

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

**Transmissão de um fitoplasma associado ao enfezamento do
brócolis por cigarrinhas de diferentes espécies**

Patrícia Fabretti Kreycki

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

**Piracicaba
2012**

**Patrícia Fabretti Kreyci
Engenheiro Agrônomo**

**Transmissão de um fitoplasma associado ao enfezamento do brócolis por
cigarrinhas de diferentes espécies**

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

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

**Piracicaba
2012**

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

Kreyci, Patrícia Fabretti

Transmissão de um fitoplasma associado ao enfezamento do brócolis por cigarrinhas de diferentes espécies / Patrícia Fabretti Kreyci. - - Piracicaba, 2012.
53 p. : il.

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

1. Brocólis 2. Cigarrinhas 3. Enfezamento (Doença de planta) 4. Fitoplasmas 5. Insetos
vetores 6. Mollicutes I. Título

CDD 635.35
K92t

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

Aos meus pais José e Magali

À minha irmã Ana Paula e sobrinho Mario

Por todo amor e afeto

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Departamento de Fitopatologia pela estrutura e oportunidade oferecidas.

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

Ao Professor Ivan Paulo Bedendo pela oportunidade de cursar o Mestrado sob a sua orientação e pela contribuição para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À amiga Dra. Barbara Eckstein pela grande ajuda na elaboração da tese e, principalmente, pela amizade, incentivos e conselhos.

À Professora Ketí M.R. Zanol e a Pesquisadora Ana Carla Gonçalves que identificaram as cigarrinhas utilizadas no trabalho;

Aos demais professores e funcionários do Setor de Fitopatologia pelos ensinamentos e auxílios dispensados.

Aos amigos do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos, Tyciana, Pedro, Elizeu, Evandro, Thais e Daniela pelo agradável convívio.

A todos os amigos dos demais Laboratórios do Setor de Fitopatologia pelos bons momentos.

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

Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 DESENVOLVIMENTO.....	19
2.1 Revisão Bibliográfica.....	19
2.1.1 A Cultura do Brócolis.....	19
2.1.2 Fitoplasmas.....	20
2.1.3 Fitoplasmas em brássicas.....	22
2.1.4 Identificação e Classificação de Fitoplasmas.....	23
2.1.5 Transmissão de Fitoplasmas.....	25
2.2 Material e Métodos.....	26
2.2.1 Teste de transmissão de fitoplasmas.....	26
2.2.2 Extração de DNA total.....	30
2.2.2.1 Extração de DNA total de amostras de plantas de brócolis.....	30
2.2.2.2 Extração de DNA total dos insetos.....	31
2.2.3 Detecção de fitoplasmas por duplo PCR com <i>primers</i> universais.....	31
2.2.4 Detecção e identificação de fitoplasmas por duplo PCR com <i>primers</i> específico.....	32
2.2.5 Seqüenciamento da região 16SrDNA do fitoplasma.....	33
2.3 Resultados e Discussão.....	34
2.3.1 Transmissão de fitoplasmas para plantas de brócolis.....	34
2.3.2 Sobrevivência dos insetos em plantas de brócolis.....	36
2.3.3 Detecção de fitoplasmas por duplo PCR com <i>primers</i> universais.....	37
2.3.4 Detecção e identificação de fitoplasmas por duplo PCR com <i>primers</i> específicos.....	37
2.3.5 Seqüenciamento da região do 16S rRNA do fitoplasma transmitido por insetos para plantas de brócolis.....	39
3 CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS.....	45

RESUMO

Transmissão de um fitoplasma associado ao enfezamento do brócolis por cigarrinhas de diferentes espécies

As brássicas compreendem diversas espécies de grande relevância comercial dentre as demais espécies olerícolas cultivadas no Brasil. A região localizada próxima à cidade de São Paulo (SP) tem se destacado no cultivo de brássicas, especialmente do repolho, da couve-flor e do brócolis. Em campos de cultivo destas espécies, tem sido observadas plantas exibindo redução de tamanho, inflorescências mal formadas, avermelhamento de folhas e necrose dos vasos condutores. Investigações tem mostrado que estas anormalidades estão associadas aos fitoplasmas e a doença tem sido denominada enfezamento. Ainda, estudos anteriores têm sugerido a ocorrência de algumas espécies de cigarrinhas potencialmente vetoras destes fitoplasmas. Considerando estas informações, o presente trabalho teve por objetivo identificar espécies transmissoras de fitoplasmas para plantas de brócolis, buscando aumentar os conhecimentos sobre os vetores de fitoplasmas envolvidos com o enfezamento desta cultura. Para isto, foram coletados insetos no interior e áreas marginais de campos cultivados. Estes insetos foram separados em grupos, identificados taxonomicamente e confinados em plantas saudáveis de brócolis. A avaliação da transmissão foi feita com base na detecção de fitoplasmas nos tecidos dos insetos e das plantas, usando-se a técnica de PCR duplo, com *primers* específicos para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrIII. A sobrevivência dos insetos nas plantas de brócolis foi pouco duradoura, não excedendo 48 horas. A transmissão experimental foi constatada em 30% das plantas inoculadas. Dentre as 8 potenciais espécies de vetores que foram testadas, as espécies *Atanus nitidus*, *Balclutha hebe*, *Agalliana sticticollis* e *Agallia albidula* transmitiram fitoplasma para plantas de brócolis. Os resultados deste estudo confirmaram aqueles obtidos nas investigações anteriores, as quais sugeriam a ocorrência de potenciais espécies vetoras de fitoplasmas dentre aquelas presentes nos campos de cultivo. No entanto, o conhecimento de detalhes sobre a transmissão necessita de estudos com populações saudáveis e infectivas das espécies vetoras, sob condições controladas. Apesar desta necessidade, uma etapa importante foi cumprida no presente trabalho, o qual se constitui numa contribuição relevante tanto para o conhecimento de aspectos epidemiológicos relacionados à disseminação do agente causal do enfezamento do brócolis como para a área de conhecimento relacionada à transmissão de patógenos por insetos vetores, nas condições brasileiras.

Palavras-chave: *Brassica oleraceae*; Fitoplasma; Insetos vetores; Transmissão de patógenos; Mollicutes fitopatogênicos

ABSTRACT

Transmission of a phytoplasma associated with broccoli stunt by different species of leafhoppers

Cole crops include several species of commercial importance among the vegetable crops cultivated in Brazil. The region located near the city of São Paulo (SP) has excelled in the cultivation of brassica, especially cabbage, cauliflower and broccoli. In cultivated fields with these species have been observed plants showing reduction of size, malformed inflorescences, reddening of leaves and necrosis of region of vessels. Previous investigations have shown that these abnormalities are associated with phytoplasmas and the disease has been called stunt. In addition, previous studies have suggested the occurrence of some species of leafhoppers potentially vectors of phytoplasmas. Considering this information, the present study aimed to identify species that transmit phytoplasmas to plants of broccoli, seeking to increase knowledge about vectors of phytoplasmas involved with this culture. Thus, insects were collected within and in marginal areas of cultivated fields. These insects were separated into groups, taxonomically identified and confined in healthy plants of broccoli. The evaluation of transmission was based on detection of phytoplasmas in the tissues of plants and insects using the technique of nested PCR with specific primers for identification of phytoplasmas group 16SrIII. The survival of insects on plants of broccoli was short-lived, not exceeding 48 hours. The experimental transmission was observed in 30% of inoculated plants. Among the 8 potential vector species that were tested, the species *Atanus nitidus*, *Balclutha hebe*, *Agalliana sticticollis* and *Agallia albidula* transmitted phytoplasma to plants of broccoli. The results of the present study confirmed those obtained in previous research, which suggested the occurrence of potential vector species of phytoplasmas among those present in crop fields. However, details about these species as vectors require the creation of healthy populations of these species and infective for broadcast demonstration in controlled conditions. Despite this need, an important step has been accomplished in this work, which constitutes a significant contribution both to the knowledge of epidemiological aspects related to the spread of causal agent of broccoli stunt and the area of knowledge related to the transmission of pathogens by insects vectors, the Brazilian conditions.

