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

**Caracterização molecular e análise filogenética do fitoplasma agente do
superbrotamento da mandioca (*Manihot esculenta*) no Estado de São Paulo**

Daniela Flôres

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

**Piracicaba
2009**

Daniela Flôres
Engenheiro Agrônomo

**Caracterização molecular e análise filogenética do fitoplasma agente do
superbrotamento da mandioca (*Manihot esculenta*) no Estado de São Paulo**

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

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

Piracicaba
2009

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

Flôres, Daniela

Caracterização molecular e análise filogenética do fitoplasma agente do superbrotamento da mandioca (*Manihot esculenta*) no Estado de São Paulo/ Daniela Flôres. - - Piracicaba, 2009.

74 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. DNA 2. Filogenia 3. Fitoplasmas - Análise 4. Mandioca 5. Marcador molecular 6. Reação em cadeia por polimerase 7. Superbrotamento I. Título

CDD 633.4
F634c

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

Aos meus pais João e Isabel, pela Vida e Amor

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força concedida, porque sem Ele nada é possível.

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

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

Ao Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo pela orientação, confiança, compreensão e pela colaboração em minha formação.

À pesquisadora do Instituto Agronômico de Campinas, Dra. Patrícia Cia pelas sugestões e correções e principalmente pela amizade e incentivo.

Aos amigos do laboratório de Procariotos Fitopatogênicos Ana Paula, Bárbara, Isolda, Eliane, Luciano, Luiz Fernando, Maria Cristina e Renata Brito.

Aos amigos do laboratório de Virologia Vegetal e Micologia pelo bom convívio e amizade.

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

Aos meus amigos em especial Ana Paula de Oliveira Amaral Mello, Adriana Jadão, Isolda Hass, Maria Cristina Rappussi e Natália Canova, pelos bons momentos juntos, pelo carinho e incentivo.

Ao Samuel Thomazzela Gazzola pelo companheirismo, amizade e apoio constante.

À minha Família pela formação, educação, amor e pela paciência nas horas em que estive ausente.

Obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	17
2 DESENVOLVIMENTO	21
2.1 Revisão Bibliográfica	21
2.1.1 A cultura da mandioca (<i>Manihot esculenta</i>).....	21
2.1.1.1 Utilização e importância da cultura	22
2.1.1.2 Ciclo da planta	24
2.1.2 Fitoplasmas	25
2.1.3 O superbrotamento da mandioca	28
2.2 Material e Métodos	30
2.2.1 Coleta de material vegetal em plantas de mandioca.....	30
2.2.2 Extração de DNA total	32
2.2.2.1 Extração rápida	32
2.2.2.2 Extração com kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).....	33
2.2.2.3 Detecção de fitoplasmas e condições de PCR	34
2.2.2.4 Identificação de fitoplasmas por PCR	35
2.2.2.5 Identificação de fitoplasmas por análise de RFLP	35
2.2.2.6 Clonagem e Sequenciamento do 16S rDNA do fitoplasma.....	36
2.2.2.7 Análise das sequências do 16S rDNA do fitoplasma	38
2.2.2.8 Teste de transmissão do fitoplasma	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 Detecção de fitoplasmas por PCR	43
3.2 Identificação por PCR	46
3.3 Identificação por RFLP.....	48
3.4 Análise das sequências de nucleotídeos do 16S rDNA do fitoplasma	51
3.5 Transmissão por Cuscuta	55

4 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICES	71

RESUMO

Caracterização molecular e análise filogenética do fitoplasma agente do superbrotamento da mandioca (*Manihot esculenta*) no Estado de São Paulo

A mandioca (*Manihot esculenta*) é uma das principais culturas exploradas no mundo, sendo o Brasil o segundo maior produtor. Cultivada em todas as regiões brasileiras, a mandioca é importante na indústria e na alimentação humana e animal. Em plantios instalados em campo experimental e comercial, nas cidades de Piracicaba/SP e Bragança Paulista/SP, respectivamente, foram observadas plantas exibindo sintomas de enfezamento generalizado, superbrotamento de ramos, deformação, clorose das folhas e redução do tamanho das folhas. Com base na sintomatologia, suspeitou-se da ocorrência de fitoplasmas nas plantas doentes. Assim, o objetivo do presente trabalho foi detectar e identificar possíveis fitoplasmas, bem como demonstrar que estes procariotos são os agentes da doença. Para isto, amostras de plantas sintomáticas e assintomáticas foram coletadas e o DNA total foi extraído e usado em duplo PCR, conduzido com os pares de *primers* P1/Tint e R16F2n/16R2, visando à detecção de fitoplasmas. A amplificação de fragmentos genômicos de 1,2 Kb a partir do 16S rDNA confirmou a presença de fitoplasmas em 76% das amostras de Piracicaba e em 95% das amostras coletadas em Bragança Paulista. A identificação molecular com o uso de *primers* específicos demonstrou que todos os fitoplasmas encontrados pertenciam ao grupo 16SrIII. As análises de RFLP, usando-se digestão enzimática dos produtos de duplo PCR com as enzimas de restrição *AluI*, *KpnI*, *HpaI*, *HpaII*, *HhaI*, *HinfI*, *MseI* e *RsaI* e as análises filogenéticas, baseadas na sequência nucleotídica do 16S rDNA, revelou que o fitoplasma detectado em todas as amostras positivas eram afiliados ao grupo 16SrIII, subgrupo B. A prova de patogenicidade foi demonstrada pela transmissão experimental do fitoplasma presente em plantas de mandioca para plantas de vinca, por meio de *Cuscuta subinclusa*. Este é o primeiro relato de que um fitoplasma do grupo 16SrIII-B é o agente causal do superbrotamento em mandioca no Estado de São Paulo.

Palavras-chaves: Fitoplasma; Diagnose; Mandioca; Superbrotamento

ABSTRACT

Molecular characterization and phylogenetic analysis of the phytoplasma agent of the witches' broom of cassava (*Manihot esculenta*) in São Paulo State.

Cassava (*Manihot esculenta*) is one of the main cultures explored in the world and Brazil is the second largest producer. Cultivated in all Brazilian regions, cassava is important in the industry, food and both human and animal feed. In plantings installed on trial and commercial fields located in Piracicaba/SP, Bragança Paulista/SP, respectively, plants have been exhibited symptoms of general stunt, witches' broom, and size reduction of leaves with deformation and chlorosis. Based on the symptoms, it has suspected the occurrence of phytoplasmas in diseased plants. Thus, this study has carried on detecting and identifying the presence of phytoplasmas and demonstrates that those prokaryotes are the disease agents. Samples from symptomatic and asymptomatic plants have been collected and total DNA extracted and used in nested PCR, conducted with primer pairs P1/Tint and R16F2n/16R2 in order to detect phytoplasmas. Amplification of genomic fragments of 1.2 Kb from the 16S rDNA has confirmed the presence of phytoplasmas in 76% of samples from Piracicaba and 95% of samples collected in Bragança Paulista. The molecular identification using specific primers has revealed that all the phytoplasmas found in diseased plants belonged to group 16SrIII. The RFLP analysis, using enzymatic digestion of PCR products with restriction enzymes *AluI*, *KpnI*, *HpaI*, *HpaII*, *HhaI*, *HinfI*, *MseI* and *RsaI* and phylogenetic analysis, based on the nucleotide sequence of 16S rDNA has revealed the detected phytoplasma in all positive samples have affiliated to the group 16SrIII, subgroup B. Pathogenicity proof has demonstrated by experimental transmission of the phytoplasma present in cassava plants to periwinkle, through the *Cuscuta subinclusa*. This is the first report that a phytoplasma group 16SrIII-B is the causal agent of cassava witches' broom, in São Paulo State.

Keywords: Phytoplasma; Diagnosis; Cassava; "Witches' broom"

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Sintomas em plantas de mandioca coletadas em Piracicaba-SP. Letras: A= enfezamento generalizado da planta (5 meses após o plantio); B= superbrotamento e clorose das folhas na região do ponteiro; C= redução do tamanho da folha e do limbo foliar e D= superbrotamento de ramos.....31
- Figura 2- Sintomas em plantas de mandioca coletadas em Bragança Paulista-SP. Letras: E= clorose, redução do tamanho das folhas e redução do limbo foliar; F= superbrotamento na região no ponteiro; G= clorose das folhas e H= superbrotamento e deformação das folhas.....32
- Figura 3- Etapas do teste de transmissão. Letras: I= filamentos da *Cuscuta* se estabelecendo nas plantas de vinca; J= filamentos da *Cuscuta* se estabelecendo nas plantas de mandioca; K= vaso de vinca ao lado do vaso de mandioca e *Cuscuta* atuando como ponte biológica e L= sintoma de filodia em planta de vinca.....41
- Figura 4- Detecção de fitoplasmas em amostras sintomáticas de mandioca coletadas em Piracicaba-SP por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 Kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* P1/Tint e R16F2n/R2. M = Marcador (1 Kb Ladder); 1 a 6 = amostras de DNA extraídas de plantas sintomáticas de mandioca; Ch = padrão positivo (Chuchu); Ps = padrão negativo (planta sadia de mandioca).....45
- Figura 5- Detecção de fitoplasmas em amostras sintomáticas de mandioca coletadas em Bragança Paulista-SP por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 Kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* P1/Tint e R16F2n/R2. M = Marcador (1 Kb Ladder); 1 a 4 = amostras de DNA extraídas de plantas sintomáticas de mandioca; Ch = padrão positivo (Chuchu); Ps = padrão negativo (planta sadia de mandioca); H = água (controle negativo).....45

Figura 6- Identificação de fitoplasmas detectados em plantas sintomáticas de mandioca da cidade de Piracicaba-SP por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 0,8 Kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* P1/Tint e R16(III)F2/R16(III)R1. M = Marcador (1 Kb Ladder); 1 a 6 = amostras de DNA extraídas de plantas sintomáticas de mandioca; Ch = padrão positivo (Chuchu); H = padrão negativo (água).....47

Figura 7- Identificação de fitoplasmas detectados em plantas sintomáticas de mandioca da cidade de Bragança Paulista-SP por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 0,8 Kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* P1/Tint e R16(III)F2/R16(III)R1. M = Marcador (1 Kb Ladder); 1 a 16 = amostras de DNA extraídas de plantas sintomáticas de mandioca; Ch = padrão positivo (Chuchu); H = padrão negativo (água).....47

Figura 8- Análise de RFLP do gene 16S rDNA de fitoplasmas do grupo 16SrIII detectados em plantas de mandioca, utilizando as enzimas *AhaI*, *BstUI*, *HhaI*, *KpnI*, *HinfI*, *HpaII*, *RsaI* e *MseI*. M= marcador molecular Φ X174RFHaeIII; Md1= amostra de mandioca de Piracicaba-SP, BG13 = amostra de mandioca de Bragança Paulista-SP; Ch = padrão positivo chuchu.....49

Figura 9- Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição com as mesmas enzimas utilizadas para a análise enzimática de RFLP. Md1(CaWB-Br01) = fitoplasma da mandioca (Piracicaba-SP); BG13 (CaWB-Br02) = fitoplasma da mandioca (Bragança Paulista-SP); CYE= fitoplasma associado ao Clover yellow edge, representante do subgrupo 16Sr III-B.....52

Figura 10- Árvore filogenética construída com representantes de 18 diferentes grupos de fitoplasma, 13 subgrupos representantes do grupo 16SrIII, o procarioto *Acholeplasma laidlawii* e os 2 fitoplasmas identificados em plantas de mandioca (amostras: Md1 = CaWB-Br01 e BG13 = CaWB-Br02). Os números nos ramos representam valores de confiança baseados no “Bootstrapping”54

Figura 11- Detecção de fitoplasmas em amostras de vinca por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 Kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* P1/Tint e R16F2n/R2. M = Marcador (1 Kb Ladder); T1 a T11 = amostras de DNA de vinca; Ch = padrão positivo (Chuchu); Ps = padrão negativo (planta sadia de vinca)....56

Figura 12- Identificação de fitoplasmas detectados em plantas de vinca por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 0,8 Kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* P1/Tint e R16(III)F2 / R16(III)R1. M = Marcador (1 Kb Ladder); T1 a 11 = amostras de DNA extraídas de vinca; Ch = padrão positivo (Chuchu); H = padrão negativo (água).....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação das plantas de mandioca amostradas em Piracicaba e Bragança Paulista visando à detecção e identificação de fitoplasmas associados ao superbrotamento.....	31
Tabela 2- Sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA representantes de fitoplasmas dos 18 grupos e de subgrupos do grupo 16SrIII, depositadas no GenBank e usadas para construção da árvore filogenética e cálculo do coeficiente de similaridade.....	40
Tabela 3- Detecção de fitoplasmas em plantas de mandioca amostradas em Piracicaba-SP e Bragança Paulista-SP, por meio de duplo PCR conduzido com os iniciadores P1-Tint e F2n/R2.....	44
Tabela 4- Comparação entre os padrões de restrição obtidos por RFLP do fitoplasma detectado em plantas de mandioca (Md1 e BG13) com outros fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII.....	50
Tabela 5- Comparação dos coeficientes de similaridade calculados para os fitoplasmas detectados nas amostras CaWB-Br01 e CaWB-Br02 de mandioca com outros fitoplasmas pertencentes a diversos subgrupos do grupo 16SrIII.....	53

1 INTRODUÇÃO

A mandioca é uma das mais importantes fontes de carboidratos para os habitantes das regiões tropicais, sendo usada na alimentação humana e animal. É cultivada em todo o território brasileiro, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial. Os estados com maior produção são Pará, Bahia, Paraná, Maranhão, Rio Grande do Sul e São Paulo. Estima-se que a produção de mandioca transformada em farinha e fécula gera uma renda equivalente a 450 e 100 milhões de dólares, respectivamente. Por outro lado, considerando a fase de produção primária e o processamento de farinha e fécula é gerado, no Brasil, um milhão de empregos diretos.

A ocorrência de diversas doenças é um dos fatores limitantes da produção e as lacunas do conhecimento em fitossanidade levam à ineficiência do controle das mesmas, resultando em danos às plantas e prejuízos ao agricultor. Dentre as doenças observadas na cultura estão àquelas associadas aos fitoplasmas. Estes agentes fitopatogênicos são procariotos sem parede celular, de ocorrência cosmopolita que infectam e causam danos em uma ampla diversidade de espécies botânicas de importância agrônômica. Recentemente, plantas de mandioca apresentando sintomas típicos de infecção por fitoplasmas foram observadas em campos experimental e comercial localizados em Piracicaba/SP e Bragança Paulista/SP.

