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

Enfezamento do brócolis: identificação molecular de fitoplasmas, potenciais insetos vetores e hospedeiros alternativos, e análise epidemiológica da doença

Bárbara Eckstein

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

**Piracicaba
2010**

Bárbara Eckstein
Engenheiro Agrônomo

Enfezamento do brócolis: identificação de fitoplasmas, potenciais insetos vetores e hospedeiros alternativos e epidemiologia da doença

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

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

Piracicaba
2010

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

Eckstein, Bárbara

Enfezamento do brócolis: identificação de fitoplasmas, potenciais insetos vetores e hospedeiros alternativos e epidemiologia da doença / Bárbara Eckstein. - - Piracicaba, 2010.

103 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Brócolis 2. Enfezamento (Doença de planta) 3. Epidemiologia 4. Fitoplasmas
Insetos vetores I. Título

ξ

CDD 635.35
E19e

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

A Deus, por estar sempre do meu lado e me guiar para caminhos seguros.

*Ao meu amor Júlio, pela dedicação, carinho,
por me dar forças para ir sempre mais longe do que poderia imaginar*

DEDICO

*Aos meus pais Adalberto e Marlene
Por todo amor, e pelo esforço que fizeram a fim de me oferecerem o melhor
A minha irmã Angélica e minha sobrinha Maria Eduarda
Por todo amor, e alegria que trazem para minha vida*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade da realização do curso de Doutorado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de doutorado;

Ao Professor Ivan Paulo Bedendo, por confiar em mim, pela oportunidade de cursar o Doutorado sob a sua orientação, e pela contribuição para o meu desenvolvimento profissional e pessoal;

À Professora Vanda Pietrowski e ao Professor José Renato Stangarlin, que fizeram despertar em mim a vontade de ser pesquisadora e professora, e me incentivam a fazer pós graduação;

À empresa Buono Gel e ao produtor João que permitiram que eu realizasse o trabalho em suas áreas;

À Dra. Kátia R. Brunelli por coletar as primeiras amostras de plantas de brócolis e dar suporte durante a seleção de áreas para o desenvolvimento do projeto de doutorado;

Ao Msc. Júlio César Barbosa, por participar de todas as etapas do projeto, e grande ajuda na elaboração da tese;

À Professora Dra. Lilian Amorim, pela ajuda na elaboração do projeto e auxílio na análise dos dados epidemiológicos;

Ao professor Dr. João Lopes, pelo auxílio na elaboração do projeto e dicas para a busca de insetos vetores;

À professora Ketí M.R. Zanol, que pacientemente me ensinou a separar os cicadelídeos em subfamílias e identificou parte das cigarrinhas coletadas no trabalho;

À amiga Patrícia Kreycki, por ter realizado incontáveis reações da PCR e eletroforese das amostras coletadas neste trabalho;

Ao Msc. Cherre Sade Bezerra da Silva, pelo auxílio na obtenção das fotos dos insetos;

À Paula Cristina Pinto Sebastião pelas orientações que me fizeram crescer e ter maturidade para enfrentar os momentos difíceis durante o doutorado;

À amiga Eliane Gonçalves da Silva, por toda ajuda no laboratório, e, principalmente pela amizade, incentivo e conselhos;

À amiga Raquel de Cássia Neroni, que aos poucos conquistou minha admiração, confiança e por me oferecer uma amizade sincera que sempre me faz tão bem;

Aos amigos que fiz durante o período de pós-graduação Ana Carolina Alves, Débora Maria Sansini, Ely Oliveira Garcia, Greyci, Fernanda, Leandro J. Dallagnol, Luciano de A. Melo, Lígia Moda, Maristela Gava, Fernanda R. Camilo, Lia Mateli Garcia, Juliana Balbinotte e Pastora J. Querales, por toda a atenção e força que me deram durante este período;

Aos amigos de longa data Adriano L. Spanhol, Andréa Ruver, Idiana Marina Dalastra e Luciana Iurkiv, pela amizade que distancia nenhuma reduz;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos, Alan, Ana Paula, Daniela, Isolda, Renata Brito, Renata Bocchi, Renata Lanza, Maria Cristina, Raquel, Samuel, Evandro, Rafaela, Thais, e demais colegas do Departamento por tudo que me ensinaram e pelos bons momentos;

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ, que muito me ensinaram e sempre foram atenciosos quando necessitei de ajuda;

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 DESENVOLVIMENTO	23
2.1 Revisão bibliográfica	23
2.1.1 Fitoplasmas	23
2.1.2 Insetos vetores de fitoplasmas	24
2.1.3 Detecção e classificação de fitoplasmas	26
2.1.4 Epidemiologia de doenças associadas aos fitoplasmas	27
2.1.4.1 Interação planta-patógeno-vetores	27
2.1.4.2 Distribuição espacial e temporal de doenças associadas à fitoplasmas	28
2.1.5 Doenças associadas à fitoplasmas em brássicas	29
2.2 Material e métodos	30
2.2.1 Material vegetal analisado	30
2.2.1.1 Amostras de plantas de brócolis	30
2.2.1.2 Amostras de plantas daninhas	31
2.2.2 Extração de DNA total	31
2.2.2.1 Extração de DNA total de amostras de plantas de brócolis	31
2.2.2.2 Extração de DNA total de amostras de plantas daninhas	32
2.2.3 Detecção e identificação de fitoplasmas por PCR	33
2.2.4 Identificação dos fitoplasmas por RFLP	34

2.2.5 Sequenciamento da região 16SrDNA do fitoplasma	34
2.2.6 Clonagem	35
2.2.7 Análise virtual de RFLP.....	36
2.2.8 Análise filogenética.....	37
2.2.9 Coleta e identificação de potenciais insetos vetores	39
2.2.9.1 Local, forma de coleta e separação dos insetos	39
2.2.9.2 Extração de DNA total dos insetos	39
2.2.9.3 Detecção e identificação de fitoplasmas em insetos	40
2.2.10 Analise epidemiológica.....	40
2.2.10.1 Caracterização dos locais de plantio e demarcação dos ensaios	40
2.2.10.2 Coleta de dados	41
2.2.10.3 Analise temporal	42
2.2.10.4 Analise espacial.....	42
2.2.10.4.1 Índice de dispersão.....	42
2.2.10.4.2 Ajuste à lei de Taylor modificada	43
2.2.10.4.3 Áreas isópatas	44
2.3 Resultados e Discussão	44
2.3.1 Detecção e identificação de fitoplasmas em plantas de brócolis	44
2.3.1.1 Detecção e identificação de fitoplasmas por PCR	44
2.3.1.2 Identificação de fitoplasmas por RFLP.....	47
2.3.1.3 Identificação de fitoplasmas por RFLP virtual	51
2.3.1.4 Análise filogenética.....	58
2.3.2 Detecção e identificação de fitoplasmas em plantas daninhas.....	60
2.3.3 Identificação de possíveis vetores de fitoplasmas na cultura do brócolis.....	67
2.3.3.1 Identificação dos insetos da família Cicadellidae.....	67

2.3.3.2 Localização das cigarrinhas na área de análise da doença.	69
2.3.3.3 Detecção de fitoplasmas nas cigarrinhas.....	71
2.3.3.4 Identificação de fitoplasmas detectados em cigarrinhas por análise de RFLP.....	72
2.3.4 Análise epidemiológica da doença	78
2.3.4.1 Análise temporal.....	78
2.3.4.2 Análise espacial	81
2.3.4.2.1 Índice de dispersão	83
2.3.4.2.2 Ajuste à lei de Taylor modificada.....	85
2.3.4.2.3 Áreas isopatas.....	87
3 CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS	93

RESUMO

Enfezamento do brócolis: identificação de fitoplasmas, potenciais insetos vetores e hospedeiros alternativos e análise epidemiológica da doença

O brócolis (*Brassica oleraceae* var. *italica*) é uma das hortaliças mais importantes do país, cujo volume de comercialização na CEAGESP é de aproximadamente 13 mil toneladas por ano. Recentemente, uma nova doença tem causado perdas relevantes para as culturas instaladas na maior região produtora do Estado de São Paulo. Os sintomas característicos da doença são expressos pelo enfezamento da planta e necrose dos vasos de floema. Devido ao fato destes sintomas indicarem a presença de fitoplasmas nas culturas de repolho e couve-flor, localizadas na mesma região geográfica onde foi observada esta nova doença, levantou-se a suspeita de que estes mesmos agentes patogênicos pudessem estar associados com as plantas doentes de brócolis. Assim, o DNA total de plantas de brócolis sintomáticas foi analisado por PCR com *primers* específicos para a região 16S rDNA de fitoplasmas. Os resultados revelaram que estes patógenos estavam associados com as plantas doentes. Através das técnicas de RFLP do sequenciamento de nucleotídeos desta mesma região genômica, os fitoplasmas foram identificados como pertencentes aos grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrXIII. Através de análise de RFLP, fitoplasmas também foram identificados em diversas espécies de plantas daninhas e em cigarrinhas da família Cicadellidae coletadas em áreas adjacentes a campos de produção de brócolis. Fitoplasmas do grupo 16SrIII foram identificados em plantas daninhas das espécies *Agetarum conyzoides* (mentrasto), *Crotalaria lanceolata* (crotalaria), *Lepidium virginicum* (mentruz), *Nicandra physalodes* (juá-de-capote), *Paulicourea marcgravii* (erva-de-rato), *Ricinus communis* (mamona), *Sida rhombifolia* (guanxuma), *Sonchus oleraceae* (serralha amarela), *Bidens pilosa* (picão preto), *Erigeron bonariensis* (buva), *Emilia sonchifolia* (falsa serralha), *Leonorus sibiricus* (rubim), enquanto que fitoplasmas do grupo 16SrVII foram encontrados as últimas quatro espécies citadas. Com relação aos insetos, fitoplasmas foram detectados em indivíduos das subfamílias Deltocephalinae, Agalliinae e Typhlocybinae. Dentro da subfamília Deltocephalinae, a cigarrinha *Balclutha hebe* portava fitoplasma do grupo 16SrI, enquanto que cigarrinhas das espécies *Atanus nitidus*, *Planicephalus flavicosta* e *Schapytopius fuliginosus* abrigavam fitoplasmas do grupo 16SrIII. Nos tecidos de duas cigarrinhas da subfamília Agalliinae e uma da Typhlocybinae, as quais não foram identificadas quanto a espécie, foram encontrados fitoplasmas do grupo 16SrIII. As análises epidemiológicas revelaram um padrão espacial agregado de plantas doentes e a ocorrência de um maior progresso da doença nos bordos dos campos de cultivo de brócolis, que estão localizados nas proximidades de áreas com a presença de plantas daninhas.

Palavras-chave: *Brássica oleraceae*; Fitoplasmas; Insetos vetores; Hospedeiros alternativos; Epidemiologia

ABSTRACT

Broccolo stunt: identification of phytoplasmas, potential insect vectors and alternative hosts and epidemiology of the disease

Broccoli (*Brassica oleraceae* var. *italica*) is one of the most important vegetables in Brazil, whose trading volume in CEAGESP is approximately 13 000 tons per year. Recently, a new disease has caused significant losses in this crop cultivated in the largest producing region of the São Paulo State. The characteristic symptoms of the disease are expressed by plant stunting and necrosis of phloem vessels. Because these symptoms indicate the presence of phytoplasmas in cabbage and cauliflower crops, grown in the same geographical region, it was suspected that the same pathogens could be associated with the affected broccoli plants. Therefore, the total DNA from symptomatic plants of broccoli was analyzed by PCR with specific primers for the 16S rDNA of phytoplasmas. Through the techniques of RFLP and nucleotide sequencing of the same genomic region, the phytoplasmas were identified as belonging to the groups 16SrI, 16SrIII and 16SrXIII. Through RFLP analysis, phytoplasmas were also identified in several species of weeds and leafhoppers in the family Cicadellidae collected in adjacent areas of broccoli fields. Phytoplasmas belonging of the 16SrIII group were identified in the weeds belonging to the species *Ageratum conyzoides*, *Crotalaria lanceolata*, *Lepidium virginicum*, *Nicandra physalodes*, *Paucicourea marcgravii*, *Ricinus communis*, *Sida rhombifolia*, *Sonchus oleraceae*, *Bidens pilosa*, *Erigeron bonariensis*, *Emilia sonchifolia*, *Leonorus sibiricus*, while phytoplasmas of the 16SrVII group were found in the last four mentioned species. In respect to insects, phytoplasmas were detected in individuals from subfamilies Deltocephalinae, Agalliinae and Typhlocybae. Within the subfamily Deltocephalinae, the leafhopper *Balclutha hebe* carried phytoplasmas of the 16SrI group, while that of the species *Atanus nitidus*, *Planicephalus flavicosta* e *Schapytopius fuliginosus* harbored phytoplasmas of the 16SrIII group. In the tissues of two leafhoppers of the subfamily Agalliinae and one of the Typhlocybae, which were not identified as specie, were found phytoplasmas of the 16SrIII group. The epidemiological analysis revealed an aggregated pattern of the diseased plants and a higher progress of the disease in the border of the broccoli fields, which were located nearby areas where the presence of weeds was abundant.

Keywords: *Brassica oleraceae*; Phytoplasmas; Insect vectors; Alternative hosts; Epidemiology

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fitoplasmas no lúmen de células de floema, os quais estão atravessando a placa crivada (setas). Célula companheira (CC) e mitocôndria (m).....26
- Figura 2 - Plantas de brócolis (Couve brócolis híbrida Avenger - Sakata Seed Sudamérica) com sintomas de enfezamento, clorose, deformação da inflorescência e avermelhamento de folhas (A); corte transversal do caule de plantas sintomáticas apresentando necrose em vasos do floema (B).....32
- Figura 3 - Localização das parcelas referentes aos ensaios conduzidos em campos de cultivo de brócolis em Bragança Paulista, SP. E-1: ensaio 1 conduzido de 02/06/2009 a 01/08/2009; E-2: ensaio 2 conduzido de 10/06/2009 a 29/08/2009. D, E, F, G, H, I e J: parcelas pertencente ao ensaio 1; O, M e N: parcelas pertencente ao ensaio 2. O ensaio 1 foi conduzido em um campo localizado próximo a uma área de pastagem (Pta), a uma área de mata (Mta₁) e um campo de cultivo de mandioca (Mdi). O ensaio 2 foi conduzido em um campo localizado próximo a uma área recém arada e gradeada e, portanto, sem vegetação (Ave) e de uma pequena área de mata (Mta₂).....43
- Figura 4- Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrI detectados nas amostras de brócolis B1, B3 e B4, com o uso das enzimas *HpaII*, *HhaI*, *KpnI*, *AluI*, *RsaI*, *MboI*, *HaeIII*, *MseI*; MBS representa o DNA do fitoplasma de referência pertencente ao grupo 16SrI-B; M: marcador molecular ØX174-*HaeIII*.....50
- Figura 5 – Padrões de RFLP obtidos a partir do DNA de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII presente nas amostras B19 e B21, utilizando as enzimas *AluI*, *BstUI*, *HhaI*, *HinfI*, *KpnI*, *MseI*, *RsaI*; ChWB representa o perfil do fitoplasma representante do grupo 16SrIII-J; MaD representa o perfil de fitoplasma pertencente ao grupo 16SrIII-B; M: marcador molecular ØX174-*HaeIII*.....51
- Figura 6 – Padrões de RFLP obtidos a partir do DNA de fitoplasmas do grupo 16SrIII presente nas amostras de brócolis B73 e B76 com as enzimas *HhaI*, *TaqI*, *KpnI*, *AluI*, *BstUI* e *RsaI*. ChWB: representa o perfil do fitoplasma representante do grupo 16SrIII-J;

MaD: representa o fitoplasma pertencente ao grupo 16SrIII-B; M: marcador molecular ØX174- *Hae*III.....52

Figura 7 – Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA de fitoplasmas do grupo 16SrXIII presentes nas amostras de brócolis B22, B27 e B33 com as enzimas *Hpa*II, *Kpn*I, *Mse*I, *Rsa*I, *Alu*II, *Bst*UI, *Hae*III, *Hha*I; PACN representa o fitoplasma pertencente ao grupo 16SrXIII; M: marcador molecular ØX174-*Hae*III.....53

Figura 8 – Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do fitoplasma da amostra B3 de brócolis e do fitoplasma representante do grupo 16SrI-B (MBS), pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III.....54

Figura 9 – Padrões restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do fitoplasma das amostras B21, B73 e B76 e dos fitoplasmas representantes dos subgrupos 16SrIII-B (CYE) e 16SrIII-J (ChWB), pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III.....55

Figura 10 – Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do fitoplasma da amostra B22 e dos fitoplasmas representantes dos subgrupos 16SrXIII-B (STRAW 1) e 16SrIII-C (CbY1), pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III.....56

Figura 11 – Árvore filogenética baseada nas seqüências da região 16Sr dos fitoplasmas identificados em plantas de brócolis (setas) e seqüências adicionais de fitoplasmas representantes dos subgrupos pertencentes aos grupos 16SrI, III e XIII.....60

Figura 12 – Plantas daninhas sintomáticas coletadas em área de produção de brócolis: A- *L. sibiricus*; B- *E.bonariensis*; C- *Agetarum conyzoides* ; D- *N. physalode* (filodia); E- *N. physalodes* (folhas pequenas) ; F- *E. sonchifolia* (F) *B. pilosa* (G).....62

Figura 13 – Plantas daninhas sintomáticas coletadas em área de produção de brócolis. *S. oleraceae* (H); *L. virginicum* (I); *Crotalaria lanceolata* (J); *Sida rhombifolia* (K); *P. marcgravii* (L); *R. communis* (M).....63

- Figura 14 – Identificação do fitoplasma pertencente ao grupo 16SrVII-B presente em plantas daninhas coletadas nas proximidades de campos cultivados com brócolis. Coluna 4:- amostra de *L. sibiricus*; Colunas 7 e 17: amostras de *E. bonariensis*; Colunas 8 e 11: amostras de *E. sonchifolia*; Coluna 252: amostra de *B. pilosa*; M: marcador molecular phiX174.....64
- Figura 15 – Identificação de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII presente em plantas daninhas com o uso das enzimas *HhaI*, *RsaI*, *KpnII*, *AluI*, *BstUI*, *HinfI*, *MseI*, *TaqI*. Coluna 80: fitoplasma do subgrupo 16SrIII-J; Coluna 139: fitoplasma do subgrupo 16SrIII-E; Coluna 171: fitoplasma idêntico a B73 e B76; Coluna 209: representante do *Atanus* phytoplasma (AtaPh); MaD e ChWB: perfil de fitoplasma pertencentes aos subgrupos 16SrIII-B (declínio do cinamomo) e 16SrIII-J (enfezamento do chuchu), M: marcador molecular phiX174.....66
- Figura 16 – Insetos sugadores de floema da família Cicadellidae capturados em área de produção de brócolis. **Subfamília Typhlocybinae**: morfotipos T1(A); e T14(B); *Protalebrella brasiliensis* (C). **Subfamília Deltocephalinae**: *Atanus nitidus* (D); *Atanus* sp. T9 (E); *Atanus* sp. T28 (F) *Chlorotettix minimus* (G); *Exitianus obscurinervis* (H); *Balclutha hebe* (I); *Dalbulus maidis* (J) *Planicephalus flavicosta* (K); *Urenus colonus* (L); *Scaphytopius fuliginosus* (M); *Osbornellus infuscatus* (N). **Subfamília Agalliinae**: morfotipos T2 (O); T4 (P); T19 (Q); T24 (R); e T30 (S).....70
- Figura 17 – Padrões de RFLP dos fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII detectados em seis Cicadélídeos, com o uso das enzimas *AluI*, *BstUI*, *HhaI*, *HinfI*, *MseI*, e *RsaI*. A: fitoplasma identificado em *Planicephalus flavicosta* com padrão de RFLP coletivo idêntico àquele do fitoplasma associado ao declínio do cinamomo (subgrupo 16SrIII-B); B: fitoplasma identificado em *Atanus nitidus* com padrão de RFLP coletivo que designa o fitoplasma do *Atanus* (AtaPh); C e D: fitoplasmas identificados nos morfotipos T2 e T3, respectivamente, com padrão de RFLP idêntico ao do AtaPh; E: fitoplasma identificado no morfotipo T1 com padrão de RFLP idêntico ao dos fitoplasmas identificados em plantas de brócolis (B73 e B76); F: padrão de RFLP identificado na espécie *Scaphytopius fuliginosus*; M: marcador molecular phiX174-*HaeIII*.....76

