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

**Identificação molecular de fitoplasmas associados ao enfezamento do
repolho e análise epidemiológica da doença**

Ana Paula de Oliveira Amaral Mello

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

Piracicaba

2007

Ana Paula de Oliveira Amaral Mello
Engenheiro Agrônomo

**Identificação molecular de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e
análise epidemiológica da doença**

Orientador:
Prof. Dr. IVAN PAULO BEDENDO

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

Piracicaba
2007

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

Mello, Ana Paula de Oliveira Amaral

Identificação molecular de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença / Ana Paula de Oliveira Amaral Mello. - - Piracicaba, 2007.

64 p. : il.

Tese (Doutorado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Enfezamento (doenças de planta) 2. Fitoplasmas 3. Marcador molecular 4. Mollicutes 5. Repolho I. Título

CDD 635.34

"Esse é o caminho mais belo que uma teoria física pode assumir: quando ela abre caminho para uma teoria mais ampla, sem perder seu caráter individual."

(Albert Einstein)

Ao meu pai Toninho (sempre presente) que de onde está continua olhando por nós e à minha mãe Maria Irene, a melhor mãe que alguém pode ter, por todo amor, carinho, apoio e pelas oportunidades que me deram na vida

DEDICO

Aos meus irmãos Juliana, Luís Gustavo e Ana Raquel e à tia Ia, por todo amor e apoio em todos os momentos

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus por me ensinar a valorizar cada momento na vida, por me permitir concluir mais uma etapa e por ter me dado a família que tenho;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pelos conhecimentos adquiridos e pela oportunidade de conviver com professores de alto nível técnico-científico;

Ao Prof. Ivan Paulo Bedendo, pela orientação desta tese, pela confiança, compreensão e paciência nesses anos todos e por mais esta contribuição em minha formação como pesquisadora;

À profa. Lilian Amorim por ter sido minha co-orientadora, por toda atenção dispensada no planejamento, avaliação dos dados e redação dos resultados epidemiológicos, bem como por ter sido sempre tão gentil comigo;

Ao Prof. Hiroshi Kimati (*in memoriam*) pelo sentimento de amizade e por ter sido o “responsável” pela realização desse projeto, nos trazendo os primeiros materiais sintomáticos de repolho e as fotos que ilustram os sintomas da doença;

A todos os professores e funcionários do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP pelos conhecimentos transmitidos, pelo sentimento de amizade e por toda contribuição neste trabalho;

Ao Engenheiro Agrônomo Saziki pela imensa colaboração, disponibilidade e atenção intermediando nossas visitas de campo e cedendo mudas para nossos estudos;

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudo durante o desenvolvimento desta tese;

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia Molecular, Eliane Gonçalves da Silva, Bárbara, Isolda, Raquel, Ricardo, Luciano, Luiz Fernando, Daniela, Alan, Samuel, Maria Cristina e as três Renatas, por tudo;

Aos amigos Adriana Gonçalves Moreira, Adriana S. Jadão, Daniela Flôres, Luciano de Aquino Melo e Samuel Gazzola, por toda ajuda, pelas risadas que demos

juntos, pelos “happy hours” e por terem tornado essa etapa ainda mais prazerosa, compartilhando conhecimentos e, sobretudo amizade;

Aos amigos do laboratório de virologia, pelos bons momentos, sobretudo nas pausas para os cafés;

A todos os amigos dos demais laboratórios do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, em especial ao amigo Júlio César Barbosa por ter me ajudado com as análises epidemiológicas;

A todo(a)s o(a)s grandes amigo(a)s que eu “abandonei” durante a realização dessa tese, mas que souberam entender minha ausência;

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho;

Agradecimento especial à querida Patrícia Cia, por toda amizade, paciência, apoio, incentivo e por todas as sugestões enriquecedoras a mais este trabalho;

Finalmente, agradeço à minha família em especial a minha mãe, minha tia, meu irmão e minhas irmãs por fazerem parte da minha vida. Se eu pudesse escolher uma “nova” família, certamente seria essa.

Obrigada!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Fitoplasmas como patógenos de plantas	14
2.2 Métodos de detecção e identificação de fitoplasma.....	16
2.3 A relação fitoplasma x repolho.....	17
2.4 Transmissão de fitoplasmas.....	18
2.5 Análise epidemiológica.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Coleta de amostras de repolho e insetos.....	22
3.2 Extração de DNA total das amostras de repolho e insetos.....	22
3.3 Condições de PCR, padrões e análise dos resultados.....	24
3.4 Análise de RFLP para identificação de fitoplasma.....	26
3.5 Análise epidemiológica.....	27
3.5.1 Seleção, caracterização das áreas e avaliações.....	27
3.5.2 Quantificação da heterogeneidade espacial de plantas afetadas...	27
3.5.2.1 Análise de seqüências ordinárias.....	27
3.5.3 Índice de dispersão e aplicação da lei de Taylor modificada.....	28
3.5.3.1 Divisão das áreas e cálculo de p.....	28
3.5.3.2 Aplicação da lei de Taylor modificada	29
3.5.3.3 Índice de dispersão ($I\beta$).....	30
3.5.4 Determinação de áreas isopatas.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Sintomatologia da planta doente e identificação preliminar de insetos.....	31
4.2 Detecção de fitoplasma em plantas de repolho por duplo PCR	34

4.3 Detecção de fitoplasma em cigarrinhas por duplo PCR.....	36
4.4 Identificação de fitoplasmas em plantas e insetos por PCR.....	37
4.5 Identificação de fitoplasmas por análise de RFLP.....	41
4.5.1 Identificação de fitoplasmas em plantas.....	41
4.5.2 Identificação de fitoplasmas em cigarrinhas.....	42
4.6 Análise epidemiológica.....	48
4.6.1 Avaliações.....	48
4.6.2 Distribuição espacial.....	48
4.6.2.1 Análise de seqüências ordinárias.....	50
4.6.2.2 Índice de dispersão e aplicação da lei de Taylor modificada.....	51
4.6.2.3 Determinação de áreas isopatas.....	52
5 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação diagramática da região rDNA de fitoplasma. Posição dos pares de <i>primers</i> P1/Tint e R16 F2n/R2.....	25
Figura 2 - Sintomas exibidos por plantas de repolho afetadas pelo enfezamento. Material vegetal oriundo das áreas s de Ibiúna/SP, Curitiba/PR e Nova Bassano/RS.....	32
Figura 3 - Cigarrinhas coletadas em áreas produtoras de Ibiúna/SP....	32
Figura 4 - Evidência da presença de fitoplasma em tecido de plantas de repolho com enfezamento de Ibiúna/SP.....	34
Figura 5 - Evidência da presença de fitoplasma em tecido de plantas de repolho com enfezamento de Curitiba/PR.....	34
Figura 6 - Evidência da presença de fitoplasma em tecido de plantas de repolho com enfezamento de Nova Bassano/RS.....	35
Figura 7 - Evidência da presença de fitoplasma em tecido de cigarrinhas provenientes de campos de Ibiúna/SP.....	35
Figura 8 – Identificação molecular de fitoplasma do grupo 16SrIII em amostras de repolho coletadas em Ibiúna/SP.....	37
Figura 9 - Identificação molecular de fitoplasma do grupo 16SrIII em amostras de repolho coletadas em Curitiba/PR.....	37
Figura 10 - Identificação molecular de fitoplasma do grupo 16SrIII em amostras de repolho coletadas em Nova Bassano/RS....	38
Figura 11 – Identificação molecular de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII em cigarrinhas coletadas em campos na região de Ibiúna/SP.....	38
Figura 12 - Produtos de digestão enzimática de fragmentos de fitoplasma extraído de repolho com <i>AluI</i> , <i>MseI</i> , <i>RsaI</i> , <i>KpnI</i> , <i>MboI</i> , <i>HhaI</i> , <i>HpaI</i> e <i>Bsh1236I</i>	41

Figura 13 - Produtos de digestão enzimática de fragmentos de fitoplasma extraído de cigarrinha com <i>Alul</i> , <i>MseI</i> , <i>RsaI</i> , <i>KpnI</i> , <i>MboI</i> , <i>HhaI</i> , <i>HpaII</i> e <i>Bsh1236I</i>	42
Figura 14 - Produtos de digestão enzimática de fragmentos de fitoplasma extraído de cigarrinha dos grupos 16SrI e 16SrIII com as endonucleases <i>Alul</i> , <i>MseI</i> , <i>MboI</i> , <i>KpnI</i> , <i>HhaI</i> e <i>HpaII</i>	42
Figura 15 - Padrão espacial de plantas de repolho infectadas com fitoplasma em campos de cultivo na região de Ibiúna/SP..	46
Figura 16 - Variação do índice Zso em função da incidência da doença em repolho nas linhas de plantio.....	47
Figura 17 - Relação entre os logaritmos das variâncias observada e binomial para o fitoplasma em repolho.....	49
Figura 18 - Áreas isopatas referentes à avaliação em cada uma das áreas analisadas.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos padrões de perfil eletroforético dos fitoplasmas das amostras de Ibiúna/SP, Curitiba/PR e Nova Bassano/RS com outros fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII obtidos através de análise de RFLP.....	44
Tabela 2 - Valores de índices de dispersão, parâmetros A e b da lei de Taylor modificada e R^2 , calculados para cada área em cada <i>quadrat</i>	48

RESUMO

Identificação molecular de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença

Uma doença, denominada de enfezamento, de etiologia desconhecida, tem sido observada nos campos de cultivo de repolho da região do cinturão verde de São Paulo. A doença tem causado sérios danos à cultura nos últimos anos. A sintomatologia apresentada pelas plantas afetadas tem sido caracterizada por clorose foliar, avermelhamento das nervuras e do limbo, enfezamento generalizado, proliferação de brotos e má formação da cabeça, de folhas e órgãos florais. A presença destes sintomas levou à suspeita da ocorrência de fitoplasma associado à doença. Com o objetivo de investigar o possível agente etiológico, plantas de repolho naturalmente infectadas foram coletadas em São Paulo e também nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul, onde a doença, recentemente, tem ocorrido com alta intensidade. Cigarrinhas que ocorrem em cultivos comerciais também foram amostradas em campos de Ibiúna/SP. Após a extração, o DNA total foi submetido ao teste de duplo PCR empregando-se os pares de *primers* universais P1/Tint e R16F2n/R2 e os pares específicos para identificação de fitoplasmas. Análises de PCR mostraram a amplificação consistente de fragmentos de DNA de 1,2 kb, evidenciando a associação constante de fitoplasma com tecidos das plantas sintomáticas e de insetos. O uso de *primers* específicos para identificação demonstrou a ocorrência de fitoplasmas afiliados ao grupos 16Srl e 16SrlII, tanto em repolho como nas cigarrinhas. Análises de RFLP, usando as enzimas de restrição *AluI*, *Bsh* 12361, *HhaI*, *HpaI*, *KpnI*, *MboI*, *MseI* e *RsaI* confirmaram a ocorrência de fitoplasmas pertencentes aos referidos grupos no material vegetal e nos insetos. O padrão espacial de plantas sintomáticas no campo foi do tipo agregado e não houve evidência da disseminação planta a planta, indicando um papel mais importante do comportamento do vetor no arranjo espacial da doença do que de influências do patógeno ou do hospedeiro.

Palavras chave: Fitoplasma; Mollicutes; *Brassica oleracea*; Epidemiologia

ABSTRACT

Molecular identification of phytoplasmas associated to cabbage stunt and epidemiological analysis of disease

A disease called stunt, of unknown etiology, has occurred in cabbage crops located in the green belt region of the São Paulo State (Brazil). The disease has caused serious yield losses in the last years. The symptomatology exhibited by the affected plants has been characterized by foliar chlorosis, intense red coloration of leaflets, general stunt, shoot proliferation and malformation of heads, leaves and floral parts. The presence of those symptoms suggested the occurrence of phytoplasma associated with the disease. In order to investigate the possible agent of the disease, naturally infected cabbage plants were collected from the States of São Paulo, and also from Paraná and Rio Grande do Sul, where the disease has occurred recently with level of intensity. Leafhoppers present in cabbage fields were sampled from Ibiúna, in São Paulo State. Total DNA was extracted and submitted to nested PCR with the universal primer pairs P1/Tint and R16 F2n/R2 and specific primers for phytoplasmas identification. PCR assays revealed the amplification of DNA fragments of 1.2kb, demonstrating consistently the presence of phytoplasma in the tissues from symptomatic plants and insects. Specific primers revealed the occurrence of phytoplasmas affiliated with the groups 16SrI and 16SrIII, both cabbage plants and leafhoppers. RFLP analyses using the restriction enzymes *AluI*, *Bsh* 1236I, *HhaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI* and *RsaI* confirmed the occurrence of phytoplasmas belonging to the same groups in plants and insects. Spatial pattern of symptomatic plants in the field was aggregated and there was no evidence of the spread plant-to-plant. This indicates a more important role of the vector behavior on spatial pattern than influences of the pathogen or host.