Considerando a necessidade de se aumentar os conhecimentos sobre a etiologia da doença, foi desenvolvido o presente trabalho que tem por objetivos confirmar a diagnose baseada nos sintomas, identificar e classificar o fitoplasma ocorrente nas plantas doentes e demonstrar que este procarioto é o agente da doença.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 A cultura da mandioca (*Manihot esculenta*)

Dentro da sistemática botânica de classificação hierárquica, a mandioca pertence à classe das Dicotiledôneas, à subclasse Archiclamydeae, à ordem Euphorbiales, à família Euphorbiaceae, à tribo Manihoteae e ao gênero *Manihot* (FUKUDA, 1999).

A mandioca é uma planta originalmente brasileira, sendo que duas espécies apresentam maior importância econômica: *Manihot glaziovii* Müll. Arg., que se destina à extração de látex, e *Manihot esculenta* Crantz, usada para a produção de fécula e amido ou para o consumo *in natura* (HERSHEY, 1992).

Embora ainda exista discussão quanto à região de origem da mandioca, Nassar (2000) e Lorenzi e Dias (1993) definiram a região central do Brasil como centro primário de diversidade da cultura, tendo em vista o enorme número de espécies do gênero identificado nesta região. Nassar et al. (1978) afirmaram ainda que a mandioca era cultivada nesta região por indígenas desde antes do descobrimento do Brasil e que a sua distribuição por toda a América do Sul foi auxiliada justamente por estes povos. Apesar desta proposição, existe a hipótese de que a origem da mandioca é a região amazônica, e que, a partir daí, a cultura imigrou para o Norte, chegando às Antilhas, à América Central e à América do Norte (SCHMIDT, 1951).

A espécie *M. esculenta* Crantz encontra-se distribuída entre os paralelos 30° de latitude Norte e 30° Sul, com maior concentração desta cultura localizada entre as latitudes 20° Norte e 20° Sul, ou seja, regiões tropicais com altitude inferior a 2.300 m (COCK, 1982). Segundo Hershey e Amaya (1989), a mandioca é cultivada em regiões tropicais com altitude inferior a 2.000 m, sendo que a maior extensão de área cultivada se encontra no Brasil, destacando-se as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste.

A mandioca é considerada uma planta tóxica e as diversas cultivares existentes são classificadas em mansas e bravas, conforme o conteúdo de ácido cianídrico (HCN) que elas possuem na polpa crua de suas raízes tuberosas (PEREIRA et al., 1985). A toxidez da planta de mandioca é conferida por quatro ou cinco glicosídeos cianogênicos, sendo os principais a linamarina e a lotaustralina. Os glicosídeos são sintetizados nas folhas e translocados para toda a

planta, ocorrendo em concentrações variadas em diferentes partes da planta. Estes glicosídeos podem ser convertidos para HCN por ação de enzimas específicas, conferindo assim a toxidez às plantas de mandioca (McMAHON et al., 1995). Em geral, as folhas são bem mais tóxicas do que as raízes tuberosas, sendo que variações na concentração dos glicosídeos cianogênicos ocorrem também em função da idade da planta, da cultivar, das condições ambientais, do solo, do clima e dos tratos culturais, dentre outros fatores (NARTEY, 1978; McMAHON et al., 1995).

A mandioca-de-mesa, popularmente conhecida como mandioca mansa, aipim ou macaxeira, é amplamente consumida no Brasil, sendo que o maior volume destas raízes tuberosas é produzido em sistemas de exploração denominados de “fundo de quintal”, não passando por um processo controlado de comercialização (LORENZI; DIAS, 1993). A produção nacional encontra-se distribuída em todas as regiões brasileiras, destacando-se a região Nordeste. De acordo com a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - EPAGRI (2008), a produção do Nordeste corresponde a 37,2% da safra 2007/08, o Norte 28,2%, o Sul 20%, o Sudeste 9,1% e o Centro-Oeste 5,6%. A região sudeste destaca por alta produtividade e subprodutos destinados à exportação.

A produção mundial de raízes tuberosas de mandioca é de aproximadamente 225,97 milhões de toneladas, sendo o Brasil o segundo maior produtor, com produção de 26,7 milhões de toneladas, perdendo apenas para a Nigéria (FAO, 2009). A produção destina-se ao consumo *in natura* e à industrialização, principalmente de produtos de relevância econômica, como fécula e farinha de mandioca. Estimativas da FAO (2009) evidenciam que pouco mais de 18 milhões de hectares são utilizados para o cultivo da mandioca em todo o mundo, sendo que mais da metade desta área concentra-se na Nigéria, Brasil, República Democrática do Congo, Indonésia e Tailândia.

2.1.1.1 Utilização e importância da cultura

A mandioca é considerada tolerante às condições de seca e de baixa fertilidade do solo, sendo cultivada e consumida principalmente por pequenos produtores rurais que normalmente dispõem de áreas agrícolas com solos pobres e degradados, situação que normalmente inviabiliza o cultivo de outras espécies economicamente importantes (CONCEIÇÃO, 1987).

As raízes tuberosas da mandioca possuem elevada capacidade de armazenamento de energia, sendo superada apenas pela cana-de-açúcar. A taxa de produção e armazenamento de energia em plantas de mandioca é de aproximadamente 250 kcal ha⁻¹ ano⁻¹, enquanto em culturas

como milho, arroz, sorgo e trigo a taxa está em torno de 200, 176, 114 e 110 kcal ha⁻¹ ano⁻¹, respectivamente (BALAGOPALAN et al., 1988). Em virtude desta característica, a planta apresenta grande importância socioeconômica, principalmente para as populações de baixa renda de regiões tropicais. Isso é evidenciado pelo fato da mandioca ser consumida como o principal alimento da dieta de mais de 400 milhões de africanos, o que representa aproximadamente 60% da população (FAO, 2009).

Embora seja bastante utilizada na alimentação humana, a mandioca também vem sendo muito aproveitada na alimentação animal (DORETO, 1993), pois se trata de uma cultura de elevado potencial produtivo, podendo alcançar produção de até 60 t de raízes tuberosas/ ha-1/ ano-1, com teores de matéria seca variando entre 20 e 40% (COCK; LYNAM, 1982). As raízes apresentam composição média de 68,2% de água, 30% de amido, 2% de cinzas, 1,3% de proteínas, 0,2% de lipídeos e 0,3% de fibras, sendo, portanto, essencialmente energéticas (ALBUQUERQUE et al., 1993; PEREIRA, 1985).

Grande parte das cultivares apresentam, em sua polpa crua, glicosídeos cianogênicos que podem conferir toxidez às pessoas que se alimentam de raízes frescas. Estas substâncias sofrem catálise por enzimas específicas, dentre elas a linamarase, ocorrendo então a liberação do ácido cianídrico (HCN) que confere toxidez à mandioca. Os glicosídeos cianogênicos distribuem-se por toda a planta, em concentrações variadas, sendo as folhas bem mais tóxicas que as raízes tuberosas (TELES, 1995). O potencial de síntese de HCN na mandioca apresenta uma variação bastante elevada de acordo com o estágio de desenvolvimento das plantas (DU et al., 1995) e as condições ambientais (TELES, 1995). Em função do conteúdo de HCN, as cultivares de mandioca podem ser classificadas como mansas, intermediárias ou bravas. As cultivares mansas apresentam teor de HCN na polpa crua das raízes tuberosas inferior a 100 mg kg⁻¹; as cultivares intermediárias apresentam teor de HCN entre 100 e 200 mg kg⁻¹; e as cultivares bravas apresentam teor de HCN superior a 200 mg kg⁻¹ (LORENZI; DIAS, 1993). As cultivares bravas são também denominadas de “cultivares para indústria”, sendo que as cultivares que apresentam concentrações de HCN inferiores ao limite de segurança (100 mg kg⁻¹) são próprias para consumo *in natura*, sendo denominadas “cultivares-de-mesa” (LORENZI et al., 1993).

Além das raízes tuberosas e seus derivados, como farinha e fécula, a parte aérea da planta também pode ser utilizada na alimentação (FARFAN, 1998). Há relatos de que o conteúdo de proteínas nas folhas de mandioca é superior àquele encontrado na maioria das gramíneas e

leguminosas (CEREDA; VILPOUX, 2000). Em média, a matéria-seca das folhas de mandioca apresenta níveis de 16 a 28% de proteína (SILVA et al., 2001). Sagrilo et al. (2003) verificaram que o teor de proteínas em folhas de mandioca variou de 23,2 a 37,9%, tendo apresentado correlação negativa com a idade da planta. Té et al. (2005) reportaram teor de proteínas em folhas de mandioca variando de 28,99 a 38,54%. Nassar e Marques (2006) sugerem a utilização de folhas de mandioca como importante fonte de proteínas de baixo custo para a alimentação humana e animal. Algumas comunidades do Norte e Nordeste brasileiro já utilizam folhas da mandioca na alimentação, embora esporadicamente. Entretanto, a introdução das folhas de mandioca na refeição cotidiana de centenas de crianças e adultos deveria ser vista com preocupação pelas autoridades de Saúde, visto que algumas cultivares podem apresentar efeitos tóxicos pelo HCN (BEZERRA, 2002).

Embora a parte aérea também seja rica em ferro, cálcio, vitaminas A, B1 e B2 (BEZERRA, 2002), o consumo rotineiro de folhas de mandioca em certas regiões da Nigéria e Tanzânia tem comumente causado Neuropatia Atáxica Tropical (TAN), caracterizada por mielopatia, atrofia óptica bilateral, surdez perceptiva bilateral e polineuropatia. Tais sintomas são diagnosticados como uma desordem fisiológica também conhecida por Konzo, que tem ocorrido devido à presença de glicosídeos cianogênicos na dieta destas populações, os quais apresentam efeitos nocivos à saúde humana e animal (BRADBURY, 2002). Entretanto, um cozimento adequado das folhas é capaz de eliminar o efeito tóxico (JOHNE, 1991), o que leva a crer que nestas regiões da África o problema está justamente na forma de preparo do alimento.

2.1.1.2 Ciclo da planta

A planta de mandioca apresenta ciclo de desenvolvimento composto por cinco fases fisiológicas principais, sendo quatro ativas e uma de repouso vegetativo. Na primeira fase, chamada de brotação da maniva, surge as primeiras raízes fibrosas após o 7º dia de plantio. Na segunda fase, com duração aproximada de setenta dias, o sistema radicular continua em formação, sendo constituído por raízes fibrosas. Na terceira fase, há o desenvolvimento da parte aérea e tem duração de 90 dias. Durante essa fase, tem início o espessamento de algumas raízes fibrosas pelo acúmulo de amido. Ressalta-se que quanto mais tempo à folha da mandioca permanecer na planta, menor a quantidade de produtos da fotossíntese que será alocada na formação de novos ápices de crescimento e, conseqüentemente, mais energia poderá ser transportada e armazenada na raiz de reserva, o que resultará em maior produtividade de amido.

Na quarta fase, ocorre o espessamento das raízes de reservas, que corresponde à migração das substâncias de reserva para as raízes de armazenamento, a qual se iniciou na fase anterior. Nessa fase já não há mais crescimento das raízes em comprimento, mas em diâmetro, pelo acúmulo de amido. Na quinta e última fase, chamada fase de repouso, a planta perde a folhagem naturalmente, encerrando a sua atividade vegetativa, permanecendo apenas a migração das substâncias de reserva para as raízes. É durante essa fase que a planta de mandioca armazena o máximo de reserva de amido nas raízes. Recomeça após esse período de repouso uma nova fase de crescimento, quando é reiniciada a formação de ramas e folhas, que inicialmente acontece à custa do amido armazenado nas raízes e ramas durante a fase de crescimento anterior (TERNES, 2002)

2.1.2 Fitoplasmas

Os fitoplasmas foram descobertos em 1967 por um grupo de pesquisadores japoneses que observavam em microscópio eletrônico tecidos de plantas doentes de batata, amora, quiri e rainha margarida exibindo sintomas do tipo amarelo (DOI et al., 1967). Antes de 1967, as doenças do tipo “amarelo” eram atribuídas aos vírus, pelas características dos sintomas e pela forma de transmissão, no entanto partículas de vírus não eram encontradas nos tecidos de plantas doentes (LEE et al., 2000). Doi e colaboradores observaram em cortes ultrafinos de plantas infectadas corpúsculos semelhantes aos micoplasmas encontrados em animais e no homem. Estes corpúsculos não apresentavam paredes celulares rígidas, os protoplasmas eram envolvidos por uma única membrana, tinham a forma esférica ou pleomórfica, com dimensões variando de 80-800 nm. Estudos complementares evidenciaram que estes corpúsculos eram sensíveis aos antibióticos do grupo da tetraciclina, fato já conhecido para os micoplasmas animais e humanos (DOI et al., 1967; ISHII et al., 1967). Como conclusão, foi proposto que as doenças conhecidas por ‘amarelos’ estavam associadas a estes procariotos semelhantes aos micoplasmas. Assim, estes micoplasmas encontrados nos vegetais passaram a ser designados por MLOs (Mycoplasma-Like Microorganisms). Em 1994, o termo ‘fitoplasma’ foi proposto no 10º *Congress of the International Organization of Mycoplasmology* em substituição ao termo MLOs.

Os fitoplasmas pertencem ao SuperReino Prokaryota, Reino Monera, Domínio Bacteria; Filo Tenericutes, Classe Mollicutes, Ordem Acholeplasmatales, Família Acholeplasmataceae, Gênero ‘*Candidatus Phytoplasma*’ (HOGENHOUT et al., 2008; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION-NCBI, 2009). A classe dos Mollicutes engloba pequenas

bactérias pleomórficas com uma única membrana celular e que divergiram de um ancestral Gram-positivo, provavelmente uma espécie de *Clostridium* ou *Lactobacillus*, por meio de reduções do genoma e perda da parede celular externa (WEISBURG et al., 1989; WOESE, 1987).

