

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

**Caracterização molecular de um fitoplasma associado ao superbrotamento
do melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L) com base nas
sequências dos genes 16S rRNA e secY**

Elizeu Merizio Munhoz

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

**Piracicaba
2012**

Elizeu Merizio Munhoz
Engenheiro Agrônomo

Caracterização molecular de um fitoplasma associado ao superbrotamento do melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L) com base nas sequências dos genes 16S rRNA e secY

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

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

Piracicaba
2012

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

Munhoz, Elizeu Merizio

Caracterização molecular de um fitoplasma associado ao superbrotamento do melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L) com base nas sequências dos genes 16S rRNA e secY / Elizeu Merizio Munhoz. - - Piracicaba, 2012.
63 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Cucurbitaceae 2. Fitoplasma 3. Marcador molecular 4. Melão de São Caetano
5. Mollicutes I. Título

CDD 632.32
M966c

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

*A Deus e Nossa Senhora Aparecida por sempre estarem nos abençoando e protegendo,
Aos meus pais José Roberto e Estela Merizio, pelo amor, educação e incentivo,
A minha noiva Michelly Silva, por sempre estar ao meu lado nos momentos difíceis, amando,
respeitando e incentivando,
A minha vó Edith M. Merizio (in memorian), por ter sido sempre tão carinhosa e inteligente.*
DEDICO.

*“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama
amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver”.*

Dalai Lama

*A toda minha família em especial meus irmãos Rocco, Pablo e Kelli, meu cunhado Vander e
minha cunhada Simone, aos meus sobrinhos Maria Geovanna, Lucas Gabriel, João Ernesto,
Marcos Vinicius e Pedro Henrique pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis, **OFEREÇO.***

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora Aparecida pelas bênçãos concedidas a toda a minha família.

Aos meus pais José Munhoz e Estela Merizio por todo o amor, carinho, respeito e educação, **meus heróis!**

A minha noiva Michelly Silva por todo o apoio na realização desse trabalho, sempre ao meu lado, amando, respeitando e dando força para nunca desistir dos nossos sonhos, **amo você!**

A toda a minha família em especial aos meus irmãos Rocco, Pablo e Kelli, aos meus cunhados Vander e Simone, pelo apoio, incentivo e carinho.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em especial ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade da realização do mestrado.

Ao Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo pela orientação, ensinamentos, humildade, paciência e por ter sido tão receptivo quando cheguei a Piracicaba fazendo toda a diferença.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela amizade e ensinamentos, em especial ao Prof. Dr. Nelson Massola, Prof. Dr. Jorge Rezende, Prof. Dr. Francisco Tanaka, Renato Salaroli, José Edivaldo e Fabiana Wolak, por sempre estarem dispostos a ajudar.

As pessoas que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho; Daniela Flôres, Thays Benites, Rafaela Roma, Patricia Kreycki, Ana Paula, Laura Garita em especial Evandro Ganem e Pedro Floresta, pela amizade, companheirismo e apoio.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando C. Ribeiro por me incentivar a fazer o mestrado.

A todos os alunos do programa, em especial o Pedro Javier pelo apoio quando cheguei a Piracicaba, tenho certeza que levarei grandes amizades.

Aos meus amigos de Alta Floresta por sempre estarem torcerem por mim, em especial ao Tonicão, Margot, Martin, Dudu e Chico pela amizade verdadeira.

Aos amigos que fiz no Cena, em especial aos guerreiros do CENA FC, Baiano, Evandro, Robinho, Geraldo, Baxote, Outro, Marcandalli, Gaúcho, Marcão, Flavio, Bob, Hugão, Pavinato, Roger, Gabriel, Renato, Jordão, Thiago, Pedro Floresta pelos anos que jogamos juntos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida nesses anos de mestrado.

MUITO OBRIGADO

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 DESENVOLVIMENTO.....	21
2.1 Revisão Bibliográfica	21
2.1.1 Fitoplasmas.....	21
2.1.1.1 Detecção e classificação	22
2.1.2 Melão-de-São-Caetano	24
2.1.2.1 Doenças em melão-de-São-Caetano.....	26
2.2 Material e Métodos	27
2.2.1 Amostras de plantas.....	27
2.2.2 Extração de DNA total	28
2.2.3 PCR para detecção de fitoplasma	29
2.2.4 Identificação de fitoplasmas por PCR	30
2.2.5 Sequenciamento da região dos genes 16S rRNA e <i>secY</i> e análise das sequências.....	31
2.2.6 Análise de RFLP <i>in silico</i>	31
2.2.7 Detecção por microscopia eletrônica de transmissão	31
2.2.8 Análise filogenética	32
2.2.9 Fitoplasmas que foram utilizados neste trabalho.....	32
2.3 Resultados e Discussão.....	33
2.3.1 Detecção de fitoplasmas por PCR	33
2.3.2 Identificação do fitoplasma por PCR	36
2.3.3 Detecção por microscopia eletrônica.....	38
2.3.4 Análise das sequências nucleotídicas	39
2.3.4.1 Análise das sequências do gene 16S rRNA.....	39
2.3.4.2 Análise de RFLP <i>in silico</i> das sequências do gene <i>secY</i>	40
2.3.4.2 Análise filogenética	47
3 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICES	61

RESUMO

Caracterização molecular de um fitoplasma associado ao superbrotamento do melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L) com base nas sequências dos genes 16S rRNA e *secY*

O melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L) é uma cucurbitácea que ocorre em todas as regiões geográficas brasileiras. A espécie apresenta duas “variedades” distintas, comumente conhecidas por “variedade silvestre” e “variedade cultivada”, esta última caracterizada por plantas de maior tamanho. Plantas da “variedade selvagem” são hospedeiras de um fitoplasma do grupo 16SrIII-J, que causa superbrotamento de ramos, nanismo generalizado, clorose, redução no tamanho de folhas e frutos. No entanto, não há informação da “variedade cultivada” ser hospedeira de fitoplasmas. Assim, no presente estudo, plantas sintomáticas desta “variedade” foram analisadas quanto à presença de fitoplasmas em seus tecidos, visando associar este tipo de patógeno à doença. Neste mesmo trabalho, os isolados do fitoplasma encontrados nas plantas sintomáticas da “variedade cultivada” foram molecularmente analisados em relação ao gene *secY*, atualmente usado como um marcador que permite identificar variações genéticas sutis. Buscou-se, com isto, identificar possíveis variantes entre os isolados. Amplificações de fragmentos de DNA a partir dos genes 16S rRNA (1,2Kb) e *secY* (1,6Kb) demonstraram a associação de fitoplasma do grupo 16SrIII com as plantas sintomáticas de melão-de-São-Caetano da “variedade cultivada”. Nestas plantas, corpúsculos pleomórficos, típicos de fitoplasmas, foram visualizados no floema dos tecidos doentes, confirmando os resultados dos testes moleculares. Análises de RFLP virtual, conduzidas com o fragmento genômico correspondente ao gene *secY* e diversas enzimas de restrição, permitiram identificar o referido fitoplasma como pertencente ao subgrupo 16SrIII-J. A análise filogenética evidenciou que o fitoplasma padrão do subgrupo 16SrIII-J emergiu do mesmo ramo que o fitoplasma identificado no melão-de-São-Caetano, confirmando que ambos estão estritamente relacionados. O emprego do gene *secY* como marcador para diferenciação fina entre fitoplasmas não apontou variabilidade genética entre os isolados do fitoplasma detectado tanto nas plantas da “variedade cultivada” como naquelas pertencentes à “variedade selvagem”. Como conclusão, a “variedade cultivada” de *M. charantia* é hospedeira do mesmo fitoplasma encontrado na “variedade selvagem”, o qual é afiliado ao subgrupo 16SrIII-J; por sua vez, o gene *seY* não distinguiu geneticamente os isolados do fitoplasma pertencente ao subgrupo 16SrIII-J, presentes nas plantas de melão-de-São-Caetano.

Palavras-chave: Mollicutes; Amarelos; Cucurbitaceae; RFLP virtual

ABSTRACT

Molecular characterization of a phytoplasma associated with *Momordica charantia* witches'-broom based on the sequences of the genes 16S rRNA and *secY*

Momordica charantia is a species of the family Cucurbitaceae that occurs in all Brazilian geographic regions. This species presents two distinct “varieties”, commonly called “wild variety” and “cultivated variety”, whose plants are bigger than those belonging to the “wild variety”. Plants of the “wild variety” are hosts of a phytoplasma of the group 16SrIII-J, which is associated with shoot proliferation, stunting, chlorosis, and small leaves and fruits. However, there is no information about the occurrence of phytoplasmas in plants of the “cultivated variety”. Thus, in the present study, symptomatic plants belonging to this “variety” were analysed in order to associate phytoplasmas with the disease. In addition, strains of the phytoplasma found in symptomatic plants of the “cultivated variety” were molecularly analyzed in relation to the gene *secY*, which is currently used as a marker for identification fine of genetic diversity, aiming provide elements for construction of new schemes for classification of phytoplasmas. The objective was to identify distinct strains among the strains present in plants of the wild and cultivated varieties. Amplifications of DNA fragments from the genes 16Sr rRNA (1.2Kb) and *secY* (1.6Kb) demonstrated the association of a phytoplasma of group 16SrIII with the symptomatic plants belonging to “cultivated variety”. These plants revealed the presence of pleomorphic bodies, typical of phytoplasmas, which was visualized in the phloem vessel from diseased tissues, confirming the results obtained by molecular assays. Virtual RFLP analysis, performed with the genomic fragment corresponding to the gene *secY* and various restriction enzymes, allowed to identify this phytoplasma as a member of the subgroup 16SrIII-J. Phylogenetic analysis revealed that the phytoplasma used as reference for 16SrIII-J subgroup and the phytoplasma identified in plants of *M. charantia* emerged from the same branch, confirming that both phytoplasmas are closely related. The gene *secY*, used as marker for fine differentiation of phythoplasmas, did not show genetic variability among the strains of the phytoplasma detected both plants belonging to “cultivated variety” and “wild variety”. In conclusion, plants of the “cultivated variety” are hosts of the same phytoplasma found in the “wild variety, which is affiliated with the 16SrIII-J subgroup; in addition, the gene *secY* did not distinguish isolates of the phytoplasma belonging to 16SrIII-J subgroup, present in plants of *M. charantia*.

Keywords: Mollicutes; Yellows, Cucurbitaceae; Virtual RFLP

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Comparativo das duas variedades de melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L). MS= variedade silvestre; MC= variedade cultivada..... 26
- Figura 2 – Sintomas em plantas de melão-de-São-Caetano. Letras: A= má formação dos frutos; B= redução do limbo foliar e nanismo (planta da direita); planta assintomática (à esquerda); C= enrugamento da lâmina foliar e D= clorose..... 28
- Figura 3 – Detecção de fitoplasmas em amostras de plantas de melão-de-São-Caetano por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 Kb, em reações de duplo PCR conduzidas com os iniciadores P1/ P7 e R16F2n/R2. M = Marcador (1 Kb Ladder); P1 a P5= amostras de DNA extraído de plantas de melão-de-São-Caetano do tipo silvestre; P6 a P12= amostras de DNA extraído de plantas de melão-de-São-Caetano do tipo cultivado; C+= padrão positivo da reação (vinca); C-= padrão negativo (mix da reação+ água)..... 35
- Figura 4 – Detecção de fitoplasmas em amostras de plantas de melão-de-São-Caetano por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,6 Kb, em reações de duplo PCR conduzidas com os iniciadores L15-F1A(III)/Map-R1A(III), e SecY-F1(III)/SecY-R1(III). M = Marcador (1 Kb Ladder); P1 a P5= amostras de DNA extraído de plantas de melão-de-São-Caetano do tipo silvestre. P6 a P12= amostras de DNA extraído de plantas de melão-de-São-Caetano do tipo cultivado. C+= padrão positivo da reação (chuchu); C-= padrão negativo (mix da reação+água)..... 35
- Figura 5 – Identificação de fitoplasmas em amostras de plantas de melão-de-São-Caetano por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 0,8 Kb, em reações de duplo PCR conduzidas com os *primers* P1/P7 e R16(III)F2/ R16(III)R1. M = Marcador (1 Kb Ladder); P1 a P5= amostras de DNA extraído de plantas de melão-de-São-Caetano do tipo silvestre. P6 a P12= amostras de DNA extraído de plantas de melão-de-São-Caetano do tipo cultivado. C+= padrão positivo da reação (chuchu); C-= padrão negativo (mix da reação+água).. 37
- Figura 6 – Identificação de fitoplasmas em amostras de plantas de melão-de-São-Caetano por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,1Kb, em reações de duplo PCR conduzidas com os *primers* P1/P7 e R16(I)F1/R16(I)R1. M = Marcador (1 Kb Ladder); P1 a P5= amostras de DNA extraído de plantas de melão-de-São-Caetano do tipo silvestre. P6 a P12= amostras de DNA extraído de plantas de

melão-de-São-Caetano do tipo cultivado. C+= padrão positivo da reação (milho);
C-= padrão negativo (mix da reação+água)..... 38

Figura 7 – Corpúsculos pleomórficos, observados ao microscópio eletrônico de transmissão, presentes no lúmen de elemento de floema de planta sintomática de melão-de-São-Caetano .. 39

Figura 8 – Padrões de restrição de RFLP gerados pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região do gene *secY* de fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII. Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*, *Tsp509I*. M=marcador ϕ X174-DNA *HaeIII* digest. Fitoplasmas: CX (16SrIII-A), CYE (16SrIII-B), PTB (16SrIII-C), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F),
WWB (16SrIII-G), JR1Ph (PoiBI)..... 42

Figura 9 – Padrões de restrição de RFLP gerados pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região do gene *secY* de fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII e do fitoplasma encontrado nas plantas de melão-de-São-Caetano. Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*, *Tsp509I*. M=marcador ϕ X174-DNA *HaeIII* digest. Fitoplasmas: MWB (16SrIII-J), MT117 (16SrIII-M), AKpot6 (16SrIII-N), ChWB (16SrIII-J)..... 43

Figura 10 – Mapas putativos de sítios de restrição envolvendo a região do gene *secY* de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII. Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*, *Tsp509I*. Fitoplasmas: CX (16SrIII-A), CYE (16SrIII-B), PTB (16SrIII-C),
GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E)..... 44