Figura 18 – Curvas de progresso da doença nas parcelas E, F, G, H, I e J do ensaio 1 (02/06/2009 a 01/08/2009) conduzido em campo de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP.....	81
Figura 19 – Curvas de progresso da doença nas parcelas M, N e O do ensaio 2 (10/06/2009 a 29/08/2009) conduzido em campo de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP.....	82
Figura 20 – Mapas de distribuição espacial de plantas de brócolis doentes observadas na ultima avaliação nas parcelas D, E, I, J, F, G e H do ensaio 1 (02/06/2009 a 01/08/2009) conduzido em campo de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP.....	83
Figura 21 - Mapas de distribuição espacial de plantas de brócolis doentes observadas na ultima avaliação nas parcelas M, N e O do ensaio 2 (10/06/2009 a 29/08/2009) conduzido em campo de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP.....	83
Figura 22 – Aplicação da lei de Taylor modificada. Relação entre $\log(V_{obs})$ e $\log(V_{bin})$ para os <i>quadrats</i> 2x2, 3x3, 4x4 e 5x5 em ensaios conduzidos em campos de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP.....	87
Figura 23 – Área isópatas referentes a ultima avaliação nas parcelas D, E, I, J, F, G e H do ensaio 1 (02/06/2009 a 01/08/2009) conduzido em campo de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP.....	89
Figura 25 – Áreas isópatas referentes a ultima avaliação nas parcelas M, N e O do ensaio 2 (11/06/2009 a 24/08/2009) conduzido em campo de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fitoplasmas representantes dos subgrupos incluídos dentro dos grupos 16SrI, III e XIII, utilizados para a construção da árvore filogenética.....	39
Tabela 2 - Detecção e identificação de fitoplasmas em plantas sintomáticas de brócolis amostradas em campos comerciais em diferentes épocas e locais, pelo uso de duplo PCR.....	48
Tabela 3 - Detecção e identificação de fitoplasmas em espécies daninhas sintomáticas, coletadas nas proximidades de campos de brócolis, localizados em Bragança Paulista, no período de julho de 2009 a março de 2010.....	61
Tabela 4 – Relação dos diferentes fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII e as espécies de plantas daninhas hospedeiras destes fitoplasmas.....	67
Tabela 5 – Identificação de cigarrinhas capturadas em áreas de cultivo de brócolis, localizadas na cidade de Bragança Paulista, ano de 2009.....	69
Tabela 6 – Quantidade de insetos capturados em diferentes locais adjacentes e dentro de campos de cultivo de brócolis durante o cultivo de inverno da hortaliça (02/06 a 29/08 de 2009) e percentagem de insetos coletados em cada local.....	71
Tabela 7 - Detecção de fitoplasmas em espécies e morfotipos de cigarrinhas coletadas em cultivos de brócolis e áreas adjacentes, em Bragança Paulista/SP, no ano de 2009.....	73
Tabela 8 – Incidência (%) e índice de dispersão (D) da doença para os <i>quadrats</i> 2x2, 3x3, 4x4 e 5x5 em ensaios conduzidos em campos de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP.....	85
Tabela 9 – Valores dos parâmetros <i>b</i> e log (A) da lei de Taylor modificada para os <i>quadrats</i> 2x2, 3x3, 4x4 e 5x5 em ensaios conduzidos em campos de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP.....	86
Tabela 10 – Parâmetros <i>b</i> e log (A) da lei de Taylor modificada e R^2 calculados para o <i>quadrat</i> 3x3 de doenças associadas à fitoplasmas em diferentes culturas.....	88

1 INTRODUÇÃO

O brócolis (*Brassica oleraceae* var. *italica*) é uma hortaliça pertencente à família das brássicas, cuja produção no país é estimada em 13 mil toneladas por ano, com demanda crescente (FNP, 2008). A cultura está sujeita a diversas doenças, no entanto, uma doença de etiologia até há pouco tempo ainda desconhecida se destaca na região de maior cultivo desta hortaliça no estado de São Paulo, em decorrência do aumento de sua incidência e das perdas relevantes que tem causado.

Essa doença, cujos sintomas principais são o enfezamento da planta e necrose dos vasos de floema, também tem sido observada em campos de cultivo de repolho (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) e couve-flor (*Brassica oleraceae* var. *botrytis*) localizados na mesma região geográfica (MELLO, 2007; RAPUSSI-DA-SILVA, 2010).

A doença foi primeiramente estudada em plantas de repolho pelo professor Hiroshi Kimati do Departamento de Fitopatologia da ESALQ. Na ocasião, exaustivas tentativas de isolamento de fungos e bactérias foram realizadas, todas sem sucesso, assim como foi improdutiva a busca por partículas virais através de microscopia eletrônica. O insucesso inicial na detecção do possível agente causal da doença, aliado às observações de campo e da sintomatologia da doença, levantou a suspeita de que esta doença poderia estar associada aos fitoplasmas. Investigações conduzidas visando confirmar esta suspeita revelaram que os fitoplasmas estavam constantemente associados com plantas de repolho que apresentavam sintomas típicos da doença (MELLO, 2007). Pouco tempo depois, fitoplasmas também foram encontrados em plantas de couve-flor e de brócolis exibindo sintomas semelhantes àqueles observados em repolho (RAPUSSI; BEDENDO, 2008; ECKSTEIN et al., 2008).

Na cultura do brócolis, a doença foi observada pela primeira vez por profissionais da empresa Sakata Seed Sudamerica em 2007, no município de Bragança Paulista, SP. Algumas plantas sintomáticas foram enviadas para o Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos da ESALQ, onde foi constatada a associação entre plantas doentes e presença de fitoplasmas nos seus tecidos.

Nos trabalhos realizados com repolho e couve flor, foram identificados fitoplasmas distintos associados à doença. Além disso, a análise da distribuição da doença no campo revelou que o padrão de dispersão da doença variava de ao acaso a agregado (MELLO, 2007; RAPUSSI-DA-SILVA, 2010). Este último caso era mais comum quando a incidência da doença era maior, o

que geralmente ocorria nos campos localizados próximos das áreas de mata, apontando que a fonte de inóculo do patógeno e/ou de possíveis vetores estaria nestes locais. Outra observação que foi feita nestes trabalhos é que os insetos do tipo cigarrinha, prováveis vetores do patógeno, eram mais abundantes nas áreas de mata do que nas culturas. Particularmente no estudo da doença em plantas de couve-flor, fitoplasmas foram detectados em cigarrinhas das espécies *Exitianus obscurinervis* e *Balclutha hebe*, amostrados na área em que a doença ocorria. Além disso, a última espécie referida foi capaz de transmitir fitoplasmas para plantas de couve-flor, em ensaios conduzidos em casa de vegetação.

Embora a doença na cultura do brócolis também esteja associada a fitoplasmas, não existem informações na literatura se estes são os mesmos que afetam as outras duas culturas, assim como nada se sabe sobre a epidemiologia, insetos vetores ou plantas hospedeiras alternativas para os fitoplasmas que afetam esta cultura. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos identificar os fitoplasmas associados ao enfezamento do brócolis e os potenciais vetores e hospedeiros alternativos do patógeno, além de analisar a distribuição espacial e temporal da doença no campo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Fitoplasmas

Fitoplasmas são bactérias fitopatogênicas que estão associados a mais de 700 doenças de plantas relatadas em todo o mundo (BERTACCINI, 2007). Estes procariotos pertencem à classe Mollicutes, a qual engloba bactérias pleomórficas, envoltas por uma única membrana, as quais divergiram de um ancestral gram positivo, possivelmente *Clostridium* ou *Lactobacillus* spp., através da redução do genoma e perda da parede celular (WEISBURG et al., 1989). São bactérias cujo tamanho varia de 200 a 800nm (BERTACCINI, 2007), que perderam muitas rotas metabólicas, como aquelas para a síntese de ATP, aminoácidos e até nucleotídeos (BAI et al., 2006; OSHIMA et al., 2004), os quais passaram a ser obtidos diretamente dos seus hospedeiros. Essa grande dependência por metabólicos tem implicações no seu cultivo em meio artificial, o qual ainda não se tornou possível até o momento.

Nas plantas, os fitoplasmas são encontrados principalmente nas células do floema, nas quais se multiplicam, colonizando os vasos pela passagem de uma célula a outra, através das placas crivadas (Figura 1) (DAVIS, 1995; HOGENHOUT et al., 2008). Os fitoplasmas normalmente interferem de forma negativa no desenvolvimento de suas plantas hospedeiras, sendo esta interferência expressa na forma dos mais variados tipos de sintomas, como clorose generalizada, declínio de plantas, superbrotamento de ramos, deformação de folhas e órgão florais, enfezamento, avermelhamento de folhas, necrose de vasos do floema, filodia e virescência. (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000; HOGENHOUT et al., 2008). Esses sintomas são expressos após um período de incubação, no qual ocorre a multiplicação e translocação do fitoplasma dentro da planta (DOUGLAS, 1986). Por esta razão é comum encontrar na literatura relatos da detecção de fitoplasmas em plantas assintomáticas (GUTHRIE et al., 1998; LEE et al., 2003; RAPUSSI-DA-SILVA, 2010; DOUGLAS, 1986).

Figura 1 - Fitoplasmas no lúmen de células de floema, e atravessando a placa crivada (setas). Célula companheira (CC) e mitocôndria (m). Fonte: Mello, 2003

2.1.2 Insetos vetores de fitoplasmas

Fitoplasmas podem ser transmitidos por material propagativo infectado, por enxertia, pela planta parasita *Cuscuta* sp., e, principalmente, por insetos vetores (DAVIS, 1995). Pelo fato de serem confinados ao floema das plantas, somente insetos sugadores que se alimentam neste tecido têm potencial para transmitir este patógeno. No entanto, dentro do grupo de sugadores do floema, somente um pequeno número de representantes, reunidos principalmente em três grupos taxonômicos, são confirmados como vetores de fitoplasmas. Na subordem Auchenorrhyncha, a superfamília que contém o maior número de vetores é a Membracoidea, dentro da qual todos os vetores estão confinados na família Cicadellidae. O segundo maior grupo de vetores é representado pelos insetos da infraordem Fulgoromorpha, na qual são encontradas quatro famílias de espécies de vetores. O menor grupo é o da subordem Sternorrhyncha, o qual reúne somente dois gêneros classificados na família Psyllidae (WEINTRAUB; BEANLAND, 2005).

Para uma cigarrinha se tornar um vetor, os fitoplasmas devem ser adquiridos durante a alimentação em plantas infectadas, os quais, uma vez no interior dos insetos, precisam atravessar as células do trato digestivo, replicar-se em vários órgãos do inseto, atravessar as glândulas

salivares e, por fim, alcançar a saliva para serem subseqüentemente introduzidos em outras plantas (HOGENHOUT et al., 2008). Embora os fitoplasmas consigam invadir e se multiplicar em vários órgãos dos seus vetores, não colonizam os órgãos reprodutores da maioria deles e, por isso, a maior parte dos vetores não apresentam transmissão transovariana. Entre as poucas exceções está a cigarrinha *Hishimonoides sellatiformis*, na qual a presença de fitoplasmas foi detectada em órgãos reprodutores e seus ovos. Neste trabalho, os autores discutem que a transmissão transovariana ocorreu para esta espécie e que esse fenômeno só foi possível devido a um período de co-evolução do fitoplasma com a espécie de cigarrinha (KAWAKITA et al., 2000).

As cigarrinhas não são capazes de transmitir os fitoplasmas logo após a sua aquisição nas plantas e o período compreendido entre o tempo para a aquisição inicial do patógeno e sua introdução em outra planta, o chamado período latente (PL), pode variar entre as espécies vetoras (HOGENHOUT, 2008). O PL pode ser relativamente curto como 16 a 20 dias para o fitoplasma do crisântemo transmitido pelas cigarrinhas *Macrostele quadripunctulatus* e *Euscelidius variegatus* (PALERMO; ARZONE; BOSCO, 2001) ou muito longo, de até 8 meses, conforme descrito por Thébaud et al., (2009), para o psílideo *Cacopsylla pruni*, o qual apresenta alta taxa de transmissão somente após adquirir fitoplasmas na fase imatura em espécies de *Prunus* sp. e passar os meses de inverno em coníferas.

No que diz respeito à relação entre insetos e fitoplasmas, existem casos tanto de baixa como de alta especificidade, onde algumas espécies de cigarrinhas transmitem uma ampla gama de fitoplasmas, enquanto outras disseminam preferencialmente um determinado fitoplasma. Como exemplos podem ser citados os fitoplasmas do grupo 16SrI, os quais podem ser transmitidos por pelo menos 35 diferentes cigarrinhas para mais de 200 espécies de plantas (LEE et al., 2004), e o fitoplasma agente da flavescência dourada da videira é predominantemente transmitido pelo Cicadelídeo *Scaphoideus titanus* e a principal planta hospedeira também é a videira (EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION - EPPO, 2010).

Embora centenas de doenças causadas por fitoplasmas sejam conhecidas, as informações sobre os vetores da maioria delas são bastante escassas (LEE et al., 2000; WEINTRAUB; WILSON, 2009). Isto se deve, provavelmente, a maior dificuldade para identificar os insetos vetores do que as plantas hospedeiras.

A identificação de insetos vetores de fitoplasmas envolve várias etapas. A primeira é determinar, através de monitoramento ao longo do ano, quais são os insetos presentes nas proximidades das plantas doentes e a população dos mesmos (WEINTRAUB; BEANLAND, 2005). A partir deste levantamento é possível fazer buscas na literatura visando eliminar do estudo os insetos que não se encaixam como vetores de fitoplasmas, e, além disso, é possível saber se alguma espécie encontrada na área já foi relatada como vetor. Testes moleculares como PCR são muito utilizados para identificar possíveis vetores (BEANLAND; WOLF, 2010), no entanto, são os experimentos de transmissão que poderão demonstrar definitivamente a capacidade de uma espécie de inseto atuar como vetor de fitoplasmas. Isto ocorre porque a infectividade do inseto devido à presença do procarioto no seu corpo não comprova a sua capacidade de transmiti-lo, pois para que possa ser inoculado, o fitoplasma deve ultrapassar algumas barreiras no interior do inseto, alcançar e se acumular nas glândulas salivares (WEINTRAUB; BEANLAND, 2005; MAIXNER, 2009), como descrito anteriormente.

2.1.3 Detecção e classificação de fitoplasmas

Por não serem cultivados *in vitro*, sua detecção é realizada por microscopia eletrônica de transmissão ou varredura (KITAJIMA, 1994; LEBSKY; POGHOSYAN, 2007) e, principalmente, por métodos moleculares, os quais também permitem a sua classificação. A técnica de PCR, usando *primers* universais ou específicos derivados da sequência conservada do gene 16S rDNA fornece um meio sensível para a detecção de fitoplasmas. Através da análise de RFLP do gene 16S rDNA amplificado por PCR, os fitoplasmas podem ser diferenciados e classificados em grupos e subgrupos (LEE et al., 1998). Este esquema de classificação tem fornecido bases moleculares confiáveis para a identificação e classificação de uma ampla gama de fitoplasmas (ZHAO et al., 2009). Recentemente, o desenvolvimento e aplicação de programas computacionais para a análise virtual de RFLP, a partir do sequenciamento da região 16S rDNA, têm contribuído para a expansão deste esquema de classificação (WEI et al., 2007, 2008; ZHAO et al., 2009). A informação contida na sequência do gene 16S rDNA também tem servido como base para a classificação dos fitoplasmas em espécies putativas, referidas como espécies candidatas: ‘*Candidatus* Phytoplasma’ (IRPCM PHYTOPLASMA/SPIROPLASMA WORKING TEAM – PHYTOPLASMA TAXONOMY GROUP, 2004). Basicamente, um fitoplasma pode ser descrito como uma nova espécie do gênero “*Ca. Phytoplasma*” se a sequência do seu gene

16S rRNA tiver similaridade menor que 97.5% com a sequência de qualquer outra espécie ‘*Ca. Phytoplasma*’ descrita.

Até o momento, 29 grupos e mais de 50 subgrupos foram delineados com base na análise de RFLP a partir de fragmentos amplificados por PCR ou a partir da análise virtual (LEE et al., 1998; MONTANO et al., 2000, 2001; JOMANTIENE et al., 2002; BARROS et al., 2002 LEE et al., 2004; AROCHA et al., 2005; WEI et al., 2007, 2008; ZHAO et al., 2009) e 26 espécies de ‘*Candidatus Phytoplasma*’ foram descritas (ARROCHA et al., 2005; DAVIS et al., 1997; GRIFFITHS et al., 1999; HIRUKI; WANG, 2004; IRPCM, 2004; JUNG et al., 2002, 2003a, 2003b; LEE et al., 2004a, 2004b; MARCONE et al., 2004a, 2004b; MONTANO et al., 2001; SAWAYANAGI et al., 1999; SCHNEIDER et al., 2005; VALIUNAS et al., 2006; VERDIN et al., 2003; ZREIK et al., 1995).

2.1.4 Epidemiologia de doenças associadas aos fitoplasmas

2.1.4.1 Interação planta-patógeno-vetores

A epidemiologia de doenças causadas por fitoplasmas envolve uma relação tritrófica entre o patógeno e normalmente vários hospedeiros e vetores, todos influenciados por condições ambientais (OLIVIER et al., 2009). Segundo Weintraub (2007) a interação vetor *versus* hospedeiro tem um papel importante na limitação ou expansão da disseminação de fitoplasmas, sendo que na maioria dos casos a gama de espécies hospedeiras de fitoplasmas depende da gama de espécies vegetais na qual o inseto se alimenta (HOGENHOUT et al., 2008), além da suscetibilidade de cada espécie botânica ao agente de doença (WEINTRAUB, 2007).

Segundo Maixner (2009) muitos fitoplasmas são mantidos por ciclos naturais da doença, que incluem somente plantas daninhas; no entanto, se plantas cultivadas são introduzidas no mesmo ambiente, a alimentação nestas plantas pelos vetores pode resultar no surgimento de novas doenças de importância econômica. Ainda, a preferência da espécie vetora decidirá se a nova doença será disseminada independentemente do sistema epidemiológico original ou se dependerá constantemente de fontes naturais de inóculo.

A disseminação dependente de fontes de inóculo externas pode ocorrer quando a cultura introduzida em uma área não é a preferencial do inseto vetor, o qual se alimenta em uma planta da cultura e às vezes em algumas plantas adjacentes, coloniza a cultura, deixando o local

(BEANLAND; NOBLE; WOLF, 2006). Outro caso em que a disseminação depende de fontes externas é quando a cultura é hospedeira final de fitoplasmas, e as plantas, portanto, são incapazes de servir como fonte de inóculo (MAIXNER, 2009; BOSCO; D'AMELIO, 2009). O amarelo da videira, presente no Canadá (BEANLAND; NOBLE; WOLF, 2006) e na Espanha (BATTLE et al., 2000) se constitui num bom exemplo de doença causada por fitoplasmas que aparentemente depende de fontes externas de inóculo.

A disseminação independente a partir da fonte de inóculo externa tem sido sugerida para a doença Flavescência dourada (FD) em videiras. Para este patossistema existe a hipótese de que os fitoplasmas são introduzidos nas videiras pela cigarrinha *Oncopsis alni* (Schrank), a partir de plantas de *Alnus glutinosa* que servem como fonte de inóculo, e, uma vez dentro do cultivo o fitoplasma é transmitido eficientemente para outras videiras pelo vetor *Scaphoideus titanus* (ANGELINI et al., 2001; ARNAUD et al., 2007).

2.1.4.2 Distribuição espacial e temporal de doenças associadas à fitoplasmas

O estudo do padrão espacial e temporal das doenças associadas aos fitoplasmas tem sido usado para aumentar o entendimento sobre as propriedades biológicas e ecológicas destas doenças e gerar informações que permitam a adoção de um manejo adequado para as mesmas (CONSTABLE, 2009).

O estudo da curva de progresso da doença, usualmente expressa pela plotagem da proporção de doença em relação ao tempo, é a melhor representação de uma epidemia. Através deste tipo de curva, podem ser caracterizadas as interações entre patógenos, hospedeiros e ambiente (BERGAMIN FILHO, 1995). Esse tipo de análise permitiu a inferência do período de incubação de fitoplasmas em videira, ou seja, o período de tempo entre a introdução do fitoplasma na planta até a expressão de sintomas (BEANLAND; NOBLE; WOLF, 2006), assim como permitiu verificar a época do ano na qual os sintomas de infecção por fitoplasmas são expressos por plantas de pêssago infectadas (DOUGLAS, 1986). A análise temporal também pode auxiliar na identificação de vetores de fitoplasmas, uma vez que os picos de ocorrência de determinada espécie de cigarrinha podem anteceder ao aumento da incidência de uma doença transmitida pela mesma. (GOODWIN et al., 1999; PILKINGTON, 2003).