Fitoplasmas são procariotos parasitas obrigatórios de plantas e insetos. Nas plantas, permanecem restritos ao floema (DOI et al., 1967; WHITCOMB; TULLY, 1989), sendo distribuídos por toda a planta. Em condições naturais, sua transmissão é feita por insetos vetores, principalmente cigarrinhas, da Ordem Hemiptera (famílias Cixiellidae e Fulgoridae) e por psílídeos, que se alimentam no floema (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006). No inseto, os fitoplasmas invadem o intestino, as glândulas salivares e outros tecidos, onde podem acumular-se em grande número dentro e fora das células (AMMAR; HOGENHOUT, 2006). Os fitoplasmas podem atravessar o intestino e as células da glândula salivar, a fim de alcançar a saliva possibilitando a inoculação no floema durante a alimentação do inseto (LEFOL et al., 1994; LHERMINIER et al., 1990; NAKASHIMA; HAYASHI, 1995). O período de latência, ou seja, o tempo entre a aquisição inicial dos fitoplasmas pelo inseto vetor e a capacidade do inseto de introduzir o patógeno em novas plantas, pode variar entre 7 a 80 dias (MOYA-RAYGOZA; NAULT, 1998; MURRAL et al., 1996). Nas plantas, os sintomas podem se desenvolver em 7 dias após a inoculação do fitoplasma pelo inseto vetor, mas pode demorar mais tempo (6 a 24 meses), dependendo do fitoplasma e da espécie vegetal.

As reduções ocorridas em seu genoma, em função da evolução, resultaram na perda da maioria das rotas metabólicas, incluindo aquelas para síntese de ATP, aminoácidos e nucleotídeos (BAI et al., 2006; OSHIMA et al., 2004), não sendo possível o seu isolamento em meio de cultura, fator que dificulta os estudos das doenças associadas a estes patógenos. No entanto, funções necessárias para a sobrevivência no floema e para a colonização de tecidos de insetos vetores foram mantidas (FIRRAO; GARCIA-CHAPA; MARZACHI, 2007).

As plantas infectadas por fitoplasmas exibem uma série de sintomas que sugerem distúrbios no balanço hormonal (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). Os sintomas típicos incluem virescência (aparecimento de pétalas verdes devido ao desenvolvimento de clorofila), filodia (formação de folhas no lugar das flores), esterilidade de flores, superbrotamento de ramos originando o sintoma conhecido por vassoura de bruxa, estiolamento de ramos, enfezamento generalizado da planta (flores e folhas pequenas, internódios curtos), descoloração

de folhas e ramos, encarquilhamento de folhas, necrose do floema, crescimento dos ramos com aspecto de roseta e declínio generalizado da planta caracterizado pela morte descendente do ponteiro dos ramos, enfezamento e amarelecimento ou avermelhamento não sazonal das folhas.

A lista de doenças causadas por fitoplasmas vem aumentando e, em certos casos, a ocorrência do patógeno torna-se fator limitante para a produção de determinadas culturas em praticamente todas as regiões do mundo (McCOY et al., 1989; LEE; DAVIS, 1992). Como exemplos, citam-se os fitoplasmas do grupo ‘Aster Yellows’, responsáveis por grandes perdas em olerícolas e ornamentais como a alface, a cenoura e o gladiolo, na América do Norte e partes da Europa; o amarelo e a doença “X” do pessegueiro responsáveis por perdas significativas em pomares comerciais instalados nos Estados Unidos; os amarelos da videira de relevante importância em países da Europa, da América do Norte e na Austrália; o superbrotamento da batata e o enfezamento vermelho do milho, causadores de sérios danos na produção destas culturas na América Central e do Sul (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). No Brasil, é grande a diversidade de plantas afetadas por fitoplasmas, incluindo vários gêneros e espécies de olerícolas, frutíferas, ornamentais e florestais. Algumas das doenças já relatadas incluem enfezamento vermelho do milho (BEDENDO; DAVIS; DALLY, 2000), o enfezamento do repolho (AMARAL MELLO, 2007), o cálice gigante do tomateiro (AMARAL MELLO et al., 2006), o superbrotamento do maracujazeiro (RIBEIRO; BEDENDO, 2007), o superbrotamento do chuchuzeiro (MONTANO et al., 2000), o lenho mole da macieira (RIBEIRO; BEDENDO; SANHUEZA, 2007) e a síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (SILVA et al., 2009).

Apesar das dificuldades para demonstração da patogenicidade desses procariotos, algumas estratégias como a associação constante fitoplasmas-planta doente, a remissão de sintomas com uso de tetraciclina e a transmissão feita por meio de insetos vetores, planta parasita (*Cuscuta* spp) ou enxertia têm sido muito úteis.

No princípio, as doenças associadas à fitoplasmas eram diagnosticadas pelos sintomas e pela observação de tecidos doentes em microscópio eletrônico, sendo o primeiro sistema de classificação de fitoplasmas baseado em propriedades biológicas como sintomatologia da planta infectada, gama de plantas hospedeiras e relação com insetos vetores (CHIYOKOWSKI, 1989; LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). A microscopia eletrônica de transmissão tem sido uma importante ferramenta para a detecção de fitoplasmas em plantas, apesar do custo

operacional e de não permitir a identificação destes agentes de doença (BARROS, 1997). O desenvolvimento das técnicas moleculares contribuiu para um grande avanço no estudo dos fitoplasmas após o sequenciamento da região 16S rRNA desses microrganismos (LIM; SEARS, 1989). Com o desenvolvimento da biotecnologia, a técnica de PCR (*“Polymerase Chain Reaction”*) passou a ser adotada rotineiramente nos trabalhos de detecção, permitindo confirmar diagnósticos feitos com base nos sintomas (MARTIN et al., 2000; LIM; SEARS, 1989; KIRKPATRICK; FRASER, 1988). A sensibilidade da técnica, principalmente em duplo PCR, tem permitido a detecção de fitoplasmas nas plantas e insetos vetores, mesmo quando o patógeno ocorre em baixas concentrações nos tecidos (SCHAFF et al., 1992; HENSON; FRENCH, 1993). Dentre os iniciadores (*“primers”*), podem ser destacados os pares P1/P7 (GREEN; THOMPSON; MacKENZIE, 1999), P1/Tint (DENG; HIRUKI, 1991; SMART et al., 1996) e R16F2n/R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996), os quais têm sido reconhecidos universalmente como apropriados para a detecção de fitoplasmas em tecidos vegetais e de insetos. O recente acúmulo de sequências de fitoplasmas depositadas no GenBank (NCBI) tem colaborado para o conhecimento da diversidade genética existente entre os fitoplasmas, fornecendo dados que podem ser utilizados na identificação e classificação destes procariotos.

Recentemente, Wei et al. (2007) propuseram a classificação de fitoplasmas em 28 grupos, com base em análises de RFLP simuladas em computador. No entanto, tradicionalmente, os fitoplasmas são classificados em 18 grupos de acordo com o uso de análise convencional de RFLP em gel de poliacrilamida, usando-se uma série pré-determinada de enzimas de restrição (LEE et al., 1998).

2.1.3 O superbrotamento da mandioca

O superbrotamento ocorre em todas as regiões brasileiras produtoras de mandioca e em alguns países vizinhos como Venezuela, México e Peru (COSTA; KITAJIMA, 1972, CIAT, 1980; TAKATSU; FUKUDA, 1990). Levantamentos realizados no Ceará acusaram a presença de fitoplasma em cerca de 85% das lavouras (FUKUDA et al., 1990), com perdas de até 95% da produção (LOZANO, 1992). A erradicação do patógeno tem sido difícil, pois muitos agricultores não fazem seleção de material sadio para plantio e as plantas doentes não são eliminadas (LORENZI et al., 1988).

Geralmente as plantas doentes apresentam sintomas de nanismo, com entrenós curtos e excessiva brotação, apresentando ou não clorose foliar, redução na produção de amido (Centro

Internacional de Agricultura Tropical - CIAT, 1980; FUKUDA, 1986) e na produção de raízes (CIAT, 1980). A disseminação pelo uso de estacas contaminadas retiradas de plantas doentes é de 100%, no entanto o vetor ainda não é conhecido, até o momento (LOZANO, 1992). Ataques severos de tripes podem ocasionar sintomas semelhantes àqueles do superbrotamento (CIAT, 1980).

No Brasil, o primeiro relato sobre a ocorrência do superbrotamento da mandioca ocorreu em 1944, em material doente coletado na cidade de Lins-SP (SILBERSCHMIDT; CAMPOS, 1944). Os sintomas são descritos como número excessivo de brotos emitidos pelo caule, redução no porte da planta, diminuição no tamanho das folhas e o clareamento da cor verde normal. Em 1970, foi relatado que numa cultura, destinada a fornecer material de propagação de mandioca, localizada em Santa Bárbara do Rio Pardo-SP foi constatada uma anomalia caracterizada pela presença de sintomas semelhantes àqueles anteriormente relatados em Lins-SP (KITAJIMA; COSTA, 1970). No entanto, neste caso, foi observado menor desenvolvimento de brotos adventícios e sintomas foliares mais severos. Esta anomalia foi transmitida para plantas sadias através de enxertia. Seções ultrafinas de amostras de folhas coletadas de plantas doentes do campo e de plantas enxertadas evidenciaram a presença de corpúsculos pleomórficos nos vasos crivados, confirmando a associação entre a doença e fitoplasmas. Posteriormente, a doença foi registrada em plantas cultivadas no Distrito Federal (KITAJIMA; COSTA, 1971) e no estado de Pernambuco (COSTA, 1971; MARIANO et al., 1991), sendo a diagnose confirmada pela observação microscópica do fitoplasma nas plantas infectadas.

Em 1998, o fitoplasma associado ao superbrotamento foi molecularmente identificado através da análise convencional de RFLP, usando-se plantas doentes coletadas no estado do Ceará. Este fitoplasma foi classificado como um representante do grupo 16SrIII, subgrupo B (BARROS et al., 1998). Recentemente, um fitoplasma do grupo 16SrIII também foi identificado em plantas de mandioca com sintomas de vassoura-de-bruxa observadas no município de Arinos, localizado no estado de Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2009).

Embora fitoplasmas do grupo 16SrIII estejam associados ao superbrotamento da mandioca no Brasil, fitoplasmas pertencentes a distintos grupos de classificação já foram identificados em outros países. Na França, fitoplasmas do grupo 16SrI foram encontrados em plantas apresentando vassoura-de-bruxa, folhas amareladas e de tamanho reduzido (DAVIS et al. 2005). Em Cuba foi identificado um fitoplasma afiliado ao grupo 16SrI, subgrupo C em plantas

com sintomas de enfezamento e amarelecimento foliar (AROCHA et al., 2009a). Em Uganda, análises moleculares identificaram um fitoplasma do grupo 16SrII associado a plantas que também mostravam sintomas de enfezamento e amarelecimento foliar (AROCHA et al., 2009b). Na Colômbia, fitoplasmas do grupo 16SrIII foram detectados em plantas de mandioca portadoras de uma doença denominada “couro-de-sapo”, cuja etiologia ainda não está totalmente definida (ALVAREZ et al., 2007).

O controle do superbrotamento deve ser focado dentro de uma estratégia de manejo integrado (LOZANO, 1992). A doença pode ser facilmente controlada pelo uso de material propagativo sadio para o plantio (TAKATSU; FUKUDA, 1990) e pela erradicação de plantas doentes do campo. A simples seleção de material para plantio em áreas afetadas do estado do Ceará foi eficiente para o controle do superbrotamento, reduzindo a infecção em mais de 98% (LOZANO et al., 1990). Recomenda-se também o uso de material resistente ou tolerante quando disponível na região. No Nordeste, devido à importância econômica da cultura e o interesse pela doença, foram desenvolvidos quatro clones de mandioca pela Embrapa, com boas características de uso para indústria e resistentes ao superbrotamento.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Coleta de material vegetal em plantas de mandioca

Plantas de mandioca apresentando sintomas de enfezamento generalizado, com superbrotamento de ramos, clorose e redução do limbo foliar predominantemente na região do ponteiro foram coletadas em campos situados na cidade de Piracicaba (Figura 1) e Bragança Paulista (Figura 2), no Estado de São Paulo. Plantas assintomáticas também foram amostradas e serviram como controle negativo.

As amostras coletadas em Piracicaba-SP foram obtidas de plantas cultivadas no Campo Experimental do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ, onde a doença ocorreu com incidência de aproximadamente 15%. Neste caso, foram coletadas 25 plantas sintomáticas e 10 plantas assintomáticas, em novembro de 2007 (Tabela 1).

As amostras provenientes de Bragança Paulista-SP foram coletadas em campo comercial onde aproximadamente 80% das plantas mostravam sintomas da doença. Neste caso, foram amostradas 21 plantas sintomáticas e 10 plantas assintomáticas, em fevereiro de 2009 (Tabela 1).

Tabela 1- Relação das plantas de mandioca amostradas em Piracicaba e Bragança Paulista visando à detecção e identificação de fitoplasmas associados ao superbrotamento

Referência da planta	Característica	Procedência
Md1 a 25	Sintomática	Piracicaba-SP
Md 26 a 35	Assintomática	Piracicaba-SP
BG 1 a 21	Sintomática	Bragança Paulista-SP
BG 22 a 31	Assintomática	Bragança Paulista-SP

Figura 1 - Sintomas em plantas de mandioca coletadas em Piracicaba-SP. Letras: A= enfezamento generalizado da planta (5 meses após o plantio); B= superbrotamento e clorose das folhas na região do ponteiro; C= redução do tamanho da folha e do limbo foliar e D= superbrotamento de ramos

Figura 2 - Sintomas em plantas de mandioca coletadas em Bragança Paulista-SP. Letras: E= clorose, redução do tamanho das folhas e redução do limbo foliar; F= superbrotamento na região no ponteiro; G= clorose das folhas e H= superbrotamento e deformação das folhas

2.2.2 Extração de DNA total

Para a extração do DNA total das amostras foram empregadas duas metodologias, denominadas aqui como extração rápida (DOYLE; DOYLE, 1987) e extração com o kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) (GREEN; THOMPSON; MacKENZIE, 1999).