Keywords: Phytoplasma; Mollicutes; *Brassica oleracea*; Epidemiology

1 INTRODUÇÃO

O repolho é uma hortaliça da família Brassicaceae e tem como região de origem a Costa Norte Mediterrânea, Ásia Menor e Costa Ocidental da Europa. Em sua forma selvagem, o repolho era utilizado pelos egípcios, sendo que o seu uso generalizou-se com as invasões arianas entre 2000 e 2500 a.C. Taxonomicamente existem duas espécies de repolho, o repolho liso (*B. oleracea* var. *capitata*), de maior expressão comercial no Brasil e o repolho crespo (*B. oleracea* var. *sabauda*). Em países onde o novo conceito de alimentação saudável e segurança alimentar estão consolidados, as hortaliças detêm boa parte do mercado. No Brasil, o repolho figura entre as hortaliças de maior importância econômica, garantindo alta rentabilidade por área, possibilitando bons lucros ao produtor, além de apresentar tendência de aumento de demanda (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2002).

Doenças de etiologia fúngica, bacteriana e viral têm papel importante na produção dessa hortaliça. No entanto, uma doença denominada de enfezamento, acefalia ou anel escuro, de etiologia desconhecida vem causando danos à cultura do repolho, há pelo menos duas décadas. Tentativas de isolamento de fungos e bactérias têm mostrado resultados negativos, enquanto exames microscópicos não têm revelado a presença de vírus nos tecidos de plantas afetadas.

Sintomas típicos de enfezamento, envolvendo clorose foliar acentuada, enfezamento generalizado da planta, avermelhamento intenso de nervuras, superbrotamento na base da planta, má formação da cabeça, de folhas e órgãos florais têm sido observados nos campos comerciais. Um sintoma interessante em plantas afetadas é o aparecimento de um anel escuro na haste, quando esta é cortada transversalmente. Este escurecimento ocorre na região dos vasos condutores, na forma de podridão.

Na área do cinturão verde de São Paulo, estes sintomas têm sido observados com maior frequência e intensidade nos últimos 6-7 anos. Não é incomum o replantio de até 5% das plantas e incidências de 30% a 70% têm ocorrido com frequência em plantios comerciais, sendo que as plantas doentes têm sido descartadas, por não apresentarem padrão para comercialização. Normalmente, as maiores

incidências da doença são coincidentes com altas populações de cigarrinhas presentes na cultura, lembrando que este grupo de insetos é o principal vetor de fitoplasmas. Ainda, todas as cultivares utilizadas apresentam sintomas da doença e os produtores que empregam baixa tecnologia são os mais afetados. Como tentativa de controle, alguns produtores tem utilizado estimulantes radiculares ou aplicação de inseticidas, porém estas práticas, às vezes, não resultam em sucesso na diminuição da intensidade de doença. Dependendo das condições de clima, a doença tem ocorrido com maior ou menor intensidade, tanto que nos anos de 2005 e 2006, a mesma não atingiu índices muito elevados. Recentemente o mesmo tipo de doença observado em São Paulo vem ocorrendo em outras áreas produtoras, como na região de Curitiba (PR) e de Nova Bassano (RS).

Além do aspecto etiológico, o conhecimento da epidemiologia pode contribuir para a adoção de medidas mais eficientes de controle (ZHOU et al., 2002). No entanto, estudos epidemiológicos sobre doenças causadas por fitoplasmas são raros no Brasil e os danos causados por elas não são bem caracterizados. No caso específico do repolho, há relatos de abandono de campos de cultivo por parte de produtores, uma vez que o produto torna-se inviável para comercialização.

Em vista da ausência de isolamento de patógenos fúngicos e bacterianos a partir das plantas doentes e da similaridade dos sintomas com o enfezamento do repolho relatado em outros países, levantou-se a suspeita da ocorrência de fitoplasmas. Em razão da importância do enfezamento para a produção de repolho e da necessidade de se investigar seu agente causal e a epidemiologia da doença, o presente trabalho teve por objetivos detectar e identificar fitoplasma associado ao enfezamento do repolho; detectar e identificar fitoplasma em cigarrinhas que ocorrem naturalmente em plantios comerciais de repolho e analisar a distribuição espacial da doença no campo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fitoplasmas como patógenos de plantas

Fitoplasmas foram primeiramente denominados “Mycoplasma like organisms” (MLOs), ou seja, organismos semelhantes aos micoplasmas, pois quando foram visualizados pela primeira vez em 1967 (DOI et al., 1967) sua morfologia mostrou-se idêntica àqueles que causavam doenças em animais (DAVIS et al., 1997; SEEMULLER et al., 1998; SCHNEIDER et al., 1999). Anos mais tarde foi proposto o termo “phytoplasmas” para denominar esses organismos encontrados em plantas (SEARS & KIRKPATRICK, 1994). Fitoplasmas são procariotos desprovidos de parede celular, de dimensões variáveis entre 200 a 800 nm, membros da classe Mollicutes, habitantes dos vasos do floema e naturalmente transmitidos por cigarrinhas (DAVIS, 1995). Ainda não foram classificados formalmente como gênero *Phytoplasma*, motivo pelo qual sua denominação atual apresenta-se como *Candidatus*. Sua taxonomia é complexa, pois, apesar de inúmeras tentativas, seu isolamento em meio de cultura ainda não foi possível (DAVIS, 1995; GOODWIN et al., 1999). Este é o maior obstáculo para o desenvolvimento de pesquisas envolvendo doenças causadas por estes fitopatógenos (JIANG & CHEN, 1987). Fitoplasmas são filogeneticamente relacionados com bactérias gram-positivas (BOVE & GARNIER, 2000) e são sensíveis à tetraciclina.

A diagnose de doenças causadas por fitoplasmas encontra dificuldades devido a alguns fatores, entre eles, impossibilidade de isolamento do patógeno a partir do tecido doente, similaridade com sintomas provocados por vírus e ocorrência de plantas portadoras de infecção latente (assintomáticas). Nesse contexto, a detecção de fitoplasmas em plantas suspeitas de infecção é de grande importância para a confirmação de diagnose e estudos epidemiológicos. A identificação permite demonstrar a presença de diferentes fitoplasmas numa mesma espécie vegetal ou relacionar fitoplasmas similares que ocorrem em espécies vegetais diferentes (DAVIS, 1995). Fitoplasmas similares podem causar diferentes sintomas em hospedeiros vegetais distintos, enquanto fitoplasmas distintos podem ser veiculados pela mesma espécie de vetor e provocar sintomas diferentes numa mesma espécie botânica. Essa

informação pode contribuir para um maior entendimento sobre a epidemiologia das doenças, visando a adoção de medidas de controle mais eficientes.

Para confirmar que um patógeno é realmente o agente causal de uma determinada doença é necessário que se aplique os “postulados de Kock” (AGRIOS, 1997), porém como fitoplasmas não podem ser cultivados em meio de cultura, a patogenicidade destes agentes tem sido demonstrada através de detecção na planta, associada à transmissão de planta doente para sadia e, em alguns casos, remissão de sintomas promovida pelo tratamento de plantas sintomáticas com o antibiótico tetraciclina (DAVIS, 1995; ISHII et al., 1967). O tratamento com a tetraciclina impede a manifestação dos sintomas nas plantas, mas não elimina o patógeno, pois a interrupção do tratamento com antibiótico conduz novamente ao aparecimento dos sintomas da doença (RUEGG & COUSIN, 1974).

Embora, WEI et al. (2007) tenham proposto 28 diferentes grupos de fitoplasmas baseados em análise de RFLP simulada em computador são geralmente relatados e reconhecidos 18 grupos e mais de 40 subgrupos baseados em diferenças nas seqüências de bases do gene 16S rDNA (LEE et al., 1998a). Cada grupo inclui pelo menos uma espécie padrão, caracterizada por propriedades biológicas, fitopatológicas e genéticas. Seguem relacionados os 18 grupos e seus respectivos padrões: 16SrI (Aster yellows), 16SrII (Peanut witches'-broom), 16SrIII (X-disease), 16SrIV (Coconut lethal yellowing), 16SrV (Elm yellows), 16SrVI (Clover proliferation), 16SrVII (Ash yellows), 16SrVIII (Luffa witches'-broom), 16SrIX (Pigeon pea witches'-broom), 16SrX (Apple proliferation), 16SrXI (Rice yellow dwarf), 16SrXII (Stolbur), 16SrXIII (Mexican periwinkle virescence), 16SrXIV (Bermudagrass white leaf), 16SrXV (Hibiscus witches'-broom), 16SrXVII (Sugarcane yellow leaf), 16SrXVIII (Papaya bunchy top), 16SrXIX (American potato purple top wilt).

Estudos iniciais sobre a etiologia de doenças causadas por fitoplasmas eram baseados na suposição de que cada espécie de fitoplasma causava um conjunto de sintomas característicos (DAVIS & SINCLAIR, 1998). A classificação original destes organismos era baseada na expressão dos sintomas, gama de hospedeiros e relação com inseto vetor (SEEMULLER et al., 1994). Só mais tarde, através da aplicação de

técnicas moleculares foi demonstrado que o mesmo fitoplasma podia causar diferentes doenças em diversos hospedeiros distintos.

O principal mecanismo envolvido na patogênese é o desequilíbrio no balanço hormonal das plantas infectadas (DAVIS & LEE, 1991). Os danos provocados pela presença do patógeno podem estar relacionados com o genótipo da planta suscetível, a estirpe do patógeno e as condições do ambiente, podendo, em alguns casos, a doença ter um efeito devastador sobre a cultura (DAVIS, 1995). Diversos gêneros e espécies vegetais são afetados por doenças causadas por fitoplasmas no Brasil (KITAJIMA, 1994). Em geral, plantas doentes podem exibir sintomas de clorose generalizada das folhas, desenvolvimento de brotos extra-numerários, clareamento ou avermelhamento das nervuras, enfezamento, deformação dos órgãos florais, esterilidade, filodia e virescência, sendo estes dois últimos considerados típicos de infecção causada pelo patógeno (KITAJIMA & COSTA, 1970; KIRKPATRICK, 1992; DAVIS, 1995). Há relatos no país de diversas doenças causadas por este tipo de fitopatógeno, entre elas, o superbrotamento do feijoeiro, da soja, do maracujazeiro e da mandioca, o enfezamento vermelho do milho, o irizado do chuchuzeiro, o cálice gigante do tomateiro (KITAJIMA, 1995, AMARAL MELLO et al., 2006), o superbrotamento da abobrinha (MELO et al., 2007), o enfezamento da berinjela (BARROS, 2002; AMARAL MELLO et al., 2007), o lenho mole da macieira (RIBEIRO et al., 2007), o superbrotamento da crotalária (AMARAL MELLO et al., 2004), sendo que algumas delas têm trazido sérios prejuízos aos produtores.

2.2 Métodos de detecção e identificação de fitoplasma

A necessidade de se determinar métodos práticos para o controle de doenças tem sido o principal fator responsável pelas pesquisas que vem sendo feitas com fitoplasmas (DAVIS, 1995).

Para a detecção e identificação do patógeno, algumas ferramentas moleculares têm se mostrado essenciais e confiáveis, entre elas a reação em cadeia da polimerase (PCR), o polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP) e a

análise da sequência nucleotídica da região do gene 16S rDNA (MILLER & MARTIN, 1988; DAVIS & PRINCE, 1994; MARTIN et al., 2000).

A técnica de RFLP consiste em promover a digestão do fragmento genômico alvo amplificado no PCR, com o uso de enzimas de restrição, gerando perfis eletroforéticos utilizados para identificação do patógeno e sua classificação em grupos. O sequenciamento da região 16S rDNA também tem sido bastante utilizado para classificação de fitoplasmas, pela análise da similaridade e diversidade de suas seqüências nucleotídicas (GUNDERSEN et. al., 1994; MONTANO et al., 2001; SIDDIQUE et al., 2001; KHAN et al., 2002). A técnica permite comparar fitoplasmas encontrados numa mesma região ou regiões distintas, sendo possível estabelecer uma identidade genética. Estudos dessa natureza têm contribuído para melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade do organismo, sua evolução, expressão de genes de resistência da planta em resposta às infecções e mecanismos de transmissão por vetores, além de auxiliar no desenvolvimento de métodos mais efetivos para o controle das doenças nos campos de cultivo (LEE et al., 2000).

2.3 A relação fitoplasma x repolho

Os fitoplasmas têm sido relatados em diversas espécies vegetais cultivadas, entre elas, cereais, frutíferas, ornamentais e hortaliças, além de plantas daninhas e espécies silvestres. Em países onde o conceito de alimentação saudável e segurança alimentar estão consolidados, as hortaliças detêm boa parte do mercado. O repolho está entre as hortaliças de maior importância econômica no Brasil, apresentando uma produtividade média de 30-60 t/ha, garantindo alta rentabilidade por área e bons lucros aos produtores, além de apresentar tendência de aumento de demanda (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2002).

