foi repetida mais uma vez. Ao precipitado foram adicionados 500µL de NaCl 1M e, em seguida, procedeu-se à incubação por 30 a 60 minutos a 4°C. Nova centrifugação foi realizada a 14.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado com 1mL de etanol 80%, sendo esta operação repetida novamente. O etanol foi descartado e os tubos foram mantidos abertos e invertidos sobre papel toalha para a secagem do precipitado. Após esta etapa, o precipitado foi ressuspenso em 100µL de água deionizada ou solução tampão 1xTE e armazenado a -20°C.

A solução tampão de extração 2X CTAB foi preparada com os seguintes componentes: 2g de CTAB; 8,18g de NaCl; 0,74g de EDTA; 1,57g de Tris-HCl; 1,0g de PVP; 0,2mL de mercaptanol. Os componentes foram dissolvidos em água deionizada, completando o volume para 100mL. Ajuste de pH foi feito para 8,0.

3.2.2.2.2 Extração completa

Material vegetal fresco (2g) foi macerado em nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. Ao extrato foram adicionados 14 mL de tampão de extração I. O material foi

transferido para tubos de vidro de 30 mL e centrifugado a 20000 rpm por 20 min a 4° C. O tampão foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 8 mL de tampão de extração II, 160 µL de proteinase K e 880 µL de sarcosyl 10%. Após um período de incubação de 2 h a 55°C em “banho maria”, a mistura foi centrifugada a 7500 rpm por 10 min. Ao sobrenadante foram adicionados 5,5 mL de isopropanol, sendo a mistura mantida durante uma noite a -20 °C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas durante 15 min a 7500 rpm, o precipitado foi ressuscitado em 3 mL de tampão 1X TE, 75 µL de SDS 20% e 60 µL de proteinase K. O material foi incubado em “banho maria” por 1 hora a temperatura de 37 °C e, em seguida, foram adicionados 525 µL de NaCl 5M e 420 µL de CTAB/NaCl. Nova incubação foi processada durante 10 min a 65 °C em “banho maria”. À mistura foram adicionados 4 mL de CIA (clorofórmio isoamil), sendo a mesma centrifugada a 4000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, sendo a etapa anterior repetida. Ao sobrenadante foram adicionados 2 mL de fenol e 2 mL de CIA e a mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 5 min. A seguir, o sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo, sendo adicionados 4 mL de CIA. Após nova centrifugação a 4000 rpm por 5 min, foram adicionados 2 mL de isopropanol. A mistura permaneceu no gelo por 1 h. Terminado esse processo, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e, ao precipitado foram adicionados 8 mL de etanol 70%. O material foi mantido durante 30 min no gelo e, após esse período, centrifugado por 10 min a 4000 rpm. O álcool foi descartado, os tubos colocados invertidos sobre papel toalha e, após a secagem da parte sólida, o precipitado foi ressuscitado em 200 µL de tampão 1X TE e armazenado a -20°C.

As soluções tampão utilizadas foram as seguintes:

- Tampão de extração I: 5,42 g de K₂HPO₄ – 3 H₂O; 1,02 g de KH₂PO₄; 25 g de sucrose; 0,375 g de BSA e 5 g de PVP-10 (material para 250 mL).
- Tampão de extração II: 6 g de Tris base; 7,3 g de NaCl e 18,6 g de EDTA; pH 8,0 (material para 500 mL).
- Tampão TE: 60,5 g de Tris base; 18,6 g de EDTA; pH 8,0 e água destilada para completar volume para 500 mL.

3.2.2.2.3 Extração com Kit comercial

Na extração utilizando kit comercial Dneasy ®Plant Mini (Qiagen), foram seguidas as recomendações do fabricante: 1g de material vegetal foi macerado com 400 µL de tampão AP1(Qiagen) e transferido para microtubos de 1,5 mL. Ao extrato foram adicionados 4 µL de Rnase e, em seguida, foi feita a incubação a 65°C por 10 minutos, em “banho maria”. Um volume de 130 µL do tampão AP2 (Qiagen) foi adicionado e a mistura permaneceu no gelo por 5 minutos. Esta mistura foi aplicada numa coluna montada sobre um tubo coletor e centrifugada a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido em um novo microtubo, ao qual foram adicionados 675 µL do tampão AP3 (Qiagen). Uma alíquota de 650µL desta mistura foi aplicada em outra coluna, sendo o produto colhido novamente centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e a coluna transferida para um novo microtubo, onde foram adicionados 500 µL do tampão AW (Qiagen). Nova foi conduzida a 13000 rpm por 2 minutos, para lavar o DNA. A coluna contendo o DNA foi transferida para outro microtubo para a eluição do DNA com 100 µL de tampão AE (Qiagen). O produto de extração foi armazenado a -20°C.

3.2.2.3 Purificação do DNA total

Parte do produto obtido nas extrações completa e rápida foi purificado com o objetivo de melhorar a qualidade do DNA a ser usado nos testes de PCR. A purificação foi conduzida com os reagentes componentes do kit comercial “Gene Clean Kit – BIO 101” (Vista/CA), seguindo as instruções do fabricante.

3.2.2.4 Detecção de fitoplasmas por PCR

O DNA total de cada amostra foi diluído em diferentes proporções em água deionizada autoclavada (1:5, 1:10, 1:20 e 1:50). Para a detecção de fitoplasmas foram utilizados os iniciadores (primers) universais P1/Tint (DENG: HIRUKI, 1991; SMART et al., 1996) e R16F2n/R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996) em PCR duplo. Na primeira reação, foi usado o par P1/Tint, sendo o produto amplificado diluído em água deionizada na proporção 1:50 e usado como molde para a segunda reação utilizando o par R16F2n/R2. Este último par amplifica um fragmento genômico de aproximadamente 1.2kb, típico para fitoplasmas, correspondente ao 16S rDNA.

Cada reação de PCR foi processada utilizando-se um volume final de 25µL, contendo: 1µL de extrato diluído de DNA de cada amostra, incluindo padrões positivos e negativos; 18,7µL de água destilada deionizada; 0,5µL de cada iniciador (concentração de 20 pmol/µL); 2µL de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo); 2,5µL de solução tampão 10X PCR e 0,17µL de Amplitaq 5U/µL. O termociclador foi programado para 30 ciclos, sendo que cada ciclo compreendeu as etapas: 1 minuto a 94°C para a desnaturação, 1 minuto a 56°C para o anelamento e 2 minutos a 72°C para a extensão, em reações com os iniciadores P1/Tint. Para os iniciadores R16F2n/R2, utilizou-se a mesma composição na reação de PCR, no entanto o programa adotado para o termociclador foi alterado para 35 ciclos, compreendendo as etapas: 1 minuto a 94°C para a 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.

Os padrões positivos foram representados pelo DNA extraído de plantas de milho e de chuchu comprovadamente infectadas por fitoplasmas. Como controles negativos foram usados o DNA extraído de planta assintomática de primavera e água destilada, deionizada e autoclavada.

3.2.2.5 Identificação de fitoplasmas por PCR

A identificação de fitoplasmas por PCR foi feita a partir de produtos de PCR obtidos com os iniciadores universais P1/Tint. Estes foram diluídos em água deionizada na proporção 1:50 e submetidos à re-amplificação usando-se os iniciadores específicos R16(I)F1/R1, R16(III)F2/R1 e R16(V)F1/R1, os quais permitem a identificação de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrV, respectivamente (LEE et al., 1994).

As condições de PCR foram idênticas àquelas utilizadas para detecção com o uso dos iniciadores R16F2n/R2, descritas anteriormente. Os padrões positivos utilizados em cada grupo foram: para o grupo 16SrI, DNA de plantas de milho portadoras do fitoplasma do enfezamento vermelho; para o grupo 16SrIII, DNA de plantas de chuchu infectadas pelo fitoplasma do superbrotamento; e para o grupo 16SrV, DNA de plantas de crotalária portadoras do fitoplasma do superbrotamento. DNA extraído de plantas sadias de primavera foi utilizado como padrão negativo para as reações de PCR.