2.2.2.1 Extração rápida

Para a etapa de extração de DNA foi seguido o protocolo de extração rápida proposto por Doyle e Doyle (1987). O material vegetal fresco das amostras de mandioca, aproximadamente 2g, foi macerado em nitrogênio líquido em almofariz de porcelana até homogeneização. O extrato obtido foi transferido para microtubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL, sendo adicionados 800 μ L de tampão de extração 2X CTAB (acrescido de 2 μ L de mercaptanol por mL de tampão) a 60°C.

Os tubos foram incubados em “banho-maria” a 65°C por 60 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos em vortex para homogeneizar a suspensão. A cada tubo foi adicionado 600 µL de CIA (clorofórmio/álcool isoamílico 24:1) e procedeu-se a centrifugação por 15 minutos a 14.000 rpm. Os tubos foram retirados da centrífuga, evitando-se perturbar a interface. Uma alíquota de 540 µL da fase superior aquosa foi transferida com auxílio de uma pipeta para novos tubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 540 µL de isopropanol pré-esfriado a -20°C. Os tubos foram mantidos por uma noite a -20°C para precipitação do ácido nucléico. Retirados do freezer, os tubos foram submetidos à centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm, descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se 1 mL de etanol 80% no tubo contendo o precipitado e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. O álcool foi descartado e repetiu-se o passo anterior. Em seguida, foram adicionados 500 µL de NaCl 1M, o precipitado foi dissolvido com o auxílio de uma pipeta e os tubos foram incubados por 60 minutos a 4°C. Após esse período, realizou-se nova centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm. O precipitado obtido nos tubos foi lavado com 1 mL de etanol 80%, repetindo-se este passo por duas vezes. O etanol foi descartado e os tubos foram mantidos abertos e invertidos sobre papel toalha para secagem a temperatura ambiente. Após a secagem, o precipitado foi ressuspenso em 100 µL de água deionizada e armazenado a -20°C.

- *Tampão de extração 2X CTAB:* Pesou-se 2 g de CTAB, 8,18 g de NaCl, 0,74 g de EDTA, 1,57 g de Tris-HCl e 1,0 g de PVP. Os componentes foram dissolvidos em água deionizada completando o volume para 100 mL. O pH foi ajustado para 8,0. No momento do uso, antes de ser aquecido a 60°C, adicionou-se mercaptanol na proporção de 0,2 mL para cada 100 mL de tampão.

2.2.2.2 Extração com kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

Para a extração do DNA total usando o kit comercial foram seguidas as recomendações do fabricante. Cerca de 1 g de material vegetal fresco foi macerado em nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. Uma parte do macerado foi transferida para microtubo de 1,5 mL e ao macerado foram adicionados 400 µL do tampão AP1 (Qiagen) e 4 µL de RNase. Os tubos permaneceram em “banho-maria” a 65°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 130 µL do tampão AP2 (Qiagen) e os tubos incubados a -20°C por 5 minutos. A mistura foi aplicada em uma coluna montada sobre tubo coletor e centrifugada por 5 minutos a 13.000 rpm. O líquido que

passou pela coluna foi recolhido em um novo microtubo e foram adicionados 675 μ L do tampão AP3 (Qiagen). Uma alíquota de 650 μ L dessa mistura foi aplicada em outra coluna, a qual foi centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. O líquido que passou pela coluna foi descartado e a coluna contendo o DNA foi transferida para um novo microtubo. No centro da coluna foram adicionados 500 μ L do tampão AW (Qiagen) e foi feita uma centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos para lavagem do DNA. A coluna foi transferida para um novo microtubo para eluição do DNA com 100 μ L de tampão AE (Qiagen). O DNA extraído foi armazenado a -20°C.

2.2.2.3 Detecção de fitoplasmas e condições de PCR

O DNA total extraído de cada amostra foi diluído em diferentes proporções em água deionizada autoclavada. Como controle negativo foi utilizado o DNA extraído de plantas assintomáticas e a água. Os padrões positivos foram representados pelo DNA extraído de plantas chuchu, comprovadamente infectadas por fitoplasma. Para a detecção foram utilizados os iniciadores universais P1/Tint (DENG; HIRUKI, 1991; SMART et al., 1996) e R16F2n/R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996) em PCR duplo. O produto amplificado por P1/Tint foi usado como molde para a segunda reação, na qual foi empregado o par R16F2n/R2. Estes últimos iniciadores amplificam uma sequência nucleotídica de aproximadamente 1.2 Kb do DNA genômico dos fitoplasmas, correspondente ao 16S rDNA.

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

R16 P1- 5'AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T 3' (DENG; HIRUKI, 1991);

R16 Tint- 5'TCA GGC GTG TGC TCT AAC CAG C3' (SMART et.al., 1996);

R16 F2n- 5'GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG3' (GUNDERSEN; LEE, 1996);

R16 R2- 5'TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G3' (GUNDERSEN; LEE, 1996).

Cada reação de PCR foi processada utilizando-se um volume final de 25 μ L, contendo: 1 μ L de extrato de DNA diluído de cada amostra utilizada, incluindo padrões positivos e negativos; 18,7 μ L de água destilada deionizada; 0,5 μ L de cada iniciador (concentração de 20 pmol/ μ L); 2 μ L de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo); 2,5 μ L de solução tampão 10X PCR e 0,17 μ L de Amplitaq 5U/ μ L. Quando os iniciadores P1/Tint foram utilizados, o termociclador foi programado para 30 ciclos, compreendendo as etapas: 1 minuto a 94°C para a etapa de desnaturação do ácido nucléico, 1 minuto a 56°C para o anelamento e 2 minutos a 72°C para a extensão. Para os iniciadores R16F2n/R2, utilizou-se um programa de 35 ciclos, compreendendo as etapas: 1 minuto a 94°C

para a etapa de desnaturação do ácido nucléico, 2 minutos a 50°C para o anelamento e 3 minutos a 72°C para a fase de extensão dos iniciadores, uma única etapa inicial de 1 minuto a 94°C e uma final de 7 minutos a 72°C.

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

2.2.2.4 Identificação de fitoplasmas por PCR

A identificação de fitoplasmas por PCR foi feita a partir de produtos obtidos com os iniciadores P1/Tint usados na primeira reação de PCR. Os produtos da primeira reação foram submetidos à reamplificação, empregando-se agora, os iniciadores específicos R16(I)F1/R1 e R16(III)F2/R1, os quais permitem a identificação de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI e 16SrIII, respectivamente (LEE et al., 1994).

As reações de PCR e a análise por eletroforese foram processadas nas mesmas condições utilizadas para detecção com o uso dos iniciadores R16F2n/R2, descritas anteriormente. Os padrões positivos utilizados para cada grupo foram DNA de plantas de milho, sabidamente infectadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho pertencente ao grupo 16SrI e DNA de plantas de chuchu infectadas pelo fitoplasma do superbrotamento, representante do grupo 16SrIII. Como padrões negativos foram usados DNA extraído de plantas assintomáticas de mandioca e água deionizada autoclavada.

As seqüências dos iniciadores específicos estão especificadas a seguir:

R16(I)F1- 5'TAA AAG ACC TAG CAA TAG G 3'

R16(I)R1- 5'CAA TCC GAA CTG AGA CTG T 3'

R16(III)F2- 5'AAG AGT GGA AAA ACT CCC 3'

R16(III)R1- 5'TCC GAA CTG AGA TTG A 3'

2.2.2.5 Identificação de fitoplasmas por análise de RFLP

As seqüências amplificadas pelo duplo PCR com o uso dos iniciadores P1/Tint – F2n/R2, indicando a presença de fitoplasma nas plantas, 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, durante um período de aproximadamente 24 h a 36 °C. As enzimas *AluI* (AG▼CT), *HhaI* (GCG▼C), *HpaII* (C▼CGG), *KpnI* (GGTAC▼C), *MseI* (TT▼AA), *BstUI* (CG▼CG), *HinfI* (G▼AnT_C) e *RsaI* (GT▼AC) foram utilizadas na identificação do fitoplasma detectado pela técnica de duplo PCR e para confirmação de resultados dos testes de PCR conduzidos com os iniciadores específicos para a identificação de grupos de classificação.

Os produtos da digestão enzimática foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (4,5%), tampão TBE 1X, voltagem inicial de 220 V durante 5 minutos e em seguida voltagem constante de 150 V por 45 min. O gel foi colorido em Sybr safe® e os fragmentos de DNA gerados, foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados. O marcador molecular utilizado foi o ϕ X174RFHaeIII. O perfil eletroforético obtido para o fitoplasma presente em cada amostra foi comparado aos padrões existentes na literatura (LEE et al., 1998; DAVIS et al., 1998; MONTANO et al., 2000; BARROS et al., 2002). Com base nestes resultados foi feita a identificação do fitoplasma.

2.2.2.6 Clonagem e Sequenciamento do 16S rDNA do fitoplasma

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

Purificação: produtos de PCR foram purificados utilizando-se “kit” de purificação PureLink™ (Invitrogen), seguindo protocolo descrito pelo fabricante. Em um microtubo de 1,5mL foram adicionados 300 µL de tampão de captura (“binding buffer”) e 75 µL de produto do PCR obtido na reação com R16 F2n/R2. Após misturar a solução obtida com micropipeta (4 a 6 vezes), a mesma foi colocada em coluna (com filtro) acoplada ao tubo coletor e centrifugada a 10.000 rpm, à temperatura ambiente. O produto que passou no tubo coletor foi descartado. A coluna foi recolocada no tubo coletor e foram adicionados 650 µL de tampão de lavagem (“Wash buffer”). Nova centrifugação foi conduzida a 10.000 rpm, sendo o conteúdo do tubo coletor descartado e a coluna recolocada no mesmo tubo e submetida novamente à centrifugação a 13.000 rpm, por 3 minutos, para remover resíduos do tampão de lavagem. Essa mesma coluna foi colocada em um novo tubo e a ela foram adicionados 50 µL de tampão de eluição ou água destilada deionizada. A coluna contendo tampão de eluição e o DNA das amostras foi incubada à

temperatura ambiente por 1 min. Após esse período foi feita a centrifugação à 13000 rpm, por 2 min. Os produtos finais, correspondentes ao DNA purificado, foram armazenados a -20 °C, para posterior utilização na reação de clonagem.

Quantificação do DNA: Antes da reação da clonagem, foi estimada a concentração de DNA das amostras. Para isso, uma alíquota de 1 µL do DNA purificado juntamente com 3 µL de tampão de carregamento foi aplicado em gel de agarose 1%, em tampão TE 0,5X acrescido do corante Syber Safe (Invitrogen), e submetida à eletroforese. Os fragmentos de DNA purificados, de aproximadamente 1,2 Kb, foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta juntamente com o marcador Lambda DNA.

Para a clonagem utilizou-se os produtos de PCR obtidos com R16F2n/R2 purificados, em uma concentração estimada de 500ng. A partir desse purificado foi feita a ligação em vetor pGEM®T Easy Vector System I (Promega), posteriormente clonado em *Escherichia coli* (estirpe DH5α) com choque térmico. A extração dos plasmídeos obtidos com a clonagem foi feita utilizando-se “kit” comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

Ligação: para a ligação do DNA purificado ao vetor plasmidial, com o uso do “kit” pGEM T Easy Vector System I (Promega), foram utilizados 3.0 µL do DNA purificado, 1 µL do vetor (25 ng.µL⁻¹), 5,0 µL de tampão ligase 2X e 1,0 µL de T4 DNA ligase (3 U.µL⁻¹), totalizando 10 µL da mistura para a ligação, que foi colocada em microtubo (1,5mL) e mantida por 12h a 4 °C. Após esse período, a ligação tornou-se pronta para ser transferida para células competentes de *E. coli*.

Transformação: na etapa de transformação foram adicionados 2 a 3µL do produto da ligação em 50µL de células competentes de *E. coli*, estirpe DH5α, preparadas conforme Hanahan (1983), sendo a mistura colocada no gelo por 30 min. Após esse período, as células contendo a ligação foram submetidas a choque térmico por incubação a 42 °C por 50 segundos e, imediatamente, colocadas no gelo por 2 min. A seguir, foram adicionados 450 µL de meio SOC (1% de triptona; 0,5% extrato de levedura; 8,5 mM NaCl; 2,5 mM de KCl; 0,01 mM MgCl₂; 0,02 mM de glicose e água para completar volume de 1000 mL) pré-aquecido à 37°C às células transformadas que ficaram incubadas a 37 °C por 3 horas em agitador moderado (200 rpm). Após o período de crescimento, foram plaqueados 80 µL de uma suspensão de células transformadas em 20 ml de meio LB (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,25% de NaCl; 4% de ágar) acrescido de 20µL de ampicilina (100 mg.mL⁻¹), 20µL X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-

galactopiranosida) na concentração de 50ng/ml e 20μL IPTG (isopropil-β-D tiogalactopiranosida) concentração de 50 mg.mL⁻¹. Os componentes X-gal e IPTG serviram para avaliar a atividade da β-galactosidase nos transformantes, permitindo diferenciá-los dos não transformantes. A placa ficou mantida por 12h em estufa a 37 °C para a quantificação de colônias e seleção das células transformadas com DNA plasmidial recombinante. As colônias recombinantes com o fragmento de DNA inserido no sítio de clonagem exibiram a cor branca (produzindo β-galactosidase não-funcional), enquanto as colônias não recombinantes ficaram azuis (produzindo β-galactosidase funcional). Os clones selecionados foram transferidos para tubos tipo “Falcon” contendo meio LB líquido. Esses tubos foram incubados a 37°C sob agitação moderada, por 12 horas para a extração do DNA plasmidial.

Extração de DNA plasmidial: Foram selecionados 3 clones para cada amostra clonada. Para dois deles foi feita a extração do DNA plasmidial, e um ficou preservado em glicerol (50%) e armazenado em freezer -80°C. As extrações dos plasmídeos para posterior sequenciamento foi feita com uso de “kit” comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Antes do sequenciamento dos clones ou insertos obtidos, foi necessário fazer a confirmação desses no vetor plasmidial. Essa confirmação foi feita por PCR utilizando-se os iniciadores universais para o fitoplasma (R16F2n/R2) e (SP6/T7) e digestão com a enzima *EcoR1*.

Os plasmídeos, cujo inserto do fitoplasma foi confirmado, foram enviados para o sequenciamento de bases.