Segundo Taylor (1961) o arranjo espacial é uma das propriedades mais características das espécies, em se tratando de doenças de plantas. O arranjo espacial fornece subsídios para

compreender a etiologia, verificar a eficiência de dispersão e gerar informações sobre a influência de fatores culturais, biológicos e do ambiente na dinâmica populacional de patógenos e/ou doenças (VIDAL et al., 2004). No caso específico de doenças causadas por fitoplasmas em brássicas, esta análise demonstrou que as doenças conhecidas por enfezamento do repolho (MELLO, 2007) e da couve-flor (RAPUSSI-DA-SILVA, 2010) não são disseminadas de uma planta para outra em uma mesma linha de plantio, como comumente ocorre na disseminação de patógenos no solo, ou por mudas contaminadas. Isto foi demonstrado devido à distribuição de plantas doentes ter variado desde o padrão ao acaso até o padrão agregado. Outra interpretação que análise espacial das plantas doentes permitiu foi de que a possível fonte de inóculo é externa, uma vez que as maiores incidências ocorriam nas áreas próximas de mata. Esse padrão de distribuição observado para as referidas brássicas foi relatado para outras doenças causadas por fitoplasmas e transmitidas por vetores (BEANLAND; MADDEN, 2005; BEANLAND; NOBLE; WOLF, 2006). Com relação à obtenção de informações sobre vetores de fitoplasmas, a análise espacial pode gerar pistas sobre o comportamento e a fonte de insetos vetores (WEINTRAUB; BEANLAND, 2005; BATTLE; MARTÍNEZ; LAVIÑA, 2000).

2.1.5 Doenças associadas à fitoplasmas em brássicas

A ocorrência de fitoplasmas em brássicas foi primeiramente relatada na Itália, os quais foram detectados em plantas de brócolis e couve-flor, através de microscopia eletrônica, no início da década de oitenta (BERTACCINI; PISI; MARANI, 1983). Atualmente, distintos fitoplasmas têm sido relatados em diversas brássicas, como nabo, repolho, couve-flor e brócolis em diferentes regiões do mundo. Como exemplos, um fitoplasma do grupo 16SrI foi identificado em plantas de brócolis na Itália (RAGOZZINO, 1995) e na Sérvia (DUDUK al., 2007) e em plantas de repolho nos Estados Unidos (LEE et al., 2003). Fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrVI foram encontrados em plantas doentes de repolho no Irã (SALEHI et al., 2007). Particularmente para brássicas cultivadas na região do cinturão verde da cidade de São Paulo, existe um histórico em relação à associação de fitoplasmas com espécies desta família botânica. Assim, fitoplasmas do grupo 16SrI, subgrupo B e do grupo 16SrIII foram identificados em associação com uma doença denominada de enfezamento, observada em plantas de repolho (MELLO, 2007) e em cultivos de couve-flor, fitoplasmas dos grupos 16SrIII e 16SrXIII foram encontrados em plantas que exibiam

sintomas de enfezamento (RAPUSSI-DA-SILVA, 2010). Em ambos os casos, altos níveis de incidência têm sido constatados em áreas de cultivo comercial, causando perdas significativas em alguns campos e a inviabilidade de cultivo das hortaliças em outros.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material vegetal analisado

2.2.1.1 Amostras de plantas de brócolis

As plantas de brócolis analisadas apresentavam sintomas de enfezamento e necrose de vasos do floema. Além disto, algumas plantas ainda exibiam sintomas de deformação da inflorescência, proliferação de ramos laterais e/ou avermelhamento das folhas (Figura 2). As plantas sintomáticas foram amostradas entre os meses de dezembro de 2007 e setembro de 2009, em campos de produção comercial de brócolis localizados nas cidades de Bragança Paulista (41 amostras), Morungaba (7 amostras), Sorocaba (4 amostras) e Iperó (10 amostras), todas no Estado de São Paulo. Plantas assintomáticas foram coletadas no final do ciclo da cultura em Bragança Paulista no ano de 2009. As plantas de brócolis amostradas em Bragança Paulista em 2007 e em Morungaba foram coletadas pela Dra. Kátia Regiane Brunelli, pesquisadora da Sakata Seed Sudamerica e enviadas ao Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos do Departamento de Fitopatologia e Entomologia da ESALQ.

Figura 2 - Plantas de brócolis (Couve brócolis híbrida Avenger) com sintomas de enfezamento, clorose, deformação da inflorescência e avermelhamento de folhas (A); corte transversal do caule de plantas sintomáticas apresentando necrose em vasos do floema (B)

2.2.1.2 Amostras de plantas daninhas

Plantas daninhas pertencentes às espécies *Ageratum conyzoides* (nome comum Mentrasto) (família Asteraceae); *Amaranthus* sp. (Caruru) (Amaranthaceae); *Bidens pilosa* (Picão-preto) (Asteraceae); *Crotalaria lanceolata* (Crotalária) (Leguminosae); *Emilia sonchifolia* (Falsa serralha) (Asteraceae); *Erigeron bonariensis* (Buva) (Asteraceae); *Ipomoea purpúrea* (Corda-de-violão) (Convolvulaceae); *Leonurus sibiricus* (Rubim) (Lamiaceae); *Lepidium virginicum* (Mentruz) (Brassicaceae); *Nicandra physalodes* (Juá-de-capote) (Solanaceae), *Paulicourea marcgravii* (Erva-de-rato) (Rubiaceae), *Ricinus communis* (Mamona) (Euforbiaceae), *Sida rhombifolia* (Guanxuma) (Malvaceae) e *Sonchus oleraceae* (Serralha amarela) (Asteraceae) foram coletadas nas proximidades do campo de produção de brócolis, em Bragança Paulista entre os meses de julho de 2009 e março de 2010.

2.2.2 Extração de DNA total

2.2.2.1 Extração de DNA total de amostras de plantas de brócolis

A extração do DNA total das amostras de plantas de brócolis foi realizada com o uso do *kit* de extração de DNA de plantas DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Partes de inflorescência e pecíolos foram utilizados para a extração. O material vegetal fresco ou congelado a -20°C (aproximadamente 1g) foram maceradas em 600µL do tampão denominado AP1. O macerado foi transferido para um tubo de 1,5mL. A este tubo foram adicionados 4 µL de RNase e a mistura foi incubada a 65°C por 30 minutos, em banho-maria. Após este período, adicionou-se 150 µL do reagente AP2 e a mistura foi incubada sob a temperatura de -20°C por 5 minutos. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 20.800g por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL ao qual foi adicionado 1,5 vezes o volume recuperado do reagente denominado AP3. Um volume de 650 µL da mistura foi colocado em uma coluna de filtração e submetido à centrifugação a aproximadamente 6.800g por 1 minuto. O filtrado recolhido no tubo coletor foi descartado e o restante da mistura foi submetido a um novo processo de centrifugação, nas mesmas condições acima especificadas. A coluna foi transferida para outro tubo de 1,5mL, sendo a ela acrescentados 500 µL de uma solução de lavagem, denominada AW. Nova centrifugação foi feita a 6.800g por 1 minuto, sendo descartado o produto de lavagem. Após a lavagem, foram adicionados 100 µL do

reagente denominado AE para a eluição do DNA, sendo processada a centrifugação a 6.800g por 5 minutos, após a qual obteve-se o DNA, o qual foi mantido a -20°C.

2.2.2.2 Extração de DNA total de amostras de plantas daninhas

A metodologia de extração utilizada seguiu o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1987). Aproximadamente 2g do material fresco, constituído de folhas novas e hastes, foram maceradas em almofariz contendo nitrogênio líquido até a homogeneização do material. Em seguida, o macerado foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL de capacidade, aos quais foram adicionados 800 µL do tampão de extração CTAB 2X a 60 °C. Após a homogeneização, o material foi incubado a 60 °C, por 60-90 minutos, sendo agitado a cada 15 minutos, em vortex. Após este período, adicionou-se 600 µL de CIA (24 partes de clorofórmio e uma parte de álcool isoamílico). A mistura foi agitada por aproximadamente 1 minuto em vortex, ou até a formação de uma emulsão de aparência leitosa. Em seguida, centrifugou-se a mistura por 10 minutos à 20.800g. Os tubos foram retirados cuidadosamente da centrífuga, evitando-se perturbar a interface. Com o auxílio de uma pipeta, o sobrenadante foi transferido para tubos novos, aos quais adicionou-se 1,5 vezes do volume contido no tubo de isopropanol gelado. Em seguida, os tubos foram invertidos até a completa homogeneização das soluções e colocados por duas horas, no mínimo, sob a temperatura de -20 °C para a precipitação do ácido nucléico presente na amostra. Nova centrifugação foi realizada por 10 minutos à velocidade de 20.800g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi lavado pela adição de 1 ml de etanol na concentração de 80%. O álcool foi removido do tubo após 5-10 min. Esta operação foi realizada duas vezes. Ao precipitado foram adicionados 500 µL de uma solução de cloreto de sódio (NaCl) 1M , e, após dissolver o precipitado, a suspensão foi mantida por 40-60 minutos a 4 °C. Nova centrifugação foi realizada por 10 minutos à velocidade de 20.800g. O sobrenadante foi recuperado para um novo tubo e o precipitado foi descartado. Ao sobrenadante foram adicionados 350µL de isopropanol gelado. Após a homogeneização do conteúdo dos tubos, o material foi mantido por 1-2 h a -20 °C. Em seguida, foi processada uma centrifugação à 20.800g 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado, conforme descrito anteriormente, por duas vezes. O precipitado foi deixado à temperatura ambiente para secar e, em

seguida, ressuspensionado em 50µL de água deionizada autoclavada. O produto de extração foi mantido a -20 °C para uso nas reações de PCR.

2.2.3 Detecção e identificação de fitoplasmas por PCR

Para a detecção dos fitoplasmas presentes nas amostras de brócolis e plantas daninhas, o DNA total extraído foi utilizado em reações de duplo PCR com o emprego dos *primers* P1/Tint (DENG; HIRUKI, 1991; SMART et al., 1996) e 16F2n/16R2 (F2n/R2) (GUNDERSEN; LEE, 1996). Estes *primers* são universais para fitoplasmas e amplificam a região correspondente ao 16S rRNA destes procariotos. Cada reação de PCR foi processada com um volume de 19 µL de água destilada deionizada; 0,5 µL de cada *primer* (solução 20 pmol.µL⁻¹); 2 µL de solução de deoxinucleotídeo trifosfato (solução 2,5 mM de cada nucleotídeo); 2,5 µL de tampão de PCR (10X); 0,12 µL de Amplitaq 5 U.µL⁻¹ e 1 µL de DNA total extraído da planta, perfazendo um volume final de 25 µL, segundo o protocolo de Lee et al. (1998). Os produtos da reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% ,corado com Syber safe (Invitrogen). As ampliações foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta.

As amostras de brócolis também foram submetidas à reação de PCR com o emprego de *primers* específicos para identificação de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrXIII. Para isto, os produtos amplificados com o par de *primers* P1/Tint foram submetidos a uma nova reação usando-se os pares de *primers*: R16(I)F1/R16(I)R1 e R16(III)F2/R16(III)R1 (LEE et al., 1994), os quais amplificam fragmentos de 1.100pb e 800pb, a partir do 16S rRNA, respectivamente. O par de *primers* fSTOL/rSTOL foi empregado para identificar fitoplasmas do grupo 16SrXIII, pois o mesmo amplifica um fragmento do 16S rRNA correspondente a 580pb (JOMANTIENE et al., 1998).

Como padrão positivo para as reações de detecção foi usado o DNA extraído de plantas sabidamente infectadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho do milho. No caso da identificação, foram usados como padrões os fitoplasmas do enfezamento do milho, do superbrotamento do chuchuzeiro e do vira-cabeça do mamoeiro como representantes dos grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrXIII, respectivamente. Plantas assintomáticas de brócolis foram utilizadas como padrões negativos, sendo que água foi empregada como controle de reação.

2.2.4 Identificação dos fitoplasmas por RFLP

Com o objetivo de confirmar os resultados obtidos com os *primers* específicos e buscar um refinamento quanto à identificação de fitoplasmas ao nível de subgrupo, os fragmentos genômicos da região 16S rRNA amplificados com o uso dos *primers* universais F2n/R2 foram submetidos à análise do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) através do uso de enzimas de restrição. Para isto, uma alíquota de 3-4 µL de cada produto da PCR, correspondente à amplificação de fragmentos genômicos dos fitoplasmas encontrados nas diferentes amostras, foi digerida, separadamente, por diferentes enzimas. Para os fitoplasmas inicialmente identificados por PCR como pertencentes ao grupo 16SrIII, foram utilizadas as enzimas *AluI*, *BstUI*, *HinfI*, *HhaI*, *KpnI*, *RsaI*, *MseI* e *TaqI*; para os fitoplasmas identificados como membros do grupo 16SrI, as enzimas de restrição utilizadas foram *AluI*, *HhaI*, *HpaII*, *HaeIII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI* e *RsaI*; e para aqueles representantes do grupo 16SrXIII, as digestões enzimáticas foram processadas com as endonucleases *AluI*, *BstUI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MseI*, *RsaI* e *TaqI*. O conjunto de enzima para cada grupo foi escolhido de acordo com a importância das enzimas para a diferenciação de subgrupos dentro de cada grupo específico. Os perfis eletroforéticos ou padrões de restrição encontrados para cada um dos fitoplasmas foi comparado com os perfis daqueles fitoplasmas pertencentes aos diversos grupos e subgrupos de fitoplasmas disponíveis na literatura (LEE et al., 1998, MONTANO et al., 2000, HARRISON; BOA; CARPIO, 2003, ZHAO et al., 2009).

2.2.5 Sequenciamento da região 16SrDNA do fitoplasma

Com a finalidade de determinar a similaridade genética existente entre os fitoplasmas encontrados nas plantas de brócolis e relacioná-los filogeneticamente entre si e com representantes de grupos e subgrupos diversos, foi conduzido o sequenciamento da região do gene 16S rRNA. Para isto, foram escolhidos os fitoplasmas presentes nas amostras de plantas de brócolis identificadas como B3, B21, B22, B73 e B76. Não foi realizado o sequenciamento dos fitoplasmas detectados nas amostras de plantas daninhas.

2.2.6 Clonagem

Os produtos de duplo PCR, amplificados com o uso de *primers* universais F2n/R2, foram clonados em *Escherichia coli* estirpe DH5 α . O processo de clonagem envolveu diversas etapas: purificação do fragmento de DNA do fitoplasma; inserção do DNA em um plasmídio (vetor); captura do vetor pela bactéria *E. coli*; multiplicação da bactéria contendo o plasmídeo; e, finalmente, a extração do DNA plasmidial inserido na bactéria para seu posterior seqüenciamento. A purificação do fragmento de DNA do fitoplasma foi feita com o *kit* PureLinkTM (Invitrogen), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. A concentração do DNA nas amostras foi estimada pela comparação do fragmento do marcador Lambda DNA com os fragmentos de DNA purificados das amostras. As amostras de DNA purificadas foram armazenadas a temperatura de -20 °C até o momento do uso. O fragmento de DNA do fitoplasma foi inserido no vetor pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega) utilizando-se o *kit* comercial que acompanha o vetor, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. O vetor contendo fragmento de DNA do fitoplasma inserido, denominado simplesmente como ligação, foi inserido em células competentes de *E. coli* através de um processo denominado de transformação. A transformação, realizada em células competentes de *E. coli*, estirpe DH5 α , preparadas conforme Hanahan (1983), foi realizada da forma descrita em seguida. Em um tubo de microcentrífuga, contendo 50 μ L de células competentes, adicionou-se 2-3 μ L da ligação e incubou-se a mistura por 30 minutos em gelo. Após este período, a mistura foi submetida a um choque térmico, por incubação a 42 °C por 50 segundo e, imediatamente, transferidas para o gelo, durante dois minutos. Em seguida, às células transformadas foram adicionados 450 μ L de meio de cultura Luria-Bertani (LB) (BERTANI, 1951; LURIA; BURROUS, 1957) pré-aquecido a 37 °C. Os tubos foram mantidos por 2-3 horas em agitador a velocidade de 200 rpm, a temperatura de 37 °C, para o crescimento das células transformadas. Após este período, uma alíquota de 100 μ L da suspensão de células transformadas foi transferida para placas de Petri contendo meio LB sólido acrescido de 20 μ L do antibiótico ampicilina (100 mg.mL⁻¹), 20 μ L de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosida) na concentração de 50 ng/mL e 20 μ L de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosida) na concentração de 50 mg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 12-14 h ou até o crescimento das colônias. Os produtos X-gal e IPTG permitem a avaliação da atividade da β -galactosidade das bactérias transformadas, possibilitando diferenciá-las das bactérias não transformadas, através da cor branca ou azul da colônia, respectivamente. Foram

selecionadas várias colônias transformadas, ou seja, vários clones de cada amostra. Estes clones selecionados foram transferidos, em câmara de fluxo, para tubos do tipo *Falcon*, contendo 20 mL de meio de cultura LB líquido, pelo toque de uma ponteira de 10 µL na colônia selecionada e sua posterior transferência para meio de cultura. A incubação foi feita a temperatura de 37 °C por 12 h, em agitador ajustado para a velocidade de 200 rpm, para crescimento da bactéria.

Para cada clone multiplicado, uma alíquota da suspensão bacteriana foi submetida à reação de PCR, conforme descrito anteriormente, utilizando-se o par de *primers* universais R16F2n/16R2 e à digestão com a enzima de restrição EcoRI para a confirmação da presença do fragmento genômico do fitoplasma nestes plasmídeos.

Após as etapas de transformação, clonagem e multiplicação, foi feita a extração do plasmídeo, que continha o fragmento de DNA do fitoplasma. A extração do plasmídeo de três clones de cada amostra foi realizada utilizando-se o *kit* comercial Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Um clone foi conservado em tubo de microcentrífuga (1,5 mL) contendo 500 µL da suspensão da bactéria clonada e 500 µL de glicerol (50%), tendo sido armazenado em congelador a -80 °C.

Os plasmídeos recombinantes foram seqüenciados pela empresa Macrogen (Seul, Coreia do Sul). As seqüências obtidas foram montadas em *contigs* após uma cobertura mínima de 2X para cada nucleotídeo com o auxílio dos programas Bio Edit V. 7.0.5.3 (HALL, 1999) e PhredPhrap V. Online (TOGAWA; BRIGIDO, 2006), e utilizadas nas análises conduzidas nas demais etapas do trabalho.

2.2.7 Análise virtual de RFLP

A análise de RFLP resultante da digestão enzimática do produto de PCR foi feita em laboratório com um conjunto de 8 enzimas de restrição. No entanto, a confirmação de que um fitoplasma pertence a determinado subgrupo é realizada utilizando-se 17 enzimas de restrição estabelecidas na literatura (LEE et al., 1998; WEI et al., 2007). Uma forma alternativa à análise de RFLP feita em laboratório, é a análise de RFLP simulada por computador (*in silico*), realizada a partir de fragmentos seqüenciados do 16S rDNA de fitoplasmas, com o auxílio do programa pDRAW32 V. 1.0 (AcaClone Software). (AcaClone Software). No presente estudo, este tipo de análise foi desenvolvida a partir das seqüências nucleotídicas encontradas no 16S rRNA dos diferentes fitoplasmas presentes nas amostras de brócolis e de seqüências de fitoplasmas

representantes dos grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrXIII, depositadas no *GenBank*. Para isto, as seqüências foram alinhadas e editadas no programa Bio Edit V. 7.0.5.3 (HALL, 1999), sendo que o fragmento resultante desta edição compreende a região que é amplificada por PCR com o *primer* F2n/R2. Cada fragmento de DNA submetido à análise foi “digerido” com as seguintes enzimas: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *SauAI* (*MboI*), *MseI*, *RsaI*, *SspI* e *TaqI*. Após a restrição *in silico*, foi plotada uma figura que simula a eletroforese em gel de agarose a 3%.

2.2.8 Análise filogenética

As seqüências da região 16S rDNA dos fitoplasmas identificados neste estudo e de outros fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrXII, assim como do organismo *Acholeplasma laidlawii*, selecionado por representar o ancestral comum dos fitoplasmas, foram alinhados usando o programa MEGA V. 4.0 (TAMURA et al., 2007), e uma árvore filogenética foi construída pelo método *Neighbor-Joining*, com o teste *bootstrapping* processado 1000 vezes. Os números de acesso no *GenBank* da seqüência de nucleotídeos dos fitoplasmas e do *Acholeplasma laidlawii* são mostrados na tabela 1.