Em alguns países, uma doença denominada de enfezamento do repolho é conhecida há muito tempo, apesar de sua associação com fitoplasma ter sido demonstrada somente a partir da década de setenta. A sintomatologia é expressa por amarelecimento, redução do tamanho das folhas, enfezamento generalizado, má formação da cabeça e proliferação de brotos extranumerários. Estes sintomas de enfezamento foram relatados na cultura do repolho no ano de 1939 em Irvington, na

Califórnia (SEVERIN & FRAZIER, 1945). Naquela época, a doença foi atribuída a um vírus em função dos sintomas exibidos pela planta (WESTDAL & RICHARDSON, 1969) e da transmissão do agente infeccioso feita através de inseto vetor (FREITAG, 1967 citado por LEE & DAVIS, 1988). Os mesmos sintomas de enfezamento foram observados em repolho no Sul da Itália, no ano de 1995 e através de técnicas de PCR e RFLP foi possível demonstrar a presença de fitoplasma em plantas cultivadas naquela região (MARCONE & RAGOZZINO, 1995). Trabalho semelhante foi realizado por Fodor et al. (1999), que através de técnicas moleculares demonstraram a associação de fitoplasmas com os sintomas de enfezamento na cultura do repolho, na Hungria. Na região Sudeste do Texas, Lee et al. (2003) encontraram um fitoplasma associado à doença e num estudo mais amplo detectaram o mesmo fitoplasma em campos de cenoura. Ainda, detectaram fitoplasmas em diferentes espécies de cigarrinhas, comumente encontradas na região durante um período de epidemia. Fitoplasmas em repolho foram identificados na Itália (BERTACCINI et al., 1990; MARCONE et al., 1997; VIBIO et al., 1996) e nos Estados Unidos (LEE et al., 2001; LEE et al., 1998a, LEE et al., 1998b), como sendo pertencentes ao grupo 16SrI, subgrupo B. Em 2001, uma doença foi observada nos campos de produção de repolho na região de Zarghan no Irã. As plantas exibiam sintomas de amarelecimento, redução no tamanho das folhas, enfezamento da planta, má formação da cabeça e proliferação de brotos na base da haste. Salehi et al. (2007) conduziram estudos sobre transmissão por cigarrinhas (*Circulifer haematoceps*) e conseguiram transmitir a doença do repolho para outras plantas de repolho e para plantas de outras espécies, incluindo a vinca (*Catharantus roseus*). Através de PCR utilizando os pares de *primers* R16 P1/P7 e R16F2n/R2 em PCR duplo, obtiveram amplificação de fragmentos de 1,2 kb, típicos de fitoplasmas. Baseados em análises de RFLP e sequenciamento de bases, o fitoplasma encontrado foi alocado no grupo 16SrVI.

2.4 Transmissão de fitoplasmas

A transmissão de fitoplasmas pode ser feita através de insetos vetores, enxertia e *Cuscuta* sp. (DAVIS, 1995; GOODWIN et al., 1999). Naturalmente, a transmissão pode ocorrer, principalmente, através de insetos vetores do tipo cigarrinhas

(DAVIS, 1995). Esta forma de disseminação do patógeno pode levar à ocorrência irregular da doença ao longo do tempo, dificultando seu controle. Em alguns anos a incidência de doenças é baixa, apesar da presença abundante de cigarrinhas no campo e, em outros, a incidência é tão alta que campos inteiros são perdidos (MURRAL et al., 1996). Errampalli et al. (1986) infectaram cigarrinhas da espécie *Macrosteles fascifrons* com o fitoplasma do enfezamento da alface. Os insetos foram soltos em campos de aipo e os sintomas de enfezamento apareceram em menos de 45 dias, comprovando a presença do patógeno e a relação da cigarrinha com o mesmo. Estudos têm mostrado que não existe uma especificidade na relação fitoplasma/vetor, portanto, um inseto pode se tornar infectivo, carregando mais de uma espécie de fitoplasma. O fitoplasma conhecido por “California aster yellows” é transmitido por 24 espécies distintas de cigarrinhas, no entanto o “American elm yellows” é transmitido por apenas um vetor (LEE et al, 1998a).

Em alface, Goodwin et al. (1999) investigaram o papel de cigarrinhas na transmissão do fitoplasma causador de enfezamento. A presença do patógeno em cigarrinhas foi relacionada com a incidência de enfezamento em alface entre 1992 e 1995. Exceto em 1995, o pico de incidência de cigarrinhas infectadas precedeu ou coincidiu com o aparecimento de sintomas da doença no campo. Em 1995, apesar da presença de cigarrinhas infectadas, não houve ocorrência da doença no campo. Os autores atribuíram este fato à baixa frequência de temperaturas favoráveis, o que pode ter prevenido a transmissão do patógeno.

Diversas espécies de cigarrinhas foram relatadas como vetoras de fitoplasmas (NIELSON, 1979; PLOAIE, 1981). Nos Estados Unidos, as principais espécies de cigarrinhas vetoras de fitoplasma em repolho são *Macrosteles fascifrons*, *M. quadrilineatus*, *Scaphytopius irroratus* e *Ceratagallia abrupta* (LEE et al., 2003). A interação entre fitoplasma, inseto vetor e planta hospedeira apresenta várias implicações, como exemplo, a planta infectada servir de fonte de inóculo, contribuindo para o aumento da doença no campo (KHADHAIR et al., 2002).

2.5 Análise epidemiológica

A epidemiologia pode ser vista como a ciência fitopatológica aplicada à população ou comunidade (KRANZ, 1990). Através da análise epidemiológica, por meio do ajuste de equações simples dos dados obtidos é possível caracterizar como a doença progride (VANDERPLANK, 1963) e, além disso, comparar epidemias desenvolvidas sob diferentes condições (KRANZ & ROTEM, 1988).

O processo doença é resultante da interação compatível entre patógeno e hospedeiro sob influência de ambiente favorável e da interferência do homem (KRANZ, 1974). Segundo Vanderplank (1963), o uso eficaz de qualquer medida de controle de doenças é mais viável quando se conhece os fatores que afetam o desenvolvimento destas, principalmente os relacionados ao triângulo hospedeiro-ambiente-patógeno. A interação destes fatores é objeto de estudo da epidemiologia. O conhecimento dessa interação é necessário não só para a compreensão da doença, mas principalmente para traçar estratégias de controles eficientes, visando interferir no seu ciclo hospedeiro (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 1996). Para entender melhor um sistema, as análises temporal e espacial são utilizadas como ferramentas epidemiológicas, sendo que a primeira é a compreensão do sistema ao longo do tempo e a segunda tem por objetivo determinar o padrão de distribuição da doença no espaço e, dessa forma, fazer considerações sobre a forma de disseminação do patógeno no campo.

A análise de um patossistema não se completa até que se saiba como a doença está distribuída no campo e quais são os fatores responsáveis pelo arranjo espacial observado. A manifestação de uma doença pode apresentar padrões que quando devidamente caracterizados, podem explicar os fatores que atuam na epidemia. Portanto, dentro da epidemiologia é primordial estudar os aspectos espacial e temporal de uma doença e a forma de disseminação do patógeno. De acordo com Campbell & Madden (1990), a descrição dos dados espaciais de populações do patógeno e plantas doentes é essencial para estudos de manejo da doença e de sua epidemiologia. Fitopatógenos possuem diversos agentes de dispersão como a água, o vento, insetos vetores, material vegetal contaminado e o próprio homem durante os tratos culturais. O padrão espacial de uma doença depende da forma de dispersão do patógeno, da arquitetura das plantas hospedeira e do arranjo destas no campo (BERGAMIN FILHO et

al., 2002). A análise espacial tem por objetivo determinar o padrão de distribuição da doença no espaço e isso implica no desenvolvimento de hipóteses biológicas e ambientais, associando essa distribuição com a presença do patógeno ou microclima favorável (CAMPBELL & MADDEN, 1990).

A distribuição espacial de uma doença em uma área pode seguir três tipos de padrões: regular, aleatório e agregado. Segundo Campbell & Madden (1990), em doenças causadas por fitopatógenos, os arranjos aleatórios e agregados são os mais observados e, portanto, são raros os arranjos regulares. A distribuição agregada de uma doença indica que há correlações entre indivíduos sintomáticos, ou seja, há alta probabilidade de que indivíduos sintomáticos estejam próximos (MADDEN, 1989). Neste contexto, o índice de dispersão é calculado para indicar os tipos de padrões espaciais: regulares ($I\beta < 1$); aleatórios ($I\beta = 1$) e agregados ($I\beta > 1$). O estudo desses padrões pode levar a inferências sobre o papel de vetores na disseminação de uma doença (MADDEN et al., 1995a). Outro dado epidemiológico importante é a análise de seqüências ordinárias usada para testar hipóteses relacionadas à disseminação do fitopatógeno. Portanto, as informações provenientes da análise epidemiológica da doença no campo devem ser fortemente consideradas para a adoção e combinação de medidas eficientes de controle no campo (ZHOU et al., 2002).

Diversos estudos têm sido feitos para as doenças associadas a fitoplasmas combinando a detecção através de métodos moleculares com dados epidemiológicos (KHADHAIR et al., 1997; GATINEAU et al., 2001; ZANGH et al., 2000). A correlação entre insetos vetores potenciais e a distribuição de sintomas da doença, pode fornecer indícios significativos para identificar os principais componentes do processo de transmissão da doença (PILKINGTON et al., 2004). Muitas doenças de plantas têm uma clara associação com um inseto vetor na medida em que exibe uma incidência elevada de sintomas na presença abundante de insetos no campo ou uma distribuição espacial/temporal. Serve de exemplo o patossistema alfafa witches' broom x Lucerne com altos níveis populacionais de 3 espécies de cigarrinha, *Aceratagallia* sp., *Neokolla hieroglyphica* e *Cuerna septentrionalis* (KHADHAIR et al., 1997). É importante identificar o tipo de inseto vetor para se estabelecer potenciais estratégias de manejo baseadas no conhecimento da biologia do inseto (OSMELAK, 1984)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de amostras de repolho e insetos

Plantas de repolho apresentando sintomas de clorose foliar acentuada, enfezamento generalizado, avermelhamento intenso de nervuras e limbo foliar, superbrotamento na base da planta, má formação da cabeça, de folhas e órgãos florais foram coletadas em campos comerciais situados nas regiões de Piedade, Sorocaba e Ibiúna, no Estado de São Paulo, em Curitiba, no Paraná e em Nova Bassano, no Rio Grande do Sul. Plantas assintomáticas também foram coletadas e serviram como controle negativo. As amostragens de folhas, caules, pequenos brotos e raízes foram feitas entre os anos de 2004 e 2006. A partir destas amostras foram feitas extrações do DNA total. Insetos do tipo cigarrinha foram coletados nos campos de cultivo da região de Ibiúna/SP, através de cartões armadilha e, principalmente, rede entomológica. Foram coletados insetos de dois locais distintos dentro da mesma área e separados em grupos com base no fenótipo. Parte dos exemplares teve seu DNA total extraído para uso em testes de PCR e o restante foi armazenado em álcool 70% para posterior classificação taxonômica.

3.2 Extração de DNA total das amostras de repolho e insetos

A obtenção de DNA total foi feita seguindo duas metodologias de extração: uma completa descrita por Lee et al. (1993) e outra usando-se Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Para ambas, 2 gramas do material vegetal de cada amostra foram previamente macerados em nitrogênio líquido. Seguindo-se o protocolo descrito por Lee et al. (1993), aos extratos vegetais obtidos por maceração foram adicionados 14 mL de tampão de extração e a seguir o material foi transferido para tubos de vidro de 30 mL e centrifugado em rotor SS-34 a 20000 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 8 mL de tampão de extração, acrescido de 160 µL de proteinase K e 880 µL de sarcosyl 10%. Após um período de incubação de 2 h a 55 °C foi feita nova centrifugação a 7500 g por 10 min. Ao sobrenadante foi adicionado 5,5 mL de isopropanol e os tubos mantidos durante uma noite a -20 °C. Após esse período, as amostras foram

centrifugadas durante 15 min a 7500 *g* e o precipitado foi ressuspendido em 3 mL de tampão 1X TE, 75 μ L de SDS 20% e 60 μ L de proteinase K. O material foi incubado por 1 h a temperatura de 37 °C e, em seguida, adicionados 525 μ L de NaCl 5M e 420 μ L de CTAB/NaCl a cada tubo, sendo feita uma nova incubação por 10 min a 65 °C. À mistura foram adicionados 4 mL de CIA (clorofórmio isoamil), sendo a mesma centrifugada a 4000 *g* por 5 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, aos quais foram adicionados 4 mL de CIA. Nova centrifugação foi feita a 4000 *g* por 5 min. Ao sobrenadante foram adicionados 2 mL de fenol e 2 mL de CIA e a mistura centrifugada a 4000 *g* por 5 min. A seguir, o sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo, sendo adicionado 4 mL de CIA. Após nova centrifugação a 4000 *g* por 5 min foram adicionados 2 mL de isopropanol. A mistura permaneceu no gelo por 1 h. Terminado esse processo, as amostras foram centrifugadas a 12000 *g* por 10 min, o sobrenadante foi descartado e, ao precipitado foram adicionados 8 mL de etanol 70%. O material foi mantido durante 30 min no gelo e, após esse período, centrifugado por 10 min a 4000 *g*. O álcool foi descartado, os tubos colocados invertidos sobre papel toalha e após estarem devidamente secos, os precipitados foram ressuspendidos em 200 μ L de tampão 1X TE.