2.2.2.7 Análise das sequências do 16S rDNA do fitoplasma

As seqüências geradas foram analisadas utilizando-se programas computacionais para construção e análise de seqüências (Bioedit, Phred phrap, MEGA e Multiple Sequence Alignment – CLUSTALW). Posteriormente, estas seqüências foram comparadas com seqüências de outros fitoplasmas depositados no GenBank, possibilitando demonstrar o nível de identidade genética existente entre o fitoplasma presente nas amostras de mandioca com diferentes fitoplasmas. Uma árvore filogenética foi construída pelo método Neighbour-joining e o teste “Bootstraping” processado por 1000 vezes para assegurar a confiabilidade da posição dos ramos formados na árvore. A árvore filogenética foi construída a partir de 33 seqüências nucleotídicas (Tabela 2), onde 18 seqüências representaram diferentes grupos de fitoplasmas, 13 seqüências

corresponderam aos distintos representantes de subgrupos do grupo 16SrIII, 2 sequências corresponderam ao fitoplasma da mandioca e uma sequência ao procarioto *Acholeplasma laidlawii*.

O programa pDraw 32 foi utilizado na análise dos mapas de sítios putativos de restrição para as sequências do 16Sr DNA do fitoplasma encontrado em plantas de mandioca e de fitoplasmas relacionados, gerados pelas mesmas endonucleases usadas na análise de RFLP convencional, permitindo compará-los.

Análise de RFLP virtual foi simulada em computador com base em todos os fitoplasmas representantes dos subgrupos componentes do grupo 16SrIII, cujas sequências foram depositadas no GenBank ou relatadas em diferentes publicações. (Tabela 2). Essas referências e seus respectivos subgrupos são: CX=Canadian Peach X-disease (16SrIII-A); CYE= Clover Yellow Edge (16SrIII-B); SP1= Spirea stunt (16SrIII-E); MW1=Milkweed q yellows (16SrIII-F); WWB=Walnut witches'-broom (16SrIII-G); PoiBI=Poinsettia branch-inducing (16SrIII-H); VGY=Virginia grapevine yellows (16SrIII-I); ChWB= Chayote witches'-broom (16SrIII-J); DV=Dandelion virescence (16SrIII-P); BRWB7= Black Raspberry witches'-broom (16SrIII-Q); CWL= Cirsium White leaf (16SrIII-R); PPT= Potato purple top e ChD=Cherry decline (III-T). As sequências alinhadas e cortadas foram exportadas para a análise de restrição em gel virtual *in silico* no programa pDRAW32, desenvolvido pela AcaClone Software, de acordo com Wei et al. (2007). Cada fragmento de DNA alinhado foi digerido *in silico* com 17 distintas enzimas de restrição que têm sido usadas rotineiramente em análise de RFLP para região 16S rRNA de fitoplasma (WEI et al., 2007). Essas enzimas foram *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI* and *TaqI*. Após a digestão *in silico*, um gel de agarose de 3% foi plotado e capturado como arquivo independente em formato PDF para posteriores comparações dos perfis gerados. Os padrões virtuais de RFLP foram comparados e um coeficiente de similaridade (F) foi calculado para cada par de isolados de fitoplasma de acordo com a fórmula $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, onde N_x e N_y são os números totais de bandas no perfil de cada isolado e N_{xy} é o número de bandas em comum entre os mesmos. As bandas até 50 pb foram consideradas para o cálculo, pois no RFLP convencional as bandas abaixo desse valor não são bem visualizadas (LEE et al., 1998; NEI; LI, 1979).

Tabela 2 - Sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA representantes de fitoplasmas dos 18 grupos e de subgrupos do grupo 16SrIII, depositadas no GenBank e usadas no presente trabalho para construção da árvore filogenética e cálculo do coeficiente de similaridade

Doença	Fitoplasma	Nº de acesso GenBank	Referência
Cassava Witches' Broom (CaWB-Br01)	Md1	GU193976	Presente estudo
Cassava Witches' Broom (CaWB-Br02)	BG13	GU193977	Presente estudo
Maize bushy stunt (MBS)	I-B	AY265208	Lee et al, 2004
Peanut Witches' Broom (PnWB)	II-A	L33765	Gundersen et al., 1994
Canadian Peach X-Disease (CX)	III-A	L33733	Gundersen et al., 1994
Clover Yellow edge (CYE)	III-B	AF175304	Davis & Dally, 2001
Spirea Stunt (SP1)	III-E	AF190228	"GenBank"
Milkweed yellows (MW1)	III-F	AF510724	"GenBank"
Walnut Witches' Broom (WWB)	III-G	AF190226	"GenBank"
Poinsettia branch-inducing (PoiBI)	III-H	AF190223	"GenBank"
Virginia grapevine yellows (VGY)	III-I	AF060875	Davis et al, 1998
Chayote Witches' Broom (ChWB)	III-J	AF147706	Montano et al., 2000
Dandelion virescence (DV)	III-P	AF370120	Jomantiene et al, 2002
Black Raspberry Witches' Broom (BRWB7)	III-Q	AF302841	"GenBank"
Cirsium White leaf (CWLA)	III-R	AF373106	Jomantiene et al, 2002
Potato purple top (PPT)	III-M	FJ226074	Davis et al., 2009
Cherry decline (ChD)	III-T	FJ231728	Valiunas et al., 2009
Coconut Lethal Yellowing (CLY)	IV	U18747	Tymon et al., 1998
Elm Yellows (EY)	V	AF189214	Unpublished
Clover Proliferation (CP)	VI-A	AF409070	Staniulis et al., 2000
Ash Yellows (AshY)	VII-B	AY034608	Barros et al., (2002)
Loofah Witches' Broom (LFWB)	VIII-A	AF353090	Wei et al., 2007
Pigeon Pea Witches' Broom (PPWB)	IX	AF248993	Martini et al., (2007)
Apple Proliferation (AP)	X	AJ542541	Seemüller et al., 2004
Rice Yellow Dwarf (RYD)	XI	D12581	Namba et al., 1993
Stolbur (STOL)	XII	X76427	Seemuller et al. 1994
Mexican Periwinkle virescence (MPV)	XIII	AF248960	Wei et al. 2007
Bermudagrass White Leaf (BGWL)	XIV	AF248961	Marccone et al., 2004
Hibiscus Witches' Broom (HibWB)	XV	AF147708	Montano et al., 2001
Sugarcane Yellow Leaf Syndrome (SYL)	XVI	EU170474	Arocha et al., 2005
Papaya Bunchy Top (PBT)	XVII	AY725234	Arocha et al., 2005
American potato purple top wilt (APPTW)	XVIII	DQ174122	Wei et al., 2007
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	M23932	Weisburg et al., (1989)

2.2.2.8 Teste de transmissão do fitoplasma

Sementes de cuscuta (*Cuscuta subinclusa*) foram pré-germinadas em papel de filtro umedecido e colocadas sobre plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) com aproximadamente 15 cm de altura. Foi permitido o tempo suficiente para que os filamentos da cuscuta se estabelecessem nas plantas de vinca.

Seis plantas de mandioca coletadas em Piracicaba, comprovadamente infectadas com fitoplasmas associados aos sintomas típicos da doença, foram estabelecidas em vasos e usadas como plantas fontes. Para transmissão, duas plantas de vinca colonizadas pela cuscuta foram colocadas em contato com cada uma das 6 plantas de mandioca. As ramificações da cuscuta presentes nas plantas de vinca passaram a se desenvolver sobre as plantas de mandioca, servindo

como ponte biológica, para possibilitar a passagem de fitoplasmas das plantas infectadas para as plantas saudáveis (Figura 3).

As avaliações foram feitas semanalmente pela observação de sintomas nas plantas de vinca. A partir do aparecimento dos sintomas iniciais nas plantas, além das observações visuais, também passaram a ser feitos testes de PCR, visando à detecção de fitoplasmas. Quando os filamentos da *Cuscuta* começaram a secar, os vasos de vinca foram separados daqueles de mandioca. As plantas de vinca foram mantidas em casa de vegetação e continuaram sendo observadas quanto ao desenvolvimento de sintomas da doença.

Figura 3 - Etapas do teste de transmissão. Letras: I= filamentos da *Cuscuta* se estabelecendo nas plantas de vinca; J= filamentos da *Cuscuta* se estabelecendo nas plantas de mandioca; K= vaso de vinca ao lado do vaso de mandioca e *Cuscuta* atuando como ponte biológica e L= sintoma de filodia em planta de vinca

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Detecção de fitoplasmas por PCR

A detecção foi positiva em 19 das 25 plantas sintomáticas de mandioca amostradas em Piracicaba-SP, indicando que os fitoplasmas estavam presentes em 76% das plantas suspeitas de infecção (Tabela 3). Fitoplasmas também foram detectados em 20 das 21 plantas sintomáticas coletadas em Bragança Paulista-SP, aparecendo, portanto, em 95% das amostras que exibiam sintomas da doença (Tabela 3). Estes resultados revelaram uma forte associação entre hospedeiros doentes e fitoplasmas, evidenciando que estes procariotos eram possivelmente os agentes etiológicos da doença. Por outro lado, em nenhuma das 10 plantas assintomáticas provenientes de Piracicaba-SP ou de Bragança Paulista foram encontrados fitoplasmas, mostrando que estas plantas estavam livres dos mesmos, podendo ser consideradas como sadias.

A presença de fitoplasmas nas plantas com sintomas de superbrotamento foi revelada pela amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 Kb, visualizados na forma de bandas em géis de agarose. As amplificações obtidas a partir do DNA extraído de algumas amostras representativas das plantas coletadas em Piracicaba e Bragança Paulista estão apresentadas a seguir (Figuras 4 e 5). A obtenção de fragmentos genômicos de 1,2Kb é esperada para fitoplasmas, quando os iniciadores P1/Tint e F2n/R2 são utilizados nas reações de duplo PCR.

Amplificações de fragmentos genômicos de 1,2Kb também foram constatadas para o controle positivo, representado pelos DNA de fitoplasma oriundo de plantas de chuchu com superbrotamento. No entanto, nenhuma amplificação ocorreu quando o DNA de planta assintomática de mandioca e a água foram usados como modelo para as reações de duplo PCR.

Tabela 3 - Detecção de fitoplasmas em plantas de mandioca amostradas em Piracicaba-SP e Bragança Paulista-SP, por meio de duplo PCR conduzido com os iniciadores P1-Tint e F2n/R2

Amostra	Piracicaba - SP		Bragança Paulista - SP	
	Resultado	Diluição	Resultado	Diluição
1	+	1:20	+	1:30
2	+	1:20	-	várias
3	+	1:10	+	1:30
4	-	várias	+	1:30
5	+	1:20	+	extrato
6	-	várias	+	extrato
7	+	1:20	+	extrato
8	+	extrato	+	extrato
9	+	1:20	+	extrato
10	+	1:10	+	extrato
11	+	extrato	+	extrato
12	+	extrato	+	extrato
13	+	1:20	+	1:20
14	+	1:20	+	extrato
15	+	1:10	+	1:20
16	+	1:10	+	extrato
17	+	1:20	+	extrato
18	-	várias	+	extrato
19	+	1:10	+	extrato
20	+	1:10	+	extrato
21	+	1:5	+	extrato
22	-	várias		
23	-	várias		
24	-	várias		
25	+	1:5

Figura 4 – Detecção de fitoplasmas em amostras sintomáticas de mandioca coletadas em Piracicaba-SP por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 Kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* P1/Tint e R16F2n/R2. M = Marcador (1 Kb Ladder); 1 a 6 = amostras de DNA extraídas de plantas sintomáticas de mandioca; Ch = padrão positivo (Chuchu); Ps = padrão negativo (planta sadia de mandioca)

Figura 5 – Detecção de fitoplasmas em amostras sintomáticas de mandioca coletadas em Bragança Paulista-SP por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 Kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* P1/Tint e R16F2n/R2. M = Marcador (1 Kb Ladder); 1 a 4 = amostras de DNA extraídas de plantas sintomáticas de mandioca; Ch = padrão positivo (Chuchu); Ps = padrão negativo (planta sadia de mandioca); H = água (controle negativo)

Os sintomas presentes nas plantas doentes utilizadas no presente estudo foram praticamente idênticos àqueles observados pela primeira vez em Lins, na década de quarenta

(SILBERSCHMIDT; CAMPOS, 1944). As plantas afetadas exibiam superbrotamento de ramos, redução do porte, diminuição no tamanho das folhas, além de clorose foliar. Este quadro sintomatológico era sugestivo de doença associada aos fitoplasmas, o que foi confirmado pela detecção molecular deste procarioto na maioria absoluta das plantas naturalmente infectadas, presentes nos dois locais amostrados.

No Brasil, a associação entre fitoplasmas e superbrotamento foi primeiramente demonstrada pelo uso de microscopia eletrônica de transmissão para plantas de mandioca cultivadas nos estados de São Paulo (KITAJIMA; COSTA, 1970) e Pernambuco (COSTA, 1971; MARIANO et al., 1991), e também no Distrito Federal (KITAJIMA; COSTA, 1971). Nestes casos, os fitoplasmas foram evidenciados pela visualização de corpúsculos pleomórficos nos elementos de floema de plantas doentes. Mais recentemente, o emprego de técnicas moleculares permitiu associar os fitoplasmas aos tecidos de plantas superbrotadas observadas em plantações conduzidas no estado do Ceará (BARROS et al., 1998) e de Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2009).

3.2 Identificação por PCR

Nas reações de duplo PCR realizadas com o par de iniciadores R16(I)F1/R16(I)R1, específico para a identificação de fitoplasmas do grupo 16SrI, não houve amplificação a partir do DNA extraído de amostras de mandioca. No entanto, o duplo PCR gerou um fragmento esperado de 1,1 Kb para o controle positivo representado pelo DNA de planta de milho, sabidamente portadora do fitoplasma do enfezamento vermelho (dados não mostrados).

Nas reações conduzidas com o par de iniciadores R16(III)F2/R16(III)R1, foi obtida, para todas as amostras positivas de mandioca, a amplificação de fragmentos de DNA de 0,8 Kb, típicos para fitoplasmas do grupo 16SrIII. Resultados idênticos foram obtidos nas reações de PCR onde se usou o DNA de planta de chuchu comprovadamente infectada pelo fitoplasma do superbrotamento, a qual representou o padrão positivo. A identificação do fitoplasma foi visualizada na forma de bandas correspondentes à amplificação do DNA do fitoplasma presente em algumas amostras que foram escolhidas para representar as plantas sintomáticas coletadas em Piracicaba-SP e Bragança Paulista-SP (Figuras 6 e 7).