Figura 11 – Mapas putativos de sítios de restrição envolvendo a região do gene *secY* de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII e do fitoplasma identificado em plantas de melão-de-São-Caetano. Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*, *Tsp509I*. Fitoplasmas: MW1 (16SrIII-F), WWB (16SrIII-G), JR1Ph (PoiBI) (16SrIII-H),
MWB (16SrIII-J), MT117 (16SrIII-M)..... 45

Figura 12 – Mapas putativos de sítios de restrição envolvendo a região do gene *secY* de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII. Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*, *Tsp509I*. Fitoplasmas: AKpot6 (16SrIII-N), ChWB (16SrIII-J)..... 46

Figura 13 – Árvore filogenética construída a partir de sequências do gene *secY* encontrado em fitoplasmas afiliados a alguns subgrupos do grupo 16SrIII, fitoplasma identificado em melão-de-São-Caetano (MWB) e os procariotos *Acholeplasma laidlawi* e *Acholeplasma palmae*. Os números nos ramos indicam os valores de confiança baseados no “Bootstrapping”. (*) As sequências foram determinadas neste trabalho, porém não foram depositadas no GenBank. Estas sequências estão apresentadas no apêndice localizado no final do texto da dissertação.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Plantas hospedeiras de fitoplasma do grupo 16SrIII subgrupo J, no Brasil.....	27
Tabela 2 – Sequências de nucleotídeos correspondentes ao gene <i>secY</i> de fitoplasmas utilizados para a construção da árvore filogenética, seus respectivos grupos e subgrupos, com números de acesso ao Genbank.	33
Tabela 3 – Detecção de fitoplasmas em plantas de melão-de-São-Caetano utilizadas no presente estudo, por meio de duplo PCR conduzido com os iniciadores específicos da região 16S rDNA e <i>secY</i>	34
Tabela 4 – Coeficientes de similaridade (F) calculados entre pares de fitoplasmas representantes de diversos subgrupos do grupo 16SrIII e o fitoplasma identificado em plantas de melão-de-São-Caetano (MWB).	46
Tabela 5 – Tipos de padrões de restrição gerados por 10 das 18 enzimas usadas na digestão <i>in silico</i> do gene <i>secY</i> , amplificado a partir de fitoplasmas pertencentes a diversos subgrupos do grupo 16SrIII, incluindo o fitoplasma presente em melão-de-São-Caetano.	47

1 INTRODUÇÃO

O melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L) é uma planta originária da Ásia, pertencente à família Cucurbitacea. Esta espécie é bem adaptada às condições de clima tropical e ocorre, de forma generalizada, em todas as regiões brasileiras. Apresenta hábito trepador, se desenvolvendo sobre outras plantas ou em cercas e muros, tanto em áreas de campos como urbanas. *M. charantia* se apresenta sob duas formas ou tipo, uma delas considerada como “variedade silvestre” ou “tipo silvestre” e a outra comumente referida como “variedade cultivada” ou “tipo cultivado”. No Brasil, não se encontra referência desta espécie ser utilizada comercialmente, no entanto, às vezes, a “variedade cultivada” pode ser encontrada em mercados e feiras, como atrativo de fruto exótico. Contrariamente, em alguns países a espécie é cultivada em larga escala tanto para uso medicinal como culinário. A chamada “variedade silvestre” é considerada como planta daninha na cultura de cana de açúcar, por competir eficientemente pela água, nutrientes e espaço físico.

Além do papel como espécie daninha em algumas culturas, o melão-de-São-Caetano tem sido relatado como hospedeiro de vírus e fitoplasmas. No Brasil, experimentalmente, dois potyvirus, agentes de doenças em plantas de mamão, abobrinha e melancia, se estabeleceram em plantas da “variedade cultivada”, porém não infectaram plantas da “variedade silvestre”. Este é um fato interessante, pois plantas de mesma espécie expressaram reações diferentes ao mesmo patógeno. Fitoplasma também foi encontrado, naturalmente, em associação com plantas da “variedade silvestre”, no entanto, não se tem informações da ocorrência de fitoplasmas na “variedade cultivada”. A caracterização molecular deste fitoplasma permitiu sua classificação como sendo pertencente ao grupo 16SrIII, subgrupo J, o qual também já foi identificado em plantas de interesse econômico, como chuchu, couve-flor e tomate, entre outras.

Fitoplasmas são procariotos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por cigarrinhas. Sua classificação tem sido fundamentada, principalmente, na diversidade de sequências nucleotídicas do gene 16S rRNA. Com base neste critério, os fitoplasmas têm sido classificados no sistema de grupos e subgrupos, utilizando-se a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP). As análises de RFLP convencional ou, mais modernamente, as análises de RFLP virtual destas sequências permitem a distinção destes procariotos e sua alocação nos diferentes grupos e subgrupos. No entanto, devido à natureza altamente conservada deste gene, dificuldades são encontradas para separar alguns fitoplasmas, sobretudo ao nível de subgrupos. Assim, outros genes têm sido explorados para

esta finalidade, entre eles o gene *secY*. Estudos têm mostrado que este gene é um marcador promissor que permite uma diferenciação genética mais fina entre os fitoplasmas, distinguindo variantes que não são normalmente delineados com base na análise do gene 16S rRNA.

Considerando-se que a “variedade silvestre” e a “variedade cultivada” reagiram de forma diferenciada em relação aos potyvirus e que poderiam diferir também em relação ao fitoplasma e que um fitoplasma do grupo 16SrIII-J infecta plantas da “variedade silvestre”, porém não se sabe se o mesmo infecta a “variedade cultivada”, um dos objetivos deste estudo foi investigar a ocorrência de fitoplasmas em plantas desta última “variedade” que exibiam sintomas tipicamente induzidos por este tipo de patógeno. Ainda, desde que este estudo mostrou, em sua primeira etapa, que somente um fitoplasma do subgrupo 16SrIII-J estava presente tanto em plantas da “variedade silvestre” como naquelas da “variedade cultivada”, o segundo objetivo foi determinar uma possível diversidade genética entre os isolados (“strains”) deste fitoplasma, através de análises de RFLP virtual, tomando-se por base as sequências nucleotídicas do gene *secY*.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Fitoplasmas

Fitoplasmas são bactérias fitopatogênicas, nas quais a parede celular está ausente, sendo o protoplasma envolvido por uma única membrana, resultando em pleomorfismo da célula (BERTACCINI, 2007; WEISBURG et al., 1989). As dimensões celulares são variáveis de 200 a 800 nm, bem menores do que aquelas encontradas nas eubactérias envolvidas com diversas doenças de plantas. São procariotos pertencentes à classe Mollicutes, habitantes de floema em plantas e de diversos órgãos e hemolinfa de insetos e estão associados a centenas de doenças ocorrentes nas mais diversas regiões do mundo. A transmissão de fitoplasmas em condições naturais é realizada principalmente por cigarrinhas pertencentes às famílias Cacadellidea e Fulgoridea, que adquirem o fitoplasma ao se alimentarem no floema de plantas infectadas. Uma vez no interior do inseto, o patógeno se multiplica e atinge as glândulas salivares, podendo ser introduzido no floema de plantas saudáveis, quando o inseto delas se alimentar. Ressalta-se que os fitoplasmas podem ser transmitidos durante toda a vida do vetor, mantendo com o mesmo uma relação do tipo circulativa-propagativa (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006).

A primeira doença associada aos fitoplasmas foi relatada em 1902, em plantas de rainha margarida (*Callistephus chinensis* Nees). Naquela época, a doença foi denominada de “amarelo” (“Aster yellow”), sendo referida por Erwin Smith, um dos pioneiros da Fitopatologia, como sendo uma das doenças mais obscuras e peculiares (HEWITT, 1987), devido aos seus sintomas e à dificuldade de se esclarecer a sua etiologia. Outras doenças apresentando características semelhantes foram relatadas a partir de então e, por falta de conhecimento, foram atribuídas aos vírus, embora as evidências não fossem suportadas pelas pesquisas posteriores. (LEE I-M, DAVIS RE, 1992). O agente causal dos “amarelos” somente foi descoberto em 1967, por um grupo de cientistas japoneses, que observaram, com o auxílio de microscópio eletrônico, a presença de corpúsculos pleomórficos em tecidos de plantas doentes e sua ausência em plantas saudáveis (DOI et al., 1967). Por serem similares aos micoplasmas, conhecidos como patógenos de animais, estes microrganismos foram identificados como MLOs (“Mycoplasma Like-Organisms”). No Brasil, em 1968, foi feito um dos primeiros relatos de uma doença associada aos fitoplasmas, a qual foi denominada de cálice gigante, sendo seu agente detectado nas plantas de tomateiro infectadas através do

emprego de microscopia eletrônica de transmissão (KITAJIMA; COSTA, 1968). O termo trivial fitoplasmas foi proposto por pesquisadores que trabalhavam com Mollicutes e passou a ser adotado a partir de 1994 para designar estes patógenos vegetais (SEARS & KIRKPATRICK, 1994).

Os sintomas induzidos por fitoplasmas nas plantas são bastante diversos, podendo ocorrer isoladamente ou em conjunto. O mecanismo de patogenicidade está relacionado com desequilíbrios hormonais provocados pelo patógeno (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000) e entre os sintomas que ocorrem com maior frequência destacam-se a clorose em folhas, o superbrotamento de ramos, o enfezamento generalizado da planta (nanismo), a má formação dos frutos, a virescência (presença de clorofila em órgãos florais), a esterilidade de flores, a filodia (conversão de órgãos florais em folhas), o avermelhamento foliar, a necrose de vasos e o declínio de plantas (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000; HOGENHOUT et al., 2008). A intensidade desses sintomas depende de fatores como a suscetibilidade da espécie vegetal, o estágio fenológico da planta, a agressividade do patógeno e as condições favoráveis do ambiente (DAVIS, 1995; BEDENDO, 2011).

No Brasil, os fitoplasmas estão associados a diversas doenças presentes tanto em plantas cultivadas como hortaliças, cereais, ornamentais e frutíferas, como em espécies daninhas e silvestres. Dentre as doenças associadas aos fitoplasmas, se destacam pela sua importância econômica o enfezamento vermelho do milho (BEDENDO et al., 1998); enfezamento do repolho (AMARAL MELO, 2007); superbrotamento do maracujazeiro (RIBEIRO; BEDENDO, 2008); enfezamento da couve-flor (RAPUSSI; BEDENDO, 2008); uma doença encontrada em plantas de citros com sintomas de HLB (TEIXEIRA et al., 2008); a síndrome do amarelecimento foliar da cana de açúcar (SILVA et al., 2009); e o superbrotamento da mandioca (FLÔRES, 2009).

O controle das doenças associadas aos fitoplasmas é feito através de medidas como o uso de material vegetal livre do patógeno, eliminação de plantas doentes (“roguing”) e plantio de variedades resistentes. O tratamento químico com o uso de antibióticos não é recomendado na maioria dos casos, por ser inviável economicamente e apresentar risco à saúde humana (GARCIA-CHAPA et al., 2003). O controle químico, por sua vez, somente é preconizado para controlar os insetos vetores destes procariotos (WEINTRAUB, 2007).

2.1.1.1 Detecção e classificação

Uma das barreiras encontradas para o estudo dos fitoplasmas está relacionada com o fato dos mesmos não serem ainda cultiváveis em meio de cultura. Durante sua evolução, estes

procariotos perderam muitas rotas metabólicas, como aquelas responsáveis pela síntese de ATP, aminoácidos e até nucleotídeos, os quais passaram a ser obtidos diretamente dos seus hospedeiros (BAI et al., 2006; OSHIMA et al., 2004). Como consequência, há impossibilidade de se determinar as suas características fenotípicas e bioquímicas ou fisiológicas, características estas exigidas para classificação de microrganismos dentro do sistema binomial latino; por esta razão não são classificados taxonomicamente ao nível de gênero e espécie. Ainda, o seu não cultivo em laboratório cria dificuldades para a detecção destes patógenos em tecidos de plantas doentes, através do método de isolamento para obtenção de colônias puras (PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2002).

A metodologia usada inicialmente para associar os fitoplasmas às doenças tomava por base os sintomas exibidos pela planta hospedeira e a visualização dos típicos corpúsculos pleomórficos no floema de tecidos doentes, com o auxílio da microscopia eletrônica. O sistema utilizado para classificar os fitoplasmas considerava os diversos tipos de sintomas presentes na planta doente, a gama de espécies hospedeiras e a relação do patógeno com os insetos vetores; no entanto, esta metodologia se mostrava pouco eficiente, além disto, era muito trabalhosa, demandava muito tempo e as informações sobre os insetos vetores eram insuficientes (CHIYOKOWSKI, 1989; LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000).

Com o advento das técnicas moleculares foi possível realizar o sequenciamento de uma região altamente conservada dos fitoplasmas, aquela correspondente ao gene 16S rRNA. As sequências de nucleotídeos deste gene, apesar de bastante conservadas, têm sido adotadas para estudos da variabilidade genética em procariotos. Estudos relacionados às sequências de bases da região do 16S rRNA, confirmaram a alocação dos fitoplasmas dentro da classe Mollicutes e levaram ao reconhecimento de um clado monofilético distinto dentro da classe, a qual também abriga os micoplasmas encontrados em animais (VANDAMME et al., 1996; GUNDERSEN et al., 1994). Entre as técnicas moleculares mais comumente utilizadas destacam-se: PCR (Polymerase Chain Reaction), que amplifica determinados fragmentos genômicos e possibilita a detecção de fitoplasmas em plantas suspeitas de infecção e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), na qual enzimas geram padrões de restrição a partir dos fragmentos genômicos amplificados em PCR, possibilitando a identificação molecular dos fitoplasmas, o que serve de base para a classificação dos mesmos em grupos e subgrupos (HARRISON et al., 1996; LEE et al., 1998). Estas técnicas permitem distinguir 19 grupos distintos e mais de 40 subgrupos (LEE et al., 1998). Recentemente, essa técnica convencional de RFLP está sendo substituída, com vantagens, pela análise simulada em computador, denominada RFLP virtual, na qual é feita a digestão *in silico* a partir do

sequenciamento da região 16S rDNA “F2n/R2”. Este novo esquema possibilitou novas interpretações, resultando no surgimento de novos grupos e subgrupos, tanto que no atual sistema, os fitoplasmas são classificados em 31 grupos e mais de 100 subgrupos (WEI et al., 2007, 2008).