Seguindo o protocolo do Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen), os extratos vegetais foram macerados com 500 μ L de tampão CTAB; a cada microtubo adicionou-se 22 μ L de RNase, misturou-se por inversão e incubou-se a 65°C por 25 minutos. Adicionou-se 162 μ L do tampão AP2 (Qiagen), misturou-se por inversão e os tubos foram colocados no gelo por 5 minutos. Essa suspensão foi aplicada na coluna colocada no tubo coletor e centrifugou-se à 14000 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, ao qual foram adicionados 675 μ L do tampão AP3 (Qiagen). Um volume de 650 μ L foi aplicado na coluna e centrifugou-se a 14000 *g* por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado, a coluna foi transferida para um novo microtubo onde foram adicionados 500 μ L do tampão AW (Qiagen) e centrifugou-se à 14000 *g* por 2 minutos. A coluna foi transferida para novo microtubo e o DNA foi diluído com 100 μ L de tampão AE (Qiagen) e pré-aquecido a 65°C.

As extrações do DNA total de insetos foram feitas com o Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen) e seguiram as mesmas etapas realizadas para a extração de DNA total do material vegetal.

Alíquotas de 2 μL do DNA total extraído, usando-se ambos os protocolos de extração, foram diluídas (1:5 e 1:50) em água miliQ e usadas nas reações de PCR, visando a detecção de fitoplasma. O restante foi armazenado em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 Condições de PCR, padrões e análise dos resultados

Oligonucleotídeos (*primers*/iniciadores) universais específicos para detecção de fitoplasmas (P1/P7, P1/Tint e R16F2N/R2) e *primers* de grupos específicos para identificação dos fitoplasmas detectados R16(I)F1/R16(I)R1 e R16(III)F2/R16(III)R1 foram empregados em PCR duplo para amplificação da sequência do gene 16S rDNA (Figura 1). Como iniciadores universais foram usados os pares P1 (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3') / P7 (5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'), Deng & Hiruki (1991) e Schneider et al. (1995), P1 / Tint (5'-TCAGGCGTGTGCTCTAACCAGC-3'), Smart et al. (1996) e R16F2n (5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3') / R16R2 (5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'), Gundersen & Lee (1996). Como oligonucleotídeos específicos foram empregados os pares R16(I)F1 (5'-TAAAAGACCTAGCAATAGG-3') / R16(I)R1 (5'-CAATCCGAACTGAGACTGT-3') e R16(III)F2 (5'-AAGAGTGGAAAACTCCC-3') / R16(III)R1 (5'-TCCGAACTGAGATTGA -3'), Lee et al. (1994).

Amostras de ácido nucléico obtidas das plantas de repolho infectadas e de insetos foram usadas como modelo/molde para a reação. Amostras de DNA provenientes de plantas de chuchu e milho, comprovadamente infectadas por fitoplasma, foram usadas como padrões positivos. Para os padrões negativos foram usados água e DNA total extraído de plantas de repolho assintomáticas. Cada reação de PCR foi processada com um volume de 19 μL de água destilada deionizada; 0,5 μL de cada oligonucleotídeo (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); 0,17 μL de Amplitaq 5 U μL^{-1} e 1 μL de DNA total extraído da planta, num volume final de 25

μL . Paralelamente, utilizou-se o kit de amplificação, PuReTaq ready-To-Go PCR Beads (Amersham, Bioscience), no qual só foi necessário acrescentar $0,5 \mu\text{L}$ de cada oligonucleotídeo (solução $20 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), $23 \mu\text{L}$ de água destilada deionizada e $1 \mu\text{L}$ do DNA de interesse. Para as reações com o par P1/Tint, o termociclador foi programado para um total de 30 ciclos, sendo 1min a 94°C para a desnaturação do ácido nucléico, 1 min a 56°C para a hibridização e 2 min a 72°C para a fase de extensão da enzima DNA polimerase. Para as reações com os demais pares de *primers* o aparelho foi programado para 35 ciclos, usando as seguintes etapas: 1 min a 94°C para a desnaturação do ácido nucléico, 2 min a 50°C para a hibridização e 3 min a 72°C para a fase de extensão. Um tempo adicional de 1 e 7 min foi permitido para a etapa de desnaturação do primeiro ciclo e para a extensão do último ciclo, respectivamente. O DNA amplificado com o par de *primer* P1/P7 ou P1/Tint foi diluído (1:50) em água miliQ e usado como modelo para a re-amplificação com os pares R16F2n/R2 ou R16(I)F1/R16(I)R1 e R16(III)F2/ R16(III)R1, seguindo-se as mesmas condições anteriormente descritas.

Figura 1 - Representação diagramática da região rDNA de fitoplasma, incluindo os genes 16S e 23S e a região espaçadora intergênica. Posição dos pares de *primers* P1/Tint e R16 F2n/R2 usados nas reações de PCR

Os produtos resultantes do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, acrescido do corante Sybr Safe (Invitrogen). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e o marcador de peso molecular utilizado foi o DNA 1 kb Ladder (Invitrogen). Na análise dos resultados foram consideradas as massas moleculares das bandas correspondentes aos fragmentos de DNA amplificados de acordo com o par de *primer* utilizado.

3.4 Análise de RFLP para identificação de fitoplasma

As seqüências do 16SrDNA amplificadas pelo duplo PCR, com o uso dos *primers* universais R16F2n/R2 foram analisadas através do uso de enzimas de restrição. Uma alíquota de 4 µL de cada produto de PCR foi digerida, separadamente, por diferentes endonucleases, seguindo as instruções do fabricante. Foram empregadas, as enzimas (e seus respectivos sítios de restrição): *AluI* (AG▼CT), *Bsh1236I* (CG▼CG), *HhaI* (GCG▼C), *HpaII* (C▼CGG), *KpnI* (GGTAC▼C), *MboI* (▼GATC), *MseI* (T▼TAA), *RsaI* (GT▼AC). A digestão foi processada à temperatura de 36 °C por, aproximadamente, 27 h. No caso da enzima *Bsh1236I* (CG▼CG) a digestão ocorreu à 37 °C por 16 h.

Os produtos da digestão enzimática foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (4,5%), coloridos em Sybr Safe por 40 min e os fragmentos de DNA gerados, foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Como marcador molecular foi utilizado φX174RFHaeIII (Invitrogen). Os perfis eletroforéticos correspondentes aos fitoplasmas presentes nas amostras analisadas foram comparados aos padrões existentes na literatura (LEE et al., 1998) e ao perfil apresentado pelos fitoplasmas do milho e do chuchu, sabidamente pertencentes aos grupos 16Srl e 16SrIII da classificação atualmente adotada para esses fitopatógenos. Com base nestes resultados foi feita a identificação e classificação dos fitoplasmas detectados nas plantas de repolho e nos insetos coletados na cultura.

3.5 Análise epidemiológica

3.5.1 Seleção, caracterização das áreas e avaliações

Foram selecionados e avaliados talhões representativos de propriedades da região de Ibiúna/SP, com incidência da doença e condições semelhantes de clima e manejo. Aproximadamente 2100 plantas foram mapeadas em cada avaliação e aquelas sintomáticas foram identificadas e anotadas numa planilha. As avaliações visuais foram baseadas na expressão de sintomas exibidos pelas plantas e na formação ou não da cabeça de repolho. O mapeamento da área foi feito a partir de dados binários (presença ou ausência de sintomas) anotados para cada planta. As avaliações foram feitas entre 2004 e 2006.

3.5.2 Quantificação da heterogeneidade espacial de plantas afetadas

3.5.2.1 Análise de seqüências ordinárias

Calculou-se o percentual de linhas de plantio com agrupamento significativo de plantas doentes. Foram seguidas, neste estudo, as definições e diretrizes de Gibbons (1976), Madden et al. (1982) e Vanderplank (1946), citado por Madden et al. (1982). “Em uma seqüência de dois ou mais tipos de símbolos, uma seqüência ordinária é definida como uma sucessão de um ou mais símbolos idênticos, que são seguidos e precedidos por um símbolo diferente ou nenhum símbolo” (GIBBONS, 1976). Assim, se tivermos um conjunto DDSSSDSDSDSSSDDDD, onde D representa uma planta doente e S, uma sadia, podemos dizer que esse conjunto possui nove seqüências ordinárias. Neste trabalho, a hipótese nula foi a de que um dado conjunto ordenado de símbolos (plantas infectadas) está distribuído de forma aleatória. A hipótese alternativa foi de que as plantas infectadas estão agrupadas (MADDEN et al., 1982). Sob a hipótese de aleatoriedade, o número esperado (E) de seqüências ordinárias (SO), o desvio padrão de SO (S_{SO}) e o SO padronizado (Z_{SO}) foram obtidos, respectivamente por:

$$E(SO) = 1 + 2m(N - m)/N \quad (1)$$

$$S_{SO} = (2.m(N - m) [2m(N - m) - N]/[N^2(N - 1)]) \quad (2)$$

$$Z_{SO} = [SO + 0,5 - E(SO)]/S_{SO} \quad (3)$$

Nessas equações m é o número de plantas doentes e N é o número total de plantas na linha.

Quanto mais agrupadas estiverem as plantas infectadas, mais negativo será o valor de Z_{SO} . As linhas foram consideradas com agrupamentos de plantas com enfezamento, ao nível de 5% de significância, se o valor de Z_{SO} for igual ou inferior a $-1,64$. A premissa básica para o uso de tal análise foi a de que agrupamento significativo de plantas afetadas indicou que o patógeno estava se disseminando de planta para planta, considerando que as observações foram feitas em áreas homogêneas, segundo Vanderplank (1946), citado por Madden et al. (1982).

3.5.3 Índice de dispersão e aplicação da lei de Taylor modificada

3.5.3.1 Divisão das áreas e cálculo de p

As áreas foram divididas em retângulos de tamanhos diversos denominados *quadrats* (3X3, 4X3, 5X3 e 6X3). Para cada *quadrat* foi determinada a proporção de plantas afetadas na avaliação e calculada a incidência da doença na área. Essa variável representada por p pode ser definida como uma estimativa da probabilidade de uma planta estar doente (MADDEN & HUGHES, 1995) e foi obtida através da equação:

$$P = \sum X_i / nN \quad (4)$$

Onde $\sum X_i$ é a soma do número de plantas doentes em cada *quadrat*, n é o número de plantas em cada *quadrat* e N é o número total de *quadrats* na área. Esses dados são a base para o estudo da lei de Taylor modificada, para o cálculo do índice de dispersão e para o estudo de áreas isópatas.

3.5.3.2 Aplicação da lei de Taylor modificada (HUGHES & MADDEN, 1992)

Para cada avaliação em cada área e para o conjunto de *quadrats* amostrados foram calculadas a variância observada (V_{obs}) e a variância binomial esperada (V_{bin}). Sob a hipótese de aleatoriedade e para incidência em proporção de plantas doentes, foram utilizadas as seguintes equações, cujos parâmetros foram definidos no item anterior (HUGHES et al., 1996).

$$V_{obs} = \sum (X_i - np)^2 / n^2 (N - 1) \quad (5)$$

$$V_{bin} = p (1 - p) / n \quad (6)$$

A lei de Taylor modificada (LTM) relaciona, por meio de polinômio do primeiro grau, a variância observada e a variância esperada para uma distribuição aleatória. Como os dados foram expressos em incidência, a distribuição binomial é a mais indicada para dados em condição de aleatoriedade (MADDEN & HUGHES, 1995). Assim:

$$\text{Log } (V_{bin}) = \log (A) + b \log (V_{obs}) \quad (7)$$

onde A e b são parâmetros.

As regressões foram calculadas pelo método dos quadrados mínimos, usando o utilitário STATISTICA 5.0. Foi considerado como variável independente o logaritmo das variâncias binomiais estimadas para cada avaliação e como variável dependente, o logaritmo das variâncias observadas. Da mesma forma, foi aplicada a regressão para os dados de todas as áreas e avaliações, em conjunto. A significância das relações entre $\log (V_{bin})$ e $\log (V_{obs})$ foi determinada pelo teste F e a adequação do ajuste do modelo aos dados foi determinada pelos 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 et al., 1995b).

A igualdade do parâmetro b a 1 foi testada através do teste *t* (MADDEN et al., 1995b), usando a estimativa do parâmetro e seu desvio padrão (BANZATTO & KRONKA, 1995). A hipótese alternativa foi a de $b > 1$. Valores de b significativamente diferentes de 1 ao nível de 5% de probabilidade foram considerados indicativos de

agregação e valores estatisticamente iguais a 1 foram considerados indicativos de aleatoriedade.

3.5.3.3 Índice de dispersão ($I\beta$)

O índice de dispersão foi calculado através da equação (GOTTWAL et al., 1996):

$$I\beta = V_{obs} / V_{bin} \quad (8)$$

O afastamento da aleatoriedade foi determinado através de teste de λ^2 ao nível de 5% de significância, para o qual o valor testado foi calculado por $I\beta$. ($N_q - 1$), em que N_q é o número de *quadrats* e a expressão $N_q - 1$ representa os graus de liberdade. Os valores de λ^2 para os graus de liberdade usados e para o nível de significância escolhido foram calculados por:

$$\lambda^2 = \frac{1}{2} [1,645 + \sqrt{2 \cdot GI - 1}]^2 \quad (9)$$

em que GI é o número de graus de liberdade (THOMPSON, 1941).