Tabela 1 - Fitoplasmas representantes dos subgrupos incluídos dentro dos grupos 16SrI, III e XIII, utilizados para a construção da árvore filogenética

(continua)

Fitoplasma ou doença associada	Grupo 16S rDNA-Subgrupo	Acesso <i>GenBank</i>	Planta/ local de origem
Broccolo stunt phytoplasma (BSP-BrB3)	16SrI-B	Deste estudo	Brócolis/Brasil
Broccolo stunt phytoplasma (BSP-BrB21)	16SrIII	Deste estudo	Brócolis/Brasil
Broccolo stunt phytoplasma (BSP-BrB73)	16SrIII	Deste estudo	Brócolis/Brasil
Broccolo stunt phytoplasma (BSP-BrB76)	16SrIII	Deste estudo	Brócolis/Brasil
Broccolo stunt phytoplasma (BSP-BrB22)	16SrXIII	Deste estudo	Brócolis/Brasil
Tomato big bud phytoplasma (BB)	16SrI-A	AF222064	Tomate/EUA
Maize bushy stunt (MBS)	16SrI-B	AY265208	Milho/EUA
Clover phyllody phytoplasma (CPh)	16SrI-C	AF222065	Trevo/Canadá
Paulownia witches' broom (PaWB)	16SrI-D	AY265206	Paulownia/ Taiwan
Blueberry stunt phytoplasma (BBS3)	16SrI-E	AY265213	Vaccinum sp./EUA
Apricot chlorotic leaf roll (ACLR-AY)	16SrI-F	AY265211	Damasco/Alemanha

Tabela 1 - Fitoplasmas representantes dos subgrupos incluídos dentro dos grupos 16SrI, III e XIII, utilizados para a construção da árvore filogenética

(conclusão)

Fitoplasma ou doença associada	Grupo 16S rDNA-Subgrupo	Acesso GenBank	Planta/ local de origem
Strawberry multiplier (STRAWB2)	16SrI-K	U96616	Morangueiro/EUA
Aster yellow (AVUT)	16SrI-M	AY265209	Aster/Alemanha
Ipomoea obscura witches' broom (IOWB)	16SrI-N	AY265205	Ipomoea/Taiwan
Soybean purple stem (SPS)	16SrI-O	AF268405	Soja/EUA
Unknown potato disease	16SrI-P	AF503568	Batata/EUA
Cherry little leaf (ChLL)	16SrI-Q	AY034089	Cereja acida/Lituania
Canada X-disease (CX)	16SrIII-A	L33733	Pessegue (Canadá)
Clover yellow edge phytoplasma CYE-C	16SrIII-B	AF175304	Trevo (Canadá)
Pecan bunch phytoplasma PB1	16SrIII-C	FJ376626	Noz (EUA)
Goldenrod yellows phytoplasma GR1	16SrIII-D	FJ376627	Solidago (EUA)
Spiraea stunt phytoplasma SP1	16SrIII-E <i>rnnA</i>	AF190228	Buquê-de-noiva (EUA)
Milkweed yellows phytoplasma MW1	16SrIII-F	AF510724	Official de sala (EUA)
Walnut witches' broom phytoplasma WWB	16SrIII-G <i>rnnA</i>	AF190226	Nogueira (EUA)
Walnut witches' broom phytoplasma WWB	16SrIII-G <i>rnnB</i>	AF190227	Nogueira (EUA)
Poinsettia branch-inducing phytoplasma PoiBI	16SrIII-H <i>rnnA</i>	AF190223	Poinsetia (EUA)
Virginia grapevine yellows phytoplasma VGYIII	16SrIII-I <i>rnnA</i>	AF060875	Videira (EUA)
Chayote witches' broom phytoplasma	16SrIII-J	AF147706	Chuchuzeiro (Brasil)
Strawberry leafy fruit phytoplasma SLF	16SrIII-K	AF274876	Morangueiro (EUA)
Poinsettia exuberant flower-inducing	16SrIII-L	EU169138	Poinsetia (México)
Montana potato purple top phytoplasma PPT-	16SrIII-M	FJ226074	Batata (EUA)
Alaska potato purple top phytoplasma PPT-	16SrIII-N	FJ376629	Batata (EUA)
Dandelion virescence phytoplasma DanVir	16SrIII-P <i>rnnB</i>	AF370120	Dente de leão
Dandelion virescence phytoplasma DanVir	16SrIII-P <i>rnnA</i>	AF370119	Dente de leão
Black raspberry witches' broom phytoplasma	16SrIII-Q	AF302841	Framboesa preta
Cirsium white leaf phytoplasma CirWL	16SrIII-R <i>rnnA</i>	AF373105	Cardo roxo (Lituania)
Cirsium white leaf phytoplasma CirWL	16SrIII-R <i>rnnB</i>	AF373106	Cardo roxo (Lituania)
Western peach X-disease phytoplasma WX	16SrIII-S	L04682	Pêssego (EUA)
Mexican Periwinkle virescence (MPV)	16SrXIII-A	AF248960	Vinca (México)
Strawberry green petal (STRAW1)	16SrXIII-B	U96614	Morango (EUA)
Chinaberry yellows (<i>CbYI</i>)	16SrXIII-C	AF495882	Cinamomo (Bolívia)
Papaya apical Curl Necrosis (PACN-Br02)	16SrXIII	EU719111	Mamoeiro (Brasil)
<i>Acholeplasma laidlawii</i> ⁽¹⁾	Não se aplica	M 23932	--

⁽¹⁾Weisburg et al. (1989)

2.2.9 Coleta e identificação de potenciais insetos vetores

2.2.9.1 Local, forma de coleta e separação dos insetos

Insetos foram coletados em Bragança Paulista entre os meses de julho de 2009 a março de 2010, em uma área de cultivo comercial de brócolis.

Com o auxílio de rede de varredura, os insetos foram capturados em áreas adjacentes aos campos de plantio de brócolis e foram transferidos para sacos plásticos e posteriormente congelados a -20°C por 24h. Após este período os insetos sugadores de floema pertencentes à família Cicadellidae foram separados em morfotipos, ou seja, de acordo com a sua morfologia e aparência. Parte dos exemplares foram secos em estufa à 60°C por 24 h para posterior identificação taxonômica e o restante foi armazenado em álcool 70% para posterior extração do DNA e testes de detecção de fitoplasmas.

A fim de se determinar os locais nos quais as cigarrinhas se abrigam, foi realizada uma coleta padronizada em diferentes pontos adjacentes ao redor e dentro da área de cultivo de brócolis. Os pontos de coletas estabelecidos foram: três áreas cobertas por vegetação nativa, denominadas de mata e identificadas como mata 1 (Mta1) e 2 (Mta2); área de pastagem; área de plantio de mandioca e área de cultivo de brócolis. A coleta foi padronizada em 40 “batidas” com a rede de varredura em cada local de coleta, que foi realizada quatro vezes, em intervalos de 15 dias, durante o cultivo de inverno de brócolis (02/06 a 29/08 de 2009).

Os morfotipos pertencentes à subfamília Deltocephalinae e um morfotipo da subfamília Typhlocybinae foram identificados a nível de gênero ou espécie pela taxonomista Dra. Ketí Maria Rocha Zanol (UFPR), enquanto os demais morfotipos coletados foram identificados somente a nível de subfamília.

2.2.9.2 Extração de DNA total dos insetos

A extração de DNA total a partir dos insetos coletados seguiu o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1989) modificado por Marzachi, Veratti e Bosco (1998). Os insetos, individualmente ou em grupos, de acordo com o seu tamanho, foram macerados dentro de tubos de 1,5mL contendo 500 μL do tampão CTAB a 60°C com o auxílio de um pistilo. Após a maceração, a suspensão foi incubada por 30 min a 60°C , em banho-maria. Em seguida, foram adicionados 350 μL de uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1, respectivamente, e a mistura foi agitada em vortex e submetida à centrifugação a 6.800g por 10

minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de 1,5mL, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado. A mistura foi incubada a -20°C por um período mínimo de 2 horas e então centrifugada a 20.800g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (que contém o DNA) lavado com álcool 70% duas vezes. Após secar em temperatura ambiente o precipitado foi ressuspenso em 20 µL de água milliQ e as amostras armazenadas a -20°C.

2.2.9.3 Detecção e identificação de fitoplasmas em insetos

A detecção e a identificação dos fitoplasmas presentes nas cigarrinhas foi realizada seguindo-se os mesmos procedimentos para a detecção e identificação de fitoplasmas presentes em plantas, conforme descrito nos itens **2.2.3** e **2.2.4**

2.2.10 Análise epidemiológica

2.2.10.1 Caracterização dos locais de plantio e demarcação dos ensaios

Dois ensaios foram conduzidos em campos de cultivo de brócolis localizados no município de Bragança Paulista (22°57'07" Sul; 47°32'31" Oeste e a 583 metros de altitude), Estado de São Paulo. O primeiro ensaio (ensaio 1, E1) foi conduzido em um campo implantado em 02/06/2009 (Figura 3). O segundo ensaio (ensaio 2, E-2) foi conduzido em um campo implantado em 10/06/2009 (Figura 3). Em cada ensaio, parcelas foram alocadas em pontos equidistantes, compreendendo áreas periféricas e centrais dos campos de cultivo de brócolis. Cada parcela foi composta por 10 linhas com 50 plantas cada, totalizando 500 plantas.

Figura 3 - Localização das parcelas referentes aos ensaios conduzidos em campos de cultivo de brócolis em Bragança Paulista, SP. E-1: ensaio 1 conduzido de 02/06/2009 a 01/08/2009; E-2: ensaio 2 conduzido de 10/06/2009 a 29/08/2009. D, E, F, G, H, I e J: parcelas pertencente ao ensaio 1; O, M e N: parcelas pertencente ao ensaio 2. O ensaio 1 foi conduzido em um campo localizado próximo a uma área de pastagem (Pta), a uma área de mata (Mta₁) e um campo de cultivo de mandioca (Mdi). O ensaio 2 foi conduzido em um campo localizado próximo a uma área recém arada e gradeada e, portanto, sem vegetação (Ave) e de uma pequena área de mata (Mta₂)

2.2.10.2 Coleta de dados

As avaliações de plantas doentes em cada parcela foram realizadas a cada 15 dias, a partir da demarcação das parcelas, até o final do ciclo da cultura. Todas as plantas de brócolis de cada parcela foram observadas em busca de sintomas típicos induzidos por fitoplasmas (enfazamento, avermelhamento foliar e necrose de vaso do floema), de modo que foram confeccionados mapas contendo a posição relativa de cada planta e seu estado fitopatológico (planta doente ou sadia). A cada avaliação, na observação de novas plantas doentes, estas foram incorporadas aos mapas, obtendo-se, assim, a incidência acumulada de plantas doentes.

2.2.10.3 Análise temporal

Curvas de progresso da doença foram plotadas ao longo do tempo para cada parcela, utilizando-se os valores em porcentagem (%) da incidência acumulada de plantas doentes.

2.2.10.4 Análise espacial

Foram utilizadas três técnicas para esclarecer aspectos da disseminação do patógeno: o índice de dispersão, a lei de Taylor modificada e áreas isopatas (MADDEN; HUGHES, 1995; BARBOSA, 1997).

O índice de dispersão e a lei de Taylor modificada apresentam a informação sobre a tendência da proximidade de plantas doentes em sub-áreas denominadas *quadrats* dentro de cada parcela. O índice de dispersão apresenta resultados pontuais, ou seja, em momentos específicos. Já a lei de Taylor modificada, permite verificar a dinâmica das plantas doentes de acordo com o grau de incidência da doença e/ou o tempo.

Áreas isópatas foram primeiramente estabelecidas por Barbosa (1997) ao estudar o patossistema *Xylella fastidiosa* - *Citrus* sp.. Embora para esta técnica não há determinações de índices ou informações puramente matemáticas (BARBOSA, 2002), ela vem sendo constantemente utilizada na epidemiologia de doenças de plantas devido a sua simplicidade e informação fornecida, realçando possíveis diferenças da intensidade da doença em uma área (BARBOSA, 1997; BARBOSA, 2002; DELLA-VECHIA, 2006; MELLO, 2007; BARBOSA, 2008; RAPUSSI-DA-SILVA, 2010).

2.2.10.4.1 Índice de dispersão

Os mapas obtidos na última avaliação de cada parcela, foram divididos em *quadrats* de diferentes tamanhos. Em análises preliminares, os *quadrats* de tamanho 2x2, 3x3, 4x4 e 5x5 foram selecionados para o presente estudo. Para cada tamanho de *quadrat*, a incidência de plantas doentes (ρ) foi determinada em cada avaliação por meio da equação (MADDEN; HUGHES, 1995):

$$\rho = \sum x_i / n N \quad (1)$$

onde:

$\sum x_i$ é o somatório do número de plantas doentes em cada *quadrat* i ,

n é o número de plantas em cada *quadrat* e N é o número total de *quadrats* em cada parcela.

Com base nestes dados, a variância observada (V_{obs}) e binomial (V_{bin}) foram calculadas utilizando-se as seguintes equações, cujos parâmetros foram definidos anteriormente (MADDEN; HUGHES, 1995):

$$V_{obs} = \sum (x_i - np)^2 / n^2 (N-1) \quad (2)$$

$$V_{bin} = \rho (1-\rho) / n \quad (3)$$

O índice de dispersão (D) foi calculado para todos os mapas através da equação:

$$D = V_{obs} / V_{bin} \quad (4)$$

A significância do índice de dispersão foi verificada por meio do teste de qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade. A hipótese nula foi de que o padrão espacial apresentado pela doença era aleatório e a hipótese alternativa foi de que o padrão era agregado. Os valores de D que não diferiram estatisticamente de 1 foram considerados como indicativo de aleatoriedade. Já valores estatisticamente superiores a 1 foram considerados como indicativo de agregação.

2.2.10.4.2 Ajuste à lei de Taylor modificada

A aplicação da lei de Taylor modificada, consistiu da relação linear entre o logaritmo da V_{bin} e o logaritmo da V_{obs} (MADDEN; HUGHES, 1995). Assim:

$$\log (V_{bin}) = \log (A) + b \log (V_{obs}) \quad (5)$$

em que A e b são parâmetros.

As regressões foram feitas por meio do método dos *Least-Squares* (HUGHES; MADDEN, 1992) utilizando-se o programa *Statistica* 6.0 (Stasoft, Tulsa, OK, EUA).

Considerou-se como variável independente o $\log (V_{bin})$ e como variável dependente o $\log (V_{obs})$ para os dados em conjunto das parcelas dos ensaios realizados. A significância das relações (regressão linear) entre $\log (v_{bin})$ e $\log (v_{obs})$ foi determinada pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Já a adequação do ajuste do modelo aos dados foi determinada por meio dos valores dos coeficientes de determinação (R^2) e dos padrões de distribuição dos resíduos, em gráficos de resíduos *versus* valores previstos de $\log (v_{bin})$ (MADDEN; HUGHES, 1995).

A igualdade dos parâmetros $b = 1$ e $\log (A) = 0$ foi testada através do teste t ao nível de 5% de probabilidade (MADDEN; HUGHES, 1995; ZAR, 1996), usando-se as estimativas destes

parâmetros e seus erros padrões. Quando $b = 1$ e $\log(A) = 0$, os dados seguem um padrão de aleatoriedade. Se $b = 1$ e $\log(A) > 0$, há um nível de agregação constante, o qual independe da incidência. O parâmetro b é considerado como um índice de agregação, de modo que quando $b > 1$, a agregação varia de acordo com a incidência.

2.2.10.4.3 Áreas isópatas

Através da distribuição de plantas doentes representadas nos mapas obtidos na última avaliação de cada parcela, elaborou-se uma matriz X , Y e Z ; onde X e Y correspondem à posição do *quadrat* dentro da parcela e Z , aos valores da incidência de plantas doentes em cada *quadrat*. Após a elaboração das matrizes, as áreas isópatas correspondentes a cada parcela foram geradas de acordo com o método *Distance-Weighted Least-Squares*, utilizando o programa *Statistica 6.0* (Stasoft, Tulsa, OK, EUA).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Detecção e identificação de fitoplasmas em plantas de brócolis

2.3.1.1 Detecção e identificação de fitoplasmas por PCR

Fitoplasmas foram detectados em 52% das amostras de brócolis, correspondendo a 32 plantas portadoras em 62 analisadas. Em todos os campos amostrados, localizados nos municípios de Bragança Paulista, Sorocaba, Morungaba e Iperó, o patógeno foi encontrado associado a plantas de brócolis sintomáticas.

A presença de fitoplasmas foi revelada pela amplificação de fragmentos de, aproximadamente, 1,2kb quando se utilizou duplo PCR, conduzido com os *primers* universais. Estes fragmentos genômicos, foram visualizados na forma de bandas em gel de agarose. Amplificações de fragmentos esperados também foram obtidas quando se utilizou DNA extraído de uma planta assintomática, entre cinco analisadas, e nenhum fragmento foi obtido para a água, utilizado como controle negativo nas reações da PCR. Amplificações esperadas de fragmentos de 1,2kb foram constatadas para o padrão positivo representado pelo fitoplasma do milho.

A identificação molecular realizada através de duplo PCR com *primers* específicos demonstrou que fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrXIII estavam

associados às plantas de brócolis amostradas nos diversos campos de produção, nas proporções de, aproximadamente, 30, 45 e 24%, respectivamente. A análise também revelou que somente um fitoplasma estava associado com cada planta sintomática (Tabela 2). No entanto, em uma das amostras foi constatada a ocorrência de infecção mista, envolvendo fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI e 16SrIII (Tabela 2).

Tabela 2 - Detecção e identificação de fitoplasmas em plantas sintomáticas de brócolis amostradas em campos comerciais em diferentes épocas e locais, pelo uso de duplo PCR

Ano de amostragem	Local amostrado	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas	Amostras positivas	Grupo 16SrDNA
2007	Bragança Paulista	6	3	B1	I
				B3	I
				B4	I
2008	Sorocaba	4	3	B19	III
				B21	III
				B22	XIII
2008	Morungaba	7	7	B27	XIII
				B28	XIII
				B29	XIII
				B30	XIII
				B31	XIII
				B32	XIII
				B33	XIII
2009	Iperó	10	8	B34	I
				B35	I
				B37	I
				B38	I
				B39	III
				B41	I e III
				B42	I
				B43	I
				B45	III
2009	Bragança Paulista	35	11	B51	III
				B58	III
				B61	III
				B73	III
				B76	III
				B76	III
				B77	III
				B81	III
				B84	III
				B85 ⁽¹⁾	III

⁽¹⁾ Planta Assintomática

Visando confirmar a identificação dos fitoplasmas realizada com a utilização de *primers* específicos, assim como identificar os isolados quanto ao subgrupo, a região 16S rDNA dos fitoplasmas foi analisada por RFLP a partir do produto de PCR amplificado com o par de *primer* F2n/R2, universais para fitoplasmas. Algumas amostras não foram analisadas através desta técnica devido à baixa quantidade de DNA amplificado.

2.3.1.2 Identificação de fitoplasmas por RFLP

Os fitoplasmas encontrados nas amostras B1, B3 e B4 representaram aqueles do grupo 16SrI coletados em Bragança Paulista (2007), os fitoplasmas detectados nas amostras B19, B21, B73 e B76 representaram os fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII coletados em Sorocaba e Bragança Paulista (2009), e os fitoplasmas identificados nas amostras B2, B33, e B22, representaram os fitoplasmas do grupo 16SrXIII, detectados em Morungaba e Sorocaba.

Em relação aos fitoplasmas do grupo 16SrI, considerando cada uma das enzimas, os três fitoplasmas mostraram padrões de restrição coletivos idênticos entre si e àquele exibido pelo fitoplasma associado ao enfezamento do milho, pertencente ao grupo 16SrI, subgrupo B (Figura 4).

Figura 4 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrI detectados nas amostras de brócolis B1, B3 e B4, com o uso das enzimas *HpaII*, *HhaI*, *KpnI*, *AluI*, *RsaI*, *MboI*, *HaeIII*, *MseI*; MBS representa o DNA do fitoplasma de referência pertencente ao grupo 16SrI-B; M: marcador molecular ØX174-*HaeIII*

Os fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII presentes nas amostras B19 e B21 apresentaram padrões idênticos àqueles mostrados pelo fitoplasma associado ao superbrotamento do chuchuzeiro, usado como referência do subgrupo 16SrIII-J, exceção feita para os perfis gerados pela enzima de restrição *Bst*UI (Figura 5). Os fitoplasmas detectados nas amostras B73 e B76 produziram padrões similares daqueles exibidos pelo fitoplasma pertencente ao subgrupo 16SrIII-B. Neste último caso, não se encontrou na literatura padrão de referência para este fitoplasma, devido ao perfil distinto do mesmo, quando se utilizou a enzima de restrição *Rsa*I (Figura 6).