Keywords: *Brassica oleraceae*; Phytoplasmas; Insect vectors; Pathogen transmission; Phytopathogenic Mollicutes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Campo de coleta e confinamento de cigarrinhas para teste de transmissão de fitoplasmas. 1) Aspecto geral de um campo de cultivo de brócolis com incidência de fitoplasma em Bragança Paulista. 2) Planta doente com sintomas típicos causados por fitoplasma entre duas plantas saudáveis. 3) Partes de plantas contendo cigarrinhas coletadas no campo e preparadas para transporte. 4) Gaiolas para confinamento de insetos usados para teste de transmissão de fitoplasma em brócolis (Fotos: Julio Cesar Barbosa e Bárbara Eckstein, 2010).....28
- Figura 2 - Insetos sugadores de floema da família Cicadellidae capturados em área de produção de brócolis e utilizados no teste de transmissão. A) *Empoasca sp*; B) *Atanus nitidus*; C) *Balclutha hebe*; D) *Scaphytopius fuliginosus*; E) *Agalliana sticticollis*; F) *Agallia albidula* (Fotos: Julio Cesar Barbosa e Bárbara Eckstein, 2010).....30
- Figura 3 - Detecção molecular de fitoplasma do grupo 16SrIII em plantas de brócolis sobre as quais foram confinados grupos de cigarrinhas coletadas no campo. PCR duplo realizado com os *primers* P1/Tint seguidos dos *primers* específicos R16(III)F2 / R16(III)R1. Chu = padrão positivo do grupo 16SrIII; Pn = padrão negativo (água). Tr1; Tr6; Tr16; Tr20; Tr22; Tr23; Tr24 e Tr25 = amostras de DNA extraídas de plantas de brócolis35
- Figura 4 - Evidência da presença de fitoplasma do grupo 16SrIII em tecidos de cigarrinhas coletadas em campos de brócolis com sintomas de enfezamento, localizados na região de Bragança Paulista/SP. Amplificação de fragmentos de DNA de 0,8 kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* P1/Tint na primeira reação e *primers* específicos R16(III)F2 / R16(III)R1. M = Marcador (1kb Ladder); Tr1; Tr2; Tr3; Tr6; Tr15; Tr16; Tr17; Tr18; Tr20; Tr21; Tr22; Tr23; Tr24 e Tr25 = amostras de DNA de fitoplasmas extraídas de cigarrinhas; Chu = padrão positivo do grupo 16SrIII; Pn = padrão negativo (água)39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Identificação das espécies de cigarrinhas confinadas nas plantas sadias de brócolis e a quantidade de insetos colocados por planta29
- Tabela 2 - Relação das amostras de insetos e plantas de brócolis positivas para a presença de fitoplasmas, através de PCR e identificados através da utilização de *primers* específicos35
- Tabela 3 - Relação das amostras de insetos analisadas quanto à presença de fitoplasmas, através de PCR conduzido com *primers* específicos38

1 INTRODUÇÃO

A doença conhecida como enfezamento, a qual ocorre em repolho, couve-flor e brócolis têm causado sérios prejuízos para os produtores destas culturas na região do cinturão verde da cidade de São Paulo e áreas próximas. Esta doença está associada a uma diversidade de fitoplasmas. As plantas atacadas tem seu desenvolvimento afetado negativamente, resultando em danos à qualidade do produto, com conseqüente redução do seu valor de mercado. O estudo deste patossistema se torna complicado, em razão dos fitoplasmas não serem cultivados em meio de cultura, dificultando as pesquisas que buscam melhor compreensão da interação entre estes patógenos e seus hospedeiros. Trabalhos recentes sobre a epidemiologia deste tipo de doença têm apontado para a possível ocorrência de insetos envolvidos na transmissão destes patógenos. Estes estudos também evidenciaram a presença de fitoplasmas nos tecidos de cigarrinhas de várias espécies encontradas em campos de brássicas. Com base nos resultados destes trabalhos e considerando que a área de conhecimento relacionada à transmissão de patógenos por vetores ainda é muito pouco explorada nas condições brasileiras, principalmente para os vetores de fitoplasmas, foi conduzido a presente investigação. Neste caso, foi escolhida a cultura de brócolis e as espécies de cigarrinhas mais frequentemente encontradas nesta cultura. O foco da pesquisa foi demonstrar a transmissão de fitoplasmas pelos diferentes grupos de insetos naturalmente portadores destes patógenos. Para isto, os distintos morfotipos de cigarrinhas foram classificados taxonomicamente e confinados em mudas saudáveis de brócolis. Nos casos positivos de transmissão, o patógeno foi caracterizado molecularmente para demonstrar que o mesmo fitoplasma estava presente tanto nas plantas como nos insetos.

O presente estudo, portanto, teve por objetivo demonstrar a ocorrência de vetores de fitoplasmas entre as espécies de cigarrinhas mais comumente encontradas em campos contendo plantas naturalmente infectadas por este tipo de patógeno.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 A Cultura do Brócolis

A família das brássicas abrange o maior número de espécies hortícolas, ocupando lugar de destaque na olericultura brasileira (FILGUEIRA, 2008). A espécie botânica *Brassica oleraceae* L. tem seu centro de origem ao longo da costa do Mediterrâneo, de onde provavelmente se disseminou por toda a Europa. Esta espécie, atualmente, compreende sete distintas variedades (var.), a saber: o repolho (*Brassica oleraceae* var. *capitata* L.), a couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis* L), a couve-manteiga (*B. oleraceae* var. *acephala* DC), o brócolis (*B. oleracea* var. *itálica* L), a couve-tronchuda (*B. oleracea* var. *tronchuda*), a couve-de-bruxelas (*B. oleracea* var. *gemmifera*) e a couve-rábano (*B. oleracea* var. *gongylodes*) (GIORDANO, 1983; SOUZA, 1983; MAROTO-BORREGO, 1995). Segundo Souza (1983), as espécies da família Brassicaceae, bem como as variedades de *B. oleracea* possivelmente são derivadas de uma espécie selvagem denominada de *Brassica sylvestris*, semelhante à couve comum.

No mercado de hortaliças existem dois tipos de brócolis, o ramoso, mais tradicional, e aquele formador de cabeça única. Este segundo tipo, pode apresentar botões com coloração superior arroxeadada, sendo comercializado em unidades, assim como acontece com a couve-flor. Diferentemente, os brócolis ramosos são comercializado em ramos, que incluem talos e folhas, além dos botões florais. As inflorescências deste tipo de brócolis devem ter coloração verde escura com os botões totalmente fechados (LANA; TAVARES, 2010).

Dentre as hortaliças mais cultivadas, as variedades de *Brassica oleracea* se destacam pela sua relevância econômica, principalmente nas regiões brasileiras do sudeste e do sul (ELLIS; SINGH, 1993). A produção média de brócolis no país é estimada em 13 mil toneladas por ano, com demanda crescente (FNP, 2009). Os maiores plantios são encontrados no estado de São Paulo, na região de Mogi das Cruzes, Suzano, Ibiúna, Mauá, Piedade, Vargem Grande entre outras. A produção é comercializada, principalmente, nos dois maiores mercados consumidores do país, representados pelos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (SÃO PAULO, 2008).

A cultura está sujeita a diversas doenças. Dentre elas, doenças bacterianas como a podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*), a podridão mole (*Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora*) e a mancha foliar translúcida (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*). Doenças de etiologia fúngica como a mancha de alternaria (*Alternaria brassicae*), a hérnia das crucíferas (*Plasmodiophora brassicae*) e a murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*) são frequentemente observadas em campos de cultivo (KIMATI et al., 2011). Há aproximadamente duas décadas, especialmente nos últimos anos, no estado de São Paulo, uma doença associada aos fitoplasmas tem se destacado, em decorrência do aumento da incidência e das perdas significativas que tem causado à produção de brássicas. Essa doença, cujos sintomas são caracterizados pelo enfezamento das plantas, má formação de inflorescências, avermelhamento foliar e necrose dos vasos do floema, tem sido relatada tanto nos campos de cultivo de brócolis (ECKSTEIN, 2010), como de repolho (MELLO, 2007) e couve-flor (RAPUSSI-DA-SILVA, 2010).

2.1.2 Fitoplasmas

Os fitoplasmas pertencem ao Super Reino Prokaryota, Reino Monera, Domínio Bactéria, Filo Tenericutes, Classe Mollicutes, Ordem Archeoplasma, Família Achleplasmataceae, Gênero '*Candidatus Phytoplasma*' (HOGENHOUT et al., 2008; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2009). Uma das características típicas da classe Mollicutes é a ausência de parede na célula procariota, o que resulta em marcante pleomorfismo (BERTACCINI; DUDUK, 2009; BEDENDO, 2011). Bedendo (2011) caracteriza os fitoplasmas como organismos procariotos, sem parede celular, habitantes de floema, com dimensões variáveis entre 200 a 800 nm, apresentando reprodução por fissão binária ou gemulação.

Segundo Hogenhout et al. (2010), os fitoplasmas podem ter se originado de bactérias Gram-positivas, provavelmente uma espécie de *Clostridium* ou *Lactobacillus* (WEISBURG et al., 1989; WOESE, 1987). Estas espécies tiveram seu genoma reduzido ao longo da evolução e perderam muitas rotas metabólicas, como aquelas relacionadas à síntese de ATP, aminoácidos e até nucleotídeos (BAI et al., 2006; OSHIMA et al., 2004), os quais passaram a ser obtidos diretamente dos seus hospedeiros. Essa grande dependência por metabólicos tem implicação no seu cultivo em meio de cultura, o qual ainda não se tornou possível até o momento.

O principal mecanismo envolvido com a patogênese é atribuído ao desequilíbrio no balanço hormonal das plantas infectadas (LEE; DAVIS, 1992). Diversos tipos de sintomas são induzidos por fitoplasmas, dependendo do genótipo da planta suscetível, da estirpe do patógeno e das condições do ambiente, podendo os mesmos aparecerem isoladamente ou combinados (DAVIS, 1995; BEDENDO, 2011).