A hipótese nula foi a de que o padrão observado é aleatório e a hipótese afirmativa a de que é agregado. Valores de $I\beta$ que não diferiram estatisticamente de 1 foram considerados como indicativo de aleatoriedade dos dados. De forma complementar, valores estatisticamente superiores a 1 foram tomados como indicativo de agregação.

3.5.4 Determinação de áreas isopatas

O estabelecimento das áreas isópatas para cada local e avaliação foi feito no utilitário STATISTICA 5.0, através do procedimento de uniformização dos quadrados mínimos, ponderados pela distância. Nessa determinação, foi utilizada a matriz dos valores não transformados de proporção de plantas afetadas de cada *quadrat*. Para cada talhão, o número de áreas isópatas foi igual. Entretanto, os níveis de cada área isópata, para cada talhão foram arbitrariamente escolhidos, com o objetivo de realçar possíveis diferenças.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sintomatologia da planta doente e identificação preliminar de insetos

Os sintomas típicos de infecção por fitoplasmas exibidos pelas plantas de repolho amostradas nas regiões de Ibiúna/SP, Curitiba/PR e Nova Bassano/RS estão apresentados na Figura 2. Estes sintomas têm sido observados nos cultivos de repolho instalados na região do cinturão verde de São Paulo há aproximadamente duas décadas. Com base nas informações fornecidas por produtores e técnicos ligados à cultura, a doença tem sido atribuída a vários fatores de natureza biótica ou abiótica. No entanto, o assunto ficou somente na especulação, pois nenhuma evidência marcante foi produzida que pudesse levar à causa da doença. Tentativas de se isolar fungos ou bactérias foram feitas exaustivamente ao longo do tempo, porém não apresentaram resultados positivos (Kimati, H. 2004, comunicação pessoal). Quando os estudos desenvolvidos neste trabalho foram iniciados e visitas freqüentes passaram a ser feitas nos campos, as informações obtidas passaram a apoiar a hipótese de que fitoplasmas pudessem estar envolvidos com o enfezamento. Os sintomas observados eram típicos de fitoplasmas e muito semelhantes àqueles já relatados em outros países (BERTACCINI et al., 1990; MARCONE et al., 1997; VIBIO et al., 1996; LEE et al., 2001; LEE et al 2003). Ainda, a doença sempre ocorria com maior intensidade nos bordos das áreas plantadas, indicando que o patógeno tinha origem externa. Culturas intensivamente tratadas com inseticidas desde o transplântio das mudas apresentavam menor incidência da doença, sugerindo a existência de vetor. Assim, passou-se a enfrentar o desafio de demonstrar a associação de fitoplasmas com as plantas afetadas.

Durante as coletas, insetos do tipo cigarrinha foram observados em grandes quantidades nos campos de cultivo da região de Ibiúna/SP, sendo que os fenótipos mais comumente encontrados podem ser visualizados na Figura 3. Após separação dos insetos em grupos, de acordo com suas características morfológicas, a identificação taxonômica apontou que os tipos predominantes pertenciam à família *Cicadellidae* e *Delphacidae*, ambas relatadas como vetoras de fitoplasmas em outras partes do mundo (BATLLE et al., 2000; MURRAL et al., 1996, BURKNESS et al., 1999). De acordo com

Fletcher (1984), citado por Pilkington et al., (2004), cigarrinhas da família *Delphacidae* e da sub-família *Deltocephalinae* (família *Cicadellidae*), são relatadas como o grupo mais numeroso de insetos vetores de fitoplasma.

Nos campos de repolho estudados, observações evidenciaram uma relação direta entre aumento da população de cigarrinhas e aumento na incidência da doença. Os próprios agricultores já haviam notado, ao longo do tempo, que a doença era mais intensa em determinadas épocas do ano, justamente nas épocas mais favoráveis ao crescimento da população de cigarrinhas. Além disto, o fato da doença ocorrer com maior intensidade nas áreas marginais da cultura e causar menor dano em plantios tratados, nas fases iniciais, com inseticidas, reforçavam as suspeitas de que o agente possuía um vetor. Por esta razão, foram planejadas coletas periódicas de insetos e aplicação de testes moleculares visando a detecção de fitoplasmas nos grupos predominantes de cigarrinhas que ocorriam nas culturas. Este seria o primeiro passo para o estabelecimento de estudos posteriores destinados a comprovar a transmissão de fitoplasmas via vetor.

Figura 2 - Sintomas exibidos por plantas de repolho afetadas pelo enfazamento: anel necrótico na haste; brotos extra-numerários (superbrotamento), avermelhamento das folhas e acefalia ou má formação da cabeça. Material vegetal oriundo das áreas produtoras de Ibiúna/SP, Curitiba/PR e Nova Bassano/RS

Figura 3 - Cigarrinhas pertencentes às famílias *Cicadellidae* e *Delphacidae*, coletadas em áreas produtoras de repolho da região de Ibiúna/SP

4.2 Detecção de fitoplasma em plantas de repolho por duplo PCR

A amplificação do 16S rDNA em duplo PCR, com o uso dos *primers* universais, revelou a constante presença de fitoplasma em plantas de repolho que exibiam sintomas de enfezamento. Fragmentos de DNA de aproximadamente 1,6 kb e de 1,2 kb foram amplificados, respectivamente, pelos pares de *primers* P1/Tint e R16F2n/R2 e visualizados na forma de bandas em géis de agarose (Figuras 4, 5 e 6). Fragmentos genômicos como estes relatados são esperados quando os respectivos *primers* universais são utilizados nas reações de PCR (DENG & HIRUKI, 1991; SCHNEIDER et al, 1995; GUNDERSEN & LEE, 1996). Nenhuma amplificação ocorreu nas reações de PCR contendo DNA extraído de plantas assintomáticas usadas como padrão negativo. Estes resultados foram confirmados através de várias repetições.

A detecção de fitoplasma permitiu confirmar a diagnose feita com base nos sintomas, confirmando a suspeita de que fitoplasma pudesse estar associado aos sintomas apresentados pelas plantas afetadas pela doença. Amostras sintomáticas coletadas nos três estados brasileiros mostraram consistentemente a associação planta doente e fitoplasma, revelando a presença de fitoplasma em todas as áreas onde a doença foi observada. Apesar dos resultados expressos neste trabalho parecerem simples, um período superior a um ano foi necessário até que fossem obtidos os primeiros resultados positivos. Ajustes constantes foram processados nas metodologias de extração e nos componentes das reações de PCR. Ensaios foram conduzidos repetidas vezes com amostras coletadas de forma contínua nos cultivos de repolho. A

investigação perseverante produziu resultados confiáveis que permitiram comprovar a hipótese formulada inicialmente de que fitoplasma estaria associado a esta importante doença. Ressalta-se que esta pesquisa também contribuiu para disseminar um pouco mais de conhecimento sobre os fitoplasmas, uma vez que agricultores e técnicos passaram a considerar estes microrganismos como mais um agente causal de doenças de plantas, ao lado de fungos, bactérias, vírus e nematóides.

Figura 4 – Evidência da presença de fitoplasma em tecido de plantas de repolho com sintomas de enfezamento amostradas em Ibiúna/SP. Amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* R16F2n/R2. M = Marcador (1kb Ladder); Mi = padrão positivo (Milho); Rs = repolho sadio (padrão negativo); 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204 = amostras de DNA extraídas de plantas sintomáticas de repolho

Figura 5 - Evidência da presença de fitoplasma em tecido de plantas de repolho com sintomas de enfezamento amostradas Curitiba/PR. Amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* R16F2n/R2. M = Marcador (1kb Ladder); Mi = padrão positivo (Milho); Rs = repolho sadio (padrão negativo); 220, 221, 222, 226, 227, 228, 229, 230 = amostras de DNA extraídas de plantas sintomáticas de repolho

Figura 6 - Evidência da presença de fitoplasma em tecido de plantas de repolho com sintomas de enfezamento amostradas Nova Bassano/RS. Amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* R16F2n/R2. M = Marcador (1kb Ladder); Mi = padrão positivo (Milho); Rs = repolho sadio (padrão negativo); 231 a 237 = amostras de DNA extraídas de plantas sintomáticas de repolho

4.3 Detecção de fitoplasma em cigarrinhas por duplo PCR

Os fragmentos genômicos correspondentes ao 16S rDNA de fitoplasma foram amplificados pelo par de iniciadores P1/Tint e re-amplificados pelo par R16F2n/R2. As amplificações obtidas com este último par de *primer* foram visualizadas na forma de bandas de aproximadamente 1,2 kb, demonstrando a presença de fitoplasma nos extratos de DNA total obtidos de tecidos de insetos coletados em campos de repolho (Figura 7).

A detecção de fitoplasma em tecidos de cigarrinhas se constituiu numa evidência de que o mesmo pode possuir um vetor. Esta evidência se tornou ainda mais consistente porque este fitoplasma foi encontrado justamente em representantes das famílias *Cicadellidae* e *Delphacidae*, amplamente relatadas como importantes vetoras de fitoplasma em diversas regiões do mundo (BATTLE et al., 2000; PILKINGTON et al., 2004). A transmissão por vetor do agente infeccioso encontrado em repolho foi relatada na década de quarenta, quando se atribuíu a doença a um vírus (LEE et al., 1988). Outros relatos sobre a ocorrência de vetor do fitoplasma associado ao enfezamento foram feitos mais recentemente nos Estados Unidos e no Oriente Médio (LEE et al.,

2003; SALEHI et al, 2007). Um trabalho interessante foi desenvolvido por Lee et al. (2003), no qual o mesmo fitoplasma detectado em repolho foi encontrado em cenoura em áreas próximas das quais havia ocorrido epidemia. Assim, a detecção de fitoplasma em cigarrinhas coletadas em cultivos de repolho instalados na região do cinturão verde de São Paulo abre um enorme campo para pesquisa, pois além de repolho outras espécies de hortaliças são intensivamente exploradas nesta área.

Figura 7 - Evidência da presença de fitoplasma em tecido de cigarrinhas provenientes de campos de repolho com ocorrência de enfezamento, localizados em Ibiúna/SP. M = Marcador (1kb Ladder); Mi = padrão positivo (Milho); Rs = repolho sadio (padrão negativo); 213, 217, 257, 258, 256, 255 e 260 = amostras de DNA extraídas de cigarrinhas

4.4 Identificação de fitoplasmas em plantas e insetos por PCR

Com o uso de *primers* específicos para identificação de fitoplasmas típicos do grupo 16SrIII, produtos de PCR foram gerados e visualizados na forma de bandas de aproximadamente 0.8 kb, após eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos amplificados demonstraram que um fitoplasma do grupo 16SrIII estava presente em todas as amostras de plantas sintomáticas de repolho (Figuras 8, 9 e 10). O mesmo resultado foi obtido para a grande maioria das cigarrinhas e para o padrão positivo representado pelo DNA extraído de planta de chuchu, sabidamente um representante de grupo 16SrIII. Para os padrões negativos, representados pelo DNA extraído de plantas sadias de repolho e pela água, nenhuma banda foi verificada.

Para as reações de PCR conduzidas com o par R16(I)F1/R16(I)R1, específico para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrI, além da banda esperada para amostra de milho sabidamente infectada por um fitoplasma deste grupo, duas amostras de repolho apresentaram resultados positivos, sendo uma delas coletada em Ibiúna/SP e outra proveniente de Nova Bassano/RS. Nestes casos, bandas de aproximadamente 1,1 Kb visualizadas no gel indicaram a presença do fitoplasma (dados não mostrados).

Para cigarrinhas, fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrI foram identificados em algumas amostras, nas quais já havia sido encontrado fitoplasma do grupo 16SrIII (Figura 11). Esta evidência indicou a ocorrência de infecção mista tanto nas plantas como nos insetos.

Através do uso de *primer* grupo-específico foi possível não só detectar como também identificar fitoplasmas distintos presentes nas amostras de repolho, sendo predominantes aqueles pertencentes ao grupo 16SrIII (grupo do fitoplasma do “X-disease”). A ocorrência de fitoplasmas do grupo 16SrI também foi verificada em trabalhos realizados no estado do Texas (EUA), onde pesquisadores demonstraram que o fitoplasma associado ao superbrotamento do repolho pertencia a este grupo de classificação (LEE et al., 2003). Caso semelhante ocorre com fitoplasma associado ao cálice gigante do tomateiro, identificado no Brasil como sendo pertencente ao grupo 16SrIII (AMARAL MELLO et al., 2006) e no exterior como representante do grupo 16SrI (LEE et al., 1998).