Figura 5 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII presente nas amostras B19 e B21, utilizando as enzimas *Alu*I, *Bst*UI, *Hha*I, *Hinf*I, *Kpn*I, *Mse*I, *Rsa*I; ChWB representa o perfil do fitoplasma representante do grupo 16SrIII-J; MaD representa o perfil de fitoplasma pertencente ao grupo 16SrIII-B; M: marcador molecular ØX174-*Hae*III

Figura 6 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA de fitoplasmas do grupo 16SrIII presente nas amostras de brócolis B73 e B76 com as enzimas *HhaI*, *TaqI*, *KpnI*, *AluI*, *BstUI* e *RsaI*. ChWB: representa o perfil do fitoplasma representante do grupo 16SrIII-J; MaD: representa o fitoplasma pertencente ao grupo 16SrIII-B; M: marcador molecular ØX174- *HaeIII*

Os fitoplasmas, inicialmente identificados como pertencentes ao grupo 16SrXIII através da reação de PCR foram encontrados em oito amostras de plantas de brócolis sintomáticas (Tabela 2).

Através da análise de RFLP com as enzimas *HhaI*, *HinfI*, *HpaII*, *MboI*, *MseI*, e *KpnI*, verificou-se que estes fitoplasmas foram similares entre si com o fitoplasma do grupo 16SrXIII associado ao vira cabeça do mamoeiro (MELO et al., 2007), sendo classificados dentro deste grupo (Figura 7).

Figura 7 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA de fitoplasmas do grupo 16SrXIII presentes nas amostras de brócolis B22, B27 e B33 com as enzimas *HpaII*, *KpnI*, *MseI*, *RsaI*, *AluI*, *BstUI*, *HaeIII*, *HhaI*; PACN representa o fitoplasma pertencente ao grupo 16SrXIII; M: marcador molecular ØX174-*HaeIII*

2.3.1.3 Identificação de fitoplasmas por RFLP virtual

Para este tipo de análise o fitoplasma presente na amostra B3 foi selecionado para representar os fitoplasmas componentes do grupo 16SrI, identificados no presente trabalho. Os padrões de restrição *in silico* gerados por este fitoplasma foram idênticos aos perfis eletroforéticos mostrados pelo fitoplasma associado ao enfezamento do milho (Acesso *GenBank*: AY265208), pertencente ao subgrupo 16SrI-B (Figura 8). Estes resultados confirmaram as análises de RFLP previamente conduzidas com as diversas enzimas de restrição realizadas em laboratório (Figura 4), as quais evidenciaram que o fitoplasma do grupo 16SrI presente em plantas de brócolis é um representante do subgrupo B.

Figura 8 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do fitoplasma da amostra B3 de brócolis e do fitoplasma representante do grupo 16SrI-B (MBS), pelo uso de 17 enzimas: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI* (*MboI*), *MseI*, *RsaI*, *SspI*, e *TaqI*. M: marcador, ØX174 DNA-*HaeIII*

Os fitoplasmas associados ao enfezamento do brócolis identificados como membros do grupo 16SrIII foram representados pelos fitoplasmas presentes nas amostras B21, B73 e B76.

Os padrões de restrição obtidos tanto pela análise de RFLP normal, como virtual do fitoplasma da amostra B21 foram idênticos àqueles exibidos pelo fitoplasma associado ao superbrotamento do chuchu, um representante do grupo 16SrIII-J (Acesso *GenBank* AF147706). No entanto, para a enzima *BstUI*, os padrões gerados pelo fitoplasma do brócolis foi diferente daqueles do fitoplasma de referência e também dos perfis já descritos para todos os demais fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII (Figura 5 e Figura 9).

Os resultados da análise virtual de RFLP mostraram que os fitoplasmas encontrados nas amostras B73 e B76 mostraram padrões de restrição próximos daqueles exibidos pelo fitoplasma pertencente ao grupo 16SrIII subgrupo B, representado pelo fitoplasma associados à doença “*Clover yellow edge*”-CYE no trevo (Acesso *GenBank* AF175304) (Figura 9). A digestão virtual conduzida com a enzima *RsaI* gerou perfil distinto para os fitoplasmas do brócolis e para o fitoplasma de referência (Figura 9), resultado também observado para a digestão normal conduzida com esta enzima em relação ao fitoplasma do declínio do cinamomo (Mad), também um representante do grupo 16SrIII-B (Figura 6). Ambos os fitoplasmas presentes nas amostras de brócolis não puderam ser classificados dentro de nenhum subgrupo do grupo 16SrIII, por não apresentarem perfis de fitoplasmas já descritos na literatura (LEE et al., 1998; ZHAO et al., 2009). Por outro lado, os fitoplasmas presentes nas amostras B73 e B76 já foram anteriormente

identificados em plantas de outras espécies no Estado de São Paulo, sendo primeiramente encontrados na planta ornamental crista-de-galo (*Celosia argêntea* L.), com sintomas de amarelecimento generalizado (ECKSTEIN et al., 2008 não publicado) e, posteriormente, detectados em plantas daninhas da espécie *Bidens pilosa* (Picão preto) com sintomas de filodia e superbrotamento coletadas nas proximidades dos campos de produção de tomate na cidade de Sumaré, Estado de São Paulo (ECKSTEIN et al., 2009, não publicados).

Figura 9 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do fitoplasma das amostras B21, B73 e B76 e dos fitoplasmas representantes dos subgrupos 16SrIII-B (CYE) e 16SrIII-J (ChWB), pelo uso de 17 enzimas: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI* (*MboI*), *MseI*, *RsaI*, *SspI*, e *TaqI*. M: marcador, ØX174 DNA-*HaeIII*

A análise de RFLP *in silico* para o fitoplasma presente na amostra B22 confirmou que os padrões de restrição similares ao daqueles fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrXIII (Figura 8). Os perfis eletroforéticos obtidos para este fitoplasma não foram idênticos a nenhum dos representantes dos três subgrupos caracterizados, até o momento fora do Brasil, para os fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrXIII. Apesar disto, os padrões de restrição produzidos pelo

fitoplasma encontrado no brócolis foram mais similares aos perfis descritos para o fitoplasma do subgrupo 16SrXIII-C, associado ao amarelo do cinamomo (*Melia azedarach* L.) na Bolívia (HARRISON et al., 2003) e ao fitoplasma PACN-Br02 (vira-cabeça do mamoeiro) proposto como representante de um novo subgrupo (16SrXIII-E) e identificado em plantas de mamoeiro no Brasil (MELO et al., 2007).

Figura 10 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do fitoplasma da amostra B22 e dos fitoplasmas representantes dos subgrupos 16SrXIII-B (STRAW 1) e 16SrXIII-C (CbY1), pelo uso de 17 enzimas: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI* (*MboI*), *MseI*, *RsaI*, *SspI*, e *TaqI*. M: marcador, ØX174 DNA-*HaeIII*

A ocorrência de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrXIII em plantas de brócolis apresentando sintomas de enfezamento vem se somar aos achados de trabalhos anteriores, que vêm demonstrando, ao longo do tempo, a predominância de representantes destes dois grupos nas associações com numerosas doenças identificadas numa diversidade de espécies vegetais presentes no Brasil.

Os fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrI, denominado de “Aster yellow group”, pertencem à espécie putativa ‘*Candidatus phytoplasma asteris*’ (LEE et al., 2004). Os afiliados a este grupo têm sido constatados em uma ampla gama de hospedeiros vegetais, cultivados ou não, encontrados nas mais diversas regiões do mundo (LEE et al., 2004). Os fitoplasmas membros do subgrupo 16SrI-B são os mais numerosos, considerando-se o número de doenças às quais estes patógenos estão associados (LEE; DAVIS, 2000; LEE et al., 2004). No Brasil, fitoplasmas do subgrupo 16SrI-B são responsáveis por uma das mais importantes doenças que ocorrem na cultura do milho, denominada de enfezamento vermelho, o qual transmitidos por cigarrinhas da espécie *Dalbulus maidis* (OLIVEIRA, 1996). Além do milho, esses fitoplasmas também já foram relatados em associação com a síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) (SILVA et al., 2009), amarelo da videira (*Vitis* sp.) (NERONI; BEDENDO; KUNIYUKI, 2006) e superbrotamento da primavera (*Bougainvillea spectabilis* L.) (SILVA, 2008). Com relação à sua ocorrência em brássicas, fitoplasmas do subgrupo 16SrI-B foram associados com plantas de brócolis na Itália (RAGOZZINO, 1995) e na Sérvia (DUDUK et al., 2007); repolho na Itália (RAGOZZINO, 1995), nos Estados Unidos (LEE et al., 2003) e no Brasil (MELLO, 2007); e nabo no Canadá (OLIVIER; SÉGUIN-SWARTZ; HEGEDUS, 2006).

Os fitoplasmas do grupo 16SrIII, cujo nome proposto da espécie putativa é ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’ (IRPCM, 1994), têm sido encontrados freqüentemente nos continentes europeu e americano (LEE et al., 1998). No Brasil, são a maioria dos fitoplasmas relatados até o momento (MONTANO; BRIOSO; PIMENTEL, 2007). Representantes deste grupo estão associados com dezenas de doenças diagnosticadas em plantas cultivadas e não cultivadas. Especificamente em relação às brássicas, estes fitoplasmas foram relatados em associação com plantas de repolho e couve-flor com sintomas de enfezamento, encontradas em plantios comerciais na região sul e sudeste do Brasil (MELLO, 2007; RAPUSSI-DA-SILVA, 2010).

Fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrXIII foram primeiramente relatados no México, ocorrendo em plantas de vinca (*Catharanthus roseus* L.) que exibiam sintomas de virescência (GUNDERSEN et al., 1994; LEE et al., 1998). Posteriormente, foram relatados nos Estados Unidos em morangueiros que mostravam uma diversidade de sintomas, (LEE et al., 1998). No primeiro caso foram classificados como representantes do subgrupo 16SrXIII-A e, no segundo, como membros do subgrupo 16SrXIII-B. Em 2003, fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrXIII foram relatados pela primeira vez na América do Sul, mais precisamente na Bolívia, associados

ao amarelecimento do cinamomo (*Melia azedarach* L.) (HARRISON et al., 2003). Sua identificação mostrou serem diversos daqueles anteriormente caracterizados e por esta razão foram classificados como representantes de um novo subgrupo, designado de 16SXIII-C.

No Brasil, são recentes os primeiros registros da ocorrência de fitoplasmas do grupo 16SrXIII e datam do ano de 2007. A sua identificação foi feita a partir de plantas de mamoeiro que apresentavam uma anomalia conhecida por vira-cabeça, observada em plantios comerciais localizados no estado do Espírito Santo (MELLO et al., 2007). Em 2009, fitoplasmas pertencentes a este mesmo grupo foram associados à doença denominada filodia do morangueiro (MELO, 2008), em mudas usadas para estabelecimento da cultura em campo. A presença de fitoplasmas do grupo 16SrXIII em brássicas foi, até o presente, constatada somente no Brasil, ocorrendo em plantas de brócolis e de couve-flor (RAPUSSI-DA-SILVA, 2010) naturalmente infectadas e exibindo sintomas de enfezamento e necrose de floema.

Além da detecção de fitoplasmas em plantas sintomáticas, a presença destes fitopatógenos foi detectada em uma planta de brócolis assintomática (entre cinco amostras analisadas) coletada no campo de Bragança Paulista, ano de 2009 (Tabela 2). Este não é um fato isolado quando se trata da associação de fitoplasmas com brássicas, pois estes organismos foram detectados em 61% das amostras de plantas de couve-flor assintomáticas analisadas no trabalho de Rapussi-da-Silva (2010) e em uma de duas plantas de repolho assintomáticas no trabalho de Lee et al., 2003. Assim como no presente trabalho, as plantas de couve-flor e repolho foram coletadas em campos com a presença de plantas sintomáticas, por isso, os fatores ambientais, que podem ter influência na expressão de sintomas pelas plantas, não são responsáveis pelo não aparecimento dos sintomas. Por outro lado, a ocorrência de um período de incubação explicaria essa observação, na verdade, as plantas que são infectadas por fitoplasmas não expressam os sintomas imediatamente, mas somente depois de determinado período de incubação, que pode ser 7 dias ou até mesmo de vários meses, dependendo do fitoplasma e da espécie vegetal (HOGENHOUT et al., 2008). Na cultura do milho, por exemplo, os sintomas de enfezamento vermelho causado por fitoplasmas são observados com frequência de 6% e 40% após 30 e 60 dias da inoculação com vetores (OLIVEIRA et al., 2002).

A ocorrência de fitoplasmas dos grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrXIII em espécies de brássicas como repolho, couve-flor e brócolis, verificada em uma região limitada como aquela amostrada neste trabalho, sugere que a disseminação do patógeno pode estar sendo feita por um

inseto vetor comum. Além disto, o fato dos sintomas exibidos por plantas infectadas por um ou outro fitoplasma serem aparentemente idênticos, leva a inferir que os mecanismos envolvidos na interação hospedeiro–patógeno sejam os mesmo para as três espécies vegetais.

2.3.1.4 Análise filogenética

Visando estabelecer a posição filogenética dos fitoplasmas encontrados em plantas de brócolis, uma árvore filogenética com fitoplasmas de 3 grupos distintos de fitoplasmas, e o ancestral comum *Acholeoplasma laidlawii*, foi construída (Figura 11).

A análise filogenética confirmou os resultados de identificação molecular conduzidos por PCR com *primers* específicos e análise de RFLP. O fitoplasma presente na amostra B3, classificado com base na análise de RFLP como pertencente ao grupo 16SrI, subgrupo B, ficou alocado no mesmo ramo do fitoplasma representante deste subgrupo. O fitoplasma presente na amostra B21, que foi caracterizado por RFLP como mais próximo do fitoplasma representante do grupo 16SrIII, subgrupo J, ficou posicionado no mesmo ramo deste último, evidenciando sua estreita relação filogenética com o mesmo. A posição do fitoplasma presente na amostra B73, cuja análise de RFLP apontou sua similaridade com o fitoplasma representante do grupo 16SrIII, subgrupo B, mostrou que, apesar dos mesmos derivarem de um ancestral comum, o mesmo ocupou um ramo diverso deste e dos demais componentes do grupo 16SrIII. Com relação ao fitoplasma do grupo 16SrXIII encontrado em brócolis e presente na amostra B22, a análise filogenética demonstrou sua proximidade com os demais fitoplasmas deste grupo relatados na América do Sul. Para ser mais preciso, este fitoplasma mostrou uma relação filogenética mais estreita com o agente do vira-cabeça do mamoeiro, identificado no Brasil (MELO, 2007), do que com o agente do amarelo do cinamomo caracterizado na Bolívia (HARRISON et al., 2003).

Figura 11 - Árvore filogenética baseada nas seqüências da região 16Sr dos fitoplasmas identificados em plantas de brócolis (setas) e seqüências adicionais de fitoplasmas representantes dos subgrupos pertencentes aos grupos 16SrI, III e XIII

2.3.2 Detecção e identificação de fitoplasmas em plantas daninhas

Dentre as 14 espécies de daninhas sintomáticas coletadas e analisadas, 12 delas se mostraram portadoras de fitoplasmas (Tabela 3, Figuras 12 e 13). A identificação molecular por RFLP revelou que representantes do grupo 16SrIII foram encontrados em todas as amostras nas quais a presença de fitoplasmas foi detectada nos tecidos vegetais (Tabela 3). Fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrVII foram caracterizados em associação com 4 espécies (Tabela 3). Os sintomas mostrados pelas plantas doentes foram variáveis, porém típicos de doenças induzidas por fitoplasmas (Tabela 3, Figuras 10 e 11).

Tabela 3 - Detecção e identificação de fitoplasmas em espécies daninhas sintomáticas, coletadas nas proximidades de campos de brócolis, localizados em Bragança Paulista, no período de julho de 2009 a março de 2010

Família	Espécie	Nome comum	Tipo de Sintomas ⁽¹⁾	Nº de plantas analisadas/ Nº positivas	Fitoplasm a Grupo 16SrDNA
Amaranthaceae	<i>Amaranthus spinosus</i>	Caruru	Ef	7/0	--
Asteraceae	<i>Erigeron bonariensis</i>	Buva	Su, Cl	16/5	III ou VII
	<i>Emilia sonchifolia</i>	Falsa serralha	Vi, Cl	13/8	III ou VII
	<i>Sonchus oleraceae</i>	Serralha amarela	Vi, Cl	22/12	III
	<i>Bidens pilosa</i>	Picão-preto	Fi, Su	8/7	III ou VII
	<i>Ageratum conyzoides</i>	Mentristo	Fi, Su, Fp	6/4	III
Brassicaceae	<i>Lepidium virginicum</i>	Mentruz	Ef, Cl	2/2	III
Convolvulaceae	<i>Ipomoea purpurea</i>	Corda-de-viola	Cl	5/0	--
Euforbiaceae	<i>Ricinus communis</i>	Mamona	Ef, Df	19/4	III
Lamiaceae	<i>Leonurus sibiricus</i>	Rubim	Df	14/3	III ou VII
Leguminosae	<i>Crotalaria lanceolata</i>	Crotalária	Su, Fp	4/4	III
Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i>	Guanxuma	Su, Ri	21/2	III
Rubiaceae	<i>Paucicourea marcgravii</i>	Erva de rato	Av, Fi	14/11	III
Solanaceae	<i>Nicandra physalodes</i>	Juá-de-capote	CL, Fp ou Fi	17/8	III

⁽¹⁾Tipos de sintomas exibidos pelas espécies de plantas daninhas. Su: superbrotamento; Cl: clorose generalizada; Vi: virescência; Fi: filodia; Fp: folhas pequenas; Ef: enfezamento; Df: deformação foliar; Ri: redução de internódios; Av: avermelhamento foliar.

Nota – Sinais convencionais utilizados:

-- não se aplica dado

Figura 12 - Plantas daninhas sintomáticas coletadas em área de produção de brócolis: A- *L. sibiricus*; B- *E. bonariensis*; C- *Ageratum conyzoides* ; D- *N. physalodes* (filodia); E- *N. physalodes* (folhas pequenas) ; F- *E. sonchifolia* (F) *B. pilosa* (G). Fotos: Júlio C. Barbosa

Figura 13 - Plantas daninhas sintomáticas coletadas em área de produção de brócolis. *S. oleraceae* (H); *L. virginicum* (I); *Crotalaria lanceolata* (J); *Sida rhombifolia* (K); *P. marcgravii* (L); *R. communis* (M). Fotos: Júlio C. Barbosa

Os fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrVII, encontrados nas espécies *Erigeron bonariensis*, *Emilia sonchifolia*, *Bidens pilosa* e *Leonorus sibiricus* (Figura 12), foram identificados através da análise de RFLP, utilizando-se as enzimas de restrição *AluI*, *HhaI*, *MseI*, *HaeIII* e *MseI* (Figura 14). Os fitoplasmas presente nas plantas daninhas apresentaram padrões de restrição indistinguíveis entre si e com aqueles descritos para o fitoplasma representante do subgrupo 16SrVII-B, identificado em plantas de buva (*Erigeron* sp) e de vinca (*Catharanthus roseus* L.), coletadas no Estado de São Paulo (BARROS et al., 2002). A identificação de fitoplasma também afiliado ao subgrupo 16SrVII-B em plantas daninhas do gênero *Erigeron* sp (*E. bonariensis*) na Argentina (MENEGUZZI et al., 2008) sugere uma ampla distribuição geográfica deste fitoplasma.