3.2.2.6 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da re-amplificação com os iniciadores universais e com os iniciadores específicos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TAE 1X. A corrida eletroforética foi processada com voltagem constante de 65V por 90 min. A coloração dos géis foi feita utilizando-se Sybr safe® 1% (Invitrogen). O padrão de peso molecular utilizado foi 1 Kb ladder (Life Technologies). A observação dos fragmentos genômicos amplificados foi feita em transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.2.7 Identificação de fitoplasmas por análise de RFLP

As seqüências amplificadas pelo PCR, utilizando-se iniciadores universais P1-Tint/R16F2n-R2, que indicaram a presença de fitoplasmas nas plantas, foram analisadas através do uso de enzimas de restrição. Para isto, uma alíquota de 3-5µl de cada produto de PCR foi digerida, separadamente, por diferentes endonucleases, segundo as instruções do fabricante das mesmas, durante um período de aproximadamente 24 horas a 37°C. As endonucleases *AluI* (AG▼CT), *HhaI* (GCG▼C), *HpaII* (C▼CGG), *KpnI* (GGTAC▼C), *MboI* (▼GATC), *MseI* (T▼TAA) e *RsaI* (GT▼AC) foram utilizadas na identificação dos fitoplasmas presentes nas amostras. Os padrões utilizados para análise de RFLP foram os fitoplasmas do enfezamento vermelho do milho e/ou do superbrotamento do chuchu.

3.2.2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos da digestão enzimática foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida (4,5%), tampão TBE 1X, voltagem inicial de 220 V durante 5 min e em seguida, voltagem constante de 150 V por 45 min. Os géis foram corados com Sybr safe® (Invitrogen) e os fragmentos de DNA gerados, foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados. O marcador molecular utilizado neste teste foi o ΦX174RFHaeIII (Invitrogen). Os perfis eletroforéticos obtidos para cada enzima de restrição foram comparados aos padrões existentes na literatura (LEE et al., 1998; DAVIS et al., 1998; MONTANO et al., 2000; BARROS et al., 2002), visando determinar a que grupos de fitoplasmas pertenciam os fitoplasmas detectados em plantas de primavera.

3.2.2.9 Sequenciamento do 16S rDNA do fitoplasma

Os produtos amplificados pelo duplo PCR correspondentes às amostras BS11, BS14, BS16 e BS17 foram clonados em *Escherichia coli* usando o kit de clonagem pGEM T Easy Vector System I (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos de 1,2 kb clonados foram seqüenciados e, através das seqüências nucleotídicas do 16S rDNA obtidas, foram comparados entre si e com seqüências de outros fitoplasmas já identificados.

Os produtos de PCR obtidos foram purificados utilizando-se “kit” de purificação PureLink™ (Invitrogen), seguindo protocolo descrito pelo fabricante.

Os produtos finais (DNAs purificados) foram armazenados a -20 °C para posterior utilização na reação de sequenciamento. Antes da reação de sequenciamento, fez-se necessário estimar a concentração de DNA das amostras. Para isso, uma alíquota de 1 µL do DNA purificado juntamente com 3 µL de tampão de carregamento foram aplicados em gel de agarose 1%, em tampão TE 0,5X, acrescido do corante Sybr Safe (Invitrogen) e submetido à eletroforese. Os fragmentos de DNA purificados de aproximadamente 1,2 Kb de fitoplasma foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta juntamente com o marcador Lambda DNA.

Os produtos de PCR purificados, apresentando concentração estimada de 400ng, foram ligados em vetor pGEM®T Easy Vector System I (Promega) e posteriormente clonados em *Escherichia coli* (estirpe DH5α), usando-se choque térmico. A extração dos plasmídeos obtidos com a clonagem foi feita utilizando-se “kit” comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

Para a ligação do DNA purificado ao vetor plasmidial, com o uso do “kit” pGEM T Easy Vector System I (Promega), foram utilizados 3,0 µL do DNA purificado, 1 µL do vetor (25 ng.µL⁻¹), 5,0 µL de tampão ligase 2X e 1,0 µL de T4 DNA ligase (3 U.µL⁻¹), totalizando 10 µL da mistura para a ligação, a qual foi colocada em microtubo (1,5mL) e mantida por uma noite a 4°C. Após esse período, a mistura foi transferida para células competentes de *E. coli*.

Na transformação foram adicionados 2 a 3µL do produto da ligação em 50µL de células competentes de *E. coli*, estirpe DH5α, preparadas conforme Hanahan (1983), sendo esta mistura colocada no gelo por 30 min. Após esse período, as células contendo a ligação foram submetidas ao processo de choque térmico, por incubação a 42 °C por 50 segundos e, imediatamente, transferidas para o gelo por 2 min. A seguir foram adicionados 450 µL de meio SOC (1% de triptona; 0,5% extrato de levedura; 8,5 mM NaCl; 2,5 mM de KCl; 0,01 mM MgCl₂; 0,02 mM de

glicose e água para completar volume de 1000 mL) pré-aquecido a 37°C às células transformadas, as quais estavam incubadas a 37 °C por 2 horas em agitador moderado (200 rpm). Após o período de crescimento, foram transferidos 100 µL da suspensão de células transformadas para placas de Petri contendo 20 ml de meio LB (1% de tripton; 0,5% de extrato de levedura; 0,25% de NaCl; 4% de ágar), acrescidas de 20µL de ampicilina (100 mg.mL⁻¹), 20µL X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosida) na concentração de 50ng/ml e 20µL IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosida) concentração de 50 mg.mL⁻¹. Os componentes X-gal e IPTG serviram para avaliar a atividade de β-galactosidase nos transformantes, permitindo diferenciá-los dos não transformantes. A placa foi mantida por uma noite em estufa a 37 °C para a quantificação de colônias e seleção das células transformadas com DNA plasmidial recombinante. As colônias recombinantes com o fragmento de DNA inserido no sítio de clonagem exibiram a cor branca (produzindo β-galactosidase não-funcional), enquanto as colônias não recombinantes mostraram-se azuis (produzindo β-galactosidase funcional). Os clones selecionados foram transferidos para tubos do tipo “Falcon” contendo meio LB líquido com auxílio de palito estéril. O material foi incubado a 37°C, sob agitação moderada, por 12 horas, para crescimento. Posteriormente procedeu-se à extração do DNA plasmidial. Três clones foram selecionados para cada amostra clonada, sendo que para dois deles feita a extração do DNA plasmidial e o clone restante foi preservado em glicerol (50%) e armazenado em congelador -80°C.

As extrações dos plasmídeos, para posterior sequenciamento, foi feita com uso do “kit” comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

Antes do sequenciamento dos clones ou insertos obtidos, foi necessário fazer a confirmação desses no vetor plasmidial. Essa confirmação foi feita pela PCR utilizando-se os iniciadores universais para fitoplasmas R16F2n/R2 e também com um par de iniciadores M13F/M13R para o vetor pGEM T.

A reação do sequenciamento continha 3µl de água Milli-Q autoclavada, 2µl de Buffer 2,5x (Save Money, 1M Tris-Hcl pH=9,0; 1M MgCl₂), 1µl de cada iniciador na concentração de 5pmoles/µl, 2µl de DYEnamic (GE) e 2µl de DNA de cada amostra clonada. O equipamento termociclador foi programado para um total de 30 ciclos, compreendendo as etapas de desnaturação por 20 segundos a 95°C, anelamento por 15 segundos a 50°C e extensão por 60 segundos a 60°C.

A reação de sequenciamento dos clones foi feita utilizando os iniciadores M13F/M13R ou T7/SP6. Estes iniciadores flanqueiam o vetor pGEM T, com isso é possível obter o DNA de interesse clonado no plasmídeo utilizado. Em seguida, foi feita a precipitação dos fragmentos utilizando-se 2µl de sódio/EDTA, 60µl de etanol 100% e centrifugação por 15 min. a 14.000 rpm. Ao precipitado resultante da centrifugação foram adicionados 150µl de etanol 70% e feita uma nova centrifugação por 5 min a 14.000 rpm, a temperatura ambiente. Após o tempo de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi levado para secagem a 40 °C por 10 min. As amostras amplificadas foram diluídas em 10µl de Hi-Di Formamida e dispostas nas placas do sequenciador (ABI 3100 - ABI Prism / Applied Biosystems).

3.2.2.10 Análise filogenética e de sítios putativos de restrição

As seqüências do gene 16S rDNA dos fitoplasmas associados ao superbrotamento da primavera juntamente com as seqüências representativas de fitoplasmas pertencentes a diversos grupos e subgrupos, depositadas no GenBank (Tabela 2), foram analisadas utilizando-se programas para construção e análise de seqüências (Bioedit e Multiple Sequence Alignment – CLUSTALW). As árvores filogenéticas foram elaboradas usando-se o método Neighbour-joining e o “Bootstrapping” foi processado por 1000 vezes. Os mapas de sítios putativos de restrição para as seqüências do 16SrDNA dos fitoplasmas encontrados em primavera e dos fitoplasmas representativos de alguns subgrupos foram gerados com as mesmas endonucleases usadas na análise de RFLP, através do programa pDRAW 32.