Os sintomas típicos incluem enfezamento generalizado da planta (flores e folhas pequenas, internódios curtos), necrose do floema, superbrotamento de ramos originando o sintoma conhecido como vassoura de bruxa, virescência (aparecimento de pétalas verdes devido ao desenvolvimento de clorofila), filodia (formação de folhas no lugar de flores), esterilidade, estiolamento de ramos, descoloração de folhas e ramos, encarquilhamento de folhas, crescimento dos ramos com aspecto de roseta e declínio generalizado da planta, caracterizado pela morte descendente do ponteiro dos ramos, enfezamento e amarelecimento ou avermelhamento não sazonal das folhas (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000; HOGENHOUT et al., 2008). Esses sintomas são expressos após um período de incubação, no qual ocorre a multiplicação e translocação do fitoplasma dentro da planta (DOUGLAS, 1986). Por esta razão é comum encontrar na literatura relatos da detecção de fitoplasmas em plantas assintomáticas, pois nestes casos, o período de incubação no hospedeiro pode ter sido curto, impedindo a manifestação dos sintomas (GUTHRIE et al., 1998; RAPUSSI-DA-SILVA, 2010; DOUGLAS, 1986).

Doenças associadas aos fitoplasmas ocorrem em centenas de espécies de plantas, causando perdas em culturas agronomicamente importantes, em praticamente todas as regiões do mundo (McCOY et al., 1989; LEE; DAVIS, 1992). Como exemplos, citam-se os fitoplasmas do grupo 'AsterYellow', responsáveis por perdas em espécies olerícolas e ornamentais como a alface, cenoura e o gladiolo, na América do Norte e partes da Europa; o amarelecimento letal do coqueiro, que causa a morte de milhões de plantas no Caribe; o amarelo e a doença "X" do pessegueiro responsáveis por perdas significativas em pomares comerciais instalados nos Estados Unidos; o nanismo amarelo do arroz, afetando várias regiões do sudeste da Ásia; o amarelo da videira, que está entre as mais sérias doenças da videira no continente americano e europeu; o declínio da pereira que reduz a produtividade e diminui a vida útil dos pomares; e o enfezamento vermelho do milho,

causador de danos sérios a essas culturas no continente americano (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000)

No Brasil, há uma extensa diversidade de plantas afetadas por fitoplasmas, incluindo espécies ornamentais, frutíferas, cereais, florestais e hortaliças. Algumas das doenças já relatadas incluem o superbrotamento do feijoeiro, da soja, do hibisco (MONTANO et al., 2001); do maracujazeiro (RIBEIRO; BEDENDO, 2007); da mandioca (FLORES, 2009); da abobrinha (MELO et al., 2007); da crotalária (AMARAL MELO et al., 2004); o irizado do chuchuzeiro (KITAJIMA, 1995; AMARAL MELLO et al., 2006); o enfezamento vermelho do milho (BEDENDO et al., 2000); o cálice gigante do tomateiro (AMARAL MELO et al., 2006); o lenho mole da macieira (RIBEIRO et al., 2007); a síndrome do amarelecimento foliar da cana de açúcar (SILVA et al., 2009); malformação de folhas de *Celosia* sp. (ECKSTEIN, 2008) e fitoplasmas em citros (BARBOSA, 2010).

2.1.3 Fitoplasmas em brássicas

A ocorrência de fitoplasmas em brássicas foi primeiramente relatada na Itália, em plantas de brócolis e couve-flor, através de microscopia eletrônica, no início da década de 80 (BERTACCINI; PISI; MARANI, 1983). A identificação de fitoplasmas associados aos enfezamentos de brássicas como nabo, repolho, couve-flor e brócolis, conduzida em várias regiões do mundo, mostrou serem eles pertencentes a grupos diferentes de classificação. Fitoplasmas do grupo 16SrI foram identificados em plantas de brócolis na Itália e na Sérvia (MARCONE; RAGAZZINO, 1995; DUDUK et al., 2007). Em nabo foi constatada a presença de fitoplasma do sub-grupo 16SrI-B, na República Tcheca (BERTACCINI et al., 1998). Os grupos 16SrI-A e 16SrI-B foram encontrados em repolho nos Estados Unidos (LEE et al., 2003), enquanto que no Irã, também em repolho foi caracterizado um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrVI (SALEHI; IZADPANA; SIAMPOUR, 2007).

No Brasil, fitoplasmas foram detectados em repolho, brócolis e couve-flor, havendo predominância daqueles representantes do grupo 16SrIII. Eckstein (2010) observou a associação de fitoplasmas do grupo 16SrI, subgrupo B e dos grupos 16SrIII e 16SrXIII com plantas sintomáticas de brócolis. Resultados semelhantes foram encontrados para repolho, em cujas plantas foram identificados fitoplasmas pertencentes 16SrI e 16SrIII (MELLO, 2007). Em relação à couve-flor, Rapussi-da-

Silva (2010), associou a ocorrência de fitoplasmas dos grupos 16SrIII-J, 16SrXIII e 16SrXV-A com plantas mostrando sintomas de enfezamento, havendo predominância de fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII.

2.1.4 Identificação e Classificação de Fitoplasmas

As doenças associadas aos fitoplasmas foram inicialmente diagnosticadas pela observação de sintomas exibidos pelas plantas e pela detecção de fitoplasmas nos tecidos doentes, através do emprego de microscopia eletrônica. O primeiro sistema de classificação de fitoplasmas era fundamentado em características biológicas, como quadro sintomatológico apresentado pelo hospedeiro, gama de espécies hospedeiras alternativas e relação do patógeno com insetos vetores (CHIYOKOESKI, 1989; LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000).

A microscopia eletrônica de transmissão foi e continua sendo uma importante ferramenta para a detecção de fitoplasmas em plantas. No Brasil, de forma pioneira, muitos foram os trabalhos nos quais esta técnica permitiu associar a planta doente com a presença de fitoplasmas. (KITAJIMA; COSTA, 1970; KITAJIMA, 1994). No entanto, o microscópio eletrônico é de uso limitado como rotina, devido ao custo elevado do equipamento e à exigência de operadores técnicos altamente qualificados. Além disto, as visualizações ao microscópio eletrônico não possibilitam a classificação dos fitoplasmas, pois a morfologia de suas células não permite a diferenciação entre os mesmos (BARROS, 1997).

Para a detecção e identificação deste tipo de patógeno, algumas técnicas moleculares tem se mostrado essenciais e confiáveis, entre elas a reação em cadeia da polimerase (PCR), o polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP) e a análise de seqüências nucleotídicas presentes na região do gene 16S rDNA (MILLER; MARTIN, 1988; DAVIS; PRINCE, 1994; MARTIN et al., 2000).

A técnica ou método de PCR consiste na amplificação enzimática *in vitro* de fragmentos específicos de DNA, em progressão geométrica, visando à produção de milhões de cópias desta seqüência de bases. Os iniciadores (“*primers*”) derivados de seqüências do gene 16S rDNA tem se mostrado altamente sensíveis para fins de detecção de fitoplasmas em plantas e insetos (GUNDERSEN; LEE, 1996). A sensibilidade da técnica, principalmente de duplo PCR, tem permitido a detecção de fitoplasmas em plantas e insetos vetores, mesmo quando o patógeno ocorre em

baixas concentrações nos tecidos dos mesmos (SCHAFF et al., 1992; HENSON; FRENCH, 1993; MARCONE et al., 1997; GREEN et al., 1999). A técnica de PCR tem sido utilizada, predominantemente, para a detecção do patógeno, embora a síntese de iniciadores específicos possa propiciar a identificação e a classificação de fitoplasmas em alguns grupos bem definidos, entre eles, os grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrV (FIRRAO et al., 1994; LEE et al., 1995; HARRISON et al., 2003; MARTIN et al., 2000).

Além do uso dos iniciadores específicos, a classificação desses procariontos pode ser realizada através da técnica de RFLP. Neste caso, as seqüências amplificadas nas reações de PCR são digeridas por enzimas de restrição, que são endonucleases que clivam fragmentos de DNA em locais específicos, reconhecendo seqüências específicas de 4 a 8 pares de bases (LAMBAIS, 1995). Os fragmentos de DNA do fitoplasma amplificados podem originar, após a digestão enzimática, um conjunto de fragmentos menores, visualizados em forma de bandas no gel de eletroforese, o qual constitui um perfil eletroforético ou um padrão de restrição. A comparação do perfil eletroforético apresentado por um fitoplasma, para uma determinada enzima de restrição, com padrões existentes na literatura, permite determinar o grau de similaridade existente entre os mesmos e, com isto, estabelecer sua classificação (LEE et al., 1998).