Figura 14 - Identificação do fitoplasma pertencente ao grupo 16SrVII-B presente em plantas daninhas coletadas nas proximidades de campos cultivados com brócolis. Coluna 4:- amostra de *L. sibiricus*; Colunas 7 e 17: amostras de *E. bonariensis*; Colunas 8 e 11: amostras de *E. sonchifolia*; Coluna 252: amostra de *B. pilosa*; M: marcador molecular phiX174

Fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII foram identificados em plantas daninhas de todas as espécies nas quais fitoplasmas foram detectados, através de análise molecular por RFLP conduzida com as enzimas *RsaI*, *HhaI* e *BstUI*. Os resultados revelaram que, mesmo pertencentes ao grupo 16SrIII, estes fitoplasmas apresentavam diversidade da região do gene 16S rRNA. Com base nos padrões de restrição gerados pelas digestões dos fragmentos genômicos dos fitoplasmas com estas três enzimas, foi possível reconhecer quatro padrões coletivos de RFLP, que corresponderam a quatro fitoplasmas distintos (Figura 15), de acordo com o esquema utilizado para classificação destes procariotos (LEE et al., 1998 ; WEI et al., 2008). Dois destes fitoplasmas puderam ser classificados dentro de dois subgrupos distintos já descritos pela literatura, sendo um deles enquadrado no subgrupo 16SrIII-J e o outro no subgrupo 16SrIII-E. Os dois fitoplasmas restantes exibiram padrões de restrição ainda não são descritos na literatura especializada. Assim, um deles apresentou um padrão de restrição inédito para a enzima *RsaI*, padrão este idêntico àquele mostrado pelos fitoplasmas identificado em amostras de plantas de brócolis (B76 e B73) e em outras espécies botânicas, conforme descrito no item 2.3.1.3. O outro fitoplasma apresentou um padrão também inédito, porém para as enzimas *BstUI* e *HhaI*. Devido ao fato deste último fitoplasma ter sido freqüentemente encontrado em cigarrinhas da espécie *Atanus nitidus*, resultado que será posteriormente apresentado como parte desta tese, ele foi denominado de “fitoplasma do Atanus” (Atanus phytoplasma-AtaPh). Fitoplasmas com padrões de restrição coletivos idênticos àqueles mostrados pelos fitoplasmas presentes nas amostras de brócolis B73 e B76 (Coluna nº 171, figura 15) foram identificados nas espécies daninhas *E. sonchifolia*, *P. marcgravii*, *E. bonariensis* e *L. virginicum* (Tabela 4, figuras 12 e 13). Fitoplasmas pertencente ao grupo 16SrIII, subgrupo J, foram encontrados apenas em uma planta de *N. physaloides* (coluna nº 80, figura 15) com sintomas de clorose generalizada e folhas pequenas (Figura 12-E). Os fitoplasmas com padrão de restrição coletivo similar àquele exibido pelo representante do grupo 16SrIII, subgrupo E (Coluna nº139, figura 15), foram encontrados em quatro espécies de plantas daninhas, ou seja, *B. pilosa*, *L. sibiricus*, *N. physaloides* e *Crotalaria lanceolata* (Tabela 4, figuras 12 e 13). Finalmente, fitoplasmas que apresentavam padrões de restrição correspondentes àqueles mostrados pelo “fitoplasma do Atanus” foram identificados nas espécies *A. conyzoides*, *Sida rhombifolia*, *N. physaloides* e *S. oleraceae* (Tabela 4, Figuras 12 e 13).

Figura 15 - Identificação de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII presente em plantas daninhas com o uso das enzimas *HhaI*, *RsaI*, *KpnI*, *AluI*, *BstUI*, *HinfI*, *MseI*, *TaqI*. Coluna 80: fitoplasma do subgrupo 16SrIII-J; Coluna 139: fitoplasma do subgrupo 16SrIII-E; Coluna 171: fitoplasma idêntico a B73 e B76; Coluna 209: representante do *Atanus phytoplasma* (AtaPh); MaD e ChWB: perfil de fitoplasma pertencentes aos subgrupos 16SrIII-B (declínio do cinamomo) e 16SrIII-J (enfezamento do chuchu), M: marcador molecular phiX174

Tabela 4 - Relação dos diferentes fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII e as espécies de plantas daninhas hospedeiras destes fitoplasmas

Espécies hospedeiras	Fitoplasma 16SrIII			
	Subgrupo J	Subgrupo E	Fitoplasma do <i>Atanus</i> ⁽¹⁾	Idêntico a B73 ⁽²⁾ e B76 ⁽²⁾
<i>A. conyzoides</i>			X	
<i>B. pilosa</i>		X		
<i>C. lanceolata</i>		X		
<i>E. sonchifolia</i>				X
<i>E. bonariensis</i>				X
<i>L. sibiricus</i>		X		
<i>L. virginicum</i>				X
<i>N. physalodes</i>	X	X	X	
<i>P. marcgravii</i>				X
<i>S. oleraceae</i>			X	
<i>S. rhombifolia</i>			X	

⁽¹⁾Fitoplasma identificado infectando cigarrinhas da espécie *Atanus nitidus*

⁽²⁾Fitoplasma identificado infectando plantas de brócolis B73 e B76

Considerando os quatro fitoplasmas distintos pertencentes ao grupo 16SrIII detectados em plantas daninhas, um deles foi encontrado em plantas de brócolis e outros dois deles foram também identificados em outras Brássicas no Brasil (MELLO, 2007; RAPUSSI-DA-SILVA, 2010). O fitoplasma pertencente ao subgrupo 16SrIII-E foi detectado em amostras de plantas de repolho nos Estados do Rio Grande do Sul e São Paulo (MELLO, 2007), enquanto que fitoplasmas pertencentes ao subgrupo 16SrIII-J foi identificado em plantas de repolho e couve-flor (MELLO, 2007; RAPUSSI-DA-SILVA, 2010). Particularmente, no caso da cultura do brócolis, a presença simultânea de plantas daninhas e de brócolis infectados com o mesmo fitoplasma são fortes indicativos de que plantas daninhas possam atuar como reservatórios e, conseqüentemente, como fonte de inóculo destes patógenos para a cultura. Além disto, plantas daninhas podem também ser hospedeiras de vetores suportando sua reprodução e, assim, tendo um papel ainda maior na epidemiologia da doença.

Os fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrVII e alguns do 16SrIII, os quais foram identificados no presente estudo infectando plantas daninhas e insetos, não foram relatados na cultura do brócolis. No entanto, isto não exclui a possibilidade dos mesmos infectarem plantas de

brócolis. Considerando que, as espécies de plantas daninhas infectadas por fitoplasmas foram coletadas próximas aos campos de produção de brócolis e que insetos vetores de fitoplasmas podem apresentar um hábito alimentar polífago (HOGENHOUT et al., 2008), é interessante especular a possível transmissão destes fitoplasmas presentes em plantas daninhas para plantas de brócolis.

A suspeita de que plantas daninhas possam atuar como fonte de inóculo de fitoplasmas tem sido relatada em diversos trabalhos. Assim, na Arábia Saudita (ALHUDAIB et al., 2009), plantas daninhas das espécies *Chenopodium morale*, *Plantago lanceolata* e *Convolvulus arvensis* foram estavam infectadas pelo mesmo fitoplasma associado a uma doença em lima (*Citrus aurantifolia* L.). Os citados autores sugeriram que estas plantas daninhas podem ter papel na disseminação do fitoplasma, bem como abrigar insetos vetores. Batlle et al. (2000), ao estudarem as doenças causadas por fitoplasmas em videira (*Vitis vinifera* L.) observaram que a maioria dos insetos vetores infectados foram amostrados em plantas de videiras que estavam localizadas próximas a floresta, onde ocorriam numerosas plantas silvestres, as quais se apresentaram infectadas por fitoplasmas.

2.3.3 Identificação de possíveis vetores de fitoplasmas na cultura do brócolis.

2.3.3.1 Identificação dos insetos da família Cicadellidae.

Cicadelídeos sugadores de floema pertencentes às subfamílias Deltocephalinae, Typhlocybinæ e Agalliinae foram encontrados na área em estudo. No total, foi verificada a presença de 19 morfotipos distintos (Figura 16). Todos os morfotipos da subfamília Deltocephalinae foram identificados a nível de gênero ou espécie, enquanto que apenas um morfotipo da subfamília Typhlocybinæ foi identificado a nível de espécie. Os demais morfotipos desta subfamília, assim como aqueles da subfamília Agalliinae, não foram identificados a nível deste taxon. Cada morfotipo não identificado foi designado pela letra T seguida de um número (Tabela 5).

Estas três subfamílias incluem as espécies de cigarrinhas descritas como vetoras de fitoplasmas, principalmente a subfamília Deltocephalinae, a qual abriga 75% dos insetos vetores conhecidos para fitoplasmas (WEINTRAUB; BEANLAND, 2005; WEINTRAUB; WILSON, 2009).

Tabela 5 - Identificação de cigarrinhas capturadas em áreas de cultivo de brócolis, localizadas na cidade de Bragança Paulista, ano de 2009

Subfamília	Tribo	Gênero	Espécie/ morfotipo (T) ⁽¹⁾
Typhlocybinæ	ND	ND	T1
	ND	ND	T14
Deltocephalinae	Alebrini	<i>Protabebrela</i>	<i>P.brasiliensis</i> (Baker, 1899)
	Athysanini	<i>Atanus</i>	<i>A. nitidus</i> (Linnavuori, 1955)
		<i>Atanus</i>	T9
		<i>Atanus</i>	T28
		<i>Chlorotettix</i>	<i>C.minimus</i> (Baker, 1898)
		<i>Exitianus</i>	<i>E. obscurinervis</i> (Stål, 1859)
	Macrostelini	<i>Balclutha</i>	<i>B.a hebe</i> (Kirkaldi, 1906)
		<i>Dalbulus</i>	<i>D.maidis</i> (DeLong &
	Deltocephalini	<i>Planicephalus</i>	<i>P. flavicosta</i> (Stål, 1860)
		<i>Urenus</i>	<i>U. colonus</i> (Uhler, 1895)
	Scaphytopiini	<i>Scaphytopius</i>	<i>S. fuliginosus</i> (Osborn, 1923)
	Scaphoideini	<i>Osbornellus</i>	<i>O. infuscatus</i> (Linnavuori,
Agalliinae	ND	ND	T2
	ND	ND	T19
	ND	ND	T24
	ND	ND	T30

⁽¹⁾ Espécies identificadas/morfotipos de espécies não identificadas

ND – Não determinado

Figura 16 - Insetos sugadores de floema da família Cicadellidae capturados em área de produção de brócolis. **Subfamília Typhlocybinae**: morfotipos T1(A); e T14(B); *Protalebrella brasiliensis* (C). **Subfamília Deltocephalinae**: *Atanus nitidus* (D); *Atanus* sp. T9 (E); *Atanus* sp. T28 (F) *Chlorotettix minimus* (G); *Exitianus obscurinervis* (H); *Balclutha hebe* (I); *Dalbulus maidis* (J) *Planicephalus flavicosta* (K); *Urenus colonus* (L); *Scaphytopius fuliginosus* (M); *Osbornellus infuscatus* (N). **Subfamília Agalliinae**: morfotipos T2 (O); T4 (P); T19 (Q); T24 (R); e T30 (S)

2.3.3.2 Localização das cigarrinhas na área de análise da doença.

A coleta padronizada em diferentes locais da propriedade revelou que quase a totalidade dos insetos amostrados estava presente nas áreas adjacentes e não no interior da cultura de brócolis. Assim, do total de insetos coletados, 30,28% estavam localizados na área de cultivo de mandioca, a qual estava infestada por plantas daninhas; 25,69% dos insetos foram oriundos da área de pastagem; 22,94% da população foi encontrada área de mata Mta1; 20,18% estavam habitando as áreas de Mta2, localizadas nas proximidades de campos de brócolis ; e apenas 0,91% do total de insetos amostrados estavam localizados no interior de campos de cultivo de

brócolis (Tabela 6, figura 3). Estes resultados indicam claramente que os possíveis vetores de fitoplasma para a cultura desta brássica estão localizados em áreas adjacentes aos campos de cultivo.

Tabela 6 - Quantidade de insetos capturados em diferentes locais adjacentes e dentro de campos de cultivo de brócolis durante o cultivo de inverno da hortaliça (02/07 a 29/08 de 2009) e percentagem de insetos coletados em cada local

Locais de coleta	N	(%)
Campos de cultivo de mandioca	33	30,28
Área de pastagem	28	25,69
Área de mata1*	25	22,94
Área de mata 2*	22	20,18
Campos de cultivo de brócolis	1	0,91
Total	109	100

* Áreas próximas aos blocos de cultivo de brócolis identificados por Mta1 e Mat3 analisados quanto à presença de plantas doentes (Figura 3).

Observações feitas no ano de 2008, em uma área de cultivo comercial de brócolis localizada no município de Sorocaba, revelaram que a maioria das cigarrinhas estava localizada em locais adjacentes à cultura, constituídas por áreas de pastagem e mata e a população de cigarrinhas dentro da área de cultivo somente aumentou no final do ciclo da cultura, quando a mesma se tornou infestada por plantas daninhas, indicando que estas favorecem a permanência dos insetos dentro da área cultivada. No caso da área analisada em Bragança Paulista, não houve aumento da incidência de cigarrinhas dentro da área de cultivo ao longo do tempo, porém o controle de plantas daninhas era rigoroso, além disso, inseticidas eram aplicados quinzenalmente na cultura.

Anteriormente ao presente trabalho, embora nenhum ensaio houvesse sido realizado especificamente para este fim, havia a suspeita de que possíveis vetores de fitoplasmas associados à cultura do repolho e da couve-flor fossem mais abundantes em áreas adjacentes à cultura. Isto em razão da ocorrência de maior incidência da doença justamente nas áreas marginais dos campos cultivados, ou seja, nas proximidades das áreas de mata (MELLO, 2007;

RAPUSSI-DA-SILVA, 2010). O estudo aqui conduzido permitiu confirmar para a cultura do brócolis as observações previamente realizadas para o repolho e a couve-flor, podendo-se possivelmente extrapolar estes resultados para ambas as referidas brássicas.

2.3.3.3 Detecção de fitoplasmas nas cigarrinhas

As análises de PCR, visando à detecção de fitoplasmas, foram realizadas para 13 dos 19 morfotipos descritos anteriormente, pois para seis deles não foram capturados indivíduos em quantidade suficiente. A quantidade de insetos coletados, o total de amostras analisadas para cada morfotipo, assim como o número de insetos por amostra, foi variável em função da frequência de ocorrência do inseto capturado e do seu tamanho, respectivamente (Tabela 7).

Cigarrinhas das espécies *Atanus nitidus*, *Balchuta hebe*, *Planicephalus flaviscosta* e *Scaphytopius fuliginosus* e do morfotipos T1, T2 e T30 estavam infectadas por fitoplasmas, sugerindo que estes insetos poderiam atuar como potenciais vetores destes agentes fitopatogênicos. Isto foi demonstrado principalmente pelos representantes da espécie *Atanus nitidus*, para a qual fitoplasmas foram detectados em 44,5% da população amostrada nos campos (Tabela 7).

Tabela 7 - Detecção de fitoplasmas em espécies e morfotipos de cigarrinhas coletadas em cultivos de brócolis e áreas adjacentes, em Bragança Paulista/SP, no ano de 2009

Espécie/ morfotipo (T) ¹	Nº insetos coletados	Proporção numérica ²	Proporção Porcentual	Insetos/amostra
T1	726	2/58	3,4	10-15
T14	9	0/2	--	3-5
T2	218	2/52	3,8	3-5
T4	10	0/3	--	3
T19	1	--	--	--
T24	2	0/1	--	1
T30	29	1/6	--	3
<i>Balclutha hebe</i>	264	2/56	3,6	5
<i>Planicephalus flavicosta</i>	30	1/15	6,6	1-3
<i>Atanus nitidus</i>	67	12/27	44,4	1-3
<i>Atanus</i> –T9	1	--	--	--
<i>Atanus</i> –T28	1	--	--	--
<i>Chlorotettix minimus</i>	5	0/1	--	1
<i>Exitianus obscurinervis</i>	1	--	--	--
<i>Dalbulus maidis</i>	3	--	--	--
<i>Urenus colonus</i>	11	0/4	--	2
<i>Protalebrella brasiliensis</i>	25	0/5	--	5
<i>Scaphytopius fuliginosis</i>	17	1/4	20	2
<i>Osbornellus infuscatus</i>	2	--	--	--
Total	1423	21/234		

¹ Espécies identificadas / morfotipos de espécies não identificadas² Proporção de insetos portadores de fitoplasmas / número de amostras compostas analisadas

Nota – Sinais convencionais utilizados:

-- não se aplica dado

2.3.3.4 Identificação de fitoplasmas detectados em cigarrinhas por análise de RFLP

A análise de RFLP revelou que dentre as cigarrinhas apontadas como potenciais vetores de fitoplasmas, aquelas pertencentes à espécie *Balclutha hebe* e ao morfotipo T1 foram identificadas como potenciais vectoras de fitoplasmas para a cultura do brócolis por se mostrarem portadoras do mesmo grupo de fitoplasmas encontrados nas amostras de plantas de brócolis. Por outro lado, a maioria das demais cigarrinhas analisadas estava infectada por fitoplasmas dos mesmos grupos de classificação daqueles encontrados em plantas daninhas.

O fitoplasma detectado nas cigarrinhas da espécie *B. hebe* foi identificado, com o uso das enzimas *AluI*, *HhaI*, *HpaII*, *HaeIII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI* e *RsaI*, como pertence ao grupo 16SrI, subgrupo B, por apresentar padrão de RFLP coletivo idêntico àquele observado para o representante típico deste subgrupo, o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho. Fitoplasmas deste mesmo subgrupo foram também reconhecidos em algumas amostras de plantas de brócolis, identificadas por B1, B3 e B4.

Os fitoplasmas caracterizados nos outros seis morfotipos (*A. nitidus*, *P. flavicosta*, *S. fuliginosus*, T1, T2, T30), foram identificados como pertencentes ao grupo 16SrIII. No entanto, como esperado, foram evidenciados diferentes padrões de RFLP coletivos, com o uso das enzimas de restrição *AluI*, *BstUI*, *HinfI*, *HhaI*, *RsaI*, *MseI*, permitindo a identificação de quatro distintos fitoplasmas. Este mesmo tipo de resultado já havia sido obtido previamente para os fitoplasmas identificados nas amostras de brócolis e de plantas daninhas.

Os insetos do morfotipo T1 estavam infectados por fitoplasmas do grupo 16SrIII, cujos padrões de restrição se mostraram idênticos àqueles observados para fitoplasmas identificados nas amostras de brócolis B73 e B76 (Figura 17-E e Figura 6) e nas plantas daninhas *Emilia sonchifolia*, *Erigeron bonariensis*, *Palicourea marcgravii* e *Lepidium virginicum* (Tabela 4)

O fitoplasma detectado no inseto da espécie *P. flavicosta* exibiu o mesmo padrão de restrição coletivo daquele obtido para o fitoplasma associado ao declínio do cinamomo no Brasil (DUARTE et al., 2009) pertencente ao subgrupo 16SrIII-B (Figura 17-A).

Fitoplasmas exibindo perfis de restrição idênticos também foram encontrados em todas as amostras dos cicadelídeos da espécie *Atanus nitidus*. Este fitoplasma que apresentou padrões inéditos de restrição para as enzimas *BstUI* e *HhaI* (Figura 17-B), não havia sido relatado em associação com plantas ou insetos. Em razão da sua alta frequência em insetos da referida espécie (Tabela 7), este fitoplasma foi denominado de fitoplasma do *Atanus* (*Atanus* Phytoplasma-AtaPh). AtaPh também foi detectado nos morfotipos T2 e T30 da subfamília Agalliinae (Figura 15-C e D), porém ocorrendo com baixa frequência (Tabela 7). Além de ser detectado em insetos, este fitoplasma também foi identificado em plantas daninhas das espécies *Ageratum conyzoides*, *Nicandra physalodes*, *Sida rhombifolia* e *Sonchus oleraceae* (Tabela 4)

O fitoplasma associado à cigarrinha *S. fuliginosus* não foi encontrado em nenhum dos outros insetos ou amostras de plantas analisadas e não foi possível classificá-lo dentro dos atuais subgrupos componentes do 16SrIII. Isto se deve ao padrão de restrição gerado pela enzima *HhaI*

distinguir o referido fitoplasma dos demais membros deste grupo conhecidos até o momento (Figura 17-F).

Fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrIII-J 16SrIII-E e 16SrVII não foram identificados nos insetos avaliados no presente estudo, apesar de terem sido encontrados em plantas daninhas presentes na mesma área onde foram coletados os insetos (Tabela 4). Este resultado, no entanto, não pode ser considerado como conclusivo, pois se reconhece a possibilidade de insetos destes táxons poderem abrigar fitoplasmas pertencentes aos referidos grupos se amostragens forem feitas em maior número, durante diferentes épocas do ano.