Tabela 2 – Sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA de fitoplasmas depositadas no GenBank e usadas no presente trabalho

Fitoplasma	Doença	Nº de acesso GenBank	Referências
BSP- Br1	Superbrotamento da primavera	EU423898	Presente estudo
BSP-Br3	Superbrotamento da primavera	EU423899	Presente estudo
16SrI: Aster yellows			
I-A	Chrysanthemum yellows (AY)	AY180956	GenBank
I-B	Maize bushy stunt (MBS)	AY265208	LEE et al.,(2004)
I-C	Clover phyllody (CPh)	AF222065	LEE et al.,(1998)
I-D	Paulownia witches'-broom (PaWB)	AY265206	LEE et al.,(1998)
I-E	Blueberry stunt (BBs)	AY265213	LEE et al.,(1998)
I-F	Apricot chlorotic leaf roll (ACLR - AY)	AY265211	SCHNEIDER et al., (1993)
16SrII: Peanut WB			
II-A	Peanut witches'-broom (PnWB)	L33765	GUNDERSEN et al., (1994)
16SrIII: X Disease			
III-A	Canada peach X-disease (CX)	L33733	GUNDERSEN et al., (1994)
III- B	Clover yellow edge (CYE)	AF175304	DAVIS; DALLY, 2001
III- E	Spiraea stunt (SP1)	AF190228	GenBank
III- F	Milkweed yellows (MW1)	AF510724	GenBank
III- G	Walnut witches' broom (MWB)	AF 190226	GenBank
III- H	Poinsettia branch-inducing (PoiBI)	AF 190223	GenBank
III- I	Virginia grapevine yellows (VGY)	AF060875	DAVIS et al. (1998)
III-J	Chayote wit.'broom (ChWB)	AF147706	MONTANO et al.,(2000)
III-P	Dandelion virescence (Danvir)	AF370119	JOMANTIENE et al. (2002)
16SrIV:Coconut lethal yellows			
IV-A	Coconut lethal yellowing (LYJ-C8)	AF498307	HARRISON et al.,(2002)
16SrV: Elm yellows			
V-A	Elm yellows(EY1)	AY197655	LEE et al.,(2004)
16SrVI: Clover proliferation			
VI-A	Clover proliferation (CP)	AY390261	HIRUKI; WANG (2004)
16SrVII: Ash yellows			
VII-B	Erigeron witches'-broom (EriWB)	AY034608	BARROS et al., 2002
16SrVIII: Loofah witche's broom			
VIII-A	Loofah witche's broom (LFWB)	AF353090	GenBank
16SrIX: Pigeon pea witches'broom group			
IX-A	Pigeon pea witches'broom (PPWB)	AF248993	MARTINI et al., (2007)
16SrX: Apple proliferation			
X-A	Apple proliferation (AP)	AJ542541	SEEMULLER; SCHNEIDER, (2004)
16SrXI: Rice yellow dwarf			
XI-A	Rice yellow dwarf (RYD)	D12581	NAMBA et al.,(1997)
16SrXII:Stolbur group			
XII-D	Hydrangea phyllody (JHP)	AB010425	SAWAYANAGI et al., (1999).
16SrXIII: Mexican Periwinkle virescence			
XIII-A	Mexican Periwinkle virescence (MPV)	AF248960	DAVIS; DALLY, 2001
16Sr XV: Hibiscus witches'broom group			
XV	Hibiscus witches'broom (HibWB26)	AF147708	MONTANO et al., (2000)
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	M23932	WEISBURG et al., (1989)

3.2.2.11 Teste de transmissão por cuscuta

A cuscuta usada para transmissão de fitoplasmas pertencia à espécie *Cuscuta subinclusa*. Sementes recém-germinadas foram colocadas sobre ramos novos de plantas de vinca (*Catharanthus roseus*), cultivadas em vasos e obtidas a partir de sementes. O estabelecimento definitivo da cuscuta ocorreu quando sua ramificação abundante passou a cobrir o docel das plantas de vinca.

Três plantas de primavera (BS14, BS16 e BS17) comprovadamente infectadas com fitoplasmas associados aos sintomas típicos da doença foram usadas como plantas fontes. Para transmissão, quatro plantas de vinca colonizadas pela cuscuta foram colocadas em contato com cada uma das 3 plantas de primavera. As ramificações da cuscuta presente nas plantas de vinca passaram a se desenvolver sobre as plantas de primavera, estabelecendo ligações entre as plantas, possibilitando a passagem de fitoplasmas das plantas infectadas para plantas sadias.

As avaliações foram feitas semanalmente pela observação de sintomas nas plantas de vinca. A partir da quinta semana após o contato das plantas, além das observações visuais, também passaram a ser feitos testes de PCR, visando a detecção de fitoplasmas nas plantas de vinca. Quando os filamentos da cuscuta começaram a secar, os vasos de vinca foram separados daqueles da primavera. As plantas de vinca foram mantidas em casa de vegetação e continuaram sendo observadas quanto ao desenvolvimento de sintomas da doença.

3.2.3 Resultados e discussão

3.2.3.1 Sintomas e detecção através de PCR

As plantas sintomáticas de primavera exibiam superbrotamento de pequenos ramos, folhas com clorose leve, redução no tamanho de folhas e flores, variegações em flores, inclusive com a presença de áreas verdes, evidenciando virescência parcial. A ocorrência de deformações foliares com enrolamento de bordos foi bastante evidente. As plantas também apresentavam pouco florescimento, declínio e, em casos mais severos, chegavam a morrer (Figura 1). Estes sintomas ocorriam com maior ou menor intensidade e nem sempre todos ocorriam simultaneamente nas plantas doentes. Sintomas como estes observados nas plantas de primavera são típicos de fitoplasma, cuja presença nos tecidos pode levar ao desenvolvimento anormal de plantas ou de algumas de suas partes. Sintomas do tipo clorose, superbrotamento, enfezamento,

virescência, filodia, necrose de floema e declínio generalizado são comumente relatados para doenças associadas aos fitoplasmas (DAVIS; SINCLAIR, 1998; SEEMULLER et al., 1998). Enrolamento foliar e variegações florais também são descritos, sendo estas alterações de cores influenciadas fortemente por condições climáticas e pela estação do ano (DAVIS; SINCLAIR, 1998; BERTACCINI et al., 1994; DAVIS, 1995). Estas características do quadro sintomatológico levaram à suspeita da associação de fitoplasmas com a anomalia ocorrente em plantas de primavera comercialmente cultivadas no município de Valinhos/SP.

Figura 1 - Sintomas observados em plantas de primavera. **A:** vista de plantas doentes no campo de produção comercial; **B:** planta de primavera com folhas deformadas e pouca floração; **C:** detalhe dos sintomas observados em folhas, ramos e flores

Com base na amplificação do 16S rDNA, empregando-se os pares de iniciadores universais P1/Tint e R16 F2n/R2 em PCR duplo, fitoplasmas foram detectados em, aproximadamente, 60% das plantas comerciais afetadas pela doença (Tabela 3). A presença de fitoplasmas nos tecidos vegetais foi evidenciada pela visualização de bandas no gel, correspondentes a fragmentos genômicos típicos de aproximadamente, 1,2kb. Resultados positivos também foram constatados para as reações de PCR que continham DNA extraído de planta de milho infectada pelo fitoplasma do enfezamento vermelho, a qual foi usada como

padrão positivo. No entanto, nenhuma amplificação foi observada quando DNA de planta de primavera assintomática foi usado como modelo para as reações de duplo PCR com os iniciadores universais. As amplificações obtidas para algumas amostras de primavera, bem como, para o padrão positivo podem ser observadas na Figura 2. Os testes foram repetidos e forneceram sempre resultados idênticos.

Fitoplasmas foram detectados em cerca de 70% das plantas de primavera apresentando sintomas da doença, usando-se DNA extraído de raízes. Todas as plantas que forneceram resultados positivos para DNA extraído de raízes também foram positivas para a presença de fitoplasmas nos tecidos foliares e de ramos.