Recentemente, uma nova modalidade de RFLP, denominada de RFLP virtual, tem sido adotada para a identificação de fitoplasmas (WEI et al., 2007; ZHAO et al., 2009). Os fragmentos genômicos amplificados por PCR são seqüenciados diretamente ou clonados e, posteriormente, seqüenciados. A digestão *in silico* é conduzida com programas de computador. Os padrões de restrição gerados para o fitoplasma em estudo são comparados com aqueles já relatados para outros fitoplasmas. Índices de similaridade entre os padrões apresentados pelo fitoplasma em estudo e aqueles encontrados na literatura são calculados a partir de equações matemáticas (PEREIRA, 2011). Através desse método novos grupos e subgrupos foram delineados e no momento, existem 29 grupos e mais de 100 subgrupos descritos (WEI et al., 2007; 2008; ZHAO et al., 2009; DAVIS et al., 2010). A digestão *in silico* facilitou a identificação de fitoplasmas, uma vez que a digestão em laboratório com as 17 enzimas de restrição é inviável para análise de grande quantidade de amostras (ZHAO et al., 2009). A informação contida na seqüência do gene 16S rDNA também tem servido como base para a classificação dos fitoplasmas

em espécies putativas, referidas como espécies candidatas: '*Candidatus* Phytoplasma (IRPCM PHYTOPLASMA/SPIROPLASMA WORKING TEAM – PHYTOPLASMA TAXONOMY GROUP, 2004). Um fitoplasma pode ser descrito como uma nova espécie do gênero "*Candidatus* Phytoplasma" se a seqüência do seu gene 16S rDNA tiver similaridade menor que 97,5% com a seqüência de qualquer outra espécie '*Ca. Phytoplasma*' descrita. Existem, até o momento, 26 espécies de '*Ca. Phytoplasma*' descritas. No entanto, outras espécies putativas ainda devem ser descritas (IRPCM PHYTOPLASMA/SPIROPLASMA WORKING TEAM – PHYTOPLASMA TAXONOMY GROUP, 2004).

2.1.5 Transmissão de Fitoplasmas

A transmissão de fitoplasmas ocorre naturalmente por meio de insetos vetores. No entanto, experimentalmente, podem ser usadas outras técnicas, como a enxertia, quando há compatibilidade entre as espécies hospedeira e uso da cuscuta. A cuscuta é uma planta parasita que ao ser estabelecida em uma planta hospedeira pode, através de filamentos, permitir a passagem de fitoplasmas de uma planta para outra (DAVIS, 1995; GOODWIN et al., 1999; BERTACCINI, 2007).

Os insetos capazes de transmitir fitoplasmas são representados por um pequeno grupo de insetos sugadores que se alimentam do floema das plantas. Estes pertencem à ordem Auchenorrhynca, famílias Ciccadelidae, Fulgoromorpha e dois gêneros da família Psyllidae (STRETEN; GIBB, 2006). Destaca-se que mais de 75% dos vetores de fitoplasmas são encontrados na subfamília Deltocephalinae (Ciccadelidae) (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006).

A transmissão de fitoplasmas por insetos da ordem Auchenorrhynca é do tipo persistente, ou seja, os fitoplasmas são adquiridos durante a alimentação em plantas infectadas, os quais, uma vez no interior dos insetos, atravessam as células do trato digestivo, replicam-se em vários órgãos do inseto, atravessam as glândulas salivares, e por fim, alcançam a saliva, sendo subseqüentemente introduzidos em outras plantas (HOGENHOUT et al., 2008). O período de latência, período compreendido entre o tempo de aquisição inicial do patógeno e sua introdução em outra planta, pode variar de 7 a 8 dias, após o qual o inseto passa a transmitir o patógeno por toda sua vida (BERTACCINI; DUDUK, 2009; MOYA-RAYGOZA; NAULT, 1998).

Apesar de ser exceção, a transmissão transovariana já foi observada em algumas espécies de cigarrinhas, como *Hishimonoides sellatiformis*, vetora do fitoplasma associado ao nanismo da amoreira (KAWAKITA et al., 2000), *Matsumyratettix hiroglyphicus*, vetora do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (HANBOONSONG et al., 2002), além dos psíldeos vetores do fitoplasma associado ao superbrotamento da maceira, *Cacopsylla melaneura* e *Cacopsylla pruni* (TEDESCHI et al., 2006).

A detecção de fitoplasmas em insetos coletados no campo tem sido útil para evidenciar a ocorrência de novos vetores, a distribuição sazonal e geográfica de vetores e o monitoramento da doença no campo (TEDESCHI et al., 2003). Embora centenas de doenças causadas por fitoplasmas sejam conhecidas, as informações sobre os vetores ainda são bastante escassas. Isto se deve, provavelmente, a maior dificuldade para identificar vetores do que as plantas hospedeiras (LEE et al., 2000; WEINTRAUB; WILSON, 2009).

A interação entre fitoplasma, inseto vetor e planta hospedeira apresenta varias implicações, como por exemplo, a planta infectada servir como fonte de inóculo, contribuindo para o aumento da doença no campo. Ainda, os insetos vetores podem garantir a sobrevivência dos fitoplasmas durante o período de ausência da planta hospedeira no campo. (LEE; DAVIS, 1992; KHADHAIR et al., 2002).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Teste de transmissão de fitoplasmas

As espécies selecionadas para os testes de transmissão foram apontadas por ECKSTEIN (2010), como potenciais vetores de fitoplasmas para a cultura do brócolis. Os insetos considerados neste estudo são cigarrinhas das espécies *Atanus nitidus*, *Balclutha hebe*, *Planicephalus flaviscosta*, *Scaphytopius fuliginosus*, *Protalebrella brasiliensis*, *Agalliana sticticollis*, *Agallia albidula* e uma espécie do gênero *Empoasca*.

Os insetos foram coletados nas áreas adjacentes de campos comerciais de brócolis, com alta incidência de plantas doentes, localizados no município de Bragança Paulista, entre os meses de julho de 2009 e março de 2010. Com o auxílio

de uma rede entomológica, os insetos foram capturados e transferidos para gaiolas de transporte (Figura 1).

Neste ensaio foram utilizadas mudas sadias de brócolis com três semanas de idade, obtidas a partir de sementes, crescidas em vasos e mantidas em local protegido de insetos. Com o auxílio de um sugador bucal, os insetos identificados como potenciais vetores de fitoplasmas por Eckstein (2010) foram confinados em número de 3 a 5 ou 10-15 por muda, dependendo da disponibilidade e tamanho dos insetos (Figura 2, Tabela 1). No total, 26 mudas foram utilizadas no experimento. Após um período de sete dias, cada grupo de insetos confinado em cada planta foi coletado, armazenado separadamente e submetido aos testes moleculares visando à detecção de fitoplasmas. As plantas foram mantidas por 60 dias para avaliação da transmissão de fitoplasmas pelos insetos. Para isto, foi observada a manifestação de sintomas pelas plantas e a detecção de fitoplasmas através da aplicação da técnica molecular de duplo PCR.



Figura 1 - Campo de coleta e confinamento de cigarrinhas para teste de transmissão de fitoplasmas. 1) Aspecto geral de um campo de cultivo de brócolis com incidência de fitoplasma em Bragança Paulista. 2) Planta doente com sintomas típicos causados por fitoplasma entre duas plantas saudáveis. 3) Partes de plantas contendo cigarrinhas coletadas no campo e preparadas para transporte. 4) Gaiolas para confinamento de insetos usados para teste de transmissão de fitoplasma em brócolis (Fotos: Julio Cesar Barbosa e Bárbara Eckstein, 2010)

Tabela 1 - Identificação das espécies de cigarrinhas confinadas nas plantas sadias de brócolis e a quantidade de insetos colocados por planta

<i>Identificação</i>	<i>Espécie</i>	<i>Quantidade de insetos</i>
Tr1	<i>Atanus nitidus</i>	3-5
Tr2	<i>Empoasca sp.</i>	10-15
Tr3	<i>Scaphytopius fuliginosus</i>	3-5
Tr4	<i>Scaphytopius fuliginosus</i>	3-5
Tr5	<i>Empoasca sp.</i>	10-15
Tr6	<i>Agalliana sticticollis</i>	3-5
Tr7	<i>Scaphytopius fuliginosus</i>	3-5
Tr8	<i>Atanus nitidus</i>	3-5
Tr9	<i>Balclutha hebe</i>	10-15
Tr10	<i>Scaphytopius fuliginosus</i>	3-5
Tr11	<i>Empoasca sp.</i>	10-15
Tr12	<i>Atanus nitidus</i>	3-5
Tr13	<i>Balchutha hebe</i>	10-15
Tr14	<i>Agallia albidula</i>	3-5
Tr15	<i>Atanus nitidus</i>	3-5
Tr16	<i>Agalliana sticticollis</i>	3-5
Tr17	<i>Balclutha hebe</i>	10-15
Tr18	<i>Agallia albidula</i>	3-5
Tr19	<i>Scaphytopius fuliginosus</i>	3-5
Tr20	<i>Atanus nitidus</i>	3-5
Tr21	<i>Agalliana sticticollis</i>	3-5
Tr22	<i>Balclutha hebe</i>	10-15
Tr23	<i>Atanus nitidus</i>	3-5
Tr24	<i>Agallia albidula</i>	3-5
Tr25	<i>Agallia albidula</i>	3-5
Tr26	<i>Agallia albidula</i>	3-5