O desenvolvimento desta área de conhecimento mostrou que a diversidade de fitoplasmas avaliada em relação ao gene 16S rRNA não permitia estabelecer distinções mais acuradas à medida em que novas descobertas possibilitaram aumentar o número de fitoplasmas conhecidos. A diferenciação molecular passou a ficar mais difícil pelo fato das sequências da região do gene 16S rRNA serem muito semelhantes entre os fitoplasmas. Assim, tornou-se necessária a utilização de outras ferramentas para distinções mais refinadas (MARCONE et al., 2000; LEE et al., 2004, 2006, 2010). A solução encontrada foi a adoção de novos marcadores moleculares, incluindo aqueles baseados nas proteínas ribossomais (RP), sequências de genes TUF, *vmp1* e *secY*, os quais estão sendo usados isoladamente ou em conjunto com algum para esta finalidade (LEE et al., 2006; ARNAUD et al., 2007;. MARTINI et al., 2007;. FIALOV'A et al., 2009;. PACIFICO et al., 2009;. MUROLO et al., 2010).

O gene *secY* é responsável por codificar uma proteína que está envolvida com o mecanismo de secreção de proteínas nas bactérias, em conjunto com o gene *secA* e outros genes. Foi inicialmente identificado nos fitoplasmas através da clonagem aleatória de um fragmento do DNA, usado originalmente como sonda de hibridização para detecção do fitoplasma da flavescência dourada da videira (DAIRE et al., 1997). É considerado como um dos marcadores mais eficientes para a diferenciação e classificação refinada de fitoplasmas, devido a sua maior variabilidade genética em relação a outros marcadores. Ainda, tem sido usado, especialmente, para detectar distinções entre estirpes dentro de um mesmo grupo classificado com base no 16S rDNA (HODGETTS et al., 2008;. LEE et al., 2006a; MARTINI et al., 2007).

2.1.2 Melão-de-São-Caetano

O melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L) pertence à família Cucurbitaceae e tem sua origem na Ásia, sendo amplamente distribuído em diferentes partes do mundo, adaptado principalmente às regiões de clima tropical e subtropical (YAMAGUCHI, 1983). Curiosamente, o termo “momordica” é originário do latim e significa “mordida”, referindo-se à conformação dos bordos das folhas. Em algumas regiões do Brasil recebe outros nomes populares como erva-de-lavadeira, erva-de-São-Vicente, fruta da cobra e melãozinho. O nome

melão-de-São-Caetano se refere ao santo São Caetano, padroeiro de uma capela existente no município de Mariana (MG), onde os escravos das minas de ouro cultivavam essa planta ao redor do prédio (SOUZA, 2001). É uma espécie vegetal silvestre encontrada facilmente em cercas, muros e sobre outras plantas, tanto em áreas urbanas como rurais, ocorrendo em vários tipos de solo e diversos tipos de clima (RIBEIRO, 2004, GIRON et al., 1991; LANS; BROWN, 1998).

No Brasil, são reconhecidas duas variedades ou tipos, em função do tamanho das plantas, das folhas, dos frutos e das suas sementes (figura 1). Uma delas, denominada de “variedade cultivada” ou “tipo cultivado”, apresenta frutos com cerca de 10-30 cm de comprimento, às vezes comercializada em mercados e feiras como fruta exótica. A outra variedade chamada de “silvestre” ou “tipo silvestre” produz frutos menores com tamanho aproximado de 5-10 cm, sementes pequenas, além de folhas de tamanho reduzido (ZHAO, 2005). Em diversos países, esta espécie é principalmente usada para fins medicinais, como na China, Colômbia, Cuba, Gana, Haiti, Índia, México, Malásia, Nova Zelândia, Nicarágua, Panamá e Peru (GROVER, 2004; GÜRBÜZ et al., 2000). Centenas de pesquisas científicas têm revelado suas propriedades curativas, entre elas, atividade antibacteriana, antiulcerogênica, antiinflamatória, antilipidêmica, hipoglicemiante, antihipertensiva, anticancerígena, abortiva, larvicida, antilipidêmica e imunossupressora (SENER, 1998; MIURA, 2001; ISMAIL, 1999).

A cultura tem capacidade de se desenvolver bem em vários tipos de solo (CANTWELL et al., 1996; REYES et al., 1994) sendo resistente a amplitudes térmicas (DESAI; MUSMADE, 1998), o que a torna uma das principais plantas infestantes na cultura da cana-de-açúcar, por competir por água, nutrientes e espaço físico, acarretando prejuízos consideráveis na cultura, sendo de difícil controle químico (OLIVEIRA; FREITAS, 2008)



Figura 1- Comparativo das duas variedades de melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.). MS= variedade silvestre; MC= variedade cultivada. (Foto gentilmente cedida por José Edivaldo Buriola)

2.1.2.1 Doenças em melão-de-São-Caetano

Em relação a esta espécie, poucos estudos têm sido desenvolvidos com relação à suscetibilidade da cultura a determinados patógenos, mesmo nos países em que a planta é explorada comercialmente. Algumas pesquisas mencionam o melão-de-São-Caetano como hospedeiro alternativo de alguns vírus que afetam plantas de interesse econômico. Neste caso, as plantas portadoras de vírus poderiam atuar como fontes de inóculo e possíveis vetores poderiam transmitir o patógeno para a cultura principal. Existem relatos da suscetibilidade desta espécie a alguns vírus de reconhecida importância como agentes de doença, como, por exemplo, o “Melon yellow spot vírus” (MYSV) (SHIGE HARU et al., 2009), o “Papaya ringspot vírus” (PRSV) (CHIN; AHMAD, 2007), o “Squash vein yellowing vírus” (SqVYV) (ADKINS et al., 2008), “Watermelon bud necrosis virus” (WBNV) (KUNKALIKAR et al., 2011).

Considerando os fitoplasmas, estudos revelaram a associação de um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrIII-J com plantas de melão-de-São-Caetano que apresentavam uma doença denominada de superbrotamento (MONTANO et al., 2000). Inicialmente relatada no estado do Rio de Janeiro, a doença foi atribuída a um fitoplasma que também estava associado ao superbrotamento do chuchuzeiro. O fitoplasma presente em plantas de melão-de-São-Caetano foi referido como Chayote witches’-broom phytoplasma [ChWbIII(Mor)]

(MONTANO et al., 2000). Como a doença não recebeu nome específico, ela será aqui considerada como superbrotamento do melão-de-São-Caetano e passará a ser referida no restante do texto como *Momordica witches'-broom* (MWB). Esta doença foi encontrada em plantas de melão-de-São-Caetano localizadas em áreas cultivadas com chuchu, no estado do Rio de Janeiro (MONTANO et al., 2000) e em áreas de pastagens e vegetação espontânea, no estado de São Paulo (RIBEIRO et al., 2004). Este fitoplasma afiliado ao grupo 16SrIII subgrupo J tem sido identificado em alguns países da América do Sul, demonstrando, até o presente, que o mesmo parece estar limitado a esta região geográfica. No Brasil, além do melão-de-São-Caetano, esse fitoplasma também tem sido encontrado em associação com diversas doenças que afetam distintas espécies botânicas, como ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Plantas hospedeiras de fitoplasma do grupo 16SrIII subgrupo J, no Brasil

Família	Espécie	Referência
Amaranthaceae,	Celosia spicata Celosia argentea	Eckstein, 2008
Ampelidaceae	Vitis vinifera	Neroni, 2009
Brassicaceae	B. oleraceae var. botrytis	Rapussi-da-Silva, 2010
Cucurbitaceae	Sechium edule Momordica charantia Cucurbita moschata	Montano et al., 2000, 2006
Solanaceae	Nicandra physalodes	Eckstein, 2010

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Amostras de plantas

Plantas de melão-de-São-Caetano que apresentavam sintomas de nanismo, superbrotamento de ramos, má formação dos frutos, redução do limbo foliar, clorose e enrugamento da lâmina foliar e (figura 2), sendo esses sintomas característicos de infecção causada por fitoplasmas, foram amostradas no campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Esalq/USP. Estas plantas foram infectadas em condições naturais, sendo coletadas amostras de 12 plantas, 5 delas da “variedade silvestre” e 7 da “variedade cultivada”. Cada amostra foi composta por secções de caules, pecíolos e folhas.



Figura 2 - Sintomas em plantas de melão-de-São-Caetano. Letras: A= má formação dos frutos; B= redução do limbo foliar e nanismo (planta da direita); planta assintomática (à esquerda); C= enrugamento da lâmina foliar e D= clorose

2.2.2 Extração de DNA total

Foi realizada a extração de DNA total de cada amostra, com a utilização do “kit” comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), segundo recomendação do fabricante. Dois gramas de material vegetal foram macerados em nitrogênio líquido, em almofariz de porcelana. Uma fração da amostra macerada foi transferida para microtubos de 1,5 mL, sendo adicionados 400 μ L do tampão AP1 e 4 μ L de RNase. Os tubos foram mantidos em “banho-maria” à 65°C por 10 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 130 μ L do tampão AP2 e, em seguida, os tubos foram mantidos a - 20°C por, 5 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado a 13.000 rpm, por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para uma coluna montada sobre um tubo coletor e centrifugado por 5 minutos a 13.000 rpm. O filtrado foi recolhido e transferido para um novo tubo, no qual foram adicionados 675 μ L do tampão AP3. Desta solução, foram transferidos 650 μ L para nova coluna. O material foi centrifugado por 1 minuto a 8.000 rpm e o filtrado foi descartado. A coluna contendo o DNA foi transferida para um novo tubo. Um volume de 500 μ L do tampão AW foi adicionado ao centro da coluna, com posterior centrifugação por 2 minutos a 13.000 rpm, para lavagem do DNA. Finalmente, foram adicionados 100 μ L de tampão AE no centro da coluna para

promover a eluição do DNA, seguido de centrifugação por 1 minuto a 8.000 rpm. O DNA extraído foi armazenado a - 20°C.

2.2.3 PCR para detecção de fitoplasma

Para a detecção de fitoplasmas, foram utilizados oligonucleotídeos ou iniciadores (“primers”) universais, cujas sequências foram delineadas a partir de dois genes presentes em fitoplasmas, identificados por 16S rRNA e *secY*. As reações foram conduzidas usando-se duplo PCR, com o DNA total extraído de cada amostra diluído em água milli-Q na proporção de 1:5. O volume final de cada reação foi de 25,0 µL, de acordo com a metodologia proposta por Lee et al. (1993), nas proporções de: 19,0 µL de água deionizada-destilada; 0,5 µL de cada nucleotídeo - solução 20 pmol/µL- (dCTP, dATP, dGTP, dTTP); 2,5 µL de tampão PCR; 0,15 µL de Amplitaq 5U/µL (Invitrogen); 1,0 µL de DNA extraído da planta (25n/µL).

Os oligonucleotídeos universais utilizados para a detecção de fitoplasmas com base no gene 16S rDNA, foram P1/ P7 (SMART et al., 1996; DENG; HIRUKI, 1991), para a primeira reação e o par R16F2n/R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996) para a segunda reação. Para a detecção de fitoplasmas com base no gene *secY*, foram utilizados para a primeira reação, o par de oligonucleotídeos L15-F1A(III)/Map-R1A(III) e os pares SecY-F1(III)/SecY-R1(III) para a segunda reação (SUH et al., 1996; LEE et al., 2010). Os produtos gerados na primeira reação foram diluídos em água Milli-Q autoclavada na proporção de 1:30 para servir de modelo para a segunda reação. Um termociclador automático foi utilizado para processar as amostras. Para os iniciadores R16 P1/ R16 P7 e R16F2n/R2, a programação utilizada foi de 35 ciclos, sendo que cada ciclo compreendeu uma etapa de desnaturação do ácido nucléico a 94°C por 1 minuto, 2 minutos a 50°C para o anelamento e 3 minutos a 72°C para a fase de extensão, uma única etapa inicial de 1 minuto a 94°C e uma final de 7 minutos a 72°C. Para os iniciadores L15-F1A(III)/Map-R1A(III), o termociclador foi programado para 35 ciclos, usando-se 94°C por 30 segundos para a desnaturação, 1 minuto a 50°C para o anelamento e 5 minutos a 68°C para a fase de extensão dos iniciadores, 1 minuto a 94°C para a etapa inicial e 10 minutos a 72°C para a final. Para a segunda reação, com os iniciadores SecY-F1(III)/SecY-R1(III), o número de ciclos foi de 38, sendo a desnaturação processada a 94°C por 1 minuto, o anelamento por 2 minutos a 50°C e a extensão por 3 minutos a 72°C, 2 minutos a 94°C para uma etapa inicial e 7 minutos a 72°C para a etapa final.

As sequências dos oligonucleotídeos ou iniciadores utilizados foram:

R16 P1- 5' AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T 3'
 R16 P7- 5' CGT CCT TCA TCG GCT CTT 3'
 R16 F2n- 5'GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG 3'
 R16 R2- 5'TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G 3'
 L15-F1A(III)- 5' CTTCTGGTAAAGGACATAAAGG 3'
 Map-R1A(III)- 5' GGTTCCTTCGTGCAATTGCAAACC 3'
 SecY-F1(III) 5' CTAGACCAGGTTTTGAAGG 3'
 SecY-R1(III) 5' GACCTGCTTTTCTCATTATAGC 3'

Os produtos gerados pelo duplo PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TBE 0,5X. A eletroforese foi conduzida com voltagem constante de 65V por 60 minutos. Para a coloração dos produtos de amplificação utilizou-se Sybr safe® (1%), sendo a visualização das amostras processadas realizada em transiluminador de ultravioleta. O marcador molecular utilizado para definir o tamanho dos fragmentos amplificados foi o 1 Kb Ladder (Life Technologies).

2.2.4 Identificação de fitoplasmas por PCR

Após a detecção de fitoplasmas realizada pela amplificação de fragmentos genômicos pelos iniciadores universais, foram conduzidas novas reações de PCR para a identificação destes fitoplasmas ao nível de grupo. Para isto, foram empregados iniciadores específicos para a identificação de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII, usando-se os iniciadores R16(I)F1/R1 e R16(III)F2/R1, respectivamente (LEE et al., 1994). Os iniciadores específicos de grupo foram empregados somente na segunda reação, sendo assim, utilizou-se uma alíquota de 1 µL do produto gerado na primeira reação com os iniciadores P1/ P7 como molde para a segunda reação com os iniciadores específicos para grupos. As reações de PCR foram processadas nas mesmas condições descritas anteriormente para os iniciadores universais. Como padrão positivo de reação para o grupo 16SrI foi utilizado o DNA de plantas de milho infectadas pelo fitoplasma associado ao enfezamento vermelho, enquanto para o grupo 16SrIII foi usado o DNA extraído de plantas de chuchu portadoras do fitoplasma associado ao enfezamento.