Figura 2 - Amplificação do 16S rDNA, através do duplo PCR usando iniciadores universais P1/Tint e F2n/R2, de fitoplasmas detectados em plantas sintomáticas de primavera. Colunas BS6, BS7, BS8, BS9, BS11, BS13, BS14 e BS16: amostras de primavera; Coluna MI: padrão positivo (milho); Coluna BSS: amostra sadia de primavera e M: marcador 1kb ladder

A técnica de PCR tem sido rotineiramente utilizada para a detecção de fitoplasmas, por ser bastante sensível e confiável (DAVIS, 1995; GUNDERSEN; LEE, 1996; HENSON; FRENCH, 1993). No entanto, não são raros os resultados negativos obtidos para plantas que exibem sintomas tipicamente associados a fitoplasmas. Nestes casos, não se pode atribuir estes resultados a falhas na metodologia de PCR, mas sim a fatores diversos, como por exemplo, ao estágio vegetativo da planta, à época de amostragem, à presença de substâncias inibidoras encontradas na planta, à distribuição irregular do patógeno ou à presença do patógeno em baixa concentração nos tecidos da planta. Em plantas lenhosas, como é o caso da primavera, é comum a ocorrência de infecção com baixo título de fitoplasma, como já registrado para outras espécies como *Rubus fruticosus* (BERTACCINI et al., 1995), olmo (*Ulmus* spp) (LEE et al., 1995),

macieira (KARTTE; SEEMUELLER, 1991), e videira (CREDI, 1994). A distribuição irregular do fitoplasma tem sido observada principalmente em fruteiras, apesar do patógeno ser um habitante de floema. Os autores Jarausch; Lansac; Dosba, (1999) observaram distribuição irregular de fitoplasma em fruteiras de caroço com sintomas de amarelos, principalmente em decorrência da estação do ano e período de dormência da planta. Trabalhos conduzidos com videira e algumas outras plantas lenhosas que apresentam período de dormência, como por exemplo a pêra, têm apontado dificuldades na detecção de fitoplasmas decorrentes da distribuição e concentração desuniformes do patógeno na planta (CHAPA *et al.*, 2003). A distribuição irregular de fitoplasmas também foi relatada em árvores de quiri (*Paulownia tomentosa*), em função da época do ano e do estágio fenológico, levando a dificuldades para a detecção do patógeno (NAKAMURA *et al.*, 1998). Ainda, fitoplasmas nem sempre são detectados a partir de um mesmo tipo de tecido de plantas ou partir de um mesmo período de amostragem, como foi demonstrado para videira (CONSTABLE; GIBB; SYMONS, 2003).

Estes relatos mostram que os fitoplasmas, apesar de presentes nas plantas e provocarem o aparecimento de sintomas, nem sempre são detectados nos tecidos vegetais. No caso do presente trabalho, a não detecção destes patógenos na totalidade das plantas sintomáticas de primavera não significa que os mesmos não estejam presentes em seus tecidos. A constatação de fitoplasmas em cerca de 60% das plantas sintomáticas amostradas através de folhas e ramos e em 70% das plantas sintomáticas amostradas por raízes pode ser considerada como alto índice de detecção, tendo em vista as dificuldades de se evidenciar o patógeno, através de PCR, em plantas lenhosas. Estes índices de detecção forneceram confiabilidade e segurança, possibilitando associar os fitoplasmas com as alterações exibidas pelas plantas e permitindo a confirmação da diagnose feita com base nos sintomas.

3.2.3.2 Identificação através de PCR

O emprego de duplo PCR com iniciadores específicos para identificação de fitoplasmas demonstrou que fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI e 16SrIII estão associados ao superbrotamento da primavera.

Fitoplasmas do grupo 16SrI foram identificados pela amplificação de fragmentos genômicos de aproximadamente 1,1kb, a partir de DNA extraído de tecidos das plantas de primavera identificadas por **BS13**, **BS14** e **BS16** (Figura 3). Fitoplasmas pertencentes ao grupo

16SrIII foram constatados nos tecidos amostrados das plantas **BS4**, **BS6**, **BS7**, **BS8**, **BS9**, **BS11**, **BS13** e **BS17**, através da visualização de bandas correspondentes a fragmentos genômicos de 0,8kb, típicos para este grupo (Figura 4). Os resultados revelaram que na planta **BS13** estavam presentes fitoplasmas representantes de ambos os grupos, evidenciando uma infecção mista. Resultados positivos também foram observados para os fitoplasmas utilizados como padrões, no caso, o fitoplasma do superbrotamento do chuchu como representante do grupo 16SrIII e o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho como representante do grupo 16SrI. Não houve amplificação quando DNA obtido de planta de primavera assintomática foi usado como modelo nas reações de duplo PCR.

A identificação de fitoplasmas através da PCR usando os iniciadores específicos para grupos demonstrou a ocorrência de fitoplasmas distintos associados ao superbrotamento da primavera, assim como evidenciou a presença de infecção mista em uma das plantas amostradas. A ocorrência de diferentes fitoplasmas associados ao mesmo quadro sintomatológico presente no mesmo hospedeiro é observada com certa frequência em infecções causadas por estes patógenos, como relatado para o enfezamento do repolho e da videira, com a participação de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII (AMARAL MELLO, 2007; NERONI, 2004) e para o caso do cálice gigante do tomateiro, envolvendo representantes dos grupos 16SrI, 16SrIII, 16SrV, 16SrVI e 16SrXII (AMARAL MELLO, et al., 2006). Infecções mistas de fitoplasmas em uma única planta também são de ocorrência comum na natureza, sendo relatadas para diversas espécies botânicas. Especificamente em plantas ornamentais, a presença simultânea de fitoplasmas afiliados aos grupos 16SrI e 16SrX foi revelada em plantas de dália (KAMIŃSKA; ŚLIWA, 2007), magnólia, roseira, tulipa e lírio (KAMINSKA; SLIWA; RUDZINSKA-LANGWALD, 2001; KAMIŃSKA, ŚLIWA, 2004), enquanto representantes dos grupos 16SrI e 16SrXII foram encontrados em vinca e lírio (BERTACCINI et al., 2002), todas afetadas por doenças do tipo amarelos. As infecções mistas têm sido relatadas com maior frequência em fruteiras, como no caso da videira, na qual foram identificados fitoplasmas representantes dos grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrV (NERONI, 2006; CONSTABLE; GIBB; SYMONS, 2003; ALMA et al., 1996) e em macieira com sintomas de proliferação de ramos, onde foram detectados fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrX (BERTACCINI et al., 1998).

Tabela 3 - Detecção e identificação de fitoplasmas em plantas comerciais de primavera exibindo sintomas de superbrotamento, através do emprego de duplo PCR com iniciadores universais (P1-Tint/ R16F2n-R2) e específicos para classificação em grupos (R16(I)F1/R1, R16(III)F2/R1), repectivamente

Amostras	Detecção	Identificação
BS1	Negativa	Não identificado
BS2	Negativa	Não identificado
BS3	Negativa	Não identificado
BS4	Positiva	16SrIII
BS5	Negativa	Não identificado
BS6	Positiva	16SrIII
BS7	Positiva	16SrIII
BS8	Positiva	16SrIII
BS9	Positiva	16SrIII
BS10	Negativa	Não identificado
BS11	Positiva	16SrIII
BS12	Negativa	Não identificado
BS13	Positiva	16SrIII e SrI
BS14	Positiva	16SrI
BS15	Negativa	Não identificado
BS16	Positiva	16SrI
BS17	Positiva	16SrIII
BSr11	Positiva	Não identificado
BSr12	Negativa	Não identificado
BSr13	Negativa	Não identificado
BSr14	Positiva	Não identificado
BSr15	Negativa	Não identificado
BSr16	Positiva	Não identificado
BSr17	Positiva	Não identificado

Figura 3 - Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas detectados em plantas de primavera, através de duplo PCR com iniciadores específicos para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrI. Colunas BS14 e BS16: amostras de primavera; Coluna MI: padrão positivo (milho); M: marcador de 1kb ladder

Figura 4 - Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas detectados em plantas de primavera, através de duplo PCR com iniciadores específicos para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrIII. Colunas BS6, BS7, BS8, BS9, BS11, BS17: amostras de primavera; Coluna Ch: padrão positivo (chuchu); M: marcador de 1kb ladder

3.2.3.3 Identificação através de RFLP

A análise de RFLP foi conduzida com os produtos de PCR amplificados pelos iniciadores universais P1-Tint/R16F2n-R2. Estes produtos foram submetidos à digestão enzimática com diversas endonucleases e os perfis eletroforéticos ou padrões de restrição gerados foram

comparados com aqueles relatados para os diferentes grupos e subgrupos de fitoplasmas, aceitos internacionalmente para a classificação destes patógenos (LEE et al., 1998).