Figura 8 – Identificação molecular de fitoplasma do grupo 16SrIII em amostras de plantas de repolho com enfezamento, coletadas na região de Ibiúna/SP. PCR duplo conduzido com os pares de *primers* P1/Tint e R16(III)F2/ R16(III)R1. M = marcador; Chu = padrão positivo (Chuchu); Água = padrão negativo (água); 198, 199, 200, 201, 202, 203, 205 = amostras de DNA extraídas de repolho; Milho = padrão de grupo 16Srl (milho); ReS= padrão negativo (repolho sadio)

Figura 9 - Identificação molecular de fitoplasma do grupo 16SrIII em amostras de plantas de repolho com enfezamento, coletadas na região de Curitiba/PR. PCR duplo conduzido com os pares de *primers* P1/Tint e R16(III)F2/ R16(III)R1. M = marcador; Chu = padrão positivo (Chuchu); 220, 221, 222, 227, 228 e 229 = amostras de DNA extraídas de repolho; Água = padrão negativo; ReS = padrão negativo (repolho sadio)

Figura 10 - Identificação molecular de fitoplasma do grupo 16SrIII em amostras de plantas de repolho com enfezamento, coletadas na região de Nova Bassano/RS. PCR duplo conduzido com os pares de *primers* P1/Tint e R16(III)F2/ R16(III)R1. M = marcador; Rs = padrão negativo (água); Chu = padrão positivo (Chuchu); 231 a 238 = amostras de DNA de fitoplasma extraídas de repolho

Figura 11 – Identificação molecular de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII em tecidos de cigarrinhas coletadas em campos de repolho com enfezamento, localizados na região de Ibiúna/SP. PCR duplo realizado com os *primers* P1/Tint na primeira reação e *primers* específicos R16(I)F1/R16(I)R1 e R16(III)F2/ R16(III)R1. Chu = padrão positivo de grupo 16SrIII; Mi = padrão positivo de grupo 16SrI; Rs = padrão negativo (repolho sadio). 213, 217, 223, 255, 256, 257, 258, 260 = amostras de DNA de fitoplasma extraídas de cigarrinhas

4.5 Identificação de fitoplasmas por análise de RFLP

4.5.1 Identificação de fitoplasmas em plantas

Fitoplasmas detectados em todas as amostras de repolho geraram padrões coletivos de RFLP mutuamente indistinguíveis entre si e com o fitoplasma usado como padrão, para as enzimas de restrição *AluI*, *MseI*, *RsaI*, *KpnI*, *MboI* e *HpaI* (Figura 12). Os perfis eletroforéticos produzidos por estas endonucleases (Tabela 1) se mostraram idênticos aos padrões relatados para fitoplasmas do grupo 16SrIII (LEE et al., 1998), demonstrando que o fitoplasma associado ao enfezamento do repolho pertencia ao grupo 16SrIII. Uma vez que um fitoplasma representante do grupo 16SrIII estava presente em todas as amostras, somente algumas foram escolhidas como representantes e estão relacionadas nos géis apresentados neste trabalho.

Considerando-se a enzima *HhaI*, os fitoplasmas presentes nas amostras de repolho de Curitiba produziram perfis eletroforéticos idênticos àqueles obtidos para o fitoplasma do chuchu usado como padrão e sabidamente pertencente ao subgrupo 16SrIII-J (LEE et al., 1998; MONTANO et al., 2000). No entanto, os fitoplasmas das amostras de Ibiúna e Nova Bassano se mostraram idênticos entre si, porém foram identificados como pertencentes ao subgrupo 16SrIII-E (LEE et al., 1998). Estes resultados evidenciaram que os fitoplasmas envolvidos com o enfezamento do repolho podem apresentar variantes ao nível de subgrupo, dentro do grupo 16SrIII, com base na análise do 16SrDNA.

A enzima *Bsh* 12361 permite diferenciar fitoplasmas componentes do subgrupo 16SrIII-F daqueles afiliados ao subgrupo 16SrIII-J. O uso desta enzima mostrou que os fitoplasmas encontrados nas amostras de Curitiba apresentaram um perfil totalmente distinto de fitoplasmas do grupo 16SrIII-J e que este perfil se distinguia de todos os padrões relatados para fitoplasmas de modo geral (LEE et al., 1998; DAVIS et al., 1998; MONTANO et al., 2000). No entanto, quando as amostras de Ibiúna e Nova Bassano foram analisadas, os fitoplasmas presentes nestas amostras geraram perfis idênticos entre si (exceção para duas amostras de Ibiúna), sendo que estes padrões permitiram alocar estes fitoplasmas no subgrupo 16SrIII-J. Para as duas amostras de

Ibiúna, os fitoplasmas encontrados nas mesmas não puderam ser classificados dentro de subgrupos, pois produziram perfis distintos de qualquer um dos subgrupos relatados para fitoplasmas do grupo 16SrIII (LEE et al., 1998; DAVIS et al., 1998; MONTANO et al., 2000).

Figura 12 - Produtos de digestão enzimática com as endonucleases *AluI*, *MseI*, *RsaI*, *KpnI*, *MboI*, *HhaI*, *HpaII* e *Bsh12361*. **(A)** Linhas 1, 5, e 9: representante do grupo 16SrIII. Linhas 2, 6 e 10: amostras de repolho de Curitiba/PR. Linhas 3, 7, e 11: amostras de repolho de Ibiúna/SP. Linhas 4, 8 e 12: amostras de repolho de Nova Bassano/RS. **(B)** Linhas 1, 5 e 9: representante do grupo 16SrIII. Linhas 2, 6 e 10: amostra de repolho de Curitiba/PR. Colunas 3, 7 e 11: amostra de repolho de Ibiúna/SP. Linhas 4, 8 e 12: amostra de repolho de Nova Bassano/RS. **(C)** Coluna 1: Chuchu (representante grupo 16SrIII). Linha 2: amostra de repolho de Curitiba/PR. Linhas 3: amostra de repolho de Ibiúna/SP; Linha 4: amostra de repolho de Nova Bassano/RS. **(D)** Linhas 1 e 2: amostras de cigarrinhas, de Ibiúna/SP. Linhas 3: fitoplasma extraído de repolho, oriundo de Nova Bassano/RS. Linhas 4, 5 e 6: fitoplasma extraído de repolho, coletado em Ibiúna/SP e Linha 7: fitoplasma extraído de chuchu, representantes de grupo 16SrIII. **(E)** Linha 1: fitoplasma extraído de chuchu; Linhas 2 e 3: fitoplasma extraído de repolho de Curitiba/PR. M – padrão de peso molecular, utilizando o marcador ϕ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb)

4.5.2 Identificação de fitoplasmas em cigarrinhas

A identificação dos fitoplasmas detectados nas cigarrinhas coletadas em campos de repolho foi conduzida de forma idêntica àquela empregada para caracterização molecular de fitoplasmas ocorrentes em plantas de repolho. A análise de RFLP revelou que 93% dos fitoplasmas presentes nas amostras de insetos pertenciam

ao grupo 16SrIII. Estes fitoplasmas produziram perfis eletroforéticos idênticos entre si e com o fitoplasma do chuchu usado como padrão, para as enzimas *AluI*, *MseI*, *RsaI*, *KpnI*, *MboI* e *HpaI*, consideradas individualmente (Figura 13).

A análise de RFLP conduzida com a enzima *HhaI* produziu padrões eletroforéticos que evidenciaram a ocorrência de fitoplasmas do subgrupo 16SrIII-J em parte das amostras de insetos. No entanto, para as demais amostras esta enzima gerou padrões que permitiram a identificação de fitoplasmas pertencentes ao subgrupo 16SrIII-E. Neste último caso, os perfis resultantes da digestão enzimática se mostraram idênticos àqueles observados para as amostras de repolho provenientes de Ibiúna e Nova Bassano. Como as cigarrinhas foram coletadas em Ibiúna, estes resultados se constituem numa evidência de que o inseto possa estar envolvido na transmissão do agente do enfezamento do repolho. Ainda, a demonstração da ocorrência de fitoplasmas do subgrupo 16SrIII-J em parte das cigarrinhas amostradas em Ibiúna e em plantas de repolho afetadas pelo enfezamento na região Curitiba é mais uma indicação de que o fitoplasma do enfezamento possa ser veiculado por vetor, assim como relatado em trabalhos de mesma natureza conduzidos em outras regiões do mundo (LEE et al., 2003; SALEHI et al., 2007).

A enzima *Bsh* 12361 possibilitou confirmar a presença de fitoplasma do subgrupo 16SrIII-J nas mesmas amostras de insetos em que enzima *HhaI* permitiu identificar o fitoplasma pertencente a este subgrupo (Tabela 1). Para as demais amostras de insetos, a digestão conduzida com *Bsh* 12361 produziu perfis eletroforéticos distintos de qualquer um dos subgrupos componentes do grupo 16SrIII (LEE et al., 1998; DAVIS et al., 1998; MONTANO et al., 2000). Neste caso, os fitoplasmas presentes nestas amostras de insetos apresentaram perfis idênticos àqueles obtidos para fitoplasmas encontrados nas duas amostras de plantas coletadas em Ibiúna e analisados com a enzima *Bsh* 12361.

Esta inconsistência quanto à classificação dos fitoplasmas do grupo 16SrIII, encontrados nas plantas e nos insetos, ao nível de subgrupo não é incomum, pois fitoplasmas pertencentes a este grupo apresentam uma diversidade genética relativamente ampla e complexa, característica esta já demonstrada em estudos anteriores para o agente do cálice gigante do tomateiro (AMARAL MELLO et al., 2006)

e para fitoplasmas encontrados em *Cirsium arvense*, com sintomas de folhas brancas e *Gaillardia sp* com enfezamento e filodia. (JOMANTIENE et al., 2002).

A análise de RFLP também revelou que aproximadamente 7% das amostras de insetos apresentavam somente fitoplasmas pertencentes ao grupo 16Srl. Esta determinação foi feita com base nos perfis eletroforéticos apresentados pelos fitoplasmas presentes nos insetos, os quais se mostraram idênticos aos padrões relatados para os fitoplasmas típicos do grupo 16Srl (LEE et al., 1998), para todas as enzimas de restrição usadas na análise de RFLP (Figura 14). A identificação molecular demonstrou claramente que o fitoplasma pertencia ao subgrupo 16Srl-B. Fitoplasma deste mesmo subgrupo também foi relatado como estando associado ao enfezamento do repolho em uma epidemia da doença registrada no estado norte-americano do Texas, há alguns anos atrás (LEE et al., 2003).

A identificação molecular de fitoplasmas conduzida com PCR duplo usando-se *primers* específicos foi confirmada com os resultados gerados pela análise de RFLP, sobretudo para as plantas. Através do emprego destas técnicas foi revelada a associação de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16Srl e 16SrIII com as amostras sintomáticas de plantas de repolho e com insetos do tipo cigarrinhas amostrados nas culturas que apresentavam plantas doentes. Embora fitoplasmas pertencentes aos grupos 16Srl e 16SrIII tenham sido identificados em associação com o enfezamento em plantas de repolho, houve ampla predominância dos fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII. Este mesmo tipo de constatação foi verificado em relação às cigarrinhas, nas quais o fitoplasma do grupo 16SrIII foi identificado na grande maioria dos espécimes amostrados no campo. As evidências indicaram a provável ocorrência de infecção mista, com a participação de fitoplasmas representantes destes dois grupos. A ocorrência de fitoplasmas pertencentes a grupos distintos associados a uma mesma doença tem sido relatada para diversas espécies vegetais, destacando-se o clássico caso do cálice gigante do tomateiro. Através de identificação molecular foi demonstrada a associação desta doença com fitoplasmas pertencentes aos grupos 16Srl nos Estados Unidos, 16SrIII no Brasil, 16SrVI na Jordânia, e 16Srl, 16SrIII, 16SrV e 16SrXII na Itália, como referido no trabalho de Amaral Mello et al. (2006). O presente estudo revelou que um fitoplasma do grupo 16Srl, subgrupo 16Srl-B, pode estar associado ao

enfezamento do repolho nas condições brasileiras, assim como foi relatado a presença de fitoplasma deste mesmo subgrupo em epidemia da doença ocorrente no território norte-americano. No entanto, este estudo também revelou como fato novo, a ocorrência altamente freqüente de um fitoplasma do grupo 16SrIII em plantas portadoras da doença e em populações de cigarrinhas presentes em campos de cultivo de repolho, nos quais o enfezamento ocorria com alta incidência.