As sequências dos iniciadores de grupo 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'

2.2.5 Sequenciamento da região dos genes 16S rRNA e *secY* e análise das sequências

O fitoplasma detectado em cada uma das amostras foi considerado como um isolado ou “strain”, totalizando doze isolados. Para o sequenciamento, foram enviados fragmentos genômicos amplificados na segunda reação de PCR conduzida com os pares de iniciadores R16F2n/R2 e SecY-F1(III)/SecY-R1(III). As sequências correspondentes a cada um dos genes foram montadas em “contigs”, usando-se os programas Bio Edit V. 7.0.9.0 (HALL, 1999), sendo estas sequências analisadas pelo programa Multiple Sequence Alignment - CLUSTALW.

2.2.6 Análise de RFLP *in silico*

Para cada isolado, a análise de RFLP das sequências amplificadas a partir do gene *secY* foi conduzida *in silico*, empregando-se programa de computador. O alinhamento e corte das sequências de nucleotídeos foi realizada com auxílio do programa Bio Edit V. 7.0.5.3 (HALL, 1999). As sequências geradas pela segunda reação de PCR, com aproximadamente 1,6 kb, foram alinhadas com uma sequência do gene *secY* depositada no GenBank e cortadas para aproximadamente 1,27 Kb. Após este procedimento, a digestão foi simulada em computador (WEI et al., 2007), utilizando-se o programa pDRAW32 (AcaClode Software). Foram utilizadas 18 enzimas de restrição, sendo 17 delas previamente estabelecidas para determinar a classificação dos fitoplasmas em grupos e subgrupos: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *SauAI* (*MboI*), *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*. A enzima *Tsp509I* foi adicionada às demais enzimas. Após a digestão, a eletroforese foi simulada em gel de agarose a 3%. Os padrões de restrição gerados foram analisados e um coeficiente de similaridade (F) foi calculado para cada par de isolados de fitoplasmas, 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 (LEE et al., 1998; NEI; LI, 1979). Na determinação do coeficiente de similaridade, as bandas até 50 pb foram consideradas para o cálculo.

2.2.7 Detecção por microscopia eletrônica de transmissão

Parte das amostras coletadas no campo foi preparada para análise dos tecidos em microscópio eletrônico de transmissão, visando à detecção direta de fitoplasmas no interior de vasos do floema. Para isto, cortes de pecíolos com aproximadamente 5 mm de comprimento por 2 mm de diâmetro foram fixados em solução de Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2,5%, tampão cacodilato 0,05M pH 7,2 + CaCl₂ 0,005M)

por 1 hora. Em seguida, os tecidos foram lavados 3 vezes por 10 minutos em tampão cacodilato 0,005M e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1% (OsO_4 1% tampão cacodilato 0,1 M) por 1 hora. A etapa de contraste foi conduzida usando-se acetato de uranila a 0,5% por uma noite. Posteriormente, foi realizada a desidratação em série acetífica, permanecendo as amostras por 10 minutos em cada uma das concentrações de 30-50-70 e 90%, e três vezes por 10 minutos em acetona 100%. O material foi colocado para iniciar a infiltração em acetona 100% e resina spurr puro, na proporção de 1:1 por 5 horas e, em seguida, foi colocado em resina spurr puro por uma noite. Seguindo os procedimentos, as amostras foram colocadas em formas apropriadas e cobertas com resina spurr puro a 60°C por três dias, finalizando-se, deste modo, o preparo das amostras, de acordo com a metodologia descrita por Kitajima e Nome (1999).

Os blocos contendo as amostras foram cortados em ultramicrótomo Leica Ultracut UCt. Os cortes ultrafinos, de aproximadamente 70 nm de espessura, foram feitos com auxílio de uma navalha de diamante, sendo estes cortes depositados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As telas foram visualizadas em microscópio Zeiss EM 9000. Todo preparo das amostras, bem como a sua visualização microscópica foram realizados no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA) da ESALQ/USP.

2.2.8 Análise filogenética

Uma árvore filogenética foi construída com base nas sequências nucleotídicas componentes do fragmento genômico correspondente à região do gene *secY* de fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII depositadas no “GenBank” e do fitoplasma identificado neste estudo nas plantas de melão-de-São-Caetano. Para tanto, foi usado o programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011) através de múltiplos alinhamentos obtidos com o programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994). Para a construção da árvore filogenética também foram usadas as sequências dos procariotos *Acholeplasma laidlawii* e *Acholeplasma palmae* como raiz, sendo utilizado o método de agrupamento Neighbour-Joining. O teste “Bootstrapping” foi processado 1.000 vezes, para garantir a confiabilidade da posição dos ramos na árvore.

2.2.9 Fitoplasmas que foram utilizados neste trabalho

As sequências nucleotídicas dos fitoplasmas utilizados no presente estudo, seus respectivos grupos e subgrupos, bem como seus números de acesso no GenBank estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. - Sequências de nucleotídeos correspondentes ao gene *secY* de fitoplasmas utilizados para a construção da árvore filogenética, seus respectivos grupos e subgrupos, com números de acesso ao Genbank

Fitoplasma	Doença associada	Origem	Classificação com base no gene 16S rRNA	Número de acesso no GenBank
CX	Peach X-disease	Canada	16SrIII-A	GU004327
CYE	Clover yellow edge	Lithuania	16SrIII-B	GU004332
PBT	Pecan bunchy top	USA	16SrIII-C	GU004361
GR1	Goldenrod yellows	USA	16SrIII-D	GU004364
SP1	Spirea stunt	USA	16SrIII-E	GU004326
MW1	Milkweed yellows	USA	16SrIII-F	GU004340
WWB	Walnut witches'-broom	USA	16SrIII-G	GU004325
JR1Ph (PoiBI)	Poinsettia branch inducing	USA	16SrIII-H	GU004328
ChWBIII	Chayote witches'- broom	Brazil	16SrIII-J	*
MWB	Momordica witches'-broom	Brazil	16SrIII-J	*
MT117	Potato purple top-MT	USA	16SrIII-M	GU004333
AKpot6	Potato purple top-AK	USA	16SrIII-N	GU004359

* As sequências foram determinadas neste trabalho, porém não foram depositadas no GenBank. Estas sequências estão apresentadas no apêndice localizado no final do texto da dissertação.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Detecção de fitoplasmas por PCR

Os sintomas observados nas plantas de melão-de-São-Caetano coletadas no campo foram similares àqueles anteriormente descritos nos trabalhos de Montano et al. (2000), Ribeiro et al. (2004) e Nilda e Montano (2010). As plantas exibiam sintomas caracterizados por nanismo ou enfezamento generalizado da parte aérea, clorose acentuada nas folhas, proliferação ou superbrotamento de ramos, encurtamento de entrenós, folhas e frutos de tamanho bastante reduzido.

Fragmentos genômicos de aproximadamente 1,2 Kb foram amplificados pelos iniciadores P1/P7 e R16F2n/R2, a partir da região 16S rDNA, confirmando a presença de fitoplasmas em todas as plantas doentes amostradas, sendo cinco representativas da “variedade silvestre” e sete pertencentes à “variedade cultivada”. Reações de duplo PCR conduzidas com iniciadores L15-F1A(III)/Map-R1A(III) e SecY-F1(III)/SecY-R1(III) amplificaram fragmentos de DNA esperados de 1,6 Kb, correspondentes à região do gene *secY*, revelando a ocorrência de fitoplasmas nos tecidos de todas as doze plantas de melão-de-São-Caetano que exibiam sintomas da doença (tabela3). Ambos os tipos de fragmentos foram visualizados na forma de bandas, após a eletroforese dos produtos de PCR conduzida em gel de agarose, como ilustrado nas fotos documentadas (figuras 3 e 4). Como controle positivo das reações de PCR baseadas no gene 16S rRNA foi utilizado o DNA de plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) sabidamente infectadas com fitoplasmas, o qual gerou um fragmento

esperado de 1,2Kb; o padrão positivo para as reações baseadas gene *secY* foi representado pelo DNA extraído de plantas de chuchu portadoras do fitoplasma do superbrotamento, a partir do qual foram amplificados fragmentos genômicos da ordem de 1,6 Kb. A água foi utilizada nos testes de PCR como forma de demonstrar a ausência de contaminação das misturas de reação. Nestes casos, nenhuma amplificação foi detectada, garantindo a confiabilidade dos resultados.

Tabela 3 - Detecção de fitoplasmas em plantas de melão-de-São-Caetano utilizadas no presente estudo, por meio de duplo PCR conduzido com os iniciadores específicos da região 16S rDNA e *secY*

Amostra	Variedade	16S rDNA		secY	
		Diluição	Resultado	Diluição	Resultado
P1	Silvestre	1:5	+	1:30	+
P2	Silvestre	1:5	+	1:30	+
P3	Silvestre	1:5	+	1:30	+
P4	Silvestre	1:5	+	1:30	+
P5	Silvestre	1:5	+	1:30	+
P6	Cultivado	1:5	+	1:30	+
P7	Cultivado	1:5	+	1:30	+
P8	Cultivado	1:5	+	1:30	+
P9	Cultivado	1:5	+	1:30	+
P10	Cultivado	1:5	+	1:30	+
P11	Cultivado	1:5	+	1:30	+
P12	Cultivado	1:5	+	1:30	+

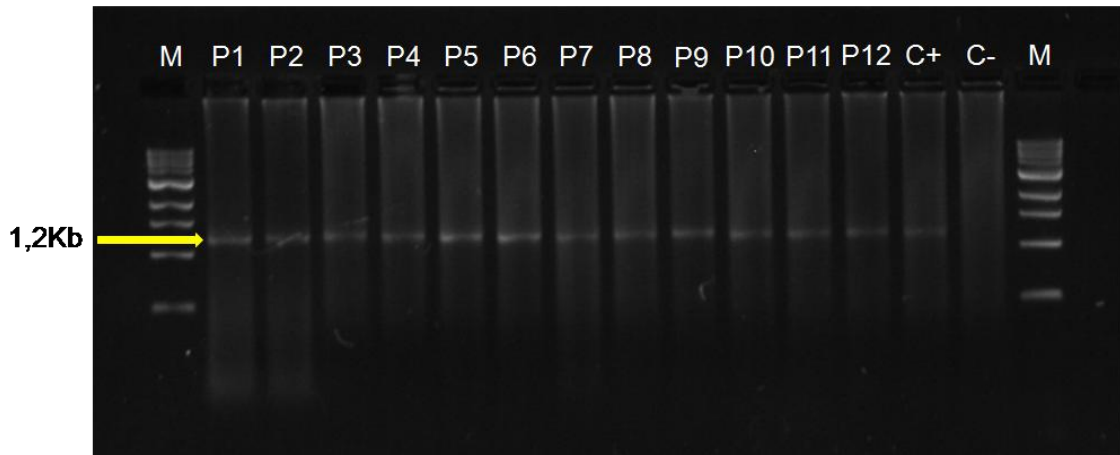


Figura 3 – Detecção de fitoplasmas em amostras de plantas de melão-de-São-Caetano por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 Kb, em reações de duplo PCR conduzidas com os iniciadores P1/ P7 e R16F2n/R2. M = Marcador (1 Kb Ladder); P1 a P5= amostras de DNA extraído de plantas de melão-de-São-Caetano do tipo silvestre; P6 a P12= amostras de DNA extraído de plantas de melão-de-São-Caetano do tipo cultivado; C+= padrão positivo da reação (vinca); C-= padrão negativo (mix da reação+ água)

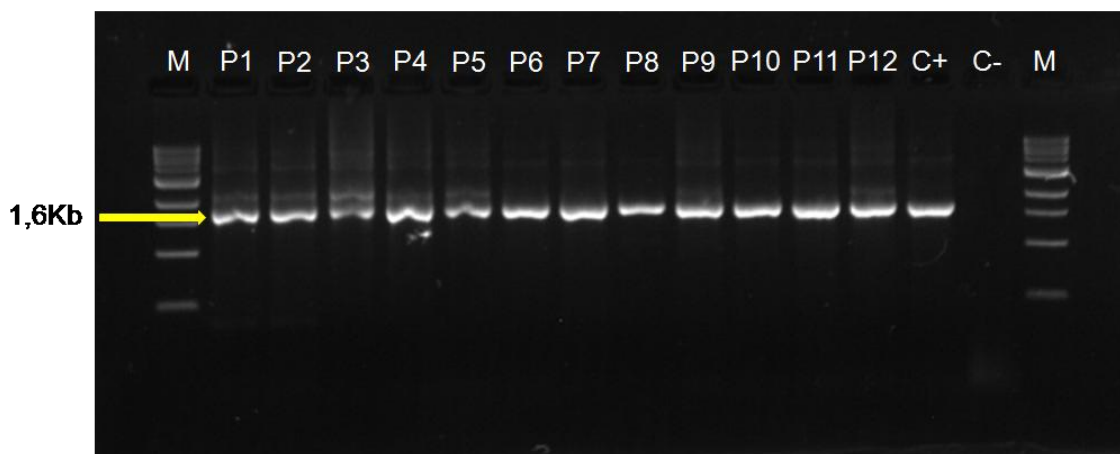


Figura 4 – Detecção de fitoplasmas em amostras de plantas de melão-de-São-Caetano por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,6 Kb, em reações de duplo PCR conduzidas com os iniciadores L15-F1A(III)/Map-R1A(III), e SecY-F1(III)/SecY-R1(III). M = Marcador (1 Kb Ladder); P1 a P5= amostras de DNA extraído de plantas de melão-de-São-Caetano do tipo silvestre. P6 a P12= amostras de DNA extraído de plantas de melão-de-São-Caetano do tipo cultivado. C+= padrão positivo da reação (chuchu); C-= padrão negativo (mix da reação+água)

2.3.2 Identificação do fitoplasma por PCR

Em todas as doze amostras submetidas ao duplo PCR conduzido com o par de iniciadores R16(III)F2/R16(III)R1, específico para a identificação de fitoplasmas do grupo 16SrIII, ocorreu a amplificação de fragmentos de DNA de, aproximadamente, 0,8 Kb, os quais são típicos para fitoplasmas do grupo 16SrIII (figura 5). Assim, ficou comprovado que um fitoplasma deste grupo estava associado às plantas de melão-de-São-Caetano que exibiam sintomas de superbrotamento. Fragmentos de 0,8 Kb também foram produzidos nos testes de PCR, quando o DNA extraído de plantas de chuchu, comprovadamente portadoras de fitoplasma do grupo 16SrIII, foi usado como modelo nas reações de amplificação.