Para o fitoplasma do grupo 16SrIII, as análises de RFLP foram realizadas com os produtos de PCR resultantes da amplificação do DNA extraído das plantas de primavera identificadas por BS11 e BS17. Como padrão foi usado o fitoplasma do superbrotamento do chuchu, sabidamente um representante do grupo 16SrIII (MONTANO et al., 2000). Para todas as enzimas de restrição utilizadas, os perfis eletroforéticos apresentados pelos fitoplasmas presentes em primavera foram idênticos entre si e com os perfis exibidos pelo fitoplasma do chuchu, exceção feita à enzima *HhaI* (Figura 5 e Figura 6). Os padrões de restrição obtidos com as endonucleases *AluI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI* e *KpnI* foram coincidentes com aqueles apresentados por fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII (Figura 5). O emprego das enzimas *HpaII* e *HhaI* (Figura 6) revelou que o fitoplasma presente em primavera poderia ser um representante do grupo 16SrIII-subgrupo B (Figura 6-B), de acordo com os padrões adotados internacionalmente (LEE et al., 1998). A Tabela 4 mostra um resumo, no qual os diferentes conjuntos de perfis eletroforéticos exibidos pelo fitoplasma detectado nas plantas de primavera e por outros fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII foram diferenciados por numerais. Para cada enzima, pode ser observado que os padrões de restrição mostrados pelo fitoplasma encontrado em primavera são totalmente concordantes com aqueles apresentados pelo fitoplasma representante do grupo 16SrIII-subgrupo B, de acordo com o esquema de classificação (LEE et al., 1998).

Para o fitoplasma do grupo 16SrI, as análises de RFLP foram realizadas com os produtos de PCR resultantes da amplificação do DNA extraído das plantas de primavera identificadas por BS14 e BS16. Como padrão foi usado o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho, previamente identificado como um membro do grupo 16SrI (BEDENDO; DAVIS; DALLY; 2000). Os padrões de restrição exibidos pelo fitoplasma detectado nos tecidos de ambas as plantas de primavera foram indistinguíveis entre si e com os perfis apresentados pelo fitoplasma do milho, para todas as endonucleases usadas na análise (Figura 7 e Figura 8). *KpnI* foi uma das enzimas determinantes para a identificação do fitoplasma como um representante do grupo 16SrI (Figura 8), pois a mesma tem a propriedade de cortar somente o fragmento genômico amplificado de fitoplasmas deste grupo e de fitoplasmas do grupo 16SrXIII. Os perfis resultantes da digestão conduzida com enzimas *AluI*, *MseI*, *RsaI* foram coincidentes com aqueles mostrados por fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrI (Figura 7). O conjunto de perfis gerados pelas enzimas

HpaII e *MboI* (Figura 8) determinaram seguramente que este fitoplasma era um representante do grupo 16SrI, permitindo confirmar a identificação conduzida por PCR com iniciadores específicos para grupos. A classificação ao nível de subgrupo foi feita pela análise dos perfis obtidos com as endonucleases *HpaII* e *MboI*, as quais indicaram que o fitoplasma presente nas plantas de primavera poderiam pertencer aos subgrupos 16SrI-A ou 16SrI-B (Figura 8). No entanto, os padrões de restrição obtidos com a enzima *HhaI* (Figura 8) levaram à conclusão de que este fitoplasma era afiliado ao subgrupo I-B, ou seja ao mesmo subgrupo ao qual pertence o fitoplasma do enfezamento do milho. A Tabela 5 apresenta, de forma concisa, os distintos conjuntos de padrões de restrição obtidos para o fitoplasma identificado nas plantas BS14 e BS16 e aqueles fitoplasmas representantes típicos do grupo 16SrI. Os números representativos dos diferentes padrões gerados pelas diversas enzimas permitem visualizar que o fitoplasma encontrado em primavera é pertencente ao grupo 16SrI-subgrupoB, de acordo com a classificação de fitoplasmas adotada internacionalmente (LEE et al., 1998).

A ocorrência de fitoplasmas do grupo 16SrI e 16SrIII em plantas ornamentais tem sido constantemente relatada na literatura. Fitoplasmas do subgrupo 16SrI-B podem ser considerados como predominantes em comparação com os demais representantes de subgrupos. Estes fitoplasmas foram identificados em associação com tecidos de diversas ornamentais entre elas magnólia (KAMINSKA; SLIWA; RUDZINSKA-LANGWALD, 2001), ciclame com sintomas de filodia e virescência (ALMA et al., 2000), *Cosolida ambigua* (TANAKA et al., 2007) e uma gama de espécies portadoras de doenças do tipo amarelos (SAMUITIENE et al., 2006; BABAIE et al., 2007). No Brasil, a maioria dos fitoplasmas encontrados em plantas ornamentais foram classificados como pertencentes ao grupo 16SrIII. Como exemplos pode ser mencionada a ocorrência de fitoplasmas deste grupo associados ao superbrotamento de plantas de begônia (RIBEIRO et al., 2006), à proliferação de ramos em mudas de bico-de-papagaio (RIBEIRO; BEDENDO, 2006) e ao superbrotamento da vinca (DAVIS et al., 1994).

Figura 5 - Análise de RFLP do 16S rDNA de fitoplasmas do grupo 16SrIII detectados em primavera, utilizando-se as enzimas *AluI*, *MseI*, *RsaI* e *KpnI*. Colunas BS11 e BS17: fitoplasmas detectados em primavera; Coluna Ch: padrão positivo representado pelo fitoplasma do grupo 16SrIII (Chuchu); M= Marcador PhiX174RFHaeIII

Figura 6 - Análise de RFLP do 16S rDNA de fitoplasmas do grupo 16SrIII detectados em primavera, com emprego das enzimas *HpaII* e *MboI* (Gel A) e *HhaI* (gel B). Colunas BS11 e BS17: fitoplasmas detectados em primavera; Coluna Ch: padrão positivo representado pelo fitoplasma do grupo 16SrIII (Chuchu); M= Marcador PhiX174RFHaeIII

Tabela 4 - Comparação entre os padrões de restrição, obtidos por RFLP, do fitoplasma encontrado em plantas de primavera (BS11 e BS17) com outros fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII

Fitoplasmas 16SrIII	subgrupos	Tipos de padrões de restrição para diversas enzimas						
		AluI	MboI	HpaII	MseI	RsaI	HhaI	KpnI
BS11		1	2	2	1	1	1	1
BS17		1	2	2	1	1	1	1
CX ^a	(A)	1	1	1	1	1	1	1
CYE ^a	(B)	1	2	2	1	1	1	1
PB ^a	(C)	1	2	2	2	1	2	1
GR1 ^a	(D)	1	2	2	3	1	2	1
SP1 ^a	(E)	1	1	1	1	1	3	1
MW1 ^a	(F)	1	2	2	1	1	2	1
WWB ^a	(G)	1	1	1	1	2	1	1
PoiBI ^d	(H)	1	1	1	1	1	1	1
VGY ^b	(I)	1	1	1	2	1	1	1
ChWB ^c	(J)	1	2	2	1	1	2	1

Os números representam os diferentes tipos de padrões de restrição obtidos para as diversas endonucleases. Abreviações: CX = Canadian X-disease; CYE = Clover yellow edge; PB = Pecan bunch; GR1 = Goldrod yellows; SP1 = Spirea stunt; MW1 = Milkweed yellows; WWB = Walnut witches'-broom; PoiBI = Poinsetia branch-inducing; VGY = Virginia grapevine yellows; ChWB = Chayote witches'-broom; EBB = Eggplant witches'-broom; EWB = Eggplant big bud e ManWB = Manihots witches'-broom.