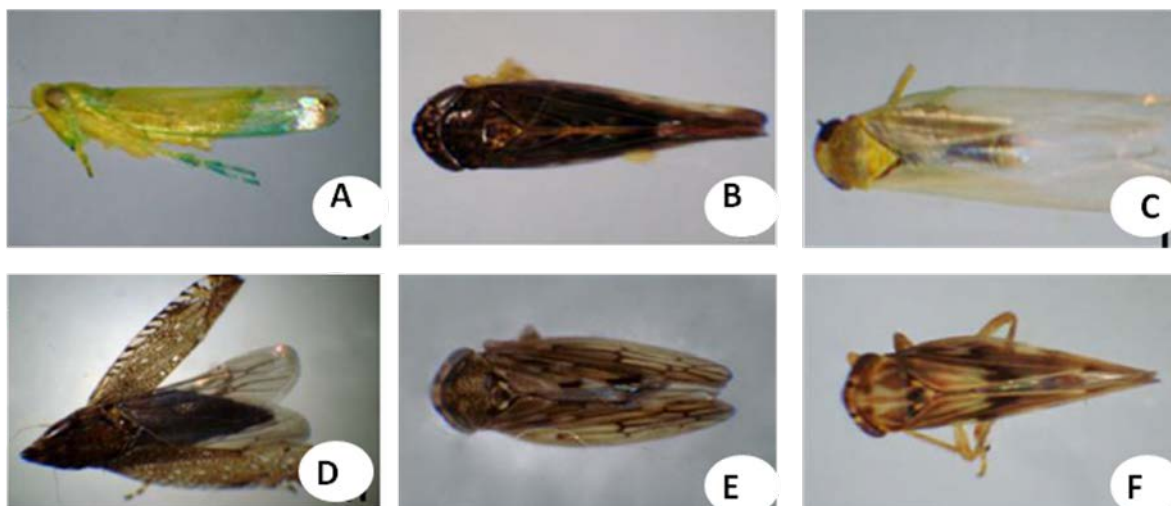


Figura 2 - Insetos sugadores de floema da família Cicadellidae capturados em área de produção de brócolis e utilizados no teste de transmissão. A) *Empoasca* sp; B) *Atanus nitidus*; C) *Balclutha hebe*; D) *Scaphytopius fuliginosus*; E) *Agalliana sticticollis*; F) *Agallia albidula* (Fotos: Julio Cesar Barbosa e Bárbara Eckstein, 2010)

2.2.2 Extração de DNA total

2.2.2.1 Extração de DNA total de plantas de brócolis

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

lavagem, denominada AW. Nova centrifugação foi feita a 6.800 g por 1 minuto, sendo descartado o produto de lavagem. Após a lavagem, foram adicionados 100 µL do reagente AE para a eluição do DNA, sendo processada a centrifugação a 6.800 g por 5 minutos. O DNA extraído foi mantido a -20°C.

2.2.2.2 Extração de DNA total dos insetos

A extração de DNA total a partir dos insetos seguiu o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987) modificado por Marzachi, Veratti e Bosco (1998). Os insetos, individualmente ou em grupos, de acordo com o seu tamanho, foram macerados dentro de tubos de 1,5mL contendo 500 µL do tampão CTAB a 60°C com o auxílio de um pistilo. Após a maceração, a suspensão foi incubada por 30 minutos a 60°C, em banho-maria. Em seguida, foram adicionados 350 µL de uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1, respectivamente, e a mistura foi agitada e submetida à centrifugação a 6.800g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de 1,5mL, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado. A mistura foi incubada a -20°C por um período de 2 horas e então centrifugada a 20.800g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo o DNA foi lavado com álcool 70% duas vezes. Após secar em temperatura ambiente, o precipitado foi ressuscitado em 20 µL de água miliQ e as amostras armazenadas a -20°C.

2.2.3 Detecção de fitoplasmas por duplo PCR com *primers* universais

O DNA total extraído de cada amostra, planta ou inseto, foi diluído em diferentes proporções de água deionizada autoclavada. Como controle negativo foi utilizado o DNA extraído de mudas sadias de brócolis. O padrão positivo foi representado pelo DNA extraído de plantas de chuchu, comprovadamente infectadas por fitoplasma. Para a detecção foram utilizados os iniciadores universais P1/Tint (DENG; HIRUKI, 1991; SMART et al., 1996) e R16F2n/R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996). O produto amplificado por P1/Tint foi usado como molde para a segunda reação, na qual foi empregado o par R16F2n/R2. Estes últimos iniciadores amplificam uma seqüência nucleotídica de aproximadamente 1.2 Kb do DNA genômico de fitoplasmas, correspondente ao gene 16S rRNA.

As seqüência dos iniciadores utilizados encontram-se descritas a seguir: P1 – 5´ AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T 3´ (DENG; HIRUKI, 1991); Tint – 5´ TCA GGC GTG TGC TCT AAC CAG C 3´ (SMART et al., 1996); R16 F2n – 5´ GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG 3´(GUNDERSEN; LEE, 1996); R16R2– 5´TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G3´(GUNDERSEN; LEE,1996).

Cada reação de PCR foi processada utilizando-se um volume final de 25 µL, contendo: 1µL de extrato de DNA diluído de cada amostra, incluindo os padrões positivo e negativo; 18,7 µL de água deionizada; 0,5µL de cada iniciador (concentração de 20 pmol/µL); 2µL de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução de 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo); 2,5µL de solução tampão 10X PCR e 0,17 µL de Amplitaq 5U/µL. Quando os iniciadores P1/Tint foram utilizados, o termociclador foi programado para 30 ciclos, compreendendo as etapas: 1 minuto a 94°C para a etapa de desnaturação do ácido nucléico, 1 minuto a 56°C para o anelamento e 2 minutos a 72°C para a extensão. Para os iniciadores R16 F2n/R2, utilizou-se um programa de 35 ciclos, compreendendo as etapas: 1 minuto a 94°C para a etapa de desnaturação do ácido nucléico, 2 minutos a 50°C para o anelamento e 3 minutos a 72°C para a fase de extensão dos iniciadores, uma única etapa inicial de 1 minuto a 94°C e uma final de 7 minutos a 72°C.

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

2.2.4 Detecção e identificação de fitoplasmas por duplo PCR com *primers* específicos

A detecção e consequente identificação de fitoplasmas por PCR em plantas de brócolis e insetos foi feita a partir de produtos obtidos com os iniciadores P1/Tint, usados na primeira reação de PCR. Os produtos da primeira reação foram submetidos à reamplificação, empregando-se os iniciadores específicos R16(III)F2/R1, os quais permitem a identificação de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII (LEE et al., 1994).

As reações de PCR e a análise por eletroforese foram processadas nas mesmas condições utilizadas para a detecção de fitoplasmas conduzidas com os iniciadores R16F2n/R2, descritas anteriormente. O padrão positivo foi representado pelo DNA extraído de plantas de chuchu infectadas pelo fitoplasma do superbrotamento, pertencente ao grupo 16SrIII. Como padrão negativo foi utilizada água deionizada autoclavada.

As seqüência dos iniciadores específicos estão descritas a seguir:

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 16S rDNA do fitoplasma

Nos casos em que houve transmissão do fitoplasma presente no inseto coletado no campo para as plantas de brócolis, o fragmento genômico correspondente ao 16S rRNA foi sequenciado. Este fragmento foi amplificado em PCR com *primers* P1/Tint e R16(III)F2/R1, a partir do DNA extraído de insetos e das plantas e enviado para laboratório especializado na determinação das seqüências nucleotídicas. Com o sequenciamento buscou-se confirmar a identidade dos fitoplasmas encontrados nas plantas e insetos, através da comparação de suas sequencias nucleotídicas. Ainda, seus fragmentos genômicos foram comparados com aquele encontrado em um fitoplasma típico representante do grupo 16SrIII-J, anteriormente identificado em plantas de brócolis naturalmente infectadas (ECKSTEIN, 2010).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Transmissão de fitoplasmas para plantas de brócolis

Dentre as 26 mudas sobre as quais foram confinados os diferentes grupos de insetos coletados no campo, a transmissão de fitoplasma foi constatada em 8 plantas, o que corresponde a 30% (Figura 3). Dentre as 8 potenciais espécies de vetores que foram testadas, cigarrinhas representantes de 4 delas transmitiram experimentalmente o fitoplasma para plantas de brócolis. As 4 espécies

transmissoras foram *Atanus nitidus*, *Balclutha hebe*, *Agalliana sticticollis* e *Agallia albidula* (Tabela 2).

A transmissão foi constatada pela detecção de fitoplasma nos tecidos das plantas, através de duplo PCR, usando-se o par de *primers* específicos para representantes do grupo 16SrIII (Figura 3). Embora portadoras do fitoplasma, as plantas não apresentaram sintomas aparentes, dentro do período de 60 dias após a remoção dos insetos que nelas permaneceram confinados. Neste caso, pode-se inferir que a quantidade inicial de inóculo depositado nas plantas pelos insetos foi muito baixa ou que não houve tempo suficiente para que o fitoplasma alcançasse uma concentração suficiente para induzir a manifestação dos sintomas esperados. A primeira hipótese pode ser suportada pelos resultados de ensaios conduzidos com milho e o fitoplasma do enfezamento, nos quais o confinamento de um único inseto infectivo por planta não resultou no aparecimento de sintomas; no entanto, o confinamento de 9 insetos infectivos por planta provocou o desenvolvimento de sintomas severos (TOFFANELLI; BEDENDO, 2002). A segunda hipótese tem por base os trabalhos com couve-flor, nos quais altas porcentagens de plantas assintomáticas apresentavam nos seus tecidos o fitoplasma associado à doença conhecida como enfezamento (RAPUSSI et al., 2012). A ocorrência de plantas sem sintomas, porém portadoras de fitoplasmas, não se constitui em fato raro, considerando-se alguns relatos de literatura. Rapussi-da-Silva (2010) detectou a presença de fitoplasmas em 61% das amostras de plantas de couve-flor assintomáticas coletadas no campo. Em repolho, Lee et al. (2003) verificou que 50% das plantas assintomáticas apresentavam fitoplasmas nos seus tecidos. Eckstein (2010) comprovou a presença destes fitopatógenos em 20% das plantas de brócolis assintomáticas e sugeriu que a ausência de sintomas poderia estar relacionada com a necessidade de períodos de incubação mais longos, durante os quais o patógeno pudesse aumentar sua concentração nos tecidos. De acordo com RAPUSSI-DASILVA (2010) a ocorrência de hospedeiros assintomáticos dificulta a correta diagnose, o que leva a subestimar a incidência da doença no campo; além disto, a ausência de sintomas pode ter implicações na epidemiologia da doença, pois plantas aparentemente sadias podem servir como fonte de inóculo, uma vez que, provavelmente, o patógeno é transmitido por vetores presentes no campo.