Figura 17 - Padrões de RFLP dos fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII detectados em seis Cicadelídeos, com o uso das enzimas *AluI*, *BstUI*, *HhaI*, *HinfI*, *MseI*, e *RsaI*. A: fitoplasma identificado em *Planicephalus flavicosta* com padrão de RFLP coletivo idêntico àquele do fitoplasma associado ao declínio do cinamomo (subgrupo 16SrIII-B); B: fitoplasma identificado em *Atanus nitidus* com padrão de RFLP coletivo que designa o fitoplasma do *Atanus* (AtaPh); C e D: fitoplasmas identificados nos morfótipos T2 e T3, respectivamente, com padrão de RFLP idêntico ao do AtaPh; E: fitoplasma identificado no morfotipo T1 com padrão de RFLP idêntico ao dos fitoplasmas identificados em plantas de brócolis (B73 e B76); F: padrão de RFLP identificado na espécie *Scaphytopius fuliginosus*; M: marcador molecular phiX174-*HaeII*

Cigarrinhas da subfamília Typhlocybinæ, embora sejam descartadas em alguns estudos de buscas por vetores de fitoplasmas (PILKINGTON, 2003), pelo fato da maioria das espécies se alimentarem nas células do mesófilo de folhas ou caules jovens das plantas (WEINTRAUB; WILSON, 2009; KLEINJAN et al., 2004), estão envolvidas na disseminação de muitos fitoplasmas. Conforme demonstrado no trabalho de Perez et al. (2002) no qual cigarrinhas da subfamília Typhlocibinæ foram identificadas como vetores de um fitoplasma do grupo 16SrII (*'Candidatus phytoplasma aurantifolia'*) para plantas de mamoeiro, causando a doença denominada de *Bunchy Top Symptoms* BTS em Cuba. Cigarrinhas desta subfamília também foram apontadas como potenciais vetores de fitoplasmas associados às doenças 'stolbur' em videira (BATTLE et al., 2000), amarelo em fruteiras de caroço (PASTORE et al., 2004), vassoura de bruxa em alfafa (KHAN et al., 2003) e declínio em lima (ALHUDAIB et al., 2009).

As cigarrinhas da espécie *Balclutha hebe* já haviam sido recentemente relatadas como possível vetor de fitoplasmas do grupo 16SrXIII em brássicas (RAPUSSI-DA-SILVA, 2010). Além disso, insetos pertencentes ao gênero *Balclutha* são suspeitos de transmitirem a doença conhecida por *purple top* na cultura da batata, devido a sua freqüente ocorrência em campos afetados pela doença (PANTOJA et al., 2009) e pelo fato de que fitoplasmas de quatro grupos distintos foram encontrados nestes insetos através da técnica de PCR (PANTOJA dados não publicados citados por PANTOJA et al., 2009).

Embora não foram encontrados relatos na literatura sobre vetores ou possíveis vetores de fitoplasmas pertencentes ao gênero *Acanthosoma*, eles pertencem à tribo Athysanini, a qual abriga 12 dos 57 vetores confirmados dentro da subfamília Deltocephalinae (WEINTRAUB; WILSON, 2009), o que confirma que estas cigarrinhas podem ser vetores destes organismos, principalmente para as plantas daninhas *Ageratum conyzoides*, *Nicandra physalodes*, *Sida rhombifolia* e *Sonchus oleraceae*, que abrigam o mesmo fitoplasma. As cigarrinhas representadas pelos morfotipos T2 e T30 da subfamília Agalliinae também estavam infectadas pelo AtaPh e, conseqüentemente, podem ser sugeridas como potenciais vetores deste fitoplasmas para as plantas daninhas citadas. Indivíduos desta subfamília são vetores de fitoplasmas importantes, como do grupo 16SrXII em videira na América do Norte (RIEDLE-BAUER, 2008) e na Espanha (BATTLE, 2000).

Cigarrinhas da espécie *Planicephalus flavicosta* são vetoras de fitoplasmas causadores da filodia das palmeiras na Jamaica (DABEK, 1982) e do vírus maize chlorotic dwarf waikavirus na cultura do milho (LOPES et al., 1994), o que demonstra que a espécie tem um hábito alimentar

polífago e, conseqüentemente, pode ser responsável pela disseminação de fitoplasmas em diversas culturas. Embora o fitoplasma do subgrupo 16SrIII-B identificado neste trabalho em indivíduos desta espécie não tenha sido encontrado em plantas daninhas ou de brócolis, ele foi identificado em plantas de mandioca coletadas na mesma área (FLÔRES, 2010), sendo um potencial vetor deste fitoplasma nesta cultura.

O fitoplasma identificado na espécie *Scaphytopius fuliginosus* ainda não foi identificado em nenhuma planta, no entanto, existe relato na literatura sobre a importância desta espécie como vetor de fitoplasmas, o machismo da soja no México (GRANADA, 1979; FLETCHER et al., 1984), o que indica que essa espécie pode estar envolvida na disseminação de fitoplasmas no Brasil. *S. acutus* é outra espécie de cigarrinha pertencente a este gênero já identificada como transmissora de fitoplasmas, transmitindo o fitoplasma que causa a proliferação de brotos da soja nos Estados Unidos (DERRICK; NEWSOM, 1984) e a doença ‘X-disease’ em rosáceas de caroço (Mc CLURE, 1980 citado por PANTOJA et al., 2009).

As cigarrinhas identificadas como possíveis vetores de fitoplasmas em brássicas no Brasil não são as mesmas envolvidas com fitoplasmas que afetam esta família botânica em outras partes do mundo. No Irã, cigarrinhas da espécie *Circulifer tenellus* são responsáveis pela transmissão de fitoplasmas para a cultura do repolho (SALEHI et al., 2007), enquanto que nos Estados Unidos as espécies *Macrosteles fascifrons*, *Scaphytopius irroratus* e *Ceratagallia abrupta* são potenciais vetores de fitoplasmas para esta mesma cultura (LEE et al., 2003). Essa diferença das espécies envolvidas em outros locais com as suspeitas no Brasil, não é inesperada, pois, devido à diversidade de cigarrinhas presentes no Brasil, e as diferenças na composição de espécies e gêneros no País em relação a outras regiões, é provável que os vetores aqui presentes não sejam os mesmos (comunicação pessoal, Lopes, J. R.S., 2008).

Considerando a identificação de fitoplasmas em plantas de brócolis, espécies de daninhas e de insetos, pode-se estabelecer uma relação entre os distintos fitoplasmas encontrados no presente trabalho. Assim, fitoplasmas do grupo 16SrIII foram predominantes nas amostras de brócolis, seguido por representantes do grupo 16SrXIII e por fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrI. O fitoplasma do grupo 16SrI foi identificado como um membro do subgrupo B, porém para os dois fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII e para os dois fitoplasmas caracterizados no grupo 16SrXIII não foram encontradas referências na literatura especializada que permitisse sua classificação. Nas espécies daninhas foram identificados com maior frequência representantes

do grupo 16SrIII e em menor proporção fitoplasma do grupo 16SrVII, subgrupo B. Dentre os afiliados do grupo 16SrIII, foi caracterizado um membro do subgrupo J e quatro fitoplasmas não descritos pelos atuais esquemas de classificação (LEE et al., 1998; WEI et al., 2007). Finalmente, nos insetos foram evidenciados um fitoplasma do grupo 16SrI-B e novamente uma prevalência de fitoplasmas do grupo 16SrIII. Dentro deste último grupo, foram identificados quatro fitoplasmas distintos dos fitoplasmas conhecidos até o momento. Em relação aos fitoplasmas detectados no presente trabalho e classificados no grupo 16SrIII, um determinado fitoplasma, dentre aqueles não relatados pela literatura, estava presente nas amostras de brócolis, daninhas e de insetos. Ainda, dois determinados fitoplasmas, para os quais não se encontrou referência, foram identificados tanto em amostras de espécies daninhas como de insetos. No entanto, um dos fitoplasmas, dentre os quatro não relatados pelos esquemas de classificação encontrados em insetos, não apareceu nas amostras de brócolis e de plantas daninhas. Fitoplasmas do subgrupo 16SrIII-J detectados em uma planta daninha não foram evidenciados nas amostras de brócolis e de insetos analisadas, porém foram identificados em associação com o enfezamento do repolho e do brócolis, em estudos conduzidos anteriormente (MELLO, 2007; RAPUSSI-DA-SILVA, 2010).

2.3.4 Análise epidemiológica da doença

2.3.4.1 Análise temporal

As primeiras plantas doentes não foram observadas antes de 30 DAT (dias após transplante) nos ensaio 1 e 2. Esta observação permite inferir o possível período de incubação da doença, como no trabalho de Beanland, Noble e Wolf (2006) no qual a análise temporal do amarelo da videira (*Vitis vinifera* L.) na América do Norte indicou que o período de incubação da doença é de um ano, pelo fato dos sintomas da doença não aparecerem antes deste período em plantas de videiras novas. De forma semelhante, pode-se sugerir que o período de incubação do enfezamento do brócolis seja de, no mínimo, 30 dias, uma vez que, de acordo com a distribuição espacial da doença, que será mostrada no item 2.3.4.2, foi descartada a possibilidade da doença ter sido introduzida por mudas contaminadas.

No ensaio 1 a incidência final da doença variou de 0,4 a 11,8%, dentre as parcelas avaliadas, enquanto no ensaio 2, variou de 1,6 a 3,6% (Figuras 18 e 19). Nas parcelas F, G e H

do ensaio 1 e O do ensaio 2, localizadas próximas a áreas de mata, pastagem ou mandioca, verifica-se um maior incremento da doença em relação as demais parcelas do ensaio. As análises epidemiológicas, principalmente as espaciais, as quais serão discutidas em seguida, ajudarão a esclarecer esta observação.

Devido às poucas avaliações nas quais plantas doentes foram observadas, fica inviável submeter os dados a análises epidemiológicas, nas quais se buscaria um modelo que representasse o progresso temporal da epidemia. Se realizadas, tais análises poderiam fornecer resultados que extrapolasse a realidade da epidemia em campo. Por outro lado, ao se analisar, de um modo geral, as curvas de progresso da doença (Figuras 18 e 19), verifica-se que o progresso temporal da doença apresentou uma tendência linear, sugerindo que o incremento da doença é dependente de fontes de inóculo externas, neste caso, do influxo constante de vetores infectivos de fora para dentro do campo de cultivo.

Figura 18 - Curvas de progresso da doença nas parcelas E, F, G, H, I e J do ensaio 1 (02/06/2009 a 01/08/2009) conduzido em campo de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP. *Incidência final

Figura 19 - Curvas de progresso da doença nas parcelas M, N e O do ensaio 2 (10/06/2009 a 29/08/2009) conduzido em campo de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP. *Incidência final

2.3.4.2 Análise espacial

Uma simples observação dos mapas apresentados a seguir (Figuras 20 e 21) nos permite afirmar que a doença, nas diferentes parcelas de um mesmo ensaio, apresenta padrões distintos de dispersão, o que também foi observado entre as parcelas dos diferentes ensaios. Isto reforça a importância do monitoramento da doença considerando o progresso espacial da epidemia. O conhecimento da ocorrência diferencial do progresso da epidemia em pontos distintos de um mesmo campo de cultivo permite a adoção de estratégias de manejo diferenciadas e apropriadas para cada ponto. Isto tende a ter uma maior relevância, ao se tratar de cultivos em grandes áreas.

Figura 20 - Mapas de distribuição espacial de plantas de brócolis doentes observadas na última avaliação nas parcelas D, E, I, J, F, G e H do ensaio 1 (02/06/2009 a 01/08/2009) conduzido em campo de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP. *Incidência final

Figura 21 - Mapas de distribuição espacial de plantas de brócolis doentes observadas na última avaliação nas parcelas M, N e O do ensaio 2 (10/06/2009 a 29/08/2009) conduzido em campo de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP. *Incidência final

2.3.4.2.1 Índice de dispersão

Os valores do índice de dispersão (D) variaram de acordo com a parcela e o tamanho do *quadrat* (Tabela 8). Valores de D estatisticamente superiores a 1 foram considerados como indicativo de agregação de plantas doentes ($p < 0,05$). Os valores que não diferiram estatisticamente de 1 foram interpretados como indicativo de casualidade ($p < 0,05$).

No ensaio 1, valores de D estatisticamente superior a 1 ($p < 0,05$) foram observados com os *quadrats* de tamanho 5X5 e 4X4, indicando uma agregação de plantas doentes (Tabela 8). A agregação foi observada apenas nas parcelas H e F, as quais estavam dispostas nas bordas do campo de cultivo de brócolis e apresentaram maiores incidência da doença (Tabela 8, Figura 17).

Segundo Burdon (1987 apud SILVA, 2001), um padrão agregado de plantas doentes pode ser caracteristicamente associado a uma fonte de inóculo próxima a população de plantas hospedeiras. Assim, a agregação observada nas parcelas localizadas nas bordas dos campos de cultivo de brócolis, sugere uma proximidade da fonte de inóculo. No entanto, a grande incógnita em trabalhos epidemiológicos é saber qual a fonte de inóculo. Neste trabalho, a busca por avanços no conhecimento sobre a epidemiologia das doenças associadas à fitoplasmas no Brasil, conhecimento este que foi iniciado por Mello (2007) e Rappussi-da-Silva (2010), levou à investigação da possível fonte de inóculo da doença. Segundo o trabalho dos autores citados, o fitoplasma pode estar sendo introduzido nas áreas de cultivo a partir de áreas de mata através de insetos vetores que ali se abrigam

Como apresentado na figura 3, as parcelas H, G e F se encontravam próximas à um mandiocal, uma área de mata e uma área de pastagem, respectivamente. No campo de mandioca localizado próximo a estas parcelas, Flôres (2010) identificou um fitoplasma do grupo 16SrIII, subgrupo B associados com as plantas desta espécie. No entanto, este fitoplasma não foi encontrado infectando plantas de brócolis nos ensaios realizados. Por outro lado, um fitoplasma do grupo 16SrIII, identificado em associação com plantas de brócolis, foi também identificado em plantas daninhas coletadas no mandiocal, nas áreas de mata e na pastagem, onde também um considerável número de cigarrinhas foi constatado (Tabela 6). O mandiocal, a mata e a pastagem, provavelmente atuaram como fonte de insetos, os quais possivelmente adquiriram o fitoplasma em plantas daninhas. Assim, plantas daninhas teriam atuado como fonte de inóculo, externa e primária, de fitoplasmas para os campos de cultivo de brócolis. Isto estaria de acordo com os resultados apresentados anteriormente no progresso temporal da doença, onde o formato das

curvas foi um indicativo de que o progresso da doença estaria associado com um influxo de insetos vetores infectivos aos campos de cultivo de brócolis.

No ensaio 2, nenhuma das parcelas apresentou valores de D estatisticamente superior a 1 ($p>0,05$), indicando a aleatoriedade das plantas doentes (Tabela 8). O fato de nenhuma parcela ter apresentado uma agregação de plantas doentes pode ser atribuído a baixa incidência da doença. A baixa incidência foi, possivelmente, resultado da ausência de uma vegetação passível de atuar como fonte de inóculo nas proximidades das parcelas M e N. No caso da parcela O, a incidência, embora baixa, foi maior que aquela observada nas parcelas M e N, provavelmente devido à sua proximidade a uma pequena área de mata que abrigava cigarrinhas e plantas daninhas (Figura 3, Tabelas 6 e 8).

Tabela 8 - Incidência (%) e índice de dispersão (D) da doença para os *quadrats* 2x2, 3x3, 4x4 e 5x5 em ensaios conduzidos em campos de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP

Ensaio	Parcela	Incidência ⁽¹⁾	Índice de dispersão (D) ⁽²⁾			
			<i>Quadrat</i>			
			2X2	3x3	4x4	5x5
1 ⁽³⁾	D	1,0	0,98	0,94	0,87	0,83
	E	1,2	0,97	0,94	0,87	0,94
	F	11,8	1,26	1,62	1,12	2,91*
	G	3,8	1,10	1,09	1,27	1,22
	H	4,8	1,46	1,59	1,72*	1,67*
	I	1,4	0,96	1,47	1,36	0,83
	J	0,4	0,99	1,00	1,00	0,94
2 ⁽⁴⁾	M	2,2	1,12	1,18	1,24	0,54
	N	1,6	1,31	1,25	1,14	1,07
	O	3,6	0,89	0,97	1,22	0,73

⁽¹⁾ Incidência da doença na última avaliação

⁽²⁾ Valores de D significativamente maiores que 1(*), pelo teste Qui-quadrado ($p<0,05$)

⁽³⁾ Ensaio realizado de 02/06/2009 a 01/08/2009

⁽⁴⁾ Ensaio realizado de 10/06/2009 a 29/08/2009

2.3.4.2.2 Ajuste à lei de Taylor modificada

A relação entre $\log(V_{\text{obs}})$ e $\log(V_{\text{bin}})$ foi significativa ($p < 0,05$) em todos os casos (Tabela 9). O coeficiente de determinação foi acima de 0,96 (Tabela 9) e nenhum padrão de resíduos foi verificado (dados não apresentados).

Tabela 9 - Valores dos parâmetros b e $\log(A)$ da lei de Taylor modificada para os *quadrats* 2x2, 3x3, 4x4 e 5x5 em ensaios conduzidos em campos de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP

<i>Quadrat</i>	$b^{(3)}$	DP ⁽¹⁾	$\log(A)^{(3)}$	DP ⁽¹⁾	R ² ⁽²⁾
2X2	1,07*	0,03	0,23	0,08	0,98
3X3	1,13*	0,04	0,45*	0,12	0,98
4X4	1,15*	0,04	0,54*	0,13	0,98
5X5	1,26*	0,07	0,94*	0,23	0,96

⁽¹⁾Desvio padrão de cada variável

⁽²⁾Coeficiente de determinação da relação entre $\log(V_{\text{obs}})$ e $\log(V_{\text{bin}})$ ⁽³⁾Valores significativamente diferentes de 1(*) para b e de 0 (*) para $\log(A)$, pelo teste t ($p < 0,05$)

Para todos os tamanhos de *quadrats* os valores de b foram estatisticamente superiores a 1 ($p < 0,05$) indicando a ocorrência de um padrão agregado da doença. Com exceção do *quadrat* 2x2, todos os outros apresentaram valores de $\log(A)$ estatisticamente superiores a 0 ($p < 0,05$) indicando que a agregação observada varia de acordo com a incidência e consequentemente ao longo do tempo. A tendência de agregação ao longo do tempo é comum para a maioria das doenças de plantas (GOTTWALD et al., 1996).

Na Figura 22 são mostradas as relações entre $\log(V_{\text{obs}})$ e $\log(V_{\text{bin}})$ obtidas com os dados agrupados dos ensaios 1 e 2, e referentes a cada tamanho de *quadrat*. A inclinação da reta, a qual é representada pelo parâmetro b , indica um afastamento da aleatoriedade e consequentemente, confirma a agregação pontual [$b > 1$, ($p < 0,05$)] anteriormente, obtida com o índice de dispersão.

Figura 22 - Aplicação da lei de Taylor modificada. Relação entre $\log(V_{obs})$ e $\log(V_{bin})$ para os *quadrats* 2x2, 3x3, 4x4 e 5x5 em ensaios conduzidos em campos de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP

O parâmetro b da lei de Taylor é considerado como sendo uma propriedade intrínseca do comportamento típico de um determinado organismo. Especificamente em estudos epidemiológicos de doenças de plantas, o parâmetro b pode caracterizar o comportamento de um vetor, de um patógeno e/ou de uma doença (TAYLOR, 1961). Desse modo, para doenças que possuem um inseto como vetor, como as associadas à fitoplasmas, o parâmetro b obtido reflete propriedades biológicas do inseto vetor envolvido na disseminação da doença. Assim, quando as doenças transmitidas por vetores apresentarem valores de b semelhantes, há uma indicação de que os patógenos que as causam possuem o mesmo vetor, ou mesmo vetores distintos, que apresentam um comportamento similar, principalmente no que se refere a dinâmica de vôo, preferência alimentar e reprodução. Na tabela 10, pode-se observar diferentes doenças e seus respectivos valores de b . Verifica-se que os valores de b obtido neste trabalho para o *quadrat* 3x3, é semelhante ao obtidos por Mello (2007) e Rappussi-da-Silva (2010) nas culturas do repolho e couve-flor, associadas à fitoplasmas. Isto nos permite inferir que estas doenças

compartilham o mesmo vetor ou grupo de vetores. Inferência esta, que é fortalecida ao verificarmos que elas estão associadas à fitoplasmas dos mesmos grupos, os quais podem ter como vetores, algumas das espécies de cigarrinhas identificadas neste trabalho (Tabela 5) e a espécie *Exitianus obscurinervis*, como relatado por Rapussi-da-Silva (2010).

Tabela 10 - Parâmetros b e $\log(A)$ da lei de Taylor modificada e R^2 calculados para o *quadrat* 3x3 de doenças associadas à fitoplasmas em diferentes culturas

Cultura	Patógeno	Vetor	b	$\log(A)$	Referência
Brócolis	Fitoplasmas	Cicadelídeo	1,13	0,45	Presente trabalho
Repolho	Fitoplasmas	Cicadelídeo	1,18	0,44	MELLO (2007)
Couve-flor	Fitoplasmas	Cicadelídeo	1,18	0,44	RAPUSSI-DA-SILVA (2010)

2.3.4.2.3 Áreas isopatas

Como pode ser observado nas áreas isópatas (Figura 23), há uma maior intensidade da doença nas delimitações das parcelas dos dois ensaios realizados. Verifica-se também, um gradiente decrescente da intensidade da doença em direção ao centro das parcelas estando de acordo com o observado por Mello (2007) e Rappussi-da-Silva (2010). Desse modo, isto fortalece a posposta da fonte de inoculo externa, sendo estas, plantas daninhas infectadas.