Letras sobrescritas: a = LEE et al (1998); b = DAVIS et al. (1998); c = MONTANO et al (2000); d = DAVIS et al (não publicado, citado por Barros, 2002)

Figura 7 - Análise de RFLP do 16S rDNA de fitoplasmas do grupo 16SrI detectados em primavera, utilizando-se as enzimas *AluI*, *MseI*, *RsaI* e *KpnI*. Colunas BS14 e BS16: fitoplasmas detectados em primavera; Coluna MI: padrão positivo representado pelo fitoplasma do grupo 16SrI (Milho); M= Marcador PhiX174RFHaeIII

Figura 8 - Análise de RFLP do 16S rDNA de fitoplasmas do grupo 16SrI detectados em primavera, com emprego das enzimas *HpaII*, *HhaI* e *MboI*. Colunas BS14 e BS16: fitoplasmas detectados em primavera; Coluna MI: padrão positivo representado pelo fitoplasma do grupo 16SrI (Milho); M= Marcador PhiX174RFHaeIII

Tabela 5 - Comparação entre os padrões de restrição, obtidos por RFLP, do fitoplasma encontrado em plantas de primavera (BS14 e BS16) com outros fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrI.

Fitoplasmas 16SrI	subgrupos	Padrões de restrição obtidos com as enzimas						
		AluI	MboI	HpaII	MseI	RsaI	HhaI	KpnI
BS14		1	1	1	1	1	2	1
BS16		1	1	1	1	1	2	1
AY ^a	(A)	1	1	1	1	1	1	1
MBS ^a	(B)	1	1	1	1	1	2	1
CPh ^a	(C)	2	1	1	2	1	1	1
PaWB ^a	(D)	1	1	1	3	1	2	1
BBs ^a	(E)	3	1	2	1	1	1	1
ACLR-AY ^b	(F)	4	1	3	4	2	1	2

Os números representam os diferentes tipos de padrões de restrição obtidos para as diversas endonucleases. Abreviações: Ay =Aster yellows; MBS= Maize bushy stunt; CPh= Clover phyllody; PaWB= Paulownia witches'-broom; BBs= Blueberry stunt; ACLR-AY= Apricot chlorotic leaf. Letras sobrescritas: a = LEE *et al* (1998); b= SCHNEIDER *et al.*, (1993)

3.2.3.4 Análise filogenética e de sítios putativos de restrição

Seqüências consenso foram determinadas a partir do alinhamento das seqüências obtidas para os clones de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII, presentes em plantas de primavera. Isto foi possível por não ocorrer polimorfismo entre as seqüências alinhadas. Assim, uma seqüência consenso foi selecionada como representativa do fitoplasma detectado nas plantas BS14 e BS16 identificada por (BSP-Br1- *Bougainvillea spectabilis* Proliferation) e depositada no GenBank

(EU423898). Outra sequência consenso foi selecionada como representativa do fitoplasma encontrado nas plantas BS11 e BS17 identificada por (BSP-Br3- *Bougainvillea spectabilis* Proliferation) e depositada no GenBank (EU423899). O sequenciamento dos clones foi repetido por pelo menos três vezes. As análises das sequências permitiram confirmar os resultados obtidos na identificação dos fitoplasmas por PCR e por RFLP.

As sequências nucleotídicas encontradas no fitoplasma da primavera representante do grupo 16SrI apresentaram 99% de similaridade com as sequências dos diversos fitoplasmas componentes deste grupo, depositadas no GenBank. A relação filogenética existente entre os fitoplasmas de diferentes grupos e o fitoplasma associado ao superbrotamento da primavera pode ser observada na árvore filogenética gerada a partir das respectivas sequências nucleotídicas (Figura 9). O fitoplasma encontrado em primavera se mostrou distinto dos fitoplasmas afiliados aos demais grupos e fez parte do ramo que agregou os diversos representantes dos subgrupos do grupo 16SrI. A análise dos mapas de sítios putativos de restrição (Figura 10) confirmou os resultados obtidos na análise de RFLP e demonstrou, definitivamente, que o fitoplasma associado ao superbrotamento da primavera é um representante do grupo 16SrI, subgrupo-B.

As sequências nucleotídicas determinadas para o fitoplasma do grupo 16SrIII presente em primavera também mostrou 99% de similaridade em relação àquelas encontradas em alguns fitoplasmas deste grupo e depositadas no GenBank. A partir destas sequências uma árvore foi construída, mostrando a relação filogenética entre o fitoplasma detectado em associação com o superbrotamento da primavera e os fitoplasmas membros de diversos grupos (Figura 11). O fitoplasma encontrado em primavera se mostrou distinto dos fitoplasmas pertencentes aos diversos grupos analisados e fez parte do ramo que agregou os diferentes representantes dos subgrupos componentes do grupo 16SrIII. Considerando as sequências do 16SrDNA, o fitoplasma presente em primavera mostrou maior similaridade com os fitoplasmas afiliados aos subgrupos 16SrIII-B, 16SrIII-F e 16SrIII-J. Apesar da alta homologia existente entre as sequências, a distinção entre estes fitoplasmas foi mostrada pela análise dos mapas de sítios putativos de restrição (Figura 12), os quais revelaram que sítios de restrição distintos podem ser encontrados na região conservada do 16SrDNA destes fitoplasmas. Com base nesta análise, não ficou definido que o fitoplasma do superbrotamento da primavera possa pertencer ao subgrupo 16SrIII-B. No entanto, os resultados aqui obtidos, que indicam esta possibilidade, aliados àqueles provenientes da análise de RFLP, revelam que o fitoplasma encontrado em primavera está mais

relacionado ao representante do subgrupo 16SrIII-B do que com afiliados aos demais subgrupos aqui considerados.

Assim como em outros trabalhos, o presente estudo também mostrou que as análises das seqüências nucleotídicas que compõem o 16SrDNA de fitoplasmas são bastante úteis na identificação de fitoplasmas, tanto ao nível de grupo como de subgrupo. Isto ficou bem claro para o fitoplasma do subgrupo 16SrI-B identificado em primavera. No entanto, para o fitoplasma do grupo 16SrIII, também detectado em primavera, não foi possível sua identificação definitiva ao nível de subgrupo. Este tipo de problema pode ser considerado como normal quando se trata de representantes do grupo 16SrIII, pois alguns trabalhos têm mostrado que o genoma destes fitoplasmas podem conter duas ou mais populações do gene 16SrRNA, o que dificulta a sua identificação (JOMANTIENE et al., 2002; SCHNEIDER; SEEMÜLLER, 1994; AMARAL MELLO; BEDENDO; CAMARGO, 2006).

Figura 9 - Árvore filogenética construída com representantes de 14 diferentes grupos de fitoplasma, 6 subgrupos representantes do grupo 16SrI, o procarioto *Acholeplasma laidlawii* e o fitoplasma da primavera (BSP-Br1). Os números nos ramos representam valores de confiança baseados no “Bootstrapping”

Figura 10 -Análise putativa de sítios de restrição com as mesmas enzimas utilizadas para análise de RFLP. A= sequência do fitoplasma da primavera (BSP-Br1) obtida pelo sequenciamento da região 16S rDNA; B= sequência do fitoplasma representante do grupo 16SrI-B (Maize bushy stunt) obtida no GenBank

Figura 11 - Árvore filogenética construída com representantes de 14 diferentes grupos de fitoplasma, 9 subgrupos representantes do grupo 16SrIII, o procarioto *Acholeplasma laidlawii* e o fitoplasma da primavera (BSP-Br3). Os números nos ramos representam valores de confiança baseados no “Bootstrapping”

isolada de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII nos tecidos de plantas de vinca associadas às respectivas plantas de primavera portadoras de fitoplasmas pertencentes a estes grupos. Nestes casos, fragmentos genômicos de 1,1kb e de 0,8kb foram visualizados na forma de bandas, após a amplificação em termociclador e eletroforese em gel de agarose (Figura 15).

Uma vez que os fitoplasmas não são cultiváveis em meio de cultura, a cuscuta tem se mostrado útil nos trabalhos envolvendo este tipo de patógeno. A transmissão destes agentes de plantas doentes para plantas sadias é um das formas de se demonstrar a sua patogenicidade e confirmar diagnoses feitas com base na sintomatologia, como tem sido relatado em diversos trabalhos (COUSIN et al., 1986; CARRARO et al., 1988; CARRARO et al., 1991; CREDI; SANTUCCI, 1992; LOI et al., 1995; MARCONE; RAGOZZINO; SEEMULLER, 1997; SALEHI; IZADPANCH; HEYDARNEJAD, 2006). A transmissão de fitoplasmas a partir de seu hospedeiro original para plantas de vinca através da cuscuta também tem sido utilizada quando estes fitoplasmas ocorrem em baixas concentrações, pois a sua passagem para vinca pode facilitar sua detecção, bem como servir para a manutenção de coleções de fitoplasmas para uso futuro (MARCONE et al., 1999). Os sintomas típicos provocados por fitoplasmas que são transferidos de seus hospedeiros originais para vinca são idênticos àqueles descritos neste trabalho para os fitoplasmas encontrados nas plantas sintomáticas de primavera. Assim, têm sido relatados a presença de clorose foliar, superbrotamento de ramos, redução de porte da planta e de seus órgãos, alterações de coloração de folhas e flores, sintomas estes que tornaram a vinca uma planta teste para estudos de fitoplasmas (MARCONE; RAGOZZINO; SEEMULLER, 1997; KAMINSKA; KORBIN, 1999 e 2001; KAMINSKA; SLIWA; RUDZINSKA-LANGWALD, 2001).