Figura 6 – Identificação de fitoplasmas detectados em plantas sintomáticas de mandioca da cidade de Piracicaba-SP por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 0,8 Kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* P1/Tint e R16(III)F2/R16(III)R1. M = Marcador (1 Kb Ladder); 1 a 6 = amostras de DNA extraídas de plantas sintomáticas de mandioca; Ch = padrão positivo (Chuchu); H = padrão negativo (água)

Figura 7 – Identificação de fitoplasmas detectados em plantas sintomáticas de mandioca da cidade de Bragança Paulista-SP por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 0,8 Kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* P1/Tint e R16(III)F2/R16(III)R1. M = Marcador (1 Kb Ladder); 1 a 16 = amostras de DNA extraídas de plantas sintomáticas de mandioca; Ch = padrão positivo (Chuchu); H = padrão negativo (água)

Fitoplasmas do grupo 16SrIII também foram anteriormente identificados em associação com o superbrotamento em plantações instaladas no Ceará (BARROS, 2002) e no estado de Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2009). A presença de representantes deste grupo em áreas geográficas tão distintas sugere que estes fitoplasmas podem ser realmente predominantes nas

associações com o superbrotamento. No entanto, em razão da diversidade genética destes agentes de doença no território brasileiro e da diversidade de variedades do hospedeiro não seria surpresa encontrar fitoplasmas pertencentes aos outros grupos em associação com a doença em questão. Em estudos conduzidos fora do Brasil, foram encontrados fitoplasmas pertencentes a grupos distintos daquele presente nos três estados brasileiros onde a doença foi relatada. Assim, um fitoplasma do grupo 16SrI foi identificado em Cuba e na França, enquanto um afiliado ao grupo 16SrII foi determinado em plantações de Uganda. Apesar da diversidade dos fitoplasmas que estão associados ao superbrotamento, tem sido constatado que o hospedeiro exibe sintomas similares para a mesma doença. Embora representantes do grupo 16SrI tenham sido revelados em plantas doentes analisadas em outros países e a presença de afiliados a este grupo seja frequente no Brasil, este trabalho e os demais trabalhos conduzidos com material vegetal coletado em território brasileiro foram concordantes com a ausência de fitoplasmas deste grupo nos genótipos de mandioca.

3.3 Identificação por RFLP

Com base na identificação através de duplo PCR com os iniciadores específicos para o grupo 16SrIII, seis amostras foram escolhidas para a análise de RFLP, sendo três de cada uma das regiões amostradas. Neste trabalho, as três amostras de Piracicaba foram representadas pela amostra denominada de Md1, enquanto a amostra BG13 foi considerada como representativa das amostras coletadas em Bragança Paulista. Na análise de RFLP, visando complementar a identificação do fitoplasma associado ao superbrotamento, foram utilizados os produtos finais gerados pelo duplo PCR conduzido com os pares de iniciadores P1/Tint e R16 F2n/R2. O fitoplasma do superbrotamento do chuchu, representante do grupo 16SrIII, subgrupo J (MONTANO et al., 2000) foi adotado como padrão.

Para o fitoplasma detectado nas plantas de mandioca com superbrotamento, os perfis coletivos de restrição gerados pelas enzimas *AluI*, *HpaII*, *KpnI*, *MseI*, *Bsh1236*, *HinfI* e *RsaI* foram idênticos entre si e coincidentes com aquele apresentado pelo padrão do grupo 16SrIII-J. A enzima *HhaI* foi a única que gerou um perfil diferenciado e permitiu classificar o fitoplasma encontrado nas amostras de mandioca como um representante do grupo 16SrIII, subgrupo B (Figura 8).

Figura 8 - Análise de RFLP do gene 16S rDNA de fitoplasmas do grupo 16SrIII detectados em plantas de mandioca, utilizando as enzimas *AluI*, *BstUI*, *HhaI*, *KpnI*, *HinfI*, *HpaII*, *RsaI* e *MseI*. M= marcador molecular Φ X174RFHaeIII; Md1= amostra de mandioca de Piracicaba-SP, BG13 = amostra de mandioca de Bragança Paulista-SP; Ch = padrão positivo chuchu

Na Tabela 4, os padrões de restrição obtidos para o fitoplasma do grupo 16SrIII presente em mandioca foram comparados aos padrões descritos na literatura (LEE et al., 1998; MONTANO et al., 2000; JOMANTIENE et al., 2002; BARROS et al., 2002). A Tabela 4 mostra que a enzima *HhaI* permite diferenciar o perfil do fitoplasma da mandioca, afiliado ao grupo 16SrIII-B, dos perfis mostrados pelos fitoplasmas pertencentes aos demais subgrupos, como 16SrIII-C, 16SrIII-D, 16SrIII-E, 16SrIII-F e 16SrIII-J. O perfil da enzima *HpaII* permite diferenciá-lo dos membros dos subgrupos 16SrIII-A, 16SrIII-E, 16SrIII-G, 16SrIII-H e 16SrIII-I. A enzima *BstUI* diferencia este fitoplasma daqueles representantes dos subgrupos 16SrIII-C, 16SrIII-D, 16SrIII-F e 16SrIII-H. A enzima *MseI* diferencia o fitoplasma do subgrupo 16SrIII-B daqueles fitoplasmas pertencentes aos subgrupos 16SrIII-C, 16SrIII-D e 16SrIII-H. Finalmente, o perfil da enzima *RsaI* apenas diferencia o fitoplasma presente em mandioca do fitoplasma pertencente ao subgrupo 16SrIII-G.

A análise dos dados da Tabela 4, aliada aos resultados mostrados na Figura 8, leva à conclusão de que o fitoplasma associado ao superbrotamento das plantas de mandioca, utilizadas no presente trabalho, está afiliado ao grupo 16SrIII, subgrupo B. Um fitoplasma membro do grupo 16SrIII-B também foi molecularmente caracterizado em amostras de plantas de mandioca cultivadas no Ceará que exibiam sintomas desta doença (BARROS, 2002), mostrando que um mesmo fitoplasma está associado a este tipo de anomalia.

Tabela 4 - Comparação entre os padrões de restrição obtidos por RFLP do fitoplasma detectado em plantas de mandioca (Md1 e BG13) com outros fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII

“Strain” do fitoplasma	Grupo 16SrIII (subgrupo)	Tipos de padrões de restrição para diferentes enzimas						
		<i>HhaI</i>	<i>BstUI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HpaII</i>	<i>MseI</i>	<i>RsaI</i>	<i>KpnI</i>
Md1	III (B)	1	1	1	2	1	1	1
BG13	III (B)	1	1	1	2	1	1	1
CX ^a	III (A)	1	1	1	1	1	1	1
CYE ^a	III (B)	1	1	1	2	1	1	1
PB ^a	III (C)	2	2	1	2	2	1	1
GR1 ^a	III (D)	2	3	1	2	3	1	1
SP1 ^a	III (E)	3	1	1	1	1	1	1
MW1 ^a	III (F)	2	2	1	2	1	1	1
WWB ^a	III (G)	1	1	1	1	1	2	1
PoiBI ^b	III (H)	1	4	1	1	1	1	1
VGY ^c	III (I)	1	1	1	1	2	1	1
ChWB ^d	III (J)	2	1	1	2	1	1	1
DanVir ^e	III (P)	2	--	2	2	1	1	1
BRWB7 ^f	III (Q)	2	1	1	2	1	3	1
CirWL ^e	III (R)	4	1	1	2	1	1	2
PPT-M ^g	III (M)	2	2	1	2	4	1	1
ChD-T ^h	III (T)	2	--	3	2	1	1	1

Os números representam os diferentes tipos de padrões de restrição obtidos para as endonucleases. Abreviações: CX= Canadian X-disease; CYE= Clover yellow edge; PB= Pecan bunch; GR1= Golden rod yellows; SP1= Spirea stunt; MW1= Milkeed yellows; WWB= Walnut witches' broom; PoiBI= Poinsettia branch-inducing; VGY= Virginia grapevine yellows; ChWB= Chayote witches' broom; DanVir= Dandelion virescence; BRWB7= Black Raspberry Witches' Broom; CirWL= Cirsium white leaf; PPT-M= Potato purple top e ChD-T= Cherry decline. Letras sobrescritas: a= Lee et al. (1998); b= Davis (não publicado. Citado por BARROS et al., (2002); c= DAVIS et al. (1998); d= MONTANO et al. (2000); e= JOMANTIENE et al. (2002); f= DAVIS et al. (GenBank); g= LEE et al. (2009); h= VALIUNAS et al. (2009).

3.4 Análise das sequências de nucleotídeos do 16S rDNA do fitoplasma

O fitoplasma encontrado na amostra identificada por Md1 (Piracicaba) e aquele presente na amostra BG13 (Bragança Paulista), usados na análise de RFLP convencional, foram submetidos ao sequenciamento de bases nucleotídicas do 16S rDNA. Para cada um dos fitoplasmas foram sequenciados três clones. As três sequências de 1,2 Kb foram comparadas entre si e foi selecionada uma sequência consenso para cada um dos fitoplasmas, tomando-se por base a ausência de polimorfismo. As sequências consenso correspondentes aos fitoplasmas Md1 e BG13 foram denominadas de CaWB-Br01 (Cassava Witches' Broom- Brazil 01) e CaWB-Br02 (Cassava Witches' Broom- Brazil 02) e depositadas no GenBank, onde receberam a identificação de GU193976 e GU193977, respectivamente.

Os perfis coletivos de eletroforese para as análises de RFLP virtual foram idênticos para os dois fitoplasmas, considerando-se individualmente cada uma das enzimas de restrição utilizadas (Figura 9). Os perfis mostrados pelo fitoplasma usado como padrão do grupo 16SrIII, subgrupo B (CYE- Clover yellow edge) foram indistinguíveis daqueles gerados pelos fitoplasmas encontrados nas amostras de mandioca (Figura 9). Os resultados da análise virtual foram coincidentes com aqueles obtidos na análise convencional de RFLP, confirmando que os fitoplasmas associados ao superbrotamento pertencem ao grupo 16SrIII, subgrupo B.

Cada sequência consenso foi comparada entre si e com a sequência usada como padrão (CYE), através de mapas putativos de restrição, construídos com as mesmas enzimas usadas para as análises de RFLP convencionais e virtuais (Figura 9). Como esperado, os fragmentos revelados pela análise putativa dos sítios de restrição apresentaram concordância com aqueles gerados por ambas as análises de RFLP (Figura 9).

Figura 9 - Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição com as mesmas enzimas utilizadas para a análise enzimática de RFLP. Md1(CaWB-Br01) = fitoplasma da mandioca (Piracicaba-SP); BG13 (CaWB-Br02) = fitoplasma da mandioca (Bragança Paulista-SP); CYE= fitoplasma associado ao Clover yellow edge, representante do subgrupo 16Sr III-B

As duas seqüências consenso pertencentes aos fitoplasmas encontrados em plantas de mandioca com superbrotamento foram digeridas *in silico* com 17 distintas enzimas de restrição para obtenção de um RFLP virtual, de acordo com Wei et al., 2007. Géis foram plotados e, com

base nos fragmentos gerados para cada enzima, foram calculados os valores de coeficientes de similaridade entre os fitoplasmas representantes dos diversos subgrupos do grupo 16SrIII, incluindo os dois fitoplasmas associados ao superbrotamento da mandioca. Para que um fitoplasma seja considerado similar ao outro o coeficiente de similaridade tem que ser maior ou igual a 0,97. Através deste tipo de análise, ficou novamente demonstrado que os fitoplasmas presentes nas amostras de mandioca são similares entre si, sendo estes similares ao fitoplasma afiliado ao grupo 16SrIII, subgrupo B (CYE), pois o coeficiente de similaridade entre eles foi igual a 1 (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação dos coeficientes de similaridade calculados para os fitoplasmas detectados nas amostras CaWB-Br01 e CaWB-Br02 de mandioca com outros fitoplasmas pertencentes a diversos subgrupos do grupo 16SrIII

Subgrupo	A	B	E	F	G	H	I	J	P1	Q	R1	PPT-M	ChD-T	CaWB Br01	CaWB Br02
CX-A	1														
CYE-B	0,93	1													
SP1-E	0,96	0,94	1												
MW1-F	0,88	0,93	0,89	1											
WWB-G	0,96	0,91	0,95	0,87	1										
PoiBI-H	0,96	0,94	0,97	0,89	0,97	1									
VGy-I	0,86	0,94	0,97	0,89	0,95	0,97	1								
ChWB-J	0,89	0,96	0,9	0,96	0,88	0,9	0,9	1							
DanVir-P1	0,86	0,93	0,87	0,93	0,84	0,87	0,87	0,94	1						
BRWB7-Q	0,85	0,95	0,89	0,95	0,87	0,89	0,89	0,96	0,93	1					
CirWL-R1	0,82	0,89	0,83	0,87	0,81	0,83	0,83	0,87	0,85	0,87	1				
PPT-M	0,81	0,86	0,85	0,94	0,85	0,85	0,85	0,94	0,88	0,88	0,83	1			
ChD-T	0,78	0,85	0,79	0,87	0,76	0,76	0,79	0,86	0,89	0,85	0,77	0,81	1		
CaWB-Br01	0,93	1	0,94	0,93	0,91	0,94	0,94	0,96	0,93	0,95	0,89	0,86	0,85	1	
CaWB-Br02	0,93	1	0,94	0,95	0,91	0,94	0,94	0,96	0,93	0,95	0,89	0,86	0,85	1	1

Abreviações: CX= Canadian X-disease; CYE= Clover yellow edge; PB= Pecan bunch; SP1= Spirea stunt; MW1= Milkeed yellows; WWB= Walnut witches' broom; PoiBI= Poinsettia branch-inducing; VGy= Virginia grapevine yellows; ChWB= Chayote witches' broom; BRWB7= Black Raspberry Witches' Broom; DanVir= Dandelion virescence; CirWL= Cirsium white leaf; PPT-M= Potato purple top; ChD-T= Cherry decline e CaWB= Cassava Witches' broom.