Tabela 2 - Relação das amostras de insetos e plantas de brócolis positivas para a presença de fitoplasmas, através de PCR e identificados através da utilização de *primers* específicos

Identificação	Espécie	PCR Insetos	PCR Brócolis
Tr1	<i>Atanus nitidus</i>	+	+
Tr2	<i>Empoasca sp.</i>	+	-
Tr3	<i>Scaphytopius fulginosus</i>	+	-
Tr6	<i>Agalliana sticticollis</i>	+	+
Tr15	<i>Atanus nitidus</i>	+	-
Tr16	<i>Agalliana sticticollis</i>	+	+
Tr17	<i>Balclutha hebe</i>	+	-
Tr18	<i>Agallia albidula</i>	+	-
Tr20	<i>Atanus nitidus</i>	+	+
Tr21	<i>Agalliana sticticollis</i>	+	-
Tr22	<i>Balclutha hebe</i>	+	+
Tr23	<i>Atanus nitidus</i>	+	+
Tr24	<i>Agallia albidula</i>	+	+
Tr25	<i>Agallia albidula</i>	+	+

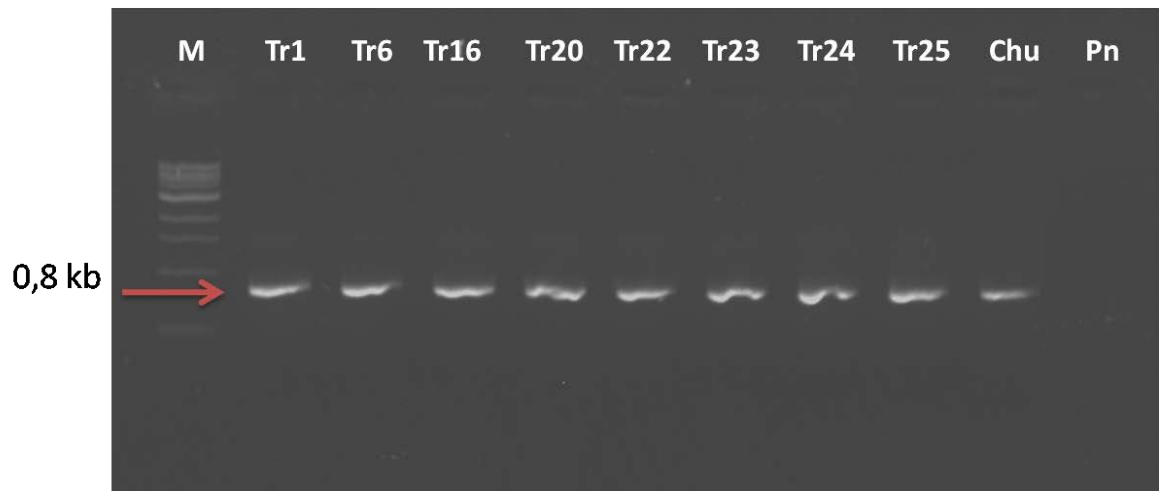


Figura 3 - Detecção molecular de fitoplasma do grupo 16SrIII em plantas de brócolis sobre as quais foram confinados grupos de cigarrinhas coletadas no campo. PCR duplo realizado com os *primers* P1/Tint seguidos dos *primers* específicos R16(III)F2 / R16(III)R1. Chu = padrão positivo do grupo 16SrIII; Pn = padrão negativo (água). Tr1; Tr6; Tr16; Tr20; Tr22; Tr23; Tr24 e Tr25 = amostras de DNA extraídas de plantas de brócolis

2.3.2 Sobrevivência dos insetos em plantas de brócolis

A sobrevivência dos insetos confinados em plantas sadias de brócolis teve curta duração. A maioria dos insetos representantes das diferentes espécies avaliadas morreu dois dias após seu confinamento nas plantas. Apenas as cigarrinhas pertencentes à Subfamília *Typhlocybinae*, gênero *Empoasca*, conseguiram sobreviver por até quatro dias.

O fato das cigarrinhas estudadas neste trabalho sobreviverem por pouco tempo nas plantas de brócolis não implica em que as mesmas não possam atuar como vetores de fitoplasmas para esta cultura. Segundo Dakhil et al. (2011) alguns vetores muitas vezes podem ser encontrados colonizando o hospedeiro doente, enquanto que outros vetores se alimentam apenas ocasionalmente da planta doente. Pilkinton e colaboradores (2004) afirmam que o inseto não necessariamente deve habitar ou preferir se alimentar da planta hospedeira do fitoplasma para ser considerado vetor da doença. Estes normalmente colonizam plantas daninhas ou outras espécies vegetais.

No entorno dos campos de cultivo de brócolis foram encontradas 14 espécies de plantas daninhas, sendo elas: *Ageratum conyzoides* (Mentrasto); *Amaranthus* sp. (Caruru); *Bidens pilosa* (Picão-preto); *Crotalaria lanceolata* (Crotalária); *Emilia sonchifolia* (Falsa-serralha); *Erigeron bonariensis* (Buva); *Ipomoea purpurea* (Corda-de-viola); *Leonurus sibiricus* (Rubim); *Lepidium virginicum* (Mentruz); *Nicandra physalodes* (Joá-de-capote); *Paulicourea marcgravii* (Erva-de-rato); *Ricinus communis* (Mamona); *Sida rhombifolia* (Guanxuma) e *Sonchus oleraceae* (Serralha amarela). Muitas delas apresentavam sintomas típicos de doenças induzidas por fitoplasmas, tais como clorose generalizada, superbrotamento, virescência, enfezamento, deformação foliar, filodia, redução de internódios e presença de folhas pequenas (ECKSTEIN, 2010). A presença de plantas daninhas sintomáticas na área de produção sugere que estas plantas podem estar atuando como fonte de inóculo destes patógenos para a cultura, ou mesmo sendo hospedeiras de vetores, suportando sua reprodução.

2.3.3 Detecção de fitoplasmas por duplo PCR com *primers* universais

As amostras de DNA extraídas das diferentes espécies de cigarrinhas e das plantas de brócolis, usadas no teste de transmissão, não geraram resultados positivos nos testes de duplo PCR conduzidos com os pares de *primers* universais P1/Tint e R16F2n/R2. A explicação para este fato torna-se difícil, uma vez que pode ocorrer pequena variação nos componentes da reação de PCR ou mesmo na temperatura de anelamento dos *primers* nas seqüências alvo. Resultados semelhantes a estes foram verificados para milho em relação à detecção do fitoplasma associado ao enfezamento vermelho (HAAS, 2010). Neste caso, embora as plantas apresentassem típicos sintomas da doença, o patógeno não foi detectado com o uso de *primers* universais em duplo PCR.

2.3.4 Detecção e identificação de fitoplasmas por duplo PCR com *primers* específicos

Fragmentos de DNA de 0,8 Kb, típicos para fitoplasmas do grupo 16SrIII, foram obtidos para 14 das 26 amostras de insetos confinados nas mudas de brócolis (Figura 4). Resultado positivo também foi obtido para o DNA extraído de plantas de chuchu sabidamente infectadas por um fitoplasma do grupo 16SrIII, usado como padrão positivo nas reações de PCR. Para os padrões negativos, representados pela água, nenhuma banda foi verificada. Os resultados positivos para a presença de fitoplasma nos tecidos dos insetos estão descritos a seguir: para a espécie *Atanus nitidus*, 4 amostras apresentaram resultados positivos para um total de 6 analisadas; para *Empoasca* sp., 1 amostra positiva para 3 analisadas; para *Scaphytopius fuliginosus*, 1 amostra positiva para 5 analisadas; para *Agalliana sticticollis*, 3 amostras positivas para 3 analisadas; para *Agallia albidula*, 2 amostras positivas para 5 analisadas; e para *Balclutha hebe*, 2 amostras positivas para 4 analisadas) (Tabela 3).

Pelos resultados obtidos nos ensaios de transmissão, 8 dos 14 grupos de insetos portadores de fitoplasma foram capazes de transmitir experimentalmente este patógeno para plantas saudáveis de brócolis. Em termos percentuais, este índice de transmissão foi de 57%, o que sugere alta viabilidade destes grupos de cigarrinhas serem capazes de atuar como vetores do fitoplasma.