Ensaio de duplo PCR com o emprego dos iniciadores R16(I)F1/R16(I)R1, específicos para a identificação de fitoplasmas do grupo 16SrI, mostraram resultados negativos, evidenciando a ausência de fitoplasmas deste grupo nas plantas sintomáticas de melão-de-São-Caetano. No entanto, o DNA total obtido a partir de plantas de milho infectadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho, um representante do grupo 16SrI, foi amplificado, gerando um fragmento genômico esperado de 1,1 Kb e confirmando a validade do teste de PCR (Figura 6).

A presença de fitoplasmas do grupo 16SrIII nas plantas da “variedade silvestre” já era prevista, pois trabalhos anteriormente feitos com melão-de-São-Caetano demonstraram de maneira consistente a associação entre um fitoplasma deste grupo e plantas doentes desta espécie. A primeira descrição deste fitoplasma foi feita, no início da década passada, em plantas de chuchu comercialmente cultivadas no estado do Rio de Janeiro (MONTANO et al., 2000). Simultaneamente, neste mesmo trabalho, o fitoplasma foi identificado em plantas de melão-de-São-Caetano que cresciam nas adjacências de culturas de chuchuzeiro. Na época, foi proposto que por se tratar de mesmo fitoplasma, as plantas silvestres poderiam atuar como reservatório e/ou fonte de inóculo deste patógeno. O mesmo fitoplasma foi identificado, alguns anos mais tarde, em plantas silvestres de melão-de-São-Caetano que se desenvolviam em cercas utilizadas em áreas de pastagens, no estado de São Paulo.

A identificação de fitoplasma do grupo 16SrIII em todas as plantas da “variedade cultivada” se constitui em nova informação, pois os relatos anteriores se referem somente a plantas da “variedade silvestre”. É interessante comentar que os sintomas presentes nestas plantas são idênticos àqueles observados nas plantas do tipo silvestre. Assim, foi verificado, em condições de campo, uma grande redução no porte da planta, severa clorose foliar, diminuição acentuada no tamanho das folhas e redução drástica nas dimensões dos frutos. As plantas sadias de ambas as “variedades” podem ser distinguidas à distância, porém as plantas

doentes da “variedade cultivada” podem se confundir com aquelas da “variedade silvestre”, tal é o efeito negativo da doença sobre as mesmas.

Fitoplasmas do grupo 16SrIII são encontrados com muita frequência em associação com diversas doenças observadas em uma série de espécies cultivadas e não cultivadas nas diversas regiões brasileiras. Representantes do grupo 16SrIII já foram relatados diversas ervas daninhas como mentrasto, serralha, falsa-serralha, mentruz, carrapateira, buva, rubim, guanxuma, erva de rato, joá-de-capote (ECKSTEIN, 2010) e em espécies de interesse agrônomo tais como cinamomo (DUARTE et al., 2009), videira (NERONI, 2009), abobrinha (MELO et al., 2009), maracujá (RIBEIRO, 2008), macieira (RIBEIRO et al., 2007), bucha-vegetal (MONTANO et al., 2007), couve-flor (RAPUSSI-DA-SILVA; BEDENDO, 2008), bico-de-papagaio (PEREIRA et al., 2006), begonia (RIBEIRO et al., 2006), abóbora (MONTANO et al., 2006), tomate (AMARAL MELLO, 2003), chuchu (MONTANO et al., 2000), mandioca (BARROS et al., 1998; FLÔRES, 2010), crotalária (BARROS et al., 1998) e berinjela (BARROS et al., 1998).

Assim, o melão-de-São-Caetano, “variedade cultivada”, embora da mesma espécie que aquele da “variedade silvestre”, pode ser relacionado como mais um hospedeiro deste importante grupo de fitoplasmas.

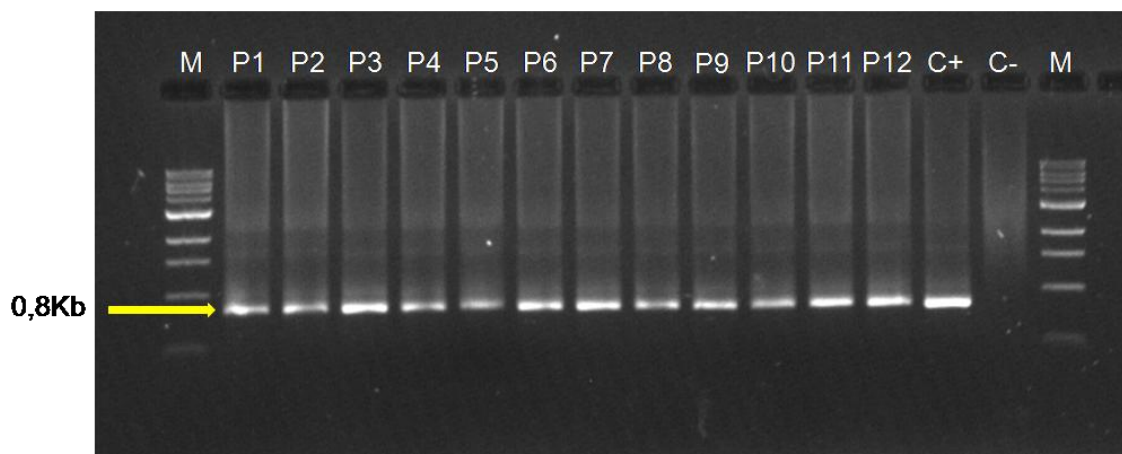


Figura 5 – Identificação de fitoplasmas em amostras de plantas de melão-de-São-Caetano por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 0,8 Kb, em reações de duplo PCR conduzidas com os primers P1/P7 e R16(III)F2/ R16(III)R1. M = Marcador (1 Kb Ladder); P1 a P5= amostras de DNA extraído de plantas de melão-de-São-Caetano do tipo silvestre. P6 a P12= amostras de DNA extraído de plantas de melão-de-São-Caetano do tipo cultivado. C+= padrão positivo da reação (chuchu); C-= padrão negativo (mix da reação+água)

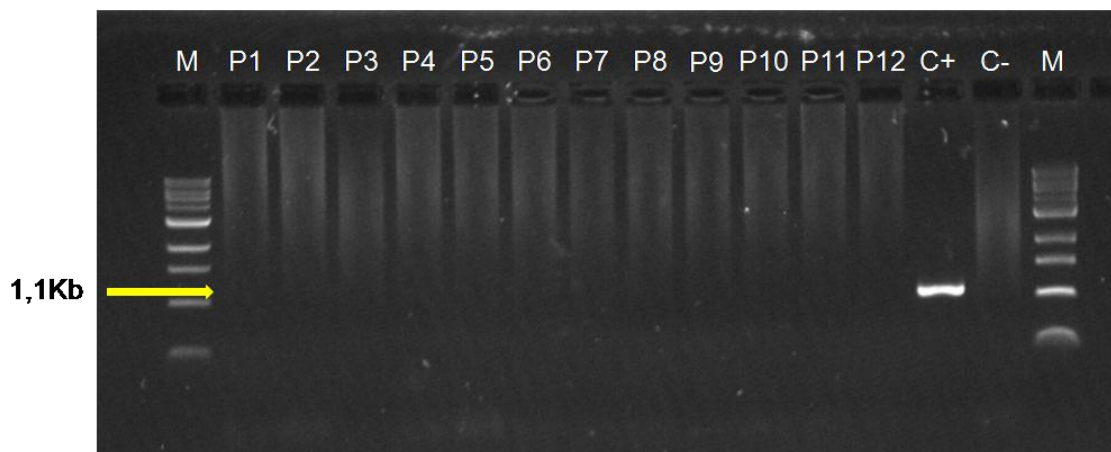


Figura 6 – Identificação de fitoplasmas em amostras de plantas de melão-de-São-Caetano por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,1Kb, em reações de duplo PCR conduzidas com os *primers* P1/P7 e R16(I)F1/R16(I)R1. M = Marcador (1 Kb Ladder); P1 a P5= amostras de DNA extraído de plantas de melão-de-São-Caetano do tipo silvestre. P6 a P12= amostras de DNA extraído de plantas de melão-de-São-Caetano do tipo cultivado. C+= padrão positivo da reação (milho); C-= padrão negativo (mix da reação+água)

2.3.3 Detecção por microscopia eletrônica

As secções ultrafinas de pecíolo visualizadas ao microscópio eletrônico de transmissão evidenciaram a presença de corpúsculos pleomórficos de tamanho variável, no lúmen dos elementos de vasos do floema (figura 7). Estas células sem forma definida são típicas de fitoplasmas, pelo fato de não apresentarem a parede celular que confere um formato constante às mesmas. Corpúsculos desta natureza são frequentemente observados em plantas infectadas por fitoplasmas, desde que sua concentração nos tecidos seja relativamente elevada. A importância da microscopia eletrônica de transmissão no estudo dos fitoplasmas, data da descoberta destes procariotos há mais de quarenta anos (DOI et al., 1967). Esta técnica tem permitido confirmar diagnósticos baseados nos sintomas exibidos pelas plantas suspeitas de infecção. No Brasil, a microscopia eletrônica tem contribuído sobremaneira para o conhecimento das doenças de etiologia fitoplasmática, possibilitando listar numerosas doenças deste tipo que ocorrem em diversas espécies botânicas (BEDENDO, 2012). Embora fitoplasmas tenham sido relatados em plantas de melão-de-São-Caetano ao longo dos anos, salvo melhor conhecimento, nenhum registro microscópico foi publicado. No presente trabalho, foi possível visualizar e fotografar as células de fitoplasmas nos vasos de plantas sintomáticas, complementando os resultados obtidos através do uso de técnica molecular para evidenciar a presença de fitoplasmas em plantas doentes.

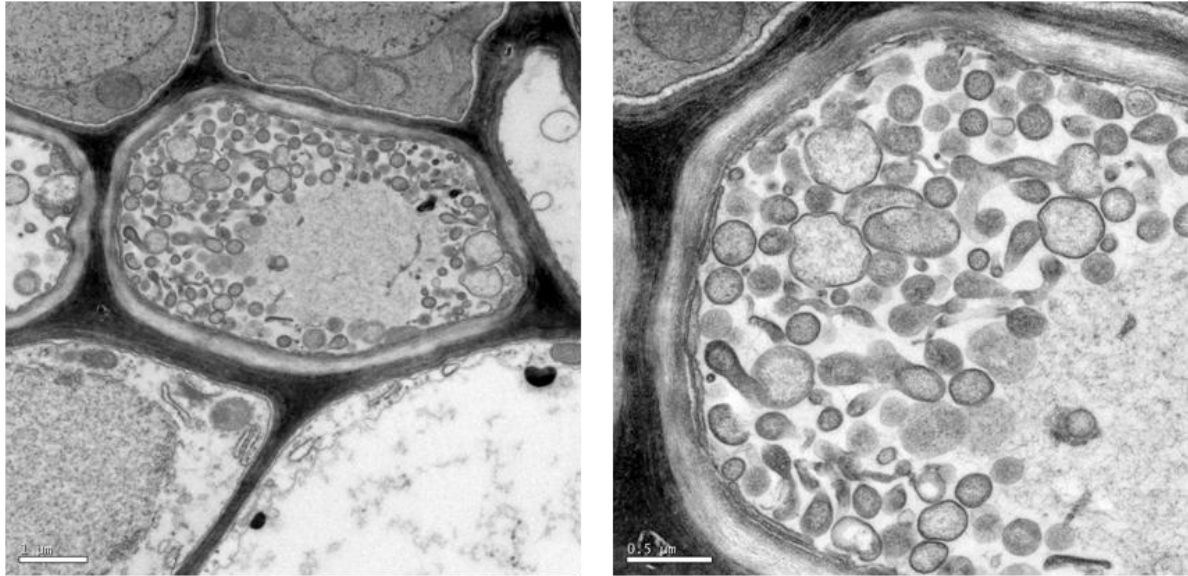


Figura 7 – Corpúsculos pleomórficos, observados ao microscópio eletrônico de transmissão, presentes no lúmen de elemento de floema de planta sintomática de melão-de-São-Caetano

2.3.4 Análise das sequências nucleotídicas

2.3.4.1 Análise das sequências do gene 16S rRNA

O alinhamento e análise das sequências amplificadas pelos iniciadores P1/P7 e 16F2n/16R2 em PCR duplo revelaram perfeita identidade entre estas sequências e aquelas pertencentes ao fitoplasma associado ao superbrotamento do chuchu, um típico representante do subgrupo 16SrIII-J (MONTANO et al., 2000). Este resultado, de certa forma, era previsto, pois um fitoplasma deste mesmo subgrupo já havia sido identificado em plantas de melão-de-São-Caetano (“variedade silvestre”) naturalmente infectadas (MONTANO et al., 2000; RIBEIRO et al., 2004) e que apresentavam sintomatologia idêntica àquela observada nas plantas da “variedade cultivada” amostradas para este estudo. Assim, ficou claramente evidenciado que um fitoplasma do subgrupo 16SrIII-J está associado aos sintomas exibidos pelas plantas da “variedade cultivada” da espécie *M. charantia*. Portanto, a chamada “variedade cultivada” é hospedeira de um fitoplasma do subgrupo 16SrIII-J.

Este fitoplasma parece estar restrito à área geográfica da América do Sul, uma vez que os relatos até agora existentes foram feitos em países pertencentes a este continente. Embora descrito pela primeira vez em plantas de chuchu e melão-de-São-Caetano (MONTANO et al., 2000), nos anos posteriores foi descrito, no Brasil, em plantas das famílias Amaranthaceae (ECKSTEIN, 2008), Ampelidaceae (NERONI, 2009), Brassicaceae (RAPUSSI-DA-SILVA, 2010) e Solanaceae (ECKSTEIN, 2010; AMARAL MELLO et al., 2011).