As seqüências nucleotídicas encontradas nos fitoplasmas da mandioca, representantes do grupo 16SrIII, apresentaram 99% de similaridade com as seqüências dos diversos fitoplasmas afiliados a este grupo, depositadas no GenBank. A relação filogenética existente entre os fitoplasmas de diferentes grupos, os fitoplasmas representantes de subgrupos do grupo 16SrIII e os fitoplasmas associados ao superbrotamento da mandioca pode ser observada na árvore filogenética gerada a partir das respectivas seqüências nucleotídicas (Figura 10).

A árvore filogenética revelou que os fitoplasmas associados ao superbrotaamento se mostraram distintos dos fitoplasmas afiliados aos demais grupos; no entanto, os referidos fitoplasmas estão inseridos nos ramos que agregaram os diversos representantes dos subgrupos pertencentes ao grupo 16SrIII. Especificamente, estes dois fitoplasmas se situam mais estritamente relacionados ao fitoplasma representante do subgrupo III-B (CYE). Os agrupamentos mostrados na árvore filogenética são considerados confiáveis, uma vez que esta foi construída com “Bootstrapping” de 1000 vezes.

Figura 10 – Árvore filogenética construída com representantes de 18 diferentes grupos de fitoplasma, 13 subgrupos representantes do grupo 16SrIII, o procarioto *Acholeplasma laidlawii* e os 2 fitoplasmas identificados em plantas de mandioca (amostras: Md1 = CaWB-Br01 e BG13 = CaWB-Br02). Os números nos ramos representam valores de confiança baseados no “Bootstrapping”

A ocorrência de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII, subgrupo B tem sido frequentemente relatada em diversas espécies botânicas encontradas no Brasil. Entre elas, além da mandioca (BARROS, 2002), estes fitoplasmas foram identificados em associação com o cálice gigante da berinjela (AMARAL MELLO et al., 2007), superbrotamento do maracujazeiro (RIBEIRO, 2008), superbrotamento da primavera (SILVA, 2008), declínio do cinamomo (DUARTE et al., 2009) e amarelo da abobrinha-de-moita (MELO et al., 2009). A variabilidade de hospedeiros deste fitoplasma e sua ampla distribuição geográfica sugerem a sua disseminação por insetos vetores polípagos, os quais possivelmente podem estar envolvidos com a transmissão do patógeno para uma gama de espécies de interesse econômico.

Em outros países, os sintomas de superbrotamento foram associados a fitoplasmas distintos daqueles pertencentes ao grupo 16SrIII. Assim, em Cuba (AROCHA et al., 2009a) e na França (DAVIS et al., 2005), um fitoplasma afiliado ao grupo 16SrI foi identificado em plantas portadoras da doença, enquanto em Uganda um fitoplasma do grupo 16SrII foi detectado em associação com doentes exibindo amarelecimento foliar e proliferação de ramos (AROCHA et al., 2009b). O fato de fitoplasmas diferentes induzirem sintomas similares, como verificados para a doença da mandioca, não se constitui em surpresa, pois tem sido relativamente comum a presença de mais de um fitoplasma associado à mesma doença, podendo-se citar como exemplos o cálice gigante do tomateiro (AMARAL MELLO et al., 2006) e a síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-acúcar (SILVA et al., 2009).

3.5 Transmissão por Cuscuta

Dentre as seis plantas de mandioca com superbrotamento que foram utilizadas, em cinco delas se constatou a transmissão de fitoplasmas para as plantas de vinca usadas como indicadoras (Figura 11). Estes resultados mostraram uma porcentagem de transmissão da ordem de 83%. Os sintomas iniciais se manifestaram dois meses após o estabelecimento do contato entre as plantas doentes de mandioca e as plantas sadias de vinca, através dos filamentos da cuscuta. O primeiro sintoma observado foi o aparecimento de clorose nas folhas. Posteriormente, constatou-se em todas as plantas cloróticas a ocorrência de filodia, caracterizada pelo desenvolvimento de folhas onde deveriam se originar as pétalas. Destaca-se que a filodia é um tipo de sintoma especificamente atribuído aos fitoplasmas, sendo sua ocorrência um forte indicativo da presença de fitoplasmas nos tecidos da planta sintomática (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000).

A partir do aparecimento dos primeiros sintomas, passou-se a amostrar tecidos de plantas doentes de vinca para confirmar a presença de fitoplasmas nos seus tecidos. A aplicação de PCR usando-se os pares de iniciadores P1/Tint – F2n/R2 revelou a presença de fitoplasmas em todas as plantas que exibiam sintomas de clorose e filodia.

A identificação molecular, realizada por duplo PCR conduzido com iniciadores específicos, evidenciou que todos os fitoplasmas detectados nas plantas de vinca pertencem ao grupo 16SrIII, o que foi demonstrado pela amplificação de fragmentos de DNA de 0,8 Kb, visualizados na forma de bandas em gel de agarose (Figura 12).

A transmissão experimental do fitoplasma presente em plantas de mandioca apresentando superbrotamento constituiu-se num teste positivo de patogenicidade, o qual demonstrou claramente que um fitoplasma do grupo 16SrIII está associado à doença.

Figura 11 – Detecção de fitoplasmas em amostras de vinca por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 Kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* P1/Tint e R16F2n/R2. M = Marcador (1 Kb Ladder); T1 a T11 = amostras de DNA de vinca; Ch = padrão positivo (Chuchu); Ps = padrão negativo (planta sadia de vinca)

Figura 12 – Identificação de fitoplasmas detectados em plantas de vinca por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 0,8 Kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* P1/Tint e R16(III)F2/R16(III)R1. M = Marcador (1 Kb Ladder); T1 a 11 = amostras de DNA extraídas de vinca; Ch = padrão positivo (Chuchu); H = padrão negativo (água)

Em relação ao agente etiológico da doença, o primeiro relato sobre o superbrotamento da mandioca, feito a partir de plantas doentes observadas em Lins, na década de quarenta, levantou a hipótese de um vírus estar associado à doença (SILBERSCHMIDT; CAMPOS, 1944). No entanto, com a descoberta dos fitoplasmas em 1967 (DOI et al., 1967), já no início da década de setenta os mesmos foram encontrados consistentemente, através de microscopia eletrônica de transmissão, em plantas infectadas provenientes do município de Santa Bárbara do Rio Pardo (KITAJIMA; COSTA, 1970). A partir desta constatação, novas evidências surgiram em relação à associação entre fitoplasmas e plantas exibindo sintomas de superbrotamento e clorose. Assim, em plantas doentes de mandioca cultivadas no Distrito Federal (KITAJIMA; COSTA, 1971) e em Pernambuco (COSTA, 1971; MARIANO et al., 1991) foram observados corpúsculos pleomórficos, típicos destes procariotos, no interior dos vasos de floema. Com o desenvolvimento das técnicas moleculares e os avanços dos conhecimentos sobre os fitoplasmas, foi possível classificar o fitoplasma associado ao superbrotamento como sendo um representante do grupo 16SrIII. Desta forma, este fitoplasma foi identificado em plantas sintomáticas de mandioca originárias dos estados do Ceará (BARROS et al., 1998) e de Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2009). O presente trabalho revelou que no estado de São Paulo os sintomas de superbrotamento, caracterizado por amarelecimento foliar, proliferação anormal de ramos, enfezamento generalizado da planta redução no tamanho de folhas, é também induzido por um fitoplasma do

grupo 16SrIII. O detalhamento investigativo revelou que este fitoplasma é afiliado ao grupo 16SrIII, subgrupo B, ou seja, o mesmo subgrupo do fitoplasma associado às plantas doentes encontradas no estado do Ceará. Os achados deste estudo quanto à identificação molecular do fitoplasma do superbrotamento e à demonstração que o mesmo é o agente causal da doença, poderão contribuir com estudos futuros que visem estudar a doença sob o ponto de vista epidemiológico. A identificação deste fitoplasma em insetos que comumente são encontrados em mandiocais poderá indicar uma possível participação dos mesmos como vetores do patógeno. Além disto, a sua detecção em plantas que frequentemente crescem em meio à cultura ou em suas adjacências poderá evidenciar o provável papel destas plantas como hospedeiros alternativos, as quais talvez possam atuar como reservatórios do patógeno e servirem como fonte de inóculo para a cultura.

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

Um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrIII, subgrupo B é o agente causal do superbrotamento da mandioca, nas plantas amostradas em campos localizados em Piracicaba e Bragança Paulista, no Estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, T.T.O.; MIRANDA, L.C.G.; SALIM, J.; TELES, F.F.F.; QUIRINO, J.G. Composição centesimal da raiz de 10 variedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivadas em Minas Gerais. **Revista Brasileira da Mandioca**, Cruz das Almas, v. 12, n. 1, p. 7-12, jan. 1993.
- ALVAREZ, E.; MEJIA, J.F.; LLANO, G.A.; LOKE, J.B. Detection and characterization of a phytoplasma associated with *frog skin disease* in cassava. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n.2, p. 273-274, 2007.
- AMARAL MELLO, A.P.O. **Identificação de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença**. 2007. 64 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- 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 rDNA.. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 258-263, 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.
- AMMAR, E.-D.; HOGENHOUT, S.A. Mollicutes associated with arthropods and plants. In: KOSTAS, B.; MILLER, T. (Ed.). **Insect symbiosis**. Boca Raton: CRC Press; Taylor and Francis Group, 2006. v. 2, p. 97-118.
- AROCHA, Y.; PIÑOL, P.; ALMEIDA, R.; ACOSTA, K.; QUIÑONES, M.; ZAYAS, T.; VARELA, M.; MARRERO, Y.; BOA, E.; LUCAS, A. First report of phytoplasmas affecting organoponic crops in central and eastern Cuba. **Plant Pathology**, London, v. 58, p. 793, 2009a.
- AROCHA, Y.; ECHODU, R.; TALANGERA, D.; MUHANGI, J.; ROCKEFELLER, E.; ASHER, O.; NAKACWA, R.; SERUGGA, R.; GUMISIRIZA, G.; TRIPATHI, J.; KABUYE, D.; OTIPA, M.; VUTSEME, K.; LUKANDA, M.; BOA, E. Occurrence of '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' (16SrII group) in cassava and four other species in Uganda. **Plant Pathology**, London, v. 58, p. 390, 2009b.
- BAI, X.; ZHANG, J.; EWING, A.; MILLER, S.A.; JANCOS RADEK, A.; SHEVCHNKO, D.V.; TSUKERMAN, K.; VALUNAS, T.; LAPIDUS, A.; CAMPELL, J.W.; HOGENHOUT, S.A. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, p. 3682-3696, 2006.
- BALAGOPALAN, C.; PADMAJA, G.; NANDA, S.K.; MOORTHY, S.N. **Cassava in food, feed and industry**. Boca Raton: CRC Press, 1988. 219 p.

BARROS, T.S.L. **Fitoplasmas no Brasil: caracterização molecular via “polimerase chain reaction” and “restriction fragment length polymorphism”**. 1997. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 1997.

_____. **Caracterização molecular de Mollicutes fitopatogênicos no Brasil**. 2002. 105 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

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

BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Detection and identification of the maize bushy stunt phytoplasma in corn plants in Brazil using PCR and RFLP. **International Journal of Pest Management**, London, v. 42, p. 73-76, 2000.

BERTOLIN, A.; ALBERTO, A.C.; SALOMON, E. Mandioca, pão dos trópicos, bom nutriente animal. **A Granja**, Porto Alegre, v. 33, p. 78-80, 1977.

BEZERRA, J.A. Mandioca: no pão, a saída da crise. **Globo Rural**, São Paulo, v. 17, p. 56-63, 2002.

BRADBURY, H. Mandioca amarga. **Revista Esporo**, Wageningen, v. 48, p. 8, 2002.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Descripcion de las enfermedades de la yuca**. Cali, 1980. 35 p. (Serie, 04SC).

CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. Potencialidades das proteínas de folhas de mandioca. In: CEREDA, M.P. (Ed.). **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino-americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2000. p. 682-692.

CHIYOKOWSKI, S. Differentiation of MLO disease by means of symptomatology and vector transmission. **Zentralblatt fuer Bakteriologie**, Stuttgart, v. 20, p. 280-287, 1989.

COCK, J.H. Aspectos fisiológicos del crecimiento y desarrollo de la planta de yuca. In: DOMINGUEZ, C.E. (Ed.). **Yuca: investigación, producción y utilización**. Cali: Centro International de Agricultura Tropical, 1982. p. 51-72.

COCK, J.H.; LYNAM, J.K. Potencial futuro e investigación necesario para el incremento de la yuca. In: DOMINGUEZ, C.E. (Ed.). **Yuca: investigación, producción y utilización**. Cali: Centro International de Agricultura Tropical, 1982. p. 1-25.

CONCEIÇÃO, A.J. **A mandioca**. São Paulo: Nobel, 1987. 382 p.

COSTA, A.S.; KITAJIMA, E.W. Studies on vírus and mycoplasma disease of the cassava plant in Brazil. In: WORKSHOP ON CASSAVA MOSAIC VIRUS, 1972, Ibadan. **Proceedings...** Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture, 1972. 18 p.

COSTA, A.S.; KITAJIMA, E.W.; ARRUDA, S.C. Moléstia de vírus e de micoplasma do milho em São Paulo. **Revista Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, v. 4, n. 4, p. 39-41, 1971.

DAVIS, R.A.; AROCHA, Y.; JONES, P.; MALAU, A. First report of the association of phytoplasmas with plant diseases in the territory of Wallis and Futuna. **Australasian Plant Pathology Society**, Melbourne, v. 34, p. 417-418, 2005.

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 16SrI, subgroup A (tomato big bud phytoplasma subgroup), and group 16SrIII, new subgroup I, **Vitis**, Landau, v. 37, p. 131-137, 1998.

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

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

DORETO, M. **Distribuição da cultura da mandioca na Paraná nos anos 80**. Londrina: IAPAR, 1993. 19 p. (IAPAR. Informe de Pesquisa, 102).

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

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

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. Disponível em: <<http://www.epagri.sc.gov.br/>>. Acesso em: 15 jun. 2009.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 15 jun. 2009.

FARFAN, J.A. Alimentação alternativa: análise crítica de uma proposta de intervenção nutricional. **Caderno Saúde Pública**, São Caetano do Sul, v. 14, p. 205-212, 1998.