Tabela 3 - Relação das amostras de insetos analisadas quanto à presença de fitoplasmas, através de PCR conduzido com *primers* específicos

Identificação	Espécie	PCR
Tr1	<i>Atanus nitidus</i>	+
Tr2	<i>Empoasca sp.</i>	+
Tr3	<i>Scaphytopius fuliginosus</i>	+
Tr4	<i>Scaphytopius fuliginosus</i>	-
Tr5	<i>Empoasca sp.</i>	-
Tr6	<i>Agalliana sticticollis</i>	+
Tr7	<i>Scaphytopius fuliginosus</i>	-
Tr8	<i>Atanus nitidus</i>	-
Tr9	<i>Balclutha hebe</i>	-
Tr10	<i>Scaphytopius fuliginosus</i>	-
Tr11	<i>Empoasca sp.</i>	-
Tr12	<i>Atanus nitidus</i>	-
Tr13	<i>Balclutha hebe</i>	-
Tr14	<i>Agallia albidula</i>	-
Tr15	<i>Atanus nitidus</i>	+
Tr16	<i>Agalliana sticticollis</i>	+
Tr17	<i>Balclutha hebe</i>	+
Tr18	<i>Agallia albidula</i>	+
Tr19	<i>Scaphytopius fuliginosus</i>	-
Tr20	<i>Atanus nitidus</i>	+
Tr21	<i>Agalliana sticticollis</i>	+
Tr22	<i>Balclutha hebe</i>	+
Tr23	<i>Atanus nitidus</i>	+
Tr24	<i>Agallia albidula</i>	+
Tr25	<i>Agallia albidula</i>	+
Tr26	<i>Agallia albidula</i>	-

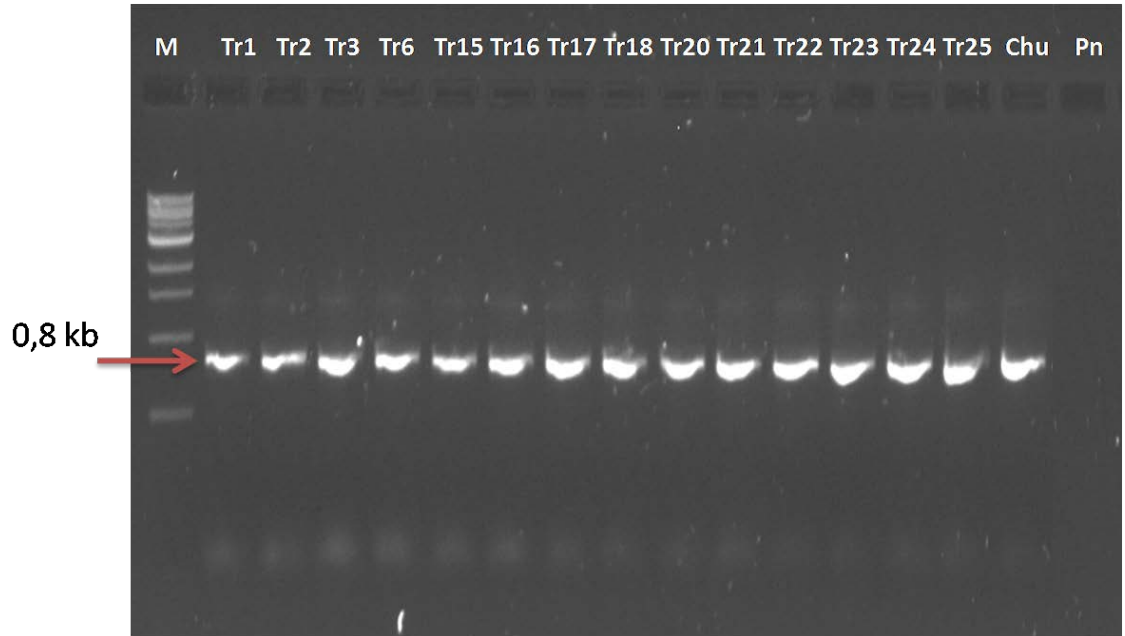


Figura 4 - Evidência da presença de fitoplasma do grupo 16SrIII em tecidos de cigarrinhas coletadas em campos de brócolis com sintomas de enfezamento, localizados na região de Bragança Paulista/SP. Amplificação de fragmentos de DNA de 0,8 kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* P1/Tint na primeira reação e *primers* específicos R16(III)F2 / R16(III)R1. M = Marcador (1kb Ladder); Tr1; Tr2; Tr3; Tr6; Tr15; Tr16; Tr17; Tr18; Tr20; Tr21; Tr22; Tr23; Tr24 e Tr25 = amostras de DNA de fitoplasmas extraídas de cigarrinhas; Chu = padrão positivo do grupo 16SrIII; Pn = padrão negativo (água)

2.3.5 Sequenciamento da região do 16S rRNA do fitoplasma transmitido por insetos para plantas de brócolis

Os resultados do sequenciamento de nucleotídeos, componentes do fragmento genômico correspondente ao 16S rRNA, confirmaram os resultados obtidos no PCR conduzido com os *primers* específicos. A similaridade entre as seqüências encontradas nos fitoplasmas presentes nas plantas e nos insetos foi maior que 99%, demonstrando o alto grau de identidade existente entre os fitoplasmas. Estes resultados permitem afirmar que o fitoplasma que infectou os insetos foi transmitido para as plantas. Os fragmentos genômicos amplificados nos fitoplasmas presentes nos insetos e nas plantas apresentaram similaridade de seqüência maior de 99%, quando comparados com as seqüências de outros fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII, considerando-se o fragmento de 0,8 resultantes do PCR conduzido com os *primers* específicos. Estes resultados são concordantes com aqueles relatados no trabalho de Eckstein (2010), no qual

fitoplasma do grupo 16SrIII foi encontrado em plantas de brócolis que apresentavam sintomas da doença denominada de enfezamento. Ainda, de acordo com o referido estudo, fitoplasma do grupo 16SrIII foi identificado em espécies de plantas daninhas que cresciam nas adjacências das culturas de brócolis.

Uma discussão mais ampla sobre o presente estudo mostra que os resultados obtidos complementam investigações anteriores conduzidas com algumas espécies de brássicas, entre elas o repolho, a couve-flor e o brócolis. Assim, Amaral Mello (2007) relatou os insetos de ocorrência mais frequente em campos de repolho e os identificou como sendo pertencentes às famílias Cicadellidae e Delphacidae, as quais abrigam importantes espécies reconhecidas como vetoras de fitoplasmas em várias partes do mundo. Esta mesma autora relatou que nos campos de repolho estudados, foram encontradas fortes evidências da relação direta entre o aumento da população de cigarrinhas e aumento da incidência da doença conhecida como enfezamento. Em ensaios conduzidos com a cultura de couve-flor, Rapussi-da-Silva (2010) identificou alta população de cigarrinhas da espécie *Balclutha hebe*. Insetos coletados no campo e confinados em plantas de couve-flor transmitiram o fitoplasma associado ao enfezamento, evidenciando esta espécie como vetora. Ainda, experimentos desenvolvidos com brócolis (ECKSTEIN, 2010) mostraram que cigarrinhas pertencentes às espécies *Atanus nitidus*, *Balclutha hebe*, *Planicephalis flavicosta* e *Scaphytopius fuliginosus*, *Agalliana sticticollis*, *Agallia albidula* e uma espécie não identificada pertencente ao gênero *Empoasca* estavam infectadas por fitoplasmas encontrados em plantas de brócolis e em algumas espécies daninhas localizadas nas proximidades da cultura. Estes resultados sugeriram que, potencialmente, estes insetos seriam capazes de atuar como vetores destes agentes fitopatogênicos, envolvidos com a doença conhecida por enfezamento do brócolis.

As espécies de cigarrinhas identificadas nos trabalhos brasileiros como possíveis vetores de fitoplasmas em brássicas não são as mesmas envolvidas com fitoplasmas que afetam esta família botânica em outras partes do mundo. No Irã, cigarrinhas da espécie *Circulifer tenellus* são responsáveis pela transmissão de fitoplasmas para a cultura do repolho (SALEHI et al., 2007), enquanto que nos Estados Unidos as espécies *Macrosteles fascifrons*, *Scaphytopius irroratus* e *Ceratagallia abrupta* são relatadas como potenciais vetores de fitoplasmas para a mesma cultura (LEE et al., 2003). Essa diferença na diversidade de espécies envolvidas com a transmissão de fitoplasmas em outras regiões do mundo e aquelas

presentes no território brasileiro é esperada e, como consequência, as espécies vetoradas aqui presentes provavelmente não sejam as mesmas relatadas em outros países (ECKSTEIN, 2010).

O conhecimento de espécies vetoradas de fitoplasmas pode contribuir para maior entendimento dos aspectos epidemiológicos relativos ao enfezamento, entre eles a gama de hospedeiros alternativos do patógeno e do inseto, a forma de distribuição da doença no campo, o período de maior ocorrência da doença, além de fornecer subsídios para a recomendação de medidas de controle mais eficientes. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que algumas espécies de cigarrinhas podem ser indicadas como vetoradas de fitoplasmas, no entanto, experimentos complementares de transmissão realizados com populações sadias e infectivas das espécies aqui estudadas poderão trazer maior conhecimento sobre os aspectos mais específicos relacionados à transmissão.