2.3.4.2 Análise de RFLP *in silico* das sequências do gene *secY*

Após o alinhamento das doze sequências correspondentes aos doze isolados de fitoplasmas encontrados nas plantas de melão-de-São-Caetano, foi observada a ausência de polimorfismo entre as sequências amplificadas a partir do gene *secY* (dados não mostrados). Com base nestes resultados, foi selecionada uma sequência como representativa das demais sequências determinadas para estes isolados. Por outro lado, polimorfismo foi identificado quando foram analisadas, por comparação, as sequências da região do gene *secY* pertencentes a alguns fitoplasmas do grupo 16SrIII, as quais estavam disponíveis no Genbank, e a sequência representativa do fitoplasma identificado nas plantas de melão-de-São-Caetano. Neste caso, a comparação foi feita pela análise dos padrões de restrição gerados pela digestão *in silico* destas sequências, com o uso de 18 enzimas de restrição previamente estabelecidas (LEE et al., 2010), sendo os resultados ilustrados nas figuras 8 e 9. A construção de mapas putativos de restrição com estas mesmas enzimas também serviram para evidenciar os resultados previamente obtidos nas análises dos padrões de restrição virtuais. Isto permitiu identificar os distintos sítios de restrição nas sequências do gene *secY* dos diversos fitoplasmas membros de subgrupos afiliados ao grupo 16SrIII, incluindo o fitoplasma presente nas plantas de melão-de-São-Caetano (Figuras 10, 11 e 12). Tanto os resultados visualizados através dos modelos coletivos dos padrões de restrição como no conjunto dos sítios putativos de restrição evidenciados nos mapas revelaram que a sequência nucleotídica presente no fitoplasma encontrado nas plantas de melão-de-São-Caetano é idêntica àquela presente no fitoplasma representante do grupo 16SrIII subgrupo J, associado ao enfezamento do chuchuzeiro, confirmando a colocação do fitoplasma encontrado no presente estudo dentro do subgrupo 16SrIII- J.

Os parâmetros analisados neste estudo revelaram que a sequência do gene *secY* apresenta variabilidade genética, considerando-se alguns dos subgrupos componentes do 16SrIII aqui avaliados. Assim, os valores do coeficiente de similaridade entre as sequências variaram de 0.41 a 1.00 (tabela 4), indicando a diversidade genética entre o fitoplasma presente no melão-de-São-Caetano e aqueles representantes de outros subgrupos aqui considerados. No entanto, este coeficiente revelou a completa identidade existente entre este fitoplasma e o representante do subgrupo 16SrIII-J. Com base no gene 16S rRNA os fitoplasmas estudados neste trabalho são classificados em 11 subgrupos, porém a determinação dos valores dos coeficientes de similaridade calculados para estes mesmo fitoplasmas com base no gene *secY* mostrou que os mesmos representam 10 subgrupos. Isto é justificável, pois os representantes dos subgrupos 16SrIII-D e 16SrIII-M mostraram

identidade completa, uma vez que o valor do coeficiente de similaridade entre estes fitoplasma foi igual a 1.0 (tabela 4). As enzimas *AluI*, *BfaI*, *DraI*, *HinfI*, *MseI* e *RsaI* foram aquelas que permitiram detectar as maiores variações nas análises dos padrões coletivos de restrição gerados pelas digestões *in silico*, como pode ser observado nos diferentes tipos de padrões apresentados pelos diversos representantes dos grupos 16SrIII, caracterizados com base no gene 16S rRNA (Tabela 5). Estudos complementares poderão fornecer maiores subsídios confirmando estas enzimas como possíveis enzimas chaves para diferenciação de grupos ou subgrupos de fitoplasmas. Os resultados aqui obtidos são plenamente concordantes com o trabalho publicado por Lee e colaboradores (2010), o qual pode ser considerado como um dos pioneiros dentre aqueles que buscaram demonstrar a validade do emprego do gene *secY* como um marcador para estudos de diferenciação de fitoplasmas. A utilização de múltiplos genes com diferentes graus de variabilidade genética realmente representa uma ferramenta necessária e útil para a identificação de variabilidade genética e seu uso na classificação de fitoplasmas.

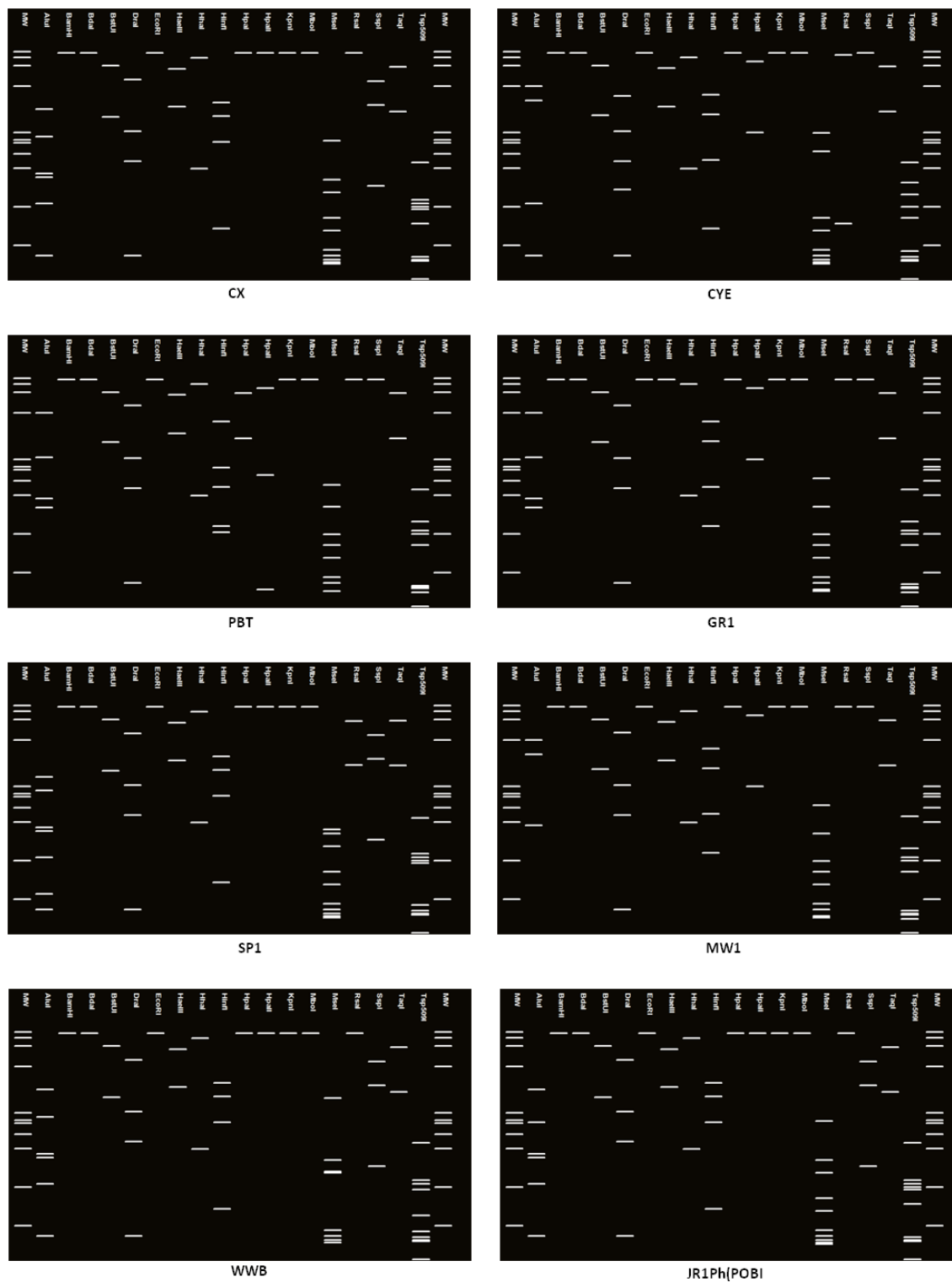


Figura 8 - Padrões de restrição de RFLP gerados pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região do gene *secY* de fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII. Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*, *Tsp509I*. M=marcador ϕ X174-DNA *HaeIII* digest. Fitoplasmas: CX (16SrIII-A), CYE (16SrIII-B), PTB (16SrIII-C), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), WWB (16SrIII-G), JR1Ph (PoiBI)

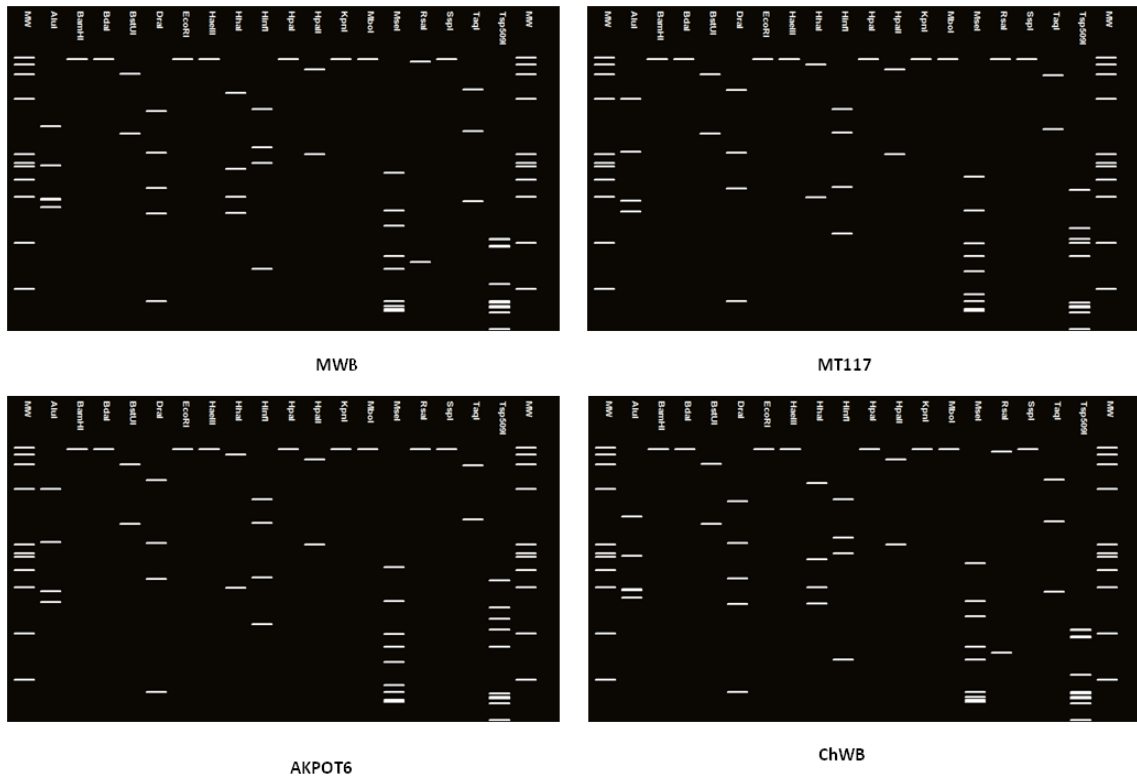


Figura 9 - Padrões de restrição de RFLP gerados pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região do gene *secY* de fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII e do fitoplasma encontrado nas plantas de melão-de-São-Caetano. Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*, *Tsp509I*. M=marcador ϕ X174-DNA *HaeIII* digest. Fitoplasmas: MWB (16SrIII-J), MT117 (16SrIII-M), AKpot6 (16SrIII-N), ChWB (16SrIII-J)

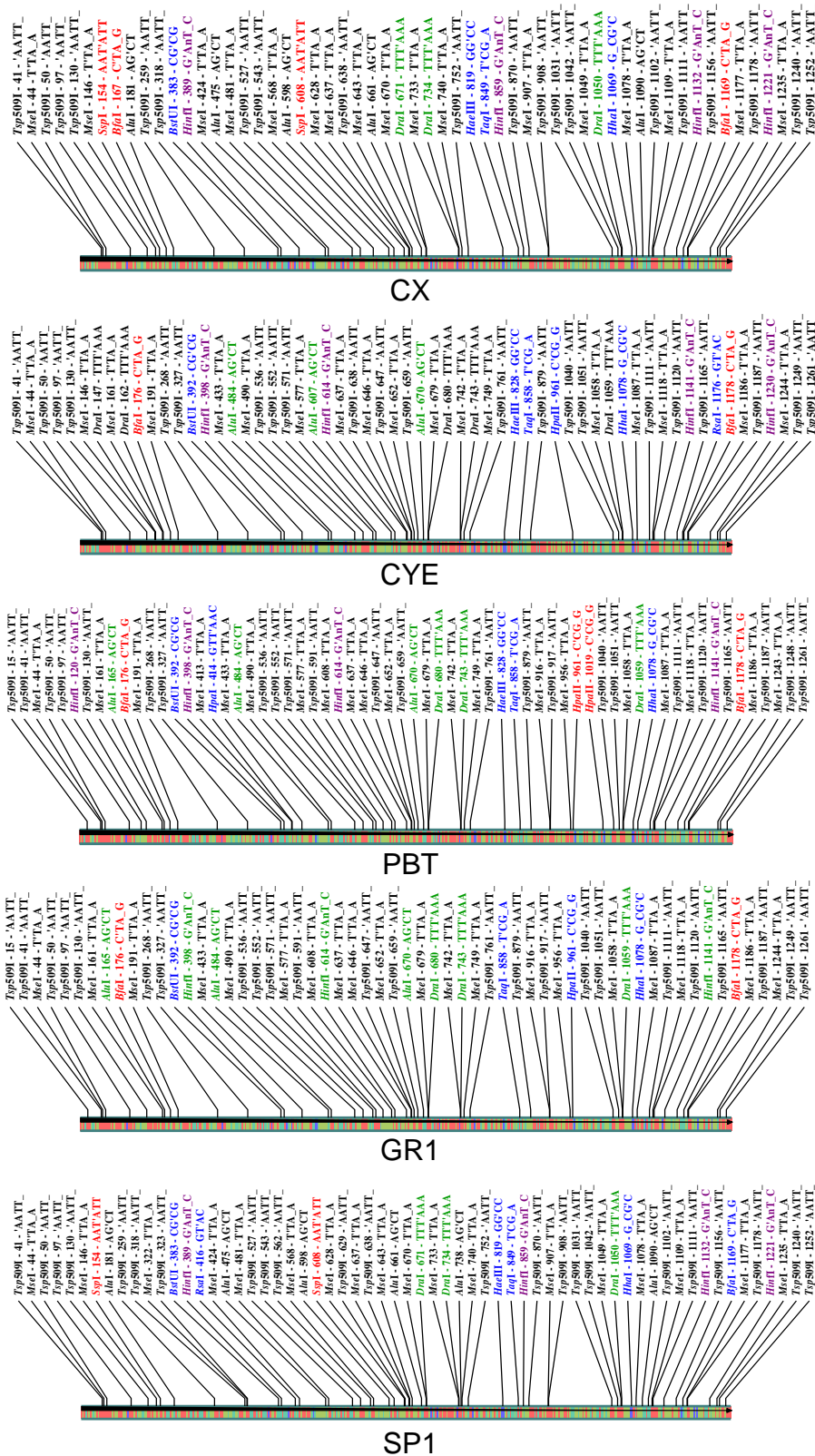


Figura 10 – Mapas putativos de sítios de restrição envolvendo a região do gene *secY* de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII. Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*, *Tsp509I*. Fitoplasmas: CX (16SrIII-A), CYE (16SrIII-B), PBT (16SrIII-C), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E)