Figura 13 - (A) Produtos de digestão enzimática com as endonucleases *Alul*, *RsaI*, *MseI*, *MboI*, *HpaII* e *HhaI*. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de *primers* P1/Tint e R16F2n/R16R2, utilizando DNA extraído de plantas de chuchu com sintomas de superbrotamento, como representante do grupo 16SrIII e DNA extraído de cigarrinhas. Coluna 1, 4, 7, 10, 13 e 16: representante do grupo 16SrIII. Coluna 2, 5, 8, 11, 14 e 17: amostra de cigarrinha. Colunas 3, 6, 9, 12, 15 e 18: amostra de cigarrinha. (B) Produtos de digestão enzimática com as endonucleases *HpaII*, *KpnI*, *HhaI*, *BshI*, *MboI*, *RsaI*, *MseI* e *Alul* do produto de duplo PCR conduzido com os pares de *primers* P1/Tint e R16F2n/R16R2, utilizando DNA de fitoplasma extraído de cigarrinha. M – padrão de peso molecular, utilizando o marcador ϕ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb)

Figura 14 - Produtos de digestão enzimática com as endonucleases *AluI*, *MseI*, *MboI*, *KpnI*, *HhaI* e *HpaII*. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de oligonucleotídeos P1/Tint e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de cigarrinha. M – padrão de peso molecular, colunas ímpares = fitoplasma de grupo 16SrIII, colunas pares = fitoplasma de grupo 16SrI. Ambos extraídos de cigarrinhas coletadas em Ibiúna/SP. Marcador ϕ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb)

Tabela 1 - Comparação dos padrões de perfil eletroforético dos fitoplasmas das amostras de Ibiúna/SP, Curitiba/PR e Nova Bassano/RS com outros fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII obtidos através de análise de RFLP.

Fitoplasmas – grupo 16SrIII	subgrupo	Padrões de restrição obtidos com as enzimas							
		<i>AluI</i>	<i>MseI</i>	<i>HpaII</i>	<i>KpnI</i>	<i>RsaI</i>	<i>MboI</i>	<i>HhaI</i>	<i>Bsh</i>
Ibiúna/SP	(?)	1	1	2	1	1	2	3	5
Ibiúna/SP	(?)	1	1	2	1	1	2	3	1
N. Bassano/RS	(?)	1	1	2	1	1	2	3	1
Curitiba/PR	(?)	1	1	2	1	1	2	2	6
Cigarrinha	(J)	1	1	2	1	1	2	2	1
Cigarrinha	(?)	1	1	2	1	1	2	3	5
CX ^a	(A)	1	1	1	1	1	1	1	1
CYE ^a	(B)	1	1	2	1	1	2	1	1
PB ^a	(C)	1	2	2	1	1	2	2	2
GR ^a	(D)	1	3	2	1	1	2	2	3
SP1 ^a	(E)	1	1	1	1	1	1	3	1
MW1 ^a	(F)	1	1	2	1	1	2	2	2
WWB ^a	(G)	1	1	1	1	2	1	1	1
PoiBI ^d	(H)	1	1	1	1	1	1	1	4
VGY ^b	(I)	1	2	1	1	1	1	1	1
ChWB ^c	(J)	1	1	2	1	1	2	2	1

Os números representam os diferentes tipos de padrões obtidos para cada enzima de restrição. CX = Canadian X-disease; CYE = Clover yellow edge; PB = Pecan bunch; GR1 = Goldrod yellows; SP1 = Spirea stunt; MW1 = Milkweed yellows; WWB = Walnut witches'-broom; PoiBI = Poinsetia branch-inducing; VGY = Virginia grapevine yellows; ChWB = Chayote witches'-broom; a = descritos por Lee et al. (1998); b = descrito por Davis et al. (1998); c = descrito por Montano et al. (2000); d = descrito por Davis et al. (não publicado, citado por Barros, 2002).

4.6 Análise epidemiológica

4.6.1 Avaliações

Foram avaliadas cinco grandes áreas produtoras de repolho da região do cinturão verde do Estado de São Paulo, todas com características semelhantes de condições climáticas e manejo e próximas a áreas de mata. Os sintomas característicos da doença inviabilizam a comercialização do produto motivo pelo qual incidências que superem 25% são consideradas altas. As porcentagens de incidência para cada área estão apresentadas ao lado dos mapas na Figura 15. Nota-se que a incidência da doença nas áreas 2B (7,6%), 3 (4,7%) e 4 (6,3%), no final do ciclo da cultura foi relativamente baixa. Nas áreas 1 (25%) e 2A (15,3%) as incidências foram maiores. Mesmo baixos, os valores de incidência foram suficientes para que a agregação significativa fosse detectada. Epidemias de amarelecimento fatal do dendezeiro analisadas por Laranjeira et al. (1998) exibiram agregação significativa para valores de incidência de 3,2% ou 3,8%. De modo semelhante, Van de Lande (1993) relata agregação significativa para o amarelecimento fatal em Victoria, Suriname, para incidência de 0,7% ($P < 0,05$). Embora não tenha sido feita a análise temporal da doença, observações de campo indicaram que houve crescimento da doença no tempo, devido possivelmente, à presença constante de inóculo no campo (plantas infectadas), à eficiência de transmissão da cigarrinha ou, até mesmo, ao elevado número de cigarrinhas presentes nos campos de cultivo.

4.6.2 Distribuição espacial

As análises espaciais realizadas tiveram por base os mapas de distribuição de plantas doentes (Figura 15). A esses mapas foram justapostos *quadrats* de 3X3, 4X3, 5X3 e 6X3 plantas, para determinar todos os parâmetros que caracterizam a distribuição espacial da doença. Com os dados dos mapas, a partir de cada conjunto de *quadrats*, calculou-se a variância observada (V_{obs}), a variância binomial esperada (V_{bin}) e o índice de dispersão ($I\beta$). Os dados da variância foram utilizados para o cálculo da lei de Taylor modificada, que relaciona o logaritmo das variâncias observada e binomial. Na Tabela 2 encontram-se os valores do índice de dispersão para cada campo e os

valores dos parâmetros b e A da lei de Taylor modificada. A Figura 17 mostra a interação das variâncias observada e binomial.

Figura 15 - Padrão espacial de plantas de repolho infectadas com fitoplasma em campos de cultivo na região de Ibiúna/SP. Áreas pretas indicam plantas sintomáticas e áreas brancas plantas assintomáticas

Como pode ser observada na Tabela 2 e Figura 17, a dinâmica espacial da doença em repolho foi do tipo agregada. Evidenciou-se o papel importante da fonte de inóculo no aumento da incidência da doença. O produtor possuía áreas em diferentes estágios de desenvolvimento da planta e estas, uma vez contaminadas, serviram de fonte para novas aquisições e infecções. Outro fator importante é a proximidade de área de mata, locais provavelmente, com uma maior predominância de insetos do tipo cigarrinha. Quanto mais próximo a essas áreas, maior foi a incidência de sintomas da doença em todos os campos avaliados.

Tabela 2 - Índice de dispersão, parâmetros A e b da lei de Taylor modificada e R^2 calculados para cada área em cada *quadrat*

Áreas						Conjunto de áreas		
	1	2A	2B	3	4			
<i>quadrats</i>	$I\beta$					b	A	R^2
3x3	1,7673	1,021	0.9583	1,2981	1,1711	1,177*	0,4438	0,9094
4x3	1,7933	1,0052	0.9978	1,1864	1,168	1,215**	0,542	0,9238
5x3	1,9568	1,058	0.9458	1,4304	1,2609	1,187*	0,5313	0,8745
6x3	2,0726	1,1127	0.9885	1,528	1,1811	1,22*	0,6349	0,87610

$I\beta$ = índice de dispersão (variância observada/variância binomial), valores indicados para cada avaliação em cada *quadrat*. Valores significativos indicam agregação de plantas sintomáticas ($P \leq 0,05$). *, **: valores significativamente diferentes de 1 para b e de zero para A, pelo teste *t* ($P \leq 0,05$).

4.6.2.1 Análise de seqüências ordinárias

Para cada campo avaliado foram calculados a proporção de linhas com agregação significativa de plantas doentes e o nível de agregação geral no sentido das linhas de planta. A variação no índice de Zso está apresentada na Figura 16 e representa os índices totais calculados em cada área de cultivo.

Figura 16 - Variação do índice Zso em função da incidência da doença em repolho nas linhas de plantio

Não foi encontrada nenhuma relação entre valores de incidência nos campos e o grau de agregação nas linhas, os resultados dessa análise indicam que a distribuição da doença nas linhas de plantio foi ao acaso, pois os valores calculados de Z_{SO} mostraram-se sempre maiores que -1,64, evidenciando que o patógeno não está se disseminando de planta a planta.

4.6.2.2 Índice de dispersão e aplicação da lei de Taylor modificada

Valores do índice de dispersão estatisticamente superiores a 1 foram tomados como indicativo de agregação. A Tabela 2 mostra os valores do índice de dispersão para cada campo e os valores dos parâmetros b e A da lei de Taylor modificada. Os maiores valores do índice de dispersão foram observados nos *quadrats* 6 x 3 plantas, indicando ser esta uma boa unidade de dispersão dos vetores.

O parâmetro b maior que 1 é um indicativo de agregação, ou seja, quando maior for o valor de b , mais agregados estão os dados. Esse parâmetro é um atributo importante na caracterização espacial de espécies vetorais (TAYLOR et al., 1988). Patógenos diferentes, mas com vetores do mesmo grupo, devem exibir padrões espaciais semelhantes. Assim, por exemplo, no patossistema *Xylella fastidiosa* x citros x *Cicadellidae*, o parâmetro b calculado por Laranjeira (1997) foi de 1,13 ($P < 0,05$), nesse mesmo contexto, o valor de b foi de 1,10 ($P < 0,005$) para o enfezamento do milho

x fitoplasma x *Dalbulus maidis* (BERGAMIN FILHO et al., 2000, dados não publicados) e 1,19 ($P < 0,05$) para o vírus do “rayado fino” x milho x *D. maidis*, o que indica, segundo os autores, um padrão moderadamente agregado, provavelmente devido ao hábito dos vetores, que se instalam ao acaso na cultura e que posteriormente, não costumam voar para plantas imediatamente vizinhas àquelas em que se encontravam.

Houve interação significativa entre $\log(V_{obs})$ e $\log(V_{bin})$. Os valores de b foram estatisticamente maiores que 1, mostrando agregação de plantas sintomáticas em todos os campos (Tabela 2). Os resultados obtidos com a lei de Taylor modificada confirmam e ampliam aqueles obtidos com os índices de dispersão, portanto, plantas de repolho com enfezamento exibem acentuada agregação com diferentes níveis de incidência, desde os mais baixos, acentuando-se em função do tempo e do conseqüente aumento da incidência da doença. Resultado semelhante foi observado por Madden et al. (1995b), que relatou um padrão espacial do tipo agregado no campo para o “aster yellows” em alface.

Figura 17 - Relação entre os logaritmos da variância da incidência observada e da variância binomial para a dinâmica espacial da doença em repolho (*quadrat* 6x3). Dados de cinco campos analisados em conjunto. A linha cheia representa a relação $\log(V_{obs}) = \log(A) + b \log(V_{bin})$

4.6.2.3 Determinação de áreas isopatas

A análise de áreas isopatas foi feita a partir de mapas espaciais, que indicaram claramente que a doença é introduzida na área de plantio a partir de área externa, principalmente em locais próximos à mata, com maiores populações de plantas silvestres e, provavelmente populações de cigarrinhas. O padrão espacial da doença nos campos de cultivo de repolho avaliados pode ser visto na figura 19 para um determinado tamanho de *quadrat* (6x3 plantas), onde o índice de dispersão é maior e, portanto, mais agregados estão os dados. De modo geral, não foram observadas diferenças no padrão espacial de plantas infectadas por fitoplasmas nas cinco áreas avaliadas.

Todas as análises aplicadas ao padrão espacial indicaram que a doença comporta-se de forma agregada no campo, e que não se dissemina de planta a planta nas linhas de plantio.

Figura 18 - Áreas isopatas referentes à avaliação em cada uma das áreas analisadas, mostrando os resultados da análise em *quadrats* 6x3. As cores indicam a variação dos valores de incidência, verde (menor incidência), vermelho escuro (maior incidência)

No Brasil, quase não se dispõe de literatura sobre aspectos epidemiológicos relacionados às doenças causadas por fitoplasmas, exceto para o complexo do enfezamento do milho, causado por fitoplasma e espiroplasma

transmitidos pela cigarrinha *Dalbulus maidis* (*Cicadellidae*). Este foi, portanto, um trabalho pioneiro, importante para o início dos estudos envolvendo a interação fitoplasma/hortaliça/vetor, sendo o primeiro relato de doença associada a fitoplasma em repolho.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados pode-se concluir que:

- 1 - Fitoplasmas estão associados ao enfezamento do repolho;
- 2 - Os fitoplasmas detectados em repolho pertencem aos grupos 16Srl e 16SrIII, com base na classificação adotada para estes procariotos;
- 3 - Cigarrinhas das famílias *Cicadellidae* e *Delphacidae* coletadas em cultivos de repolho com enfezamento se mostraram portadoras de fitoplasmas dos grupos 16Srl e 16SrIII;
- 4 - O padrão espacial da doença é agregado.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.
- AMARAL MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; CAMARGO, L.E.A. Identidade molecular dos fitoplasmas associados aos enfezamentos do tomateiro e da berinjela com base na análise do gene 16S rDNA. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p. 113-118, 2007.
- AMARAL MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; KITAJIMA, E. W.; RIBEIRO, L.F.C.; KOBORI, R. Tomato big bud associated with a phytoplasma belonging to group 16SrIII in Brazil. **International Journal of Pest Management**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 233-237, 2006.
- AMARAL MELLO, A.P.O.; RIBEIRO, L.F.C.; MASSOLA JUNIOR, N.S.; BEDENDO, I.P. Um fitoplasma do grupo 16SrV associado ao superbrotamento da crotalária. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 432-435, 2004.
- BARROS, T.S.L. **Caracterização molecular de Mollicutes fitopatogênicos no Brasil**. 2002. 105p. Tese (Doutorado na área de Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2002.
- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S. N. **Experimentação Agrícola**. 3 ed. Jaboticabal: FUNEP, FCAV/UNESP, 1995. 247p.
- BATLLE, A.; MARTINEZ, M.A. ;LAVIÑA, A. Occurrence, distribution and epidemiology of grapevine yellows in Spain. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.106, n.9, p. 811-816, 2000.
- BERGAMIM FILHO, A ; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**, São Paulo: Ceres, 1996. 299p.
- BERGAMIM FILHO, A ; HAU, B.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F.F. Análise especial de epidemias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.10, p. 155-218, 2002.
- BERTACCINI, A., DAVIS, R. E. LEE, I.-M. Distinction among mycoplasma-like organisms (MLOs) in *Gladiolus*, *Ranunculus*, *Brassica* and *Hydrangea* through detection with non-radioactive cloned DNA probes. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 29, p.107-113, 1990.
- BOVE, J.M.; GARNIER, M. Witches' broom disease of lime. **Arab Society for Plant Protection**, Kuala Lumpur, v.18, p.148-152, 2000.
- BURKNESS, E.C.; ENI'ITE, R.C.; O'ROURKE, P.K.; HUTCHISON, W.D. Binomial sequential sampling for management of aster Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae)

and aster yellows phytoplasma in carrot: Impact of tally Threshold on the accuracy of treatment decisions. **Environmental Entomology**, College Park, v.25, n.5, 851-857, 1999.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley, 1990. 532p.