3 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo, foi concluído que cigarrinhas das espécies *Atanus nitidus*, *Agalliana sticticollis*, *Balchlutha hebe* e *Agallia albidula* transmitiram um fitoplasma do grupo 16SrIII, associado ao enfezamento do brócolis.

REFERÊNCIAS

AMARAL MELLO, A.P.O. **Identificação molecular de fitoplasma associado ao enfezamento do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) e da berinjela (*Solanum melogena*)**. 2004. 52 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

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

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

BAI, X.; ZHANG, J.; EWING, A.; MILLER, S.A.; RADEK, A.J., SCHEVCHENKO, D.V.; TSUKERMAN, K.; WALUNAS, T.; LAPIDUS, A.; CAMPEBELL, J.W.; HOGENHOUT, S. Living whit genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant host. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 188, n. 10, p. 3682-2696, 2006.

BARBOSA, J.C. **Caracterização molecular e diversidade de fitoplasmas em pomares de citros no Estado de São Paulo**. 2010. 100 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BARROS, T.S.L. **Fitoplasmas no Brasil: caracterização molecular via “Polymerase chain reaction” e “Restriction length polymorphism”**. 1997. 88 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 1997.

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.

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

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

BERTACCINI, A.; DUDUK, B. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 48, p. 355-378, 2009.

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

BERTACCINI, A.; VORÁCKOVÁ, Z.; VIBIO, M.; FRÁNOVÁ, J.; NAVRÁTIL, M.; SPAK, J.; NEBESÁRIOVÁ, J. Comparison of phytoplasmas infecting winter oilseed rape in the Czech Republic with Italian *Brassica* phytoplasmas and their relationship to the aster yellows group. **Plant Pathology**, Oxford, v. 47, p. 317-324, 1998.

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

DAKHIL, H.; HAMMAD, E.A.; EL-MOHTAR, C.; ABOU-JAWDAH, Y. Survey of leafhopper species in almond orchards infected with almond witches'-broom phytoplasma in Lebanon. **Journal of Insect Science**, Wisconsin, v. 11, p. 1-12, 2011.

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

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

DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; ZHAO, Y.; LEE, I-M.; JOMANTIENE, R.; DETWEILER, A.J.; PUTNAM, M.L. First report of a new subgroup 16SrIX-E ('Candidatus *Phytoplasma phoenicium*-related) phytoplasma associated with juniper witches' broom disease in Oregon, USA. **Plant Pathology**, London, v. 20, p. 35, 2010.

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

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

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

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

ECKSTEIN, B. **Identificação molecular de um fitoplasma associado à malformação das folhas das ornamentais *Celosia argentea* 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.

_____. **Enfezamento do brócolis:** identificação de fitoplasmas, potenciais insetos vetores e hospedeiros alternativos e epidemiologia da doença. 2010. 103 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ELLIS, P.R.; SINGH, R. A review of the host plants of the cabbage aphid *Brevicorine brassicae* (L.) (Homóptera: Aphididae) **International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants: West Palaearctic Regional Section Bulletin**, Darmstadt, v. 16, p. 192-201, 1993.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura:** agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: Viçosa USV. 2000. 412 p.

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

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

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2009:** anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2009. p.235-258.

GIORDANO, L.B. Melhoramento de Brássicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 9, p. 16-20, 1983.

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

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

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

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

HAAS, I.C.R. **Potenciais hospedeiros alternativos para o fitoplasma e o espiroplasma, agentes do enfezamento do milho, e alterações bioquímicas em plantas infectadas pelo espiroplasma.** 2010. 73 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

HANBOONSONG, Y.; CHOOSAI, C.; PANYIM, S.; DAMAK, S. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 11, p. 97-103, 2002.

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

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

HOGENHOUT, S.A.; MUSIC, M.S. Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics – what have we learnt? In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. **Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors**. Wallingford: CAB International, 2010. chap. 2, p. 19-36.

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

IRPCM PHYTOPLASMA/SPIROPLASMA WORKING TEAM – PHYTOPLASMA TAXONOMY GROUP. 'Candidatus Pphytoplasma', a taxon for the wall-less, non helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. **International Journal of Systematic Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1243-1255, 2004.

KAWAKITA, H.; SAIKI, T.; WEI, W.; MITSUHASHI, W.; WATANABE, K.; SATO, M. Identification of Mulberry dwarf phytoplasma in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 9, p. 909-914, 2000.

KHADHAIR, A-H.; DUPLESSIS McALISTER, P.; AMPONG-NYARKO, K.; BAINS, P. Transmission and characterization of phytoplasma diseases associated with infected potato cultivars in Alberta. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 619, p. 167-176, 2003.

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

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

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

- LAMBAIS, M.R. Biologia molecular e engenharia genética na fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1: Princípios e conceitos, cap. 26, p. 507-538.
- LANA, M.M.; TAVARES, S.A. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Distrito Federal. **50 hortaliças como comprar, conservar e consumir**. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2010. 290 p.
- LEE, I.M.; DAVIS, R.E. Mycoplasmas with infect plants and insects. In: MANILOFF, J.; McELHANSEY, R.N.; FINCH, L.R.; BASEMAN, F.B. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 379-390.
- LEE, I-M.; DAVIS, R.E; GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Phytoplasma: phythopatogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, Washington, v. 54, p. 221-252, 2000.
- LEE, I.M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; DAVIS, R.E.; BARTOSZYK, I.M. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16SrRNA and ribossomal protein gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 48, p. 1153-1169, 1998.
- LEE, I.M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; HAMMONS, R.W.; DAVIS, R.E. Use of micoplasmalike organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested PCR assay to detect MLO infections in a single host plant. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 559-566, 1994.
- LEE, I-M.; MARTINI, M.; BOTTNER, K.D.; DANE, R.A.; BLACK, M.C.; TROXCLAIR, N. Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 1368-1377, 2003.
- MARCONE, C.; RAGOZZINO, A. Detection of phytoplasmas in Brassica spp. in Southern Italy and their characterization by RFLP analysis. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Stuttgart, v. 102, p. 449-460, 1995.
- MARCONE, C.; RAGOZZINO, A.; SEEMULLER, E. Detection and identification og phytoplasmas infecting vegetable, ornamental and forage crops in southern Italy. **Journal Plant Pathology**, Bari, v. 79, p. 211-217, 1997.
- MARINGONI, A.C. Doenças das crucíferas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 285-292.
- MAROTO-BORREGO, J.V.M. **Horticultura herbácea especial**. 4ed. Madrid: Mundi-Prensa, 1995. 590 p.
- MARTIN, R.R.; JAMES, D.; LÉVESQUE, C.A. Impacts of molecular diagnostic Technologies on plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 207-239, 2000.

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

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

MELLO, A.P.O.M. **Identificação molecular 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.

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.

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

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T.; PIMENTEL, J.P. List of phytoplasma hosts in Brazil. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, p. 129-139, 2007.

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

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

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>>. Acesso em: 09 out. 2012.

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

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

PEREIRA, T.B.C. **Identificação molecular de um fitoplasma do grupo 16SrI-B em plantas de soja.** 2011. 65 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

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

RAPUSSI, M.C.C.; ECKSTEIN, B.; FLORES, D.; HAAS, I.C.R.; AMORIM, L.; BEDENDO, I.P. Cauliflower stunt associated with a phytoplasma of subgroup 16SrIII-J and spatial pattern of disease. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 133, p. 829-840, 2012.

RAPUSSI-DA-SILVA, M.C.C. **Enfezamento da couve-flor: identificação molecular de fitoplasma, 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.

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

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

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

SÃO PAULO (ESTADO). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Instituto de Econômica Agrícola. **Levantamento censitário de unidades de produção agrícola do Estado de São Paulo: 2007/2008.** São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa/mapaculturas/pdf/brocolis.pdf>>. Acesso em: 01 out. 2012.

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

SILVA, E.G.; BEDENDO, I.P.; CASAGRANDE, M.V.; MORAES, V.A. Molecular identification and phylonetic 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.; SCHENEIDER, B.; BLOMQUIST, C.L.; GUERRA, L.J.; HARRISON, N.A.; AHRENS, U.; LORENZ, K-H; SEEMULLER, E.; KIRKPATRICK, B.C. Phytoplasm-specific PCR primer based on sequence of the 16S-23S rDNA spacer region. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2988-2993, 1996.

SOUZA, R.J. Origem e botânica de algumas brássicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 9, p. 10-12, 1983.

STRETEN, C.; GIBB, K.S. Phytoplasma diseases in sub-tropical and tropical Australia. **Australasian Plant Pathology**, Sydney, v. 35, p. 129-146, 2006.

TEDESCHI, R.; FERRATO, V.; ROSSI, J.; ALMA, A. Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. **Plant Pathology**, Bari, v. 55, p. 18-24, 2006.

TEDESCHI, R.; VISENTIN, C.; ALMA, A.; BOSCO, D. Epidemiology of Apple proliferation (AP) in northwestern Italy: evaluation of the frequency of AP-positive psyllids in naturally infected populations of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 142, p. 285-290, 2003.

TOFFANELLI, C.M.; BEDENDO, I.P. Efeito da população infectiva de *Dalbulus maidis* na produção de grãos e no desenvolvimento de sintomas do enfezamento vermelho do milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 104-108, 2002.

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

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

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

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

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

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

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