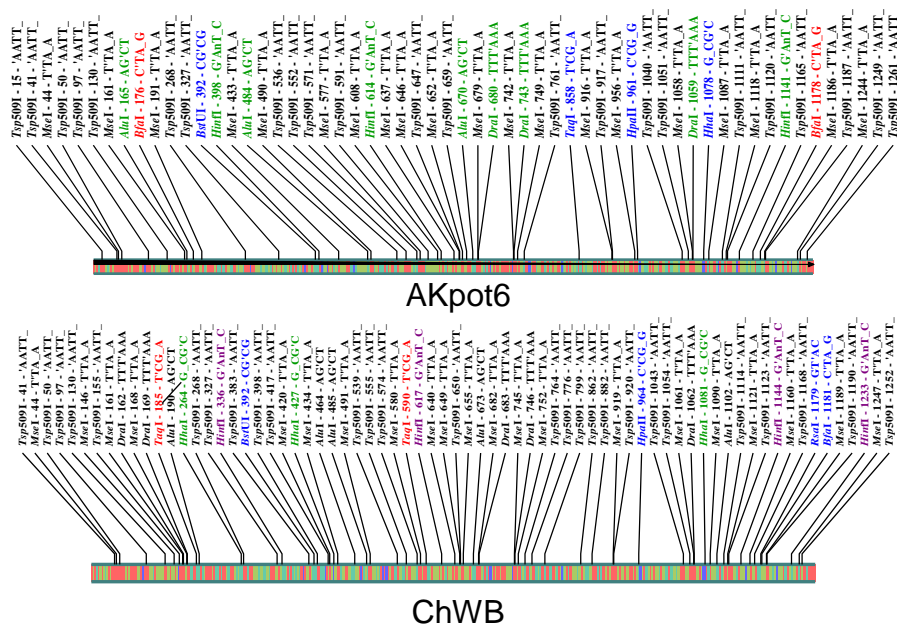


Figura 12 – Mapas putativos de sítios de restrição envolvendo a região do gene *secY* de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII. Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*, *Tsp509I*. Fitoplasmas: AKpot6 (16SrIII-N), ChWB (16SrIII-J)

Tabela 4 - Coeficientes de similaridade (F) calculados entre pares de fitoplasmas representantes de diversos subgrupos do grupo 16SrIII e o fitoplasma identificado em plantas de melão-de-São-Caetano (MWB)

SUBGRUPO	A	B	C	D	E	F	G	H	J	M	N	MWB
CX (16SrIII-A)	1											
CYE (16SrIII-B)	0,495	1										
PTB (16SrIII-C)	0,547	0,718	1									
GR1 (16SrIII-D)	0,524	0,760	0,871	1								
SP1 (16SrIII-E)	0,862	0,433	0,411	0,442	1							
MW1 (16SrIII-F)	0,543	0,860	0,851	0,938	0,519	1						
WWB (16SrIII-G)	0,924	0,427	0,423	0,415	0,878	0,435	1					
JR1Ph (16SrIII-H)	0,981	0,495	0,471	0,485	0,880	0,485	0,924	1				
ChWB (16SrIII-J)	0,477	0,584	0,504	0,576	0,472	0,576	0,467	0,495	1			
MT117 (16SrIII-M)	0,524	0,780	0,851	1	0,500	0,938	0,475	0,524	0,673	1		
AKpot6 (16SrIII-N)	0,524	0,820	0,851	0,979	0,480	0,938	0,455	0,504	0,634	0,979	1	
MWB (16SrIII-J)	0,477	0,584	0,504	0,576	0,472	0,576	0,467	0,495	1	0,673	0,634	1

Tabela 5 – Tipos de padrões de restrição gerados por 10 das 18 enzimas usadas na digestão *in silico* do gene *secY*, amplificado a partir de fitoplasmas pertencentes a diversos subgrupos do grupo 16SrIII, incluindo o fitoplasma presente em melão-de-São-Caetano

FITOPLASMA	ENZIMAS									
	AluI	BfaI	DraI	HaeIII	HhaI	HinfI	MseI	RsaI	TaqI	Tsp509I
CX (16SrIII-A)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CYE (16SrIII-B)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
PTB (16SrIII-C)	3	2	3	2	2	3	3	3	2	1
GR1 (16SrIII-D)	3	2	3	3	2	4	4	3	2	1
SP1 (16SrIII-E)	4	3	1	1	1	1	5	4	1	1
MW1 (16SrIII-F)	5	2	3	2	2	4	4	3	2	1
WWB (16SrIII-G)	1	2	1	1	1	1	6	1	1	1
JR1Ph (16SrIII-H)	6	2	1	1	1	1	1	1	1	1
ChWB (16SrIII-J)	7	4	4	3	3	5	7	2	3	3
MT117 (16SrIII-M)	3	2	3	3	2	4	4	3	2	1
AKpot6 (16SrIII-N)	3	2	3	3	2	4	4	3	2	2
MWB (16SrIII-J)	7	4	4	3	3	5	7	2	3	3

2.3.4.2 Análise filogenética

A árvore filogenética que ilustra a análise das relações filogenéticas entre fitoplasmas representantes típicos de alguns subgrupos do grupo 16SrIII e o fitoplasma identificado em melão-de-São-Caetano (figura 13) mostrou resultados que deram suporte àqueles revelados nas análises de RFLP e similaridade de sequências. Na visualização da árvore pode ser notado que os fitoplasmas do superbrotamento do chuchu e aquele do melão-de-São-Caetano emergem do mesmo ramo com um valor de Bootstrapping altamente confiável. Isto implica em dizer que ambos pertencem ao mesmo subgrupo 16SrIII-J. Além disto, os fitoplasmas pertencentes aos subgrupos 16SrIII-D e 16SrIII-M mostraram uma estreita relação filogenética entre si, em perfeita concordância com os tipos de padrões de restrição gerados pela digestão *in silico* da sequência do gene *secY* com diversas enzimas. As relações filogenéticas entre os fitoplasmas componentes da presente árvore também acompanham as mesmas tendências daquelas relatadas por Lee e colaboradores (2010), em relação aos fitoplasmas componentes de distintos subgrupos do grupo 16SrIII.

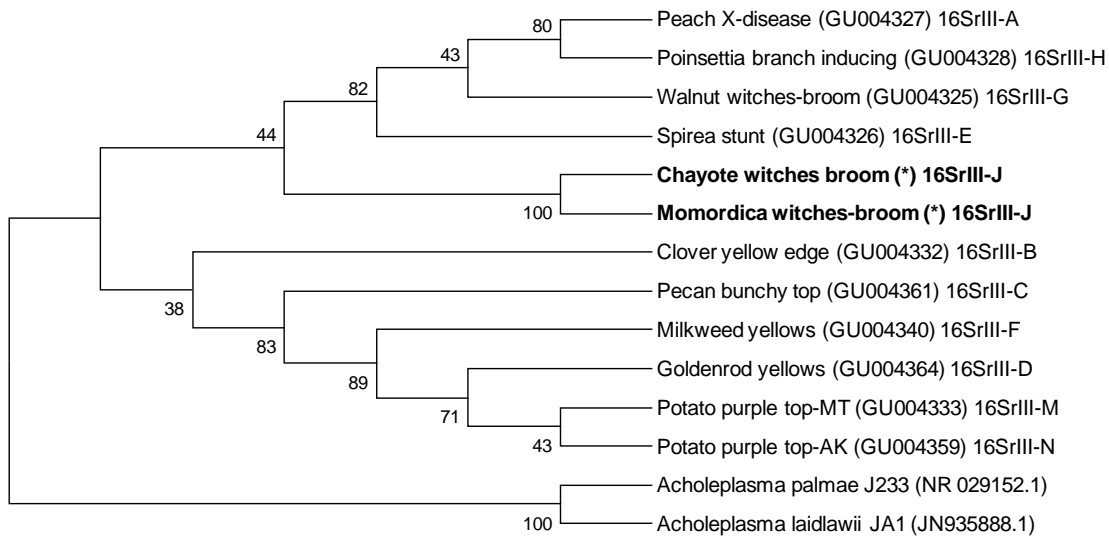


Figura 13 - Árvore filogenética construída a partir de sequências do gene *secY* encontrado em fitoplasmas afiliados a alguns subgrupos do grupo 16SrIII, fitoplasma identificado em melão-de-São-Caetano (MWB) e os procariotos *Acholeplasma laidlawii* e *Acholeplasma palmae*. Os números nos ramos indicam os valores de confiança baseados no “Bootstrapping”. (*) As sequências foram determinadas neste trabalho, porém não foram depositadas no GenBank. Estas sequências estão apresentadas no apêndice localizado no final do texto da dissertação

3 CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente trabalho, as seguintes conclusões podem ser apresentadas:

- O fitoplasma identificado nas plantas sintomáticas de melão-de-São-Caetano “variedade cultivada”, tanto pela análise do gene 16S rRNA como do gene *secY*, mostrou ser afiliado ao subgrupo 16SrIII-J.

- As análises das sequências nucleotídicas do gene *secY* não permitiram a diferenciação genética dos isolados do fitoplasma pertencente ao subgrupo 16SrIII-J, encontrados nas plantas de melão-de-São-Caetano.

REFERÊNCIAS

ADKINS, S.; WEBB, S.E.; BAKER, C.A.; KOUSIK, C.S. Squash vein yellowing virus detection using nested polymerase chain reaction demonstrates that the cucurbit weed *Momordica charantia* is a reservoir host. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, p. 1119-1123, 2008.

AMARAL MELLO, A.P.O. **Identificação molecular de um fitoplasma associado ao enfezamento do tomateiro (*Lycopersicon sculentum* L.) e da berinjela (*Solanum melongena* L.)**. 2003. 52 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

_____. **Identificação de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença**. 2007. 64 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

AMARAL MELLO, A.P.O.; ECKSTEIN, B.; FLORES, D.; KREYCI, P.F. Identification by computer-simulate RFLP of phytoplasmas associated with eggplant giant calyx representative of two subgroups, a lineage of 16 SrIII-J and the new subgroup 16 SRIII-U. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 61, p. 1454-1461, 2011.

ARNAUD, G.; MALEMBIC-MAHER, S.; SALAR, P.; BONNET, P.; MAIXNER, M.; MARCONE, C.; BOUDON-PADIEU, E.; FOISSAC, X. Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct flavescence dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 4001–4010, 2007.

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

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

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

_____. Fitoplasmas e espiroplasmas. In: EIRA, M.; GALLETI, S.R. **Técnicas de diagnóstico de fitopatógenos**. São Paulo: Devir Livraria, 2012. p. 65-80.

BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Identificação molecular do fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 329, 1998.

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

CANTWELL, M.; NIE, X.; ZONG, R.J.; YAMAGUCHI, M. Asian vegetables: selected fruit and leafy types. In: JANICK, J. (Ed.). **Progress in new crops**. Arlington: ASHS Press, 1996. p. 488-495.

CHIN, M., AHMAD, M. H., and TENNANT, P. Momordica charantia is a weed host reservoir for Papaya ringspot virus type P in Jamaica. . **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91:p. 1371-1519, 2007.

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

DAIRE, X., CLAIR, D.; REINERT, W.; BOUDON-PADIEU, E. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v 103, p. 507–514, 1997.

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

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

DESAI, U.T.; MUSMADE, A.M. Pumpkins, squashes and gourds. In: SALUNKHE, D.K.; KADAM, S.S. (Ed.). **Handbook of vegetable science and technology**: production, composition, storage and processing. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 273-298.

DOI, Y.M.; 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. **Annual of Phytopathology Society of Japan**, Tokyo, v. 33, p. 259-266, 1967.

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

DUDUK, B.; CALARI, A.; PALTRINIERI, S.; DUDUK, N.; BERTACCINI, A. Multigene analysis for differentiation of aster yellows phytoplasmas infecting carrots in Serbia. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 154, p. 219–229, 2009.

ECKSTEIN, B. **Identificação molecular de um fitoplasma associado á malformação das folhas das ornamentais *Celosia argêntea* L. e *Celosia spicata* L.** 2008. 50 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

ECKSTEIN, B.; BARBOSA, J.C.; REZENDE, J.A.M.; BEDENDO, I.P. Sida sp. a new host for Candidatus Phytoplasma brasiliensis in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, 2010. In press.

ECKSTEIN, B.; SILVA, E.G.; BEDENDO, I.P.; BRUNELLI, K. Primeiro relato da ocorrência de fitoplasmas em cultura do brócolis no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, p. 93, 2008.

FIALOVÁ, R.; VÁLOVÁ, P.; BALAKISHIYEVA, G.; DANET J.-L.; ŠAFÁROVÁ, D.; FOISSAC, X.; NAVRÁTIL, M. Genetic variability of stolbur phytoplasma in annual crop and wild plant species in south Moravia. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 91, p. 411–416, 2009.

FLORES, D. **Caracterização molecular e análise filogenética do fitoplasma agente do superbrotamento da mandioca (*Manihot esculenta*) no Estado de São Paulo.** 2009. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

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

GIRON, L.M.; FREIRE, V.; ALONZO, A.; CACERES, A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 34, p. 173–187, 1991.

GROVER, J.K.; YADAV, S.P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 93, p. 123–132, 2004.