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

DAVIS, R.E.; LEE, I.M. Mycoplasma-like organisms as plant disease agents – a review. **ATCC, Quarterly Newsletter**, Rockville, v.11, p.1-11, 1991

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

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

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

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

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

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

ERRAMPALLI, D.; FLETCHER, J.; EASTMAN, C. Natural occurrence of aster yellows in vegetable crops of Oklahoma. **Phytopathology**, Saint Paul, v.76, p.1084, 1986.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2002**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, p.46-50, 2002.

FODOR, M.; VICZIAN, O.; MERGENTHALER, E.; SULE, S. Cabbage infected with phytoplasma from the aster yellows group in Hungary. **Acta Phytopathological and Entomological Hungarica**, Budapest, v.34, p.1-6, 1999.

GATINEAU, F.; LARRUE, J.; CLAIR, D.; LORTON, F.; RICHARD-MOLARD, M. BOUDON-PADIEU, E. A new natural planthopper vector of stolbur phytoplasma in the genus *Pentastiridius* (Hemiptera: *Cixiidae*). **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 263-271, 2001.

GIBBONS, J.D. **Nonparametric methods for quantitative analysis**. New York: Holt, Rinehart & Winston, 1976. 463p.

GOODWIN, P.H.; MAHUKU, G.S.; LIU, H.W; XUE BG. Monitoring phytoplasma in populations of aster leafhopper from lettuce fields using the polymerase chain reaction. **Crop Protection**, Guildford, v.18, n.2 p.91-99, 1999.

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

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

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

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

HUGHES, G.; MADDEN, L.V.; MUNKVOLD, G.P. Cluster sampling for disease incidence data. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p.132-137, 1996.

ISHIIE, T.; DOY, Y.; YORA, K.; ASUYAMA, H. Suppressive effect of antibiotics of the tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease. **Annual Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 33, p.267-275, 1967.

JIANG, Y. P; CHEN, T. A. Purification of mycoplasma-like organisms from lettuce with aster yellows disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v.77, n.6, p.949-953, 1987.

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

- KHADHAIR, A.H.; HIRUKI, C.; HWANG, S. Molecular detection of alfafa witches' broom phytoplasma in four leafhopper species associated with infected alfafa plants. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 152, p. 269-275, 1997.
- KHADHAIR, A.H.; EVANS, I.R.; CHOBAN, B. Identification of aster yellows phytoplasma in garlic and green onion by PCR-based methods. **Microbiological Research**, Amsterdam, v.157, p.1-7, 2002.
- KHAN, A.J.; BOTTI, S.; AL-SUBHI, A. M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; BERTACCINI, A.F. Molecular identification of a new phytoplasma associated with alfafa witches' broom in Oman. **Phytopathology**, Saint Paul, v.92, p.1038-1047, 2002.
- KITAJIMA, E.W. Enfermidade de plantas associadas a organismos do tipo micoplasma. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p.153-174, 1994.
- KITAJIMA, E.W. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatadas de plantas no Brasil (1986-1993). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, (Supl. Especial) p.92, 1995.
- KITAJIMA, E.W.; COSTA, A. S. Micoplasma: Possível agente etiológico de certas moléstias de plantas. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.22, n.4, p.351-363, 1970.
- KIRKPATRICK, B.C. Mycoplasma-like organisms – Plant and invertebrate pathogens. In: BALLOWS, A.; TRUPER, H.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. (Ed.). **The prokaryotes**. New York: Springer, 1992. p.4050-4067.
- KRANZ, J. **Comparasion of epidemics. Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.12, p.355-374, 1974.
- KRANZ, J. **Epidemics of plant diseases. Mathematical analysis and modeling**. Berlin: Springer, 1990. 268p.
- KRANZ, J.; ROTEM, J. **Experimental techniques in plant disease epidemiology**. Berlin: Springer, 1988. 299p.
- LARANJEIRA, F.F. **Dinâmica espacial e temporal da clorose variegada dos citros** 1997. 144p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.
- LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; BERGER, R.D.; HAU, B. Análise espacial do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 23, p. 397-403, 1998.
- LEE, I.M; DAVIS, R.E. Detection and investigation of genetic relatedness among cloned DNA and RNA probes. **Molecular Plant-microbe Interactions**, Saint Paul, v.1, n.8, p.303-310, 1988.

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

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

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

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

LEE, I.-M., GUNDERSEN-RINDAL, D. E.; BERTACCINI, A. Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. **Phytopathology**, Saint Paul, v.88, p.1359-1366, 1998b.

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

LEE, I.-M.; DANE, R. A.; BLACK, M. C. ; TROXCLAIR, N. First report of an aster yellows phytoplasma associated with cabbage in southern Texas. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p.447, 2001.

LEE, I.-M.; MARTINI, M.; BOTTNER, K. D; DANE, R. A.; BLACK, M. C.; TROXCLAIR, N. Ecological Implications from a Molecular Analysis of Phytoplasmas Involved in an Aster Yellows epidemic in various crops in Texas. **Phytopathology**, Saint Paul, v.93, p. 1368-1377, 2003.

MADDEN, L.V. Dynamic nature of within-field disease and pathogen distributions. In: JEGGER, M.J. (Ed.) **Spatial components of plant disease epidemics**, New Jersey: Prentice-Hall, 1989. p. 96-126.

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

MADDEN, L.V.; HUGHES, G.; ELLIS, M.A. Spatial heterogeneity of the incidence of grape downy mildew. **Phytopathology**, Saint Paul, v.85, p. 269-275, 1995a.

- MADDEN, L.V.; NAULT, L.R.; MURRAL, D.J.; ATELT, M.R. Spatial pattern analysis of the incidence of aster yellows diseases in lettuce. **Research Population Ecological**, v. 37, p. 279-289, 1995b.
- MADDEN, L.V.; LOUIE, R.; ABT, J.J.; KNOKE, J.K. Evaluation of tests of randomness of infected plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v.72, p. 195-198, 1982.
- MARCONE, C.; RAGOZZINO, A. Detection of phytoplasmas in Brassica spp in Southern Italy and their characterization by RFLP analysis. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v.102, n.5, p.449-460, 1995.
- MARCONE, C.; RAGOZZINO, A.; SEEMULLER, E. Detection and identification of phytoplasmas infecting vegetable, ornamental and forage crops in southern Italy. **Journal Plant Pathology**, Bari, v.79, p.211-217, 1997.
- MARTIN, R.R; JAMES, D.; LÉVESQUE, C.A. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.38, p.207-239, 2000.
- MELO, L.A.; YUKI, V.A.; BEDENDO, I.P. Ocorrência de um fitoplasma do grupo 16SrIII associado ao superbrotamento de abobrinha no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, p.S44, 2007.
- MILLER, S.A.; MARTIN, R.R. Molecular diagnosis of plant disease. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.26, p.409-432, 1988.
- MONTANO, H.G., DAVIS, R.E., DALLY, E.L., PIMENTEL, J.P., BRIOSO, P.S.T. Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, p.429-436, 2000.
- MONTANO, H.G.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; HOGENHOUT, S.; PIMENTEL, J.P.; BRIOSO, P.S.T. 'Candidatus phytoplasma brasiliense', a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches'broom disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading. v.51, p.1109-1118, 2001.
- MURRAL, D.J.; NAULT, L.R.; HOY, C.W.; MADDEN, L.V.; MILLER, S.A. Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.89, n.5, p.1223-1232, 1996.
- NIELSON, M.W. Taxonomic relationships of leafhopper vectors of plant pathogens in: MARAMOROSCH, K.; HARRIS, K.F. (Ed.). **Leafhopper Vectors and Plant Disease Agents**, New York: Academic Press, 1979. p. 3-27.
- OSMELAK, J.A. Predicting vector movements and disease incidence in tomato crops for the control of tomato big bud disease. **Proceedings of the Fourth Australian Applied Entomological Research Conferences**, p. 458-462, 1984.

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

PLOAIE, P.G. Mycoplasma-like organisms and plant diseases in Europe. in: K. MARAMOROSCH, K.; HARRIS, K. F. (Ed.) **Plant Diseases and Vectors**. New York. Academic Press, 1981. p. 61-104.

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

RUEGG, E.F., COUSIN, M.T. Ação da oxitetraciclina sobre o cálice gigante, moléstia causada por micoplasmas. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.41, n.1, p.39-46, 1974.

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.

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

SEEMULLER, E.; SCHNEIDER, B.; MAURER, R.; AHRENS, U.; DAIRE, X.; KISON, H.; LORENZ, K.H.; FIRRAO, G.; AVINENT, L.; SEARS, B.B.; STACKEBRANDT, E. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16 S ribosomal DNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p.440-446, 1994.

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

SCHNEIDER B, SEEMÜLLER E, SMART CD, KIRKPATRICK B. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: RAZIN S, TULLY JG, (Ed.). **Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma**, San Diego, CA: Academic Press, 1995. p. 369–380.

SCHNEIDER, B.; GIBB, K.S.; PADOVAN, A. DAVIS RI ; DE LA RUE, S. Comparison and characterization of tomato big bud and sweet potato little leaf group phytoplasmas. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.147, p. 31-40, 1999.

SEVERIN, H.H.P; FRAZIER, N.W. California aster yellows on vegetable and seed crops. **Hilgardia**, Berkeley, v.16, p.573-596, 1945.

SIDDIQUE, A.B.M.; AGRAWAL, G.K.; ALAM, N.; KRISHNA REDDY, M. Electron microscopy and molecular characterization of phytoplasmas associated with little leaf disease of brinjal (*Solanum melongena* L.) and periwinkle (*Catharanthus roseus*) in Bangladesh. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.149, p.237-244, 2001.

SMART, C.D.; SCHNEIDER, B.; BLOMQUIST, C.L.; GUERRA, L.J.; HARRISON, N.A.; AHRENS, U.; LORENZ, K.-H; SEEMULLER, E.; KIRKPATRICK, B. C. Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, n.8, p. 2988–2993, 1996.

TAYLOR, L.R.; PERRY, J.N.; WOIWOD, I.P.; TAYLOR, R.A.J. Specificity of the spatial power-law exponent in ecology and agriculture. **Nature**, London, v.332, p. 721-722, 1988.

THOMPSON, C.M. Table of percentage points of the λ^2 distribution. **Biometrika**, Cambridge, v.32, p.168-181, 1941.

VAN DE LANDE, H.L. Spatio-temporal analysis of spear rot and 'marchitez sorpresiva' in Africa oil palm in Surinam. **Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 99, p. 129-138, 1993.

VANDERPLANK, J.E. **Plant diseases: epidemics and control**. New York: Academic Press, 1963. 349p.

VIBIO, M., BERTACCINI, A., LEE, I.-M., DAVIS, R. E.; CLARK, M. F. Differentiation and classification of aster yellows and related European phytoplasmas. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v.35, p.33-42, 1996.

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

WESTDAL, P.H.; RICHARDSON, H.P. The susceptibility of cereals and wild oats to an isolate of the aster yellows pathogen. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.47, p.755-760, 1969.

ZANGH, X.S.; HOET, J.; COLVIN, J. A general model of plant-virus disease infection incorporating vector aggregation. **Plant Pathology**, London, v. 49, p. 435-444, 2000.

ZHOU, X.; HOY, C.W.; MILLER, S.A; NAULT, L.R. Spatially explicit simulation of aster yellows epidemics and control on lettuce. **Ecological Modelling**, Amsterdam, v.151, p.293-307, 2002.