FIRRAO, G.; GARCIA-CHAPA, M.; MARZACHI, C. Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. **front. BioScience**, Washington, v. 12, p. 1353-1375, 2007.

FUKUDA, C. Doenças da mandioca. In: CURSO INTENSIVO NACIONAL DE MANDIOCA: DOENÇAS DA MANDIOCA, 4., 1986, Cruz das Almas. Cruz das Almas: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa em Mandioca e Fruticultura, 1986. 27 p.

FUKUDA, C.; FILHO, J.T.; SA, M.F.P.; CARNEIRO, J.S.; MACAMBIA, F.A.; PAIVA, A.B.; PEREIRA, C.T.C.; LIMA, H.A. Levantamento da ocorrência do superbrotamento da mandioca na microrregião de Ibiapaba, CE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 6., 1990, Londrina. **Resumos...** Londrina: Sociedade Brasileira de Mandioca, 1990. p. 49.

FUKUDA, W.M.G. Melhoramento de mandioca. In: BÓREM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 409-428.

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

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

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

HERSHEY, C.H. Manihot esculenta diversity. In: INTERNATIONAL NETWORK FOR CASSAVA GENETIC RESOURCES, 1992, Cali. **Proceedings...** Rome: IBPGR, 1992. p. 111-134.

HERSHEY, C.H.; AMAYA, A. Germoplasma de yuca: evolución, distribución y colección. In: DOMINGUEZ, C.E. (Ed.). **Yuca: investigación, producción y utilización**. Cali: CIAT, 1989. p. 77-79.

HOGENHOUT, S.A.; OSHIMA, K.; AMMAR, E.; KAKIZAWA, S.; KINGDOM, H.N.; NAMBA, S. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 9, n. 4, 2008.

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

JOHNE, S. Cyanogenic plants. In: RIZK, A.M. (Ed.). **Poisonous plant contamination of edible plants**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 65-93.

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.

KIRKPATRICK, B.C.; FRASER, J.D. Cloning and parcial sequence of 16S ribossomal RNA gene from the western x-disease mycoplasma-like organism. **Phytopathology**, Lancaster, v. 78, p. 1541, 1998.

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

_____. Corpúsculos do tipo micoplasma associados a diversas moléstias de plantas, do grupo amarelo, no Estado de São Paulo. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 285-291, 1971.

LEE, I.M.; BOTTLNER, K.D. An emerging potato purple top disease associated with a new 16SrIII Group phytoplasma in Montana. **Plant Disease**, St. Paul, v. 93, n. 9, p. 970, 2009.

LEE, I.M.; DAVIS, R.E. Mycoplasmas witch infect plants and insects. In: MANILOFF, J.; McELHANSEY, R.N.; FINCH, L.R.; BASEMAN, J.B. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 379-390.

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

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

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

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

LEFOL, C.; LHERMINIER, J.; BOUDON-PADIEU, E.; LARRUE, J.; LOUIS, C. AND CAUDWELL, A. Propagation of flavescence doree MLO (Mycoplasma-Like Organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 63, p. 285-293, 1994.

LHERMINIER, J.; PRENSIER, G.; BOUDON-PADIEU, E. AND CAUDWELL, A. Immunolabeling of grapevine flavescence doree MLO in salivary glands of *Euscelidius variegatus*: a light and electron microscopy study. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 38, p. 79-85, 1990.

LIM, P.O.; SEARS, B.B. 16S rRNA sequence shows that plant-pathogenic "mycoplasma-like organisms" are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, p. 5901-5906, 1989.

LORENZI, J.O.; DIAS, C.A. **Cultura da mandioca**. Campinas: CATI, 1993. 41 p. (CATI. Boletim Técnico, 211).

LORENZI, J.O.; VALLE, T.L.; MONTEIRO, D.A.; COSTA, A.S. Mandioca: distribuição no Estado de São Paulo do micoplasma causador do superbrotamento-de-Santa-Bárbara-do-Rio-Pardo. **Bragantia**, Campinas, v. 47, p. 63-69, 1988.

LOZANO, J.C. Overview of integrated control of cassava diseases. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 18-22, 1992.

LOZANO, J.C.; CAVALCANTE, M.L.S.; FUKUDA, C.; LIMA, H.A. Efeito da seleção de material de plantio para o controle de micoplasma da mandioca na microrregião de Ibiapaba, CE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 6., 1990, Londrina. **Resumos...** Londrina: Sociedade Brasileira de Mandioca, 1990. p. 48.

MARIANO, R.L.R.; LARANJEIRAS, D.; SANTOS, E.O.; LOZANO, J.C.; PADOVAN, I.P.; PEIXOTO, A.R. Superbrotamento da mandioca no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 42, jun. 1991.

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.

McCOY, R.E.; CAUDWELL, A.; CHANG, C.J.; CHEN, T.A.; CHYKOWSKI, L.N.; COUSIN, M.T.; DALE, J.L.; LEEUW, G.T.; GOLINO, D.A.; HACKETT, K.J.; KIRKPATRICK, B.C.; MARWITZ, R.; PETZOLD, H.; SINHA, R.C.; SUGIURA, M.; WHITCOMB, R.F.; YANG, I.L.; ZHU, B.M.; SEEMÜLLER, E. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: WHITCOMB, R.F.; TULLY, J.G. (Ed.). **The mycoplasmas**. New York: Academic Press, 1989. v. 5, p. 545-640.

McMAHON, J.M.; WHITE, W.L.B.; SAYRE, R.T. Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, p. 731-741, 1995.

MELO, L.A.; BEDENDO, I.P.; VALDIR A. YUKI, V.A. Abobrinha-de-moita: um novo hospedeiro de fitoplasma do grupo 16SrIII. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 114-117, 2009.

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.

MOYA-RAYGOZA, G. AND NAULT, L.R. Transmission biology of maize bushy stunt Phytoplasma by the corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 91, p. 668–676, 1998.

MURRAL, D.J., NAULT, L.R., HOY, C.W., MADDEN, L. AND MILLER, S.A. Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 89, p. 1223–1232, 1996.

NAKASHIMA, K.; HAYASHI, T. Multiplication and distribution of rice yellow dwarf phytoplasma in infected tissues of rice and green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 61, p. 519–528, 1995.

NARTEY, F. ***Manihot esculenta* (cassava):** cyanogenesis, ultrastructure and seed germination. Copenhagen: Munksgaard, 1978. 262 p.

NASSAR, N.M.A. Conservation of genetic resources of cassava (*Manihot esculenta*). Determination of wild species localities with emphasis on probable origin. **Economic Botany**, 32:311-320, 1978.

_____. Wild cassava, *Manihot* spp.: biology and potentialities for genetics improvement. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 201-212, 2000.

NASSAR, N.M.A.; MARQUES, A.O. Cassava leaves as a source of protein. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 4, p. 187-188, 2006.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 03 jul. 2009.

NEI, M.; LI, W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

OLIVEIRA, A.S.; SILVA, M.S.; BATISTA, B.C.C.; RESENDE, R.O. Molecular identification of a phytoplasma belonging to the 16SrIII group found naturally infecting cassava. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, ago. 2009. Suplemento.

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

PEREIRA, A.S.; LORENZI, J.O.; VALLE, T.L. Avaliação do tempo de cozimento e padrão de massa cozida em mandiocas de mesa. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 4, p. 27-32, 1985.

RIBEIRO, L.F.C. **Identificação do superbrotamento do maracujazeiro: identificação molecular, análise filogenética e prova de patogenicidade**. 2008. 58 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

RIBEIRO, L.F.C.; BEDENDO, I.P. Associação constante de um fitoplasma do grupo II com o superbrotamento da maracujazeiro cultivado em diversas regiões brasileiras. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 33. p. 60, 2007. Suplemento.

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

SAGRILO, E.; VIDIGAL FILHO, P.S.; PEQUENO, M.G.; SCAPIM, C.A.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; DINIZ, S.P.S.S.; MODESTO, E.C.; KVITSCHAL, M.V. Effect of harvest period on the quality of storage roots and protein content of the leaves in five cassava cultivars (*Manihot esculenta*, Crantz). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, p. 295-305, 2003.

SCHAFF, D.; LEE, I.M.; DAVIS, R.E. Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 186, p. 1502-1509, 1992.

SCHMIDT, C.B. A Mandioca: contribuição para o conhecimento de sua origem. **Boletim da Agricultura**, v. 1, p. 56-56, 1951.

SILBERSCHMIDT, K.; CAMPOS, A.R. Estudos relativos à doença superbrotamento ou envassouramento da mandioca. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 15, p. 1-26, 1944.

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

SILVA, E.G.; BEDENDO, I.P.; MARCOS V. CASAGRANDE, M.V.; MORAES, V.A. Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of a Group 16SrI-B Phytoplasma Associated with Sugarcane Yellow Leaf Syndrome in Brazil. **Journal of Phytopathology**, London, v. 157, p. 771-774, 2009.

SILVA, R.M.; BANDEL, G.; FARALDO, M.I.F.; MARTINS, P.S. Biologia reprodutiva de etnovarietades de mandioca. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, p. 101-107, 2001.

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

TAKATSU, A.; FUKUDA, C. Current status of cassava diseases in Brazil. In: WORKSHOP ON THE GLOBAL STATUS AND PROSPECTS FOR INTEGRATED PEST MANAGEMENT OF ROOT AND TUBER CROPS IN THE TROPICS, 1987, Ibadan. **Proceedings...** Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture, 1990. p. 127-131.

TELES, F.F.F. Toxicidade crônica da mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) na África e América Latina. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 14, p. 107-115, 1995.

TÉO, C.R.P.A.; COELHO, S.R.M.; PRATES, A.F.L.; FRIEDRICH, M.H. Efeito do tempo de plantio nos conteúdos de proteína e tanino de farinhas de folhas mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 11., 2005, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Embrapa, CPAO, 2005. 1 CD-ROM.

TERNES, M. Fisiologia da planta. In: CEREDA, M.P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas latino-americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. (Série: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino-Americanas, 2).

VALIUNAS, D.; JOMANTIENE, R.; IVANAUSKAS, A. First Report of a New Phytoplasma Subgroup, 16SrIII-T, Associated with Decline Disease Affecting Sweet and Sour Cherry Trees in Lithuania. **Plant Disease**, St. Paul, v. 93, n. 5, p. 550, 2009.

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

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

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

WHITCOMB, R.F.; YANG, I.L.; ZHU, B.M.; SEEMÜLLER, E. Plant diseases associated with micoplasmalike organisms. In: WHITCOMB, R.F.; TULLY, J.G. (Ed.). **The mycoplasmas**. New York: Academic Press, 1989. v. 5, p. 545-640.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A - Sequência parcial do gene 16S rDNA do fitoplasma associado superbrotamento da mandioca, presente na amostra CaWB-Br01 (Md1)= Piracicaba-SP

> CaWB-Br01

```
ACGTAAGCAACCTGCCCTTAAGACGAGGATAACAATTGGAAACAGTTGCTAAGACT
GGATAGGAAAAGTAAAGGCATCTTTACTTTTTTAAAGACCTTCTTTGGAGGTATGCTT
AAGGAGGGGGCTTGCGACACATTAGTTAGTTGGCAGGGTAAAGGCCTACCAAGACTA
TGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC
AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACC
GAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTACCTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTAAGGA
AGAAAAAAGAGTGGAAAACTCCCTTGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAA
TTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAAAGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGG
GCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTTAATAAGTCTATAGTTTAATTTCAGTGCTTAACG
CTGTTGTGCTATAGAACTGTTTTACTAGAGTGAGATAGAGGCAAGCGGAATTCCAT
GTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTTG
CTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCGGGTAAAACCGGTACTG
AAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAA
GGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACAC
GAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATTTTCTTGCGAAGTTATAGAAATATAATGGAGG
TTATCAGGAAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTAGG
TTAAGTCCTAAAACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCATGTAATGATGGGG
ACTTTAACGAGACTGCCAATGAAAAATTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCA
TCATGCCCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGTTGATACAAAGAGTAG
CTGAAACGCGAGTTCTTAGCCAATCTCACAAAATCAATCTCAGTTCGGATTGAAGTC
TGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGG
TGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCAAACCACGAAAGTTGGCAATA
CCCCAAAGCGGTGCGCTAACTTCGTAAGAAGAAGGATCCGTCTAAGGTAGGGTCGAT
AATTGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTC
CTTTCTAAGGAAACAATAAAATTATCATCTTCAGTTTTTGAAAGACTTAGAAAATTAA
TAAGTTTTTCTTTTTTAAGGCATTAAGGGCCTATAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGC
CTGATAAGCGTGAGGTGCGGTGGTTCAAGTCCATTTAGGCCACCAG
```

APÊNDICE B - Sequência parcial do gene 16S rDNA do fitoplasma associado superbrotamento da mandioca, presente na amostra CaWB-Br02 (BG13)= Bragança Paulista-SP

> CaWB-Br02

```
GAATTCAC TAGTGATTGAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAAAGTAAAGGCATC
TTTACTTTTTTAAAAGACCTTCTTTGAAGGTATGCTTAAGGAGGGGCTTGCACACAT
TAGTTAGTTGGCAGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAG
GTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATG
AAGTACCTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTAAGGAAGAAAAAAGAGTGGAAAAACTC
CCTTGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACATAAGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTT
TAATAAGTCTATAGTTTAATTTCACTGCTTAACGCTGTTGTGCTATAGAACTGTTTT
ACTAGAATGAGTTAGAGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAAT
ATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTTGCTGGGACTTTACTGACGCTGAGG
CACGAAAGCGTG GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTACTAAGTGTTCGGGTAAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCG
CCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACA
AGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTGA
CATTTTCTTGCGAAGTTATAGAAATATAATGGAGGTTATCAGGAAAACAGGTGGTGC
ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTAGGTAAAGTCCTAAAACGAGCGCAA
CCCTTGTCGTTAATTGCCAGCATGTAATGATGGGGACTTTAACGAGACTGCCAATGA
AAAATTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCATGTCCCTTATGATCTGGGCT
ACAAACGTGATACAATGGTTGATACAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTCTTAGCCA
ATCTCACAAAATCAATCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTT
GGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGT
ACACACCGCCCGTCAAATCGAATTCCCGCGGCCG
```