Figura 23 - Áreas isópatas referentes a última avaliação nas parcelas D, E, I, J, F, G e H do ensaio 1(02/06/2009 a 01/08/2009) conduzido em campo de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP

Figura 24 - Áreas isópatas referentes a última avaliação nas parcelas M, N e O do ensaio 2 (10/06/2009 a 29/08/2009) conduzido em campo de cultivo de brócolis, em Bragança Paulista-SP

Vários são os indicativos de que os fitoplasmas são introduzidos nos campos de brócolis a partir de fontes externas de inóculo. Os resultados das análises espacial e temporal da doença, mostram que uma maior intensidade da doença ocorre nas parcelas próximas a áreas adjacentes aos campos de cultivo; as cigarrinhas e plantas daninhas são abundantes nas áreas ao redor do cultivo e ausentes no interior da cultura; e, várias das espécies de cigarrinhas coletadas, inclusive aquelas portadoras de fitoplasmas, não colonizam plantas de brócolis (Eckstein, 2009, dados não mostrados). Este último indicativo, ainda sugere que não ocorreu a disseminação secundária do patógeno, ou seja, plantas de brócolis infectadas não atuaram como fonte de inóculo para outras na mesma época de cultivo, o que, em primeiro instante, não condiz com a agregação da doença observada. No entanto, a agregação de plantas de brócolis doentes pode estar relacionada à movimentação de cigarrinhas. As cigarrinhas migram para a cultura, alimentam-se de poucas plantas adjacentes, preferencialmente as localizadas na periferia dos campos, deixando a cultura imediatamente. Isto tem sido observado em outros patossistemas envolvendo fitoplasmas (BEANLAND et al., 2005, 2006).

3 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, foi concluído:

Fitoplasmas do grupo 16SrI, subgrupo B e dos grupos 16SrIII e 16SrXIII estavam associados às plantas de brócolis com sintomas de enfezamento, com predominância de representantes do grupo 16SrIII.

As plantas daninhas das espécies *Emilia sonchifolia* (falsa serralha), *Erigeron bonariensis* (buva), *Lepidium virginicum* (mentruz) e *Paulicourea marcgravii* (erva-de-rato) são potenciais hospedeiras de fitoplasmas associados ao enfezamento do brócolis.

A cigarrinha da espécie *Balclutha hebe* da subfamília Deltocephalinae e uma representante da subfamília Typhlocybinæ, não identificada quanto à espécie, são potenciais vetores de fitoplasmas para a cultura do brócolis.

As plantas doentes de brócolis apresentavam distribuição espacial agregada e a maior intensidade da doença ocorre nos bordos do campo de cultivo.

REFERÊNCIAS

- ALHUDAIB, K.; AROCHA, Y.; WILSON, M.; JONES, P. Molecular identification, potential vectors and alternative hosts of the phytoplasma associated with a lime decline disease in Saudi Arabia. **Crop Protection**, Guildford, v. 28, p. 13-18, 2009.
- AMARAL MELLO, A.P.O. **Identificação molecular de um fitoplasma associado ao enfezamento do tomateiro (*Lycopersicum sculentum* L.) e da berinjela (*Solanum melongena* L.)**. 2003. 52 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- _____. **Identificação de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença**. 2007. 64 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- ANGELI, E.; CLAIR, D.; BORGO, M.; BERTACCINI, A.; BOUDON-PADIEU, E. Flavescence doree in France and Italy – occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinade grapevine yellows and an alder yellow phytoplasma. **Vitis**, Landau, v. 40, p. 79-86, 2001.
- ARNAUD, G.; MAHER, M.; SALAR, P.; BONNET, P.; MAIXNER, M.; MARCONE, C.; BOUDON-PADIEU, E.; FOISSAC, X. Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct flavescence doree phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, p. 4001-4010, 2007.
- ARROCHA, Y.; LÓPEZ, M.; PIÑOL, B.; FERNANDEZ, M.; PICORNELL, B.; ALMEIDA, R.; PALENZUELA, I.; WILSON, M.R.; JONES, P. ‘*Candidatus Phytoplasma graminis*’ and ‘*Candidatus Phytoplasma caricae*’, two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 2451-2463, 2005.
- BAI, X.; ZHANG, J.; EWING, A.; MILLER, S.A.; RADEK, A.J.; SCHEVCHENKO, D.V.; TSUKERMAN, K.; WALUNAS, T.; LAPIDUS, A.; CAMPBELL, J.W.; HOGENHOUT, S. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 188, n. 10, p. 3682-2696, 2006.
- BARBOSA, F.F.L. **Epidemiologia da clorose variegada dos citros no Estado de São Paulo**. 2002. 158 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- BARBOSA, J.C. **Epidemiologia de begomoviroses em tomateiro em condições de campo e de cultivo protegido**. 1997. 109 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

BARROS, T.S.L.; DAVIS, R.E.; RESENDE, R.O.; DALLY, E.L. Erigeron Witche's 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, n. 10, p. 1142-1148, 2002.

BATTLE, A.; MARTINEZ, A.; LAVIÑA, A. Occurrence, distribution and epidemiology of Grapevine Yellows in Spain. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, p. 811-816, 2000.

BEANLAND, L.; NOBLE, R.; WOLF, T.K. Spatial and temporal distribution on North American grapevine yellows diseases and of potential vectors of the causal phytoplasma in Virginia. **Environmental Entomology**, College Park, v. 35, n. 2, p. 332-344, 2006.

BEANLAND, L.; MADDEN, C.W.; HOY, S.A.; MILLER, S.A.; NAULT, L.R. Temporal distribution of aster leafhopper sex ratios and spatial pattern os aster yellows phytoplasma disease in lettuce. **Annals of Entomology Society of America**. Lexington, v. 98, p. 756-762, 2005.

BEANLAND, L.; WOLF. **Ecology of potential vectors of North American Grapevine Yellows**. Disponível em < fpath.cas.psu.edu/FIELD_DAY/2004/ Grapevine%20yellows.ppt>. Acesso em: 03 jul. 2010

BERGAMIN FILHO, A. Curvas de progresso da doença. In: KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronomica Ceres, 1995. cap. 30, p. 902-926.

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

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

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. The mode of phage libertation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 62, p. 293-300, 1951.

BOSCO, D.; D'AMELIO, R. Transmission specificity and competition of multiple phytoplasmas in the insect vector. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. **Phytoplasmas, genomes, plant hosts and vectors**. Oxon: CABI, 2009. chap.16, p.293-308.

CONSTABLE, F.E. Phytoplasma epidemiology: grapevine as a model. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. **Phytoplasmas, genomes, plant hosts and vectors**. Oxon: CABI, 2009. chap. 11, p. 188-212.

DABEK, A.J. Transmission experiments on coconut lethal yellowing disease with *Deltoccephalus flavicosta* Stål, a leafhopper vector of periwinkle phyllody in Jamaica. **Journal of Phytopathology**, Berlin,v. 103, p. 103-109, 1982.

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

DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; GUNDERSEN, D.E.; LEE, I-M.; HANILI, N. 'Candidatus phytoplasma australiense,' a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 47, p. 262-269, 1997.

DELLA VECCHIA, M.G.S. **Dinâmica espacial e temporal da begomovirose causada por Tomato yellow vein streak vírus em tomateiro na região de Campinas-SP**. 2006. 91 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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

DERRICK, K.S.; NEWSOM, L.D. Occurrence of a leafhopper-transmitted disease of soybeans in Louisiana. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 68, p. 343-344, 1984.

DOUGLAS, S.M. Detection of mycoplasma-like organisms in peach and chokecherry with X-disease by fluorescence microscopy. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, p. 784-787, 1986.

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, V.; SILVA, E.G.; HASS, I.C.R.; BEDENDO, I.P.; KITAJIMA, E.W. First report of a group 16SrIII-B phytoplasma associated with decline of China Tree in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n. 6, p. 666, 2009.

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

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. Disponível em <http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Flavescence_doree/PHYPP64_ds.pdf>. Acesso em: 05 jul. 2010.

FLETCHER, J.; IRWIN, M.E.; BRADFUTE, O.E.; GRANADA, G.A. Discovery of a Mycoplasma-like Organism Associated with Diseased Soybeans in Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 68, n. 11, p. 994-996, 1984.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrinual 2009**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2009. 329-383 p.

GOTTWALD, T.R.; CAMBRA, M.; MORENO, P.; CAMARASA, E.; PIQUER, J. Spatial and temporal analysis of citrus tristeza in eastern Spain. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 45-55, 1996.

GRANADA, G.A. Machismo disease of soybeans I: Symptomatology and transmission. **Plant Disease Reports**, Saint Paul, v. 63, p. 47-50, 1979.

GRIFFITHS, H.M.; SINCLAIR, W.A.; SMART, C.D.; DAVIS, R.E. The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches'-broom: '*Candidatus phytoplasma fraxini*'. **International of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 49, p. 144-151, 1999.

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

GUNDERSEN, D.E.; LEE, I-M.; CHANG, C.; DAVIS, R.E. RFLP analysis of ribosomal protein genes reveal strain diversity in MLO 16S rRNA groups I and III. **Phytopathology**, Reading, v. 84, p. 1128-1132, 1994.

GUTHRIE, J.N.; WHITE, D.T.; WALSH, K.B.; SCOTT, P.T. Epidemiology of phytoplasma-associated papaya diseases in Queensland, Australia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 10, p. 1107-1111, 1998.

FLÔRES, D. **Caracterização molecular e análise filogenética do fitoplasma da mandioca (*Manihot esculenta* L.) no Estado de São Paulo**. 2009. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, New York, v. 41, p. 95-98, 1999.

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

HARRISON, N.A.; BOA, E.; CARPIO, M.L. Characterization of phytoplasmas detected in Chinaberry trees with symptoms of leaf yellowing and decline in Bolivia. **Plant Pathology**, San Diego, n. 52, p. 147-157, 2003.

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

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

HUGHES, G.; MADDEN, L.V. Aggregation and incidence of disease. **Plant Pathology**, London, v. 41, p. 657-660, 1992.

IRPCM PHYTOPLASMA/ SPIROPLASMA WORKING TEAM – PHYTOPLASMA TAXONOMY GROUP. '*Candidatus phytoplasma*', a taxon for the wall-less, non helical

prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic Microbiology*, Reading, v. 54, p. 1243-1255, 2004 .

JOMANTIENE, R.; DAVIS, R.E.; MAAS, J.; DALLY, E.L. Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene operon sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, n. 48, p. 269–77, 1998.

JOMANTIENE, R.; DAVIS, R.E.; VALIUNAS, D.; ALMINAITE, A. New group 16SrIII phytoplasma lineages in Lithuania exhibit rRNA interoperon sequence heterogeneity. **European Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 108, n. 6, p. 507-517, 2002.

JUNG, H.Y.; SAWAYANAGI, T.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; MIYATA, S.; OSHIMA, K.; UGAKI, M.; LEE, J.T.; HIBI, T.; NAMBA, S. '*Candidatus phytoplasma castaneae*', a novel phytoplasma taxon associated with chestnut witches' broom disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, p. 1543-1549, 2002.

JUNG, H.Y.; SAWAYANAGI, T.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; WEI, W.; OSHIMA, K.; MIYATA, S.; UGAKI, M.; HIBI, T.; NAMBA, S. '*Candidatus phytoplasma ziziphi*', a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches'-broom disease, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1037-1041, 2003a.

JUNG, H.Y.; SAWAYANAGI, T.; WONGKAEW, T.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; WEI, W.; OSHIMA, K.; MIYATA, S.; UGAKI, M.; HIBI, T.; NAMBA, S. '*Candidatus Phytoplasma oryzae*', a novel phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1925-1929, 2003b.

KAWAKITA, H.; SAIKI, T.; WEI, W.; MITSUHASHI, W.; WATANABE, K.; SATO, M. Identification of Mulberry dwarf phytoplasma in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 8, p. 909-914, 2000.

KHAN, A.; BOTTI, S.; AL-SUBHI, A.; ZAIDI, M.; ALTOSAAR, L.; ALMA, A. Molecular characterization of the 16S rRNA gene of phytoplasmas detected in two leafhopper species associated with alfalfa plants infected with witches's broom in Oman. **Phytopathologica Mediterranea**, Bologna, v. 42, p. 257-267, 2003

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

KLEINJAN, C.A.; EDWARDS, P.B.; HOFFMANN, J.H. Impacto foliage feeding by *Zygina* sp. On tuber biomass and reproduction of *Asparagus asparagoides* (L.): relevance to biological control in Australia. **Biological Control**, Edinburgh, v. 30, p. 36-41, 2004.

LEBSKY, V.; POGHOSYAN, A. Phytoplasma associated diseases in tomato and pepper in the state of BCS, México: a brief overview. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 131-132, 2007.

LEE, I-M.; DAVIS, R.E.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Phytoplasma: phythopatogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, Washington, v. 54, p. 221-252, 2000.

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

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

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

LEE, I.M.; GUNDERSEM, 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 diseases. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1037-1048, 2004b.

LEE, I-M.; MARTINI, M.; BOTTLNER, 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.

LOPEZ, J.R.S.; NAUL, L.R.; GINGERY, R.E. Leafhopper transmission and host plant range of Maize chlorotic dwarf waikavirus strains. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 876-882, 1994.

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

MADDEN, L.V.; HUGHES, G. Plant disease incidence: distributions, heterogeneity, and temporal analysis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 529-564, 1995.

MAIXNER, M. Phytoplasma epidemiological systems with multiple plant hosts. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. **Phytoplasmas, genomes, plant hosts and vectors**. Oxon: CABI, 2009. chap. 12, p. 213-232.

MARCONE, C.; SCHNEIDER, B.; SEEMÜLLER, E. ‘*Candidatus Phytoplasma cynodontis*’, the phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease, **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1077-1082, 2004b.

MARCONE, C.; GIBB, K.B.; STRETEN, C.; SCHNEIDER, B. ‘*Candidatus Phytoplasma spartii*’, ‘*Candidatus Phytoplasma rhamni*’ and ‘*Candidatus Phytoplasma allocasuarinae*’, respectively associated with spartium witches’-broom, buckthorn witches’-broom and allocasuarina yellows diseases. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1025-1029, 2004.

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

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

MELO, L.A.; VENTURA, J.A.; COSTA, H.; BEDENDO, I.P. Fitoplasmas do grupo 16SrXIII associados a plantas de mamão com a anomalia conhecida por vira-cabeça. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. S214-S214, 2007.

MENEGUZZI, N.G.; TORRES, L.E.; GALDEANO, E.; GUZMÁN, F.A.; NOME, S.F, CONCI, L.R. Molecular characterization of a phytoplasma of the ash yellows group (16Sr VII-B) occurring in *Artemisia annua* and *Conyza bonariensis* weeds. **Agriscientia**, Córdoba, v. 25, n. 1, p. 7-15, 2008.

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

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

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

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

OLIVEIRA, C.M. **Variação morfológica entre populações de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae) de algumas localidades do Brasil**. 1996. 69 p. Tese (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M.; SOUZA, I.R.P.; MAGALHÃES, P.C.; CRUZ, I. Enfezamentos em milho: expressão de sintomas foliares, detecção dos mollicutes e interações com genótipos. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 1, p. 53-62, 2002.

OLIVIER, C.Y.; LOWERY, D.T.; STOBBS, L.W. Phytoplasma diseases and their relationships with insect and plant hosts in Canadian horticultural and field crops. **Canadian Entomology**, Ottawa, v. 141, p. 425-462, 2009.

OLIVIER, C.Y.; SÉGUIN-SWARTZ, G.; HEGEDUS, D. First report of “*Candidatus Phytoplasma asteris*”- related strains in *Brassica rapa* in Saskatchewan, Canada. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 6, p. 832, 2006.

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

PALERMO, S.; ARZONE, A.; BOSCO, D. Vector-pathogen-host plant relationships of chrysanthemum yellows (CY) phytoplasma and the vector leafhoppers *Macrostelus quadripunctulatus* and *Euscelidius variegatus*. **Entomologia Experimentalis Applicata**, Edinburgh, v. 99, p. 347-354, 2001

PANTOJA, A.; HAGERTY, A.M.; EMMERT, S.Y.; MUNYANEZA, J.E. Leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) associated with potatoes in Alaska: species composition, seasonal abundance, and potential phytoplasma vectors. **American Journal of Potato Research**, New York, v. 86, p. 68-75, 2009.

PASTORE, M.; RAFFONE, E.; SANTONASTASO, M.; PRIORE, M. PALTRINIERE, S.; BERTACCINI, A.; SIMEONE, A.M. Phytoplasma detection in *Empoasca* spp. and their possible role as vectors of European stone fruit yellows (16SrX-B) phytoplasma. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 1, p. 657, 2004. Apresentado no INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF TEMPERATE FRUIT CROPS, 2004, Valencia.

PÉREZ, K.A.; PIÑOL, B.; ROSETES, T.A.; WILSONS, M.; BOA, E.; LUCAS, J. Transmissions of the phytoplasma associated with bunchy top symptom of Papaya by *Empoasca papayae* Oman. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 3, p. 1-3, 2009. doi: 10.1111/j.1439-0434.2009.01590.x 2009.

PILKINGTON, L.J. **Austrain Lucerne Yellows: pathogen, vector and control**. 2003. 193p. Thesis (PhD in Phytopathology) - Universidade de Sydney, Sydney, 2003.

RAGOZZINO, M.C. Detection of phytoplasmas in *Brassica* spp. In southern Italy and their characterization by RFLP. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Sonderheft, v. 102, p. 449-460, 1995.

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

RIEDLE-BAUER, M.; SARA, A.; REGNER, F. Transmission of a Stolbur Phytoplasma by the Agalliinae leafhopper *Anaceratagallia ribauti* (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae). **Journal of Phytothatology**, Berlin, v. 156, p. 687-690, 2008

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

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

SCHNEIDER, B.; TORRES, E.; MARTIN, M.P.; SCHRODER, M.; BEHNKE, H.D.; SEEMÜLLER, E. '*Candidatus* Phytoplasma pini', a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 303-307, 2005

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

SILVA, J.N.; MICHERREF, S.J.; RIBEIRO, G.P. ANDRADE, G.P. Arranjo espacial do vira-cabeça do fumo em Arapiraca, Estado de Alagoas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 721-725, 2001.

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 primer based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2988-2993, 1996.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Molecular evolutionary analysis (MEGA) version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p.1596-1599, 2007.

TAYLOR, L.R. Aggregation, variance and mean. **Nature**. London, v. 189, p. 723, 735, 1961

THÉBAUT, G.; YVON M.; ALARY, R.; SAUVION, N.; LABONNE, G. Efficient transmission of '*Candidatus* *Phytoplasma prunorum*' is delayed by eight months due to a long latency in its host-alternating vector. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 3, p. 265-273, 2009.

TOGAWA, R.C.; BRIGIDO, M.M. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOINFORMATICS AND COMPUTATIONAL BIOLOGY, Ribeirão Preto, 2003. **Proceedings...** Ribeirão Preto: USP, 2003. Abstract 10.44

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

VERDIN, E.; SALAR, P.; DANET, J.L.; CHOUEIRI, E.; JREIJIRI, F.; ZAMMAR, S.; GELIE, B.; BOVE, J.M.; GARNIER, M. '*Candidatus phytoplasma phoenicium*' sp. nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, n. 833-838, 2003.

VIDAL, C.A.; LARANJEIRA, F.F.; NASCIMENTO, A.S.; HABIBE, T.C. Distribuição espacial da meleira do mamoeiro em zonas de trópico úmido e trópico semi-árido. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 276-281, 2004.

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

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

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

WEINTRAUB, P.G.; BEANLAND, L. Insect vectors of phytoplasmas. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.59, p. 91-111, 2006.

WEINTRAUB, P.G.; WILSON, M.R. Control of phytoplasma diseases and vectors. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. **Phytoplasmas, genomes, plant hosts and vectors**. Oxon: CABI, 2009. chap. 13, p. 233-249.

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

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. Englewood Cliffs. Hardcover, 1996. 620 p.

ZHAO, Y.; WEI, W.; LEE, I-M.; SHAO, J.; SUO, X.; DAVIS, R.E. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 2582-2593, 2009.

ZREIK, L.; CARLE, P.; BOVE, J.M.; GARNIER, M. Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches' broom disease of lime and proposition of a Candidatus taxon for the organism, '*Candidatus phytoplasma aurantifolia*'. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 45, p. 449–453, 1995.