Figura 13 - Teste de transmissão de fitoplasmas detectados em primavera para plantas de vinca, através de cuscuteira; **A**: planta de vinca com sintomas típicos da presença de fitoplasma; **B**: plantas de vinca sintomáticas (à direita) e planta de vinca sadia (à esquerda); **C**: planta de vinca com alteração na cor e tamanho da flor (direita) e planta com flor normal (esquerda)

Figura 14 - Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas presentes em plantas de vinca, através de PCR com os iniciadores P1/Tint e 16F2n/R2. Colunas de 1 e 2: amostras de plantas de vinca infectadas com fitoplasma de primavera (planta BS14); coluna 3: amostra planta de vinca infectada com fitoplasma de primavera (planta BS16); coluna 4: amostra de planta de vinca infectada com fitoplasma de primavera (planta BS17); coluna 5: amostra de planta de vinca sadia; coluna 6: padrão positivo representado pela planta de milho; M: marcador 1kb ladder

Figura 15 - Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas detectados em plantas de vinca através de duplo PCR com iniciadores específicos para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrIII (Gel-A) e do grupo 16SrI (Gel-B). **Gel A:** Colunas de 1 à 4: amostras de plantas de vinca infectadas pelo fitoplasma da primavera; coluna 5: amostra de planta de vinca sadia; coluna 6: padrão positivo representado pela planta de chuchu; M: marcador 1kb ladder. **Gel B:** coluna 1: amostra de planta de vinca infectada pelo fitoplasma da primavera; coluna 2: padrão positivo representado pela planta de milho; M: marcador 1kb ladder

Conclusões

Os estudos desenvolvidos neste trabalho, visando à detecção e identificação de fitoplasmas associados a uma doença ocorrente em espécie ornamental, foi possível concluir que:

- fitoplasmas são os agentes causais de uma nova doença em primavera, denominada de superbrotamento.
- um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrI, subgrupo B e um fitoplasma representante do grupo 16SrIII, provável afiliado ao subgrupo B, ocorrem isoladamente ou em infecção mista em plantas de primavera portadoras de superbrotamento.

Referências

ALMA, A.; MARZACHI, C.; D'AQUILIO, M.; BOSCO, D. Cyclamen (*Cyclamen persicum* L.): a dead-end host species for 16Sr-IB and – IC subgrupo phytoplasmas. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 136, p.173-178, 2000.

ALMA, A.; DAVIS, R.E.; VIBIO, M.; DANIELLI, A.; BOSCO, D. ARZONE, A. BERTACCINI, A. Mixed infection of grapevines in northern Italy by phytoplasmas including 16S rRNA RFLP subgroup 16SrI-B strains previously unreported in this host. **Plant Disease**, Saint Paul, v.80, p.418-421, 1996.

AMARAL MELLO, A.P.O. **Identificação de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença**. 2007. 64p. Tese (Doutorado na área de Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007

AMARAL MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; CAMARGO, L.E.A. Identidade molecular dos fitoplasmas associados aos enfezamentos do tomateiro e da berinjela com base na análise do gene 16S rDNA. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p. 113-118, 2007.

AMARAL MELLO, A.P.O.; RIBEIRO, L.F.C.; MASSOLA JUNIOR, N.S.; BEDENDO, I.P. Um fitoplasma do grupo 16SrV associado ao superbrotamento da crotalária. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 432-435, 2004.

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

AROCHA, Y.; LÓPEZ, M., PIÑOL, B.; FERNANDEZ, M.; PICORNELL, B.; ALMEIDA, R.; PALENZUELA, I. '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**, Londres, v. 55, p. 2451-2463, 2005.

BABAIE, G.; KHATABI, B.; BAYAT, H.; RASTGOU, M.; HOSSEINI, A.; SALEKDEH, G.H. Detection and characterization of phytoplasmas infecting ornamental and weed plants in Iran. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.155, p.368-372, 2007.

BALASARASWATHI, R.; SADASIVAM, S.; WARD, M.; WALKER, M. An antiviral protein from *Bougainvillea spectabilis* roots; purification and characterisation. **Phytochemistry**, New York, v.47, n.8, p.1561-1565, 1998.

BARROS, T.S.L. **Caracterização molecular de Mollicutes fitopatogênicos no Brasil**. B2002. 105p. Tese (Doutorado na área de Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2002..

BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Detecção e caracterização de fitoplasmas em plantas de vinca (*Catharantus roseus*) e de pimenta (*Capsicum frutescens*) através das técnicas de duplo PCR e de RFLP. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p.197-201, 1999.

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

BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; LUCA, G.; VILLANI, A. Detection and molecular characterization of mycoplasma-like organisms in an Emilia-Romagna pear orchard. **Rivista di frutticoltura**, Bologna, v. 9, p.83-86, 1994.

BERTACCINI, A.; KAMIŃSKA, M.; BOTTI, S.; MARTINI, M. Molecular evidence for mixed phytoplasma infection in lily plants. Proc. 10th IS on Virus Diseases in ornamentals, ed. J. Hammond, **Acta Horticulturae ISHS**, The Hague, v. 568, p.35-41, 2002, suplemento.

BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; GENNARI, F.; LEE, I.-M.; GUERRINI, A.; BENNI, A. Detection of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas) in rubus by nested polymerase chain reaction (PCR). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 386, p. 126-131, 1995.

BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; FRANOVA, J.; JANECKOVA, M.; HADIDI, A. Molecular detection of phytoplasmas in apple with rubbery wood symptoms. **Acta-Horticulturae**, The Hague, v.472, p.693-700, 1998.

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

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

CASTRO, C.E.F. Cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 4, n. 1/2, p.1-46, 1998.

CHAGAS, C.M.; ALEXANDRE, M.A.V.; DUARTE, L.M.L.; RIVAS, E.B.; TOMBOLATO, A.F.C. Badnavirus-like particles associated with chlorotic veinbanding symptoms in *Bougainvillea spectabilis*. **Virus: Reviews and Research**, Rio de Janeiro, v.6, p.153, 2001.

CHAPA, M.G.-; MEDINA, V.; VIRUEL, M.A.; LAVIÑA, A.; BATLLE, A. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. **Plant Pathology**, Oxford, v.52, p.513-520, 2003.

CLARO, D.P. **Análise do complexo agroindustrial das flores do Brasil**. 1998. 103p. Dissertação (Mestrado na área de Economia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

CONSTABLE, F.E.; GIBB, K.S.; SYMONS, R.H. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, p.267-276, 2003.

COUSIN, M.T.; SHARMA, A. K.; ROUSSEAU, J.; POITEVIN, J.P.; SAVOURÉ, A. Hydrangea virescence. I. Description of the disease and its transmission to differential host plant *Catharanthus roseus* by *Cuscuta subinclusa*. **Agronomie**, Paris, v. 6, n. 3, p.249-254, 1986.

CREDI, R. Occurrence of anomalous mycoplasma-like organisms in grapevine yellows diseased phloem. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.142, p. 310-316, 1994.

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

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

DAVIS, R.E.; SINCLAIR, W.A. Phytoplasma identity and disease etiology. **Phytopathology**, Saint Paul, v.88, p.1372-1376, 1998.

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

DAVIS, R.I.; SCHNEIDER, B.; GIBB, K.S. Detection and differentiation of phytoplasma in Australia. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 48, p. 535-544, 1997.

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

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

DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; BERTACCINI, A.; CREDI, R.; OSLER, R.; SAVINO, V.; CARRARO, L.; DITERLIZZI, B.; BARBA, M.; LEE, I-M. RFLP analyses and dot hybridizations of chromosomal DNA distinguish two mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p.242, 1992.