GUNDERESEN, D. E.; LEE, I.M. Ultrasensitive detection of phytoplasma by nested-PCR assays using two universal primers pairs. **Phytopathologia Mediterrânea**, Beltsville, v. 35, p. 144-151, 1996.

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

GURBUZ, I.; AKYUZ, C.; YESILADA, E.; SENER, B. Anti-ulcerogenic effect of *Momordica charantia* L. fruits on various ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 71, p. 77-82, 2000.

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

HARRISON, N.A.; RICHARDSON, P.A.; TSAI, J.H. Assay for detection of phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 263-269, 1996.

HEWITT, W.B.R.E. Smith: pioneer in phytopathology. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 41-50, 1987.

HODGETTS, J.; BOONHAM, N.; MUMFORD, R.; HARRISON, N.; DICKINSON, M. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Reading, v.58, p. 1826-1837, 2008.

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

ISMAIL, Z.; ISMAIL, N.; LASSA, J. Malaysian Herbal Monograph. **Malaysian Monograph Committee**, Kuala Lumpur, v. 1, p. 3, 1999.

KITAJIMA, E.W.; COSTA, A.S. Estruturas do tipo mycoplasma no floema de tomateiro afetado pelo cálice gigante. **Bragantia**, Campinas, v. 27, p. XCVII-XCIX, 1968.

KITAJIMA, E.W.; NOME, C.F. Microscopia eletrônica em virologia vegetal. In: DO CAMPO, D.M.; LENARDÓN, S.L. **Métodos para detectar patógenos sistêmicos**. Córdoba: IFFIVE; NTA; JICA, 1999. p. 59-86.

KUNKALIKAR, S.R.; POOJARI, S.; ARUN, B.M.; RAJAGOPALAN, P.A.; CHEN, T.-C.; YEY, S.-D.; NAIDU, R.A.; ZEHR, U.B.; RAVI, K.S. Importance and genetic diversity of vegetable-infecting tospoviruses in India. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, p. 367-376, 2011.

LANS, C.; BROWN, G. Observations on ethnoveterinary medicines in Trinidad and Tobago. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 35, p. 125–142, 1998.

LEE, I.-M.; DAVIS, R.E. Mycoplasmas which 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 of Microbiology**, 1992. p. 379–390.

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

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

LEE, I.-M.; ZHAO, Y.; BOTTFNER, K.D. *SecY* gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 20, p. 87–91, 2006.

LEE, I.-M.; ZHAO, Y.; DAVIS, R.E. Prospects of multiple gene-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas. In: WEINTRAUB, P.; JONES, P. (Ed.). **Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vector**. Wallingford: CABI Publishing, 2010. p. 51–63.

LEE, I.-M.; BOTTFNER, K.D.; ZHAO, Y.; DAVIS, R.E.; HARRISON, N.A. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, p. 2887–2897, 2010.

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

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

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

LEE, I.-M.; BOTTLNER, K.D.; ZHAO, Y.; DAVIS, R.E.; HARRISON, N.A. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Reading, v. 60, p. 2887–2897, 2010.

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

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

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

MELO, L.A.; BEDENDO, I.P.; 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.

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

MIURA, T. Hypoglycemic activity of the fruit of the *Momordica charantia* in type 2 diabetic mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 47, p. 340–44, 2001.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.; CUNHA JUNIOR, J.O.; FIGUEIREDO, D.V.; PIMENTEL, J.P. First report of group 16SrIII phytoplasma in loofah (*Luffa cylindrica*). **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, p. 277-278, 2007.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T.; PEREIRA, R.C.; PIMENTEL, J.P. *Sicana odorifera* (Cucurbitaceae) a new phytoplasma host. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 287-288, 2007.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T.; PIMENTEL, J.P.; FIGUEIREDO, D.V.; CUNHA JUNIOR, J.O. *Cucurbita moschata*, new phytoplasma host in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Reading, v. 88, p. 226, 2006.

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

MUROLO, S.; MARCONE, C.; PROTA, V.; GARAU, R.; FOISSAC, X.; ROMANAZZI, G. Genetic variability of the stolbur phytoplasma *vmp1* gene in grapevines, bindweeds and vegetables. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 109, p. 2049–2059, 2010.

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

NERONI, R.C. **Amarelos da videira: identificação e análise filogenética dos fitoplasmas, transmissão dos agentes causais e otimização da diagnose**. 2009. 96 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

NILDA Z. A. JIMÉNEZ & HELENA G. MONTANO. Detection of phytoplasma in desiccated tissue of *Momordica charantia*, *Catharanthus roseus* and *Sechium edule*. Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro UFRRJ, 23890-000, Seropédica, RJ, Brazil **Tropical Plant Pathology**, Brasilia, v. 35, n. 6, p. 381-384, 2010.

OLIVEIRA, A.R.; FREITAS, S.P. Levantamento fitossociológico de plantas daninhas em áreas de produção de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 33-46, 2008.

OSHIMA, K.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; JUNG, H-I, WEI, W.; SUZUKI, S.; ARASHIDAL, R.; NAKATA, D.; MIYATAL, S-I; UGAKI, M.; NAMBA, S. Reductive

evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. **Nature Genetics**, London, v. 36, n. 1, p. 27-29, 2004.

PACIFICO, D.; ALMA, A.; BAGNOLI, B.; FOISSAC, X.; PASQUINI, G.; TESSITORI, M.; MARZACHÌ, C. Characterization of Bois noir isolates by restriction fragment length polymorphism of a Stolbur-specific putative membrane protein gene. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, p. 711–715, 2009.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**. 5th ed. Reading: The McGraw-Hill, 2002. 1139 p.

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

RAPUSSI-DA-SILVA, M.C.C.; BEDENDO, I.P. Enfezamento da couve-flor associado à fitoplasma do grupo 16SrIII. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, p. 91, 2008. Suplemento.

REYES, M.E.C.; GILDEMACHER, B.H.; JANSEN, G.J. *Momordica* L. In: SIEMONSMA, J.S.; PILUEK, K. (Ed.). **Plant resources of South-East Asia: vegetables**. Wageningen: Pudoc Scientific Publishers, 1994. p. 206-210.

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

RIBEIRO, L.F.C.; AMARAL MELLO, A.P.; BEDENDO, I.P.; KITAJIMA, E.W.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Ocorrência de um fitoplasma do grupo 16SrIII associado ao enfezamento em melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, p. 3, 2004.

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

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

SEARS, B.B.; KIRKPATRICK, B.C. Unveiling the evolutionary relationships of plantpathogenic mycoplasma-like organisms. Phylogenetic insights may provide the key to culturing phytoplasmas. **ASM News**, Washington, v. 60, p.307-312, 1994.

SENER, B.; TEMIZER, H. Biologically compounds of *Momordica charantia* L. **FABAD. Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 13, p. 516-521, 1998.

SHIGEHARU TAKEUCHI, Y.S; KOICHI, I. First report of Melon yellow spot virus infecting balsam pear (*Momordica charantia* L.) in Japan Shigeharu Takeuchi, Yoshifumi Shimomoto and Koichi Ishikawa. **Journal of General Plant Pathology**, Yamaguchi, v. 75, n. 2, p. 154-156, 2009.

SILVA, E.G.; BEDENDO, I.P.; 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**, Berlin, v. 157, p. 771-774, 2009.

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.

SOUZA, J.A.L. **Plantas medicinais usadas como anti-helmínticas estudo químico de *Spigelia anthelmia* Linn.** 2001. 47 p. Monografia (Bacharelado em Química) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2001.

SUH, J.-W.; BOYLAN, S.A.; OH, S.-H.; PRICE, C.W. Genetic and transcriptional organization of the *Bacillus subtilis* spc-a region. **Gene**, California, v. 169, p. 17-23, 1996.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**. 2011.

Disponível em:

<<http://mbe.oxfordjournals.org/content/early/2011/05/04/molbev.msr121.full.pdf+html>>.

Acesso em: 01 nov. 2012:

TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.; MARTINS, E.C.; KITAJIMA, E.W.; BASSANEZI, R.; AYREX, A.J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches-broom phytoplasma (16SrIX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the State of São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 9, p. 977-984, 2008.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 20, p. 407-438, 1996.

WEI, W.; DAVIS, R.E.; JOMANTIENE, R.; ZHAO, Y. Ancient, recurrent phage attacks and recombination events shaped dynamic sequence-variable mosaic structures at the root of phytoplasma genome evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, p. 11827–11832, 2008.

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

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

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.

YAMAGUCHI, M. **World Vegetables**. New York: AVI; Van Nostrand Reinhold, 1983. 415 p.

ZHAO, H.W. **Studies on extraction and hypoglycemic effect of saponins of *Momordica charantia* L. Var. *Abbreviata* Ser.** 2005. 88 p. Dissertation (Master in Food Nutrition & Safety) - Jiangnan University, Wuxi, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A

>Sequência do gene *secY* do fitoplasma presente nas plantas de meão-de-São-Caetano (MWB).

ATGAAAATGGTAATAGATTTTCTTCGTGATAAAAGTAAAATAATTAAAAAATTTTATTTACTTTAGTTATTTTA
 TTTATCTTTGTTATCGGTAATAAATTAGTCATTCCTTATGTAACAGTTCAAGAAAAATTTCTTTTTGACATTAAT
 CGGCAATTTTAAACTTTAAATGTCTGGTTTATTGGAAGCTAATGGTTCTATATATTTTTATCTTTAGGGGTTTA
 TCCTTATATTACTGCCTCTATTATTGTCCAGTTTGCGCAAAAATTATTTCTTTTATGAAAGAATGGCAAGAACA
 AGGCGAAAGAGGAAAATATAAAACCAATTTAGTGACTCGTTCTTTGACTTTGCTGTTTGCAGTAGGATTGGCTT
 TATCTTCAATTCAACGCGATGGAATTGCCACGCTCGCTAACAATTAAGCGCATGTTTTAACCATAGTGTTTTTT
 TTAGTAGTCGGAGCTTTCATTAGCGTTTGGTTAGCTGATTTAATCACTTCCAAAGGGAATAGGGAAACGGTATT
 TCTATTTTCGTAGCAATTAGTGTCAGTAAGAATTTATTTGAAACACTGCAATTTTAAACAAAAATCGACGATACA
 AACTTTGTAACATAAAAGAATCTTGACTTTAGTAGTTTTGTTAATCTTGTTAATTTTAAACAGTGATTTTATCAGCTG
 CTTATTTAAAAGTTCCAATGACTTACGCTACTAAACAAAATAATGATAAAATAAACAATCACATCCCTTTAAAAC
 TTAACACTTCAGGAATTTTGTGAGTAATTTTAGCCAACAGTTTATTGCAATTTTTTGGCACTATTTGCTTTTTGTT
 GGGACCAGAAAATGGTTTTTCAAATGGGTAACACTCAATTTCAAGCCTCTCAAAGTAATTATTTAGGTTTAGGTT
 TTTTTGTTACTTATTATTAATTTTGTATTTTTCAGTTTTTCTACTTTTATAACTATCAATCCGGCAGATATTGCCG
 AACATTTATCAAAACAAGATGCTTACTTAGAAGGGGTAAAACCTGGAGACGAAACAGTTTATAAAATTAACA
 AAAATTTTAAAGTAACAATCATCGGCGCTTTGCTTAACTGTCTTAGCTGCTTACCTGAATTGATTAAATTT
 TTTGTTGGACTAATGAATCTGACCGAACAGTTAAAGTTCAATTAGGTGGTACTAGTCTTTAATTGTTGTAGGT
 GTGGCTGTTGAAGTAATGCAACGTATAACGACTCAAACACTAACGTTAAGAAATTATACCAAAAAATTATTTTA

>Sequência do gene *secY* do fitoplasma presente nas plantas de chuchu (ChWB)

ATGAAAATGGTAATAGATTTTCTTCGTGATAAAAGTAAAATAATTAAAAAATTTTATTTACTTTAGTTATTTTA
 TTTATCTTTGTTATCGGTAATAAATTAGTCATTCCTTCTGTAACAGTTCAAGAAAAATTTCTTTTTGACATTAAT
 CGGCAATTTTAAACTTTAAATGTCTGGTTTATTGGAAGCTAATGGTTCTATATATTTTTATCTTTAGGGGTTTA
 TCCTTATATTACTGCCTCTATTATTGTCCAGTTTGCGCAAAAATTATTTCTTTTATGAAAGAATGGCAAGAACA
 AGGCGAAAGAGGAAAATATAAAACCAATTTAGTGACTCGTTCTTTGACTTTGCTGTTTGCAGTAGGATTGGCTT
 TATCTTCAATTCAACGCGATGGAATTGCCACGCTCGCTAACAATTAAGCGCATGTTTTAACCATAGTGTTTTTT
 TTAGTAGTCGGAGCTTTCATTAGCGTTTGGTTAGCTGATTTAATCACTTCCAAAGGGAATAGGGAAACGGTATT
 TCTATTTTCGTAGCAATTAGTGTCAGTAAGAATTTATTTGAAACACTGCAATTTTAAACAAAAATCGACGATACA
 AACTTTGTAACATAAAAGAATCTTGACTTTAGTAGTTTTGTTAATCTTGTTAATTTTAAACAGTGATTTTATCAGCTG
 CTTATTTAAAAGTTCCAATCACTTACGCTACTAAACAAAATAATGATAAAATAAACAATCACATCCCTTTAAAAC
 TTAACACTTCAGGAATTTTGTGAGTAATTTTAGCCAACAGTTTATTGCAATTTTTTGGCACTATTTGCTTTTTGTT
 GGGACCAGAAAATGGTTTTTCAAATGGGTAACACTCAATTTCAAACCTCTCAAAGTAATTATTTAGGTTTAGGTT
 TTTTTGTTACTTATTATTAATTTTGTATTTTTCAGTTTTTCTACTTTTATAACTATCAATCCGGCAGATATTGCCG
 AACATTTATCAAAACAAGATGCTTACTTAGAAGGGGTAAAACCTGGAGACGAAACAGTTTATAAAATTAACA
 AAAATTTTAAAGTAACAATCATCGGCGCTTTGCTTAACTGTCTTAGCTGCTTACCTGAATTGATTAAATTT
 TTTGTTGGACTAATGAATCTGACCGAACAGTTAAAGTTCAATTAGGTGGTACTAGTCTTTAATTGTTGTAGGT
 GTGGCTGTTGAAGTAATGCAACGTATAACGACTCAAACACTAACGTTAAGAAATTATACCAAAAAATTATTTTA