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

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

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

DUARTE, L.M.L. Extratos vegetais utilizados no controle de fitoviroses. **Divulgação técnica, Biológico**, São Paulo, v.66, n1/2, p. 19-20, 2004.

FARIA, R.T. **Floricultura**: As plantas ornamentais como agronegócio Londrina:.. Ed. ecenas, 2005. 116p.

FIRRAO, G.; GARCIA-CHAPA, M.; MARCZACHI, C. Phytoplasmas: genetics, Diagnosis and relationships with the plant and insect host. **Frontiers in Bioscience**, Washington, v. 12, p.1353-1375, 2007.

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

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

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, London, v.166, n.4, p.557-580, 1983.

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

HENSON, J.M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant diseases diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.31, p. 81-109, 1993.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA. Programa Florabrazilis. **Release Florabrazilis 2003/2004**. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com.br>>. Acesso em: 25 ago. 2004.

JARAUSCH, W., LANSAC, M. DOSBA, F. Seasonal colonization pattern of European Stone fruit yellows phytoplasmas in different prunus species detected by specific PCR. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p. 47-54, 1999.

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

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

KAMINSKA, M.; KORBIN, M. Detection of phytoplasma infection in *Lilium* sp. plants. ISHS In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIRUS DISEASES OF ORNAMENTAL PLANTS, 10., Acta Horticulturae, The Hague, 568, 2001, supplement.

KAMIŃSKA, M.; ŚLIWA, H. First Report of phytoplasma belonging to apple proliferation group in roses in Poland. **Plant Disease**, Saint Paul, v.88, p.1283, 2004.

KAMIŃSKA, M.; ŚLIWA, H. Mixed infection of dahlia plants in Poland with apple proliferation and aster yellows phytoplasmas. **New Disease Reports**, Oxford, v.15, 11-12, 2007.

KAMINSKA, M.; SLIWA, H.; RUDZINSKA-LANGWALD, A. The association of phytoplasma with stunting, leaf necrosis and witches' broom symptoms in magnolia plants. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, p.719-724, 2001.

KARTTE, S.; SEEMULLER, E. Susceptibility of grafted *Malus* taxa and hybrids to apple proliferation disease. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.131, p. 137-148, 1991.

KIRKPATRICK, B.C. Mycoplasma-like organisms – Plant and invertebrate pathogens. In: BALLOWS, A.; TRUPER, H.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. (Ed.). **The prokaryotes**. New York: Springer, 1992. p.4050-4067.

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

KITAJIMA, E.W. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1986-1993). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, (Supl. Especial) p.92, 1995.

KITAJIMA, E.W.; COSTA, A. S. Micoplasma: Possível agente etiológico de certas moléstias de plantas. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.22, n.4, p.351-363, 1970.

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

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

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

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

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

LEE, I.-M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; DAVIS, R.E.; BOTTLNER, K. D.; MARCONE, C.; SEEMÜLLER, E. 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with

aster yellows and related disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1037-1048, 2004.

LEE, I.-M.; BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; GUNDERSEN, D.E.; DAVIS, R.E.; MITTEMPERGHER, L.; CONTI, M.; GENNARI, F. Detection and characterization of phytoplasmas associated with diseases in *Ulmus* and *Rubus* spp. in Northern Italy. **Phytopathology Mediterranea**, Bologna, v.34, p.174–183, 1995.

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

LORENZI, H. E SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbácea e trepadeiras. [S.l.]: Ed. Plantarum, 2001.1088p.

MARCONI, C., RAGOZZINO, A.; SEEMULLER, E. Detection and identification of phytoplasmas infecting vegetable, ornamental and forage crops in southern Italy. **Journal Plant Pathology**, Bari, v.79, p.211-217, 1997.

MARCONI, C.; HERGENHAHN, H.; RAGOZZINO, A.; SEEMULLER, E. Dodder transmission of pear decline, european stone fruit yellows, rubus stunt, picris echioides yellows and cotton phyllody phytoplasmas to periwinkle. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p.187-192, 1999.

MARCONI, C.; LEE, I.M.; DAVIS, R.E.; RAGOZZINO, A.; SEEMULLER, E. Classification of aster yellows-groups phytoplasmas based on combined analysis of rRNA and tuf genes sequences. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v.50, p.1703-1713, 2000.

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

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T. Detection of witches' broom phytoplasmas infecting *Hibiscos rosa-sinensis*, in Rio de Janeiro state, by polymerase chain reaction (PCR).In: Reunião ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR,26., 1997. cidade. **Resumos...** p.74, 1997, suplemento.

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

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

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

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

PITTA, G.P.B. **Doenças das plantas ornamentais**. São Paulo: Instituto Brasileiro do livro científico 1989. 174p.

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

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

RIBEIRO, L.F.C.; AMARAL MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; GIÓRIA, R. Phytoplasma associated with shoot proliferation in begônia. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.63, p.475-477, 2006.

RIVAS, E.B., GALLETI, S.R., DUARTE, L.M.L., SEABRA, P.V., ALEXANDRE, M.A.V. Virus and phytoplasma diseases of lisianthus. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.26, n. 2, p. 257-262, 2000.

RIVAS, E.B.; DUARTE, L.M.L.; ALEXANDRE, M.A.V.; FERNANDES, F.M.C.; HARAKAVA, R. A new Badnavirus species detected in *Bougainvillea* in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**, Japan, v.71, p.438-440, 2005.

SALEHI, M.; IZADPANAH, K.; HEYDARNEJAD, J. Characterization of a new Almond witches Broom Phytoplasma in Iran. *Journal of Phytopathology*, **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.154, p.386-391, 2006.

SAMUITIENE, M.; NAVALINSKIENE, M.; DAVIS, R.E.; JOMANTIENE, R. Molecular characterization of diverse phytoplasma of subgroups 16SrI-A, 16SrI-B, 16SrI-L, and 16SrI-M infecting ornamental plants in Lithuania. **Bulletin OEPP/EPPO** Vilnius, v.36, p.47-51, 2006.

SAWAYANAGI, T.; HORIKOSHI, N.; KANEHIRA, T.; SHINOHARA, M.; BERTACCINI, A.; COUSIN, M.T.; HIUKI, C.; NAMBA, S. Candidatus Phytoplasma Japonicum', a new phytoplasma taxon associated with Japanese hydrangea phyllody. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.49, p. 1275-1285, 1999.

SCHNEIDER B.; AHRENS U.; KIRKPATRICK, B.C.; SEEMULLER, E. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. **Journal of General Microbiology**, London, v.139, p. 519-527, 1993.

SEARS, B.B.; KIRKPATRICK, B.C. Uveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. **ASM News**. Michigan, v.60, p.307-312, 1994.

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

SEEMULLER, E.; MARCONE, C.; LAUER U.; RAGOZZINO A. ; GOSCHL, M. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 80, p. 3-26, 1998.

SHAHRAEEN, N.; GHOTBI, T.; MEHRABAN, A.H. Ocorrence of Impatiens necrotic spot virus in ornamentals in Mahallat and Tehran provinces in Iran. **Plant Disease**, Saint Paul, v.86, p.694, 2002.

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

SOLOGUREN, F.J.; JULIATTI, F.C. Doenças fúngicas em plantas ornamentais em Uberlândia-MG, **Biociencia Journal**, Uberlândia, v.23, n.2, p.42-52, 2007.

TANAKA, M.; TANINA, K.; KASUYAMA, S.; USUGI, T. Ocorrence of rocket larkspur witches' broom caused by "Candidatus Phytoplasma asteris" in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Japan, v.73, n.4, p.286-289, 2007.

TSAI, J.H. Vector transmission of mycoplasmal agents of plant diseases. In: WHITCOMB, R.F; JG TULLY, J.G, (Ed.). **Plant and inset mycoplasma** New york: Academic Press, 1979. p.265-307,

VALIUNAS, D.; STANIULIS, J. ; DAVIS, R. E. 'Candidatus phytoplasma fragariae', a novel phytoplasma taxon discovered in yellows deseased strawberry, *Fragaria 6 ananassa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.56, p.277-281, 2006.

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

YAMASHITA, S.; FERREIRA, P.T.O.; FIGUEIREDO, D.V.; BRIOSO, P.S.T.; KITAJIMA, E.W. Occurrence of a Badnavirus in *Bougainvillea* in Brazil. **Summa Phytopathologyca**, Botucatu, v.30, p.68, 2004.