

**FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA
MESTRADO PROFISSIONAL EM
CONTROLE DE DOENÇAS E PRAGAS DOS CITROS**

LUÍS FERNANDO BIANCO

**Investigação da presença de fitoplasmas em *Crotalaria juncea* (L.),
com ênfase ao fitoplasma associado ao HLB**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Nelson Arno Wulff

Araraquara
Novembro-2011

LUÍS FERNANDO BIANCO

**Investigação da presença de fitoplasmas em *Crotalaria juncea* (L.),
com ênfase ao fitoplasma associado ao HLB**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Nelson Arno Wulff

Araraquara
Novembro-2011

B473i Bianco, Luis Fernando
Investigação da presença de fitoplasmas em *Crotalaria juncea* (L.), com ênfase ao fitoplasma associado ao HLB/ Luis Fernando Bianco. – Araraquara, 2011.
31 p.

Dissertação (Mestrado) – Fundo de Defesa da Citricultura
Orientador: Nelson Arno Wulff

1. Huanglongbing 2. Fitoplasma 3. Crotalária 4. PCR 5. Sintomas
I. Título

LUIS FERNANDO BIANCO

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da Citricultura - Fundecitrus, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade.

Araraquara, 11 de novembro de 2011.

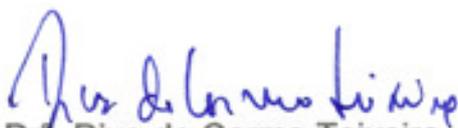
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Nelson Arno Wulff (Orientador)
Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS, Araraquara/SP



Dr^a. Viviani Vieira Marques Marçal
IAPAR – Instituto Agronômico do Paraná, Londrina/PR



Prof^a. Dr^a. Diva do Carmo Teixeira
Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS, Araraquara/SP

Ao meu filho **Matheus Torrecilha Bianco** que esta obra sirva-lhe de inspiração e que possa trazer-lhe futuramente incentivo ao estudo das Ciências.

Dedico

A minha querida esposa **Luciene Andrea Nunes Torrecilha Bianco** pelo amor, compreensão e apoio na realização dos meus sonhos.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao Fundecitrus pela oportunidade de participação no Curso de mestrado Profissional em Controle de Doenças e Pragas dos Citros, em especial ao departamento científico.

Aos professores do Curso, pela dedicação, competência e habilidade de gerar e transferir conhecimento.

Ao Prof. Dr. Nelson Arno Wulff pela dedicação, convívio, paciência e solicitude na orientação conduzida.

À técnica de laboratório Elaine Cristina Martins pela disponibilidade e eficiência nos trabalhos realizados.

Aos funcionários do laboratório Daniela, Deividson, Eder, Fernanda, Jean, Juliana, Rodrigo e Sidnei pelo empenho e participação direta na realização dos trabalhos

Ao Vagner R. Russo pela elaboração dos mapas.

A todos os funcionários do Fundecitrus que direta, ou indiretamente contribuíram para o bom andamento do primeiro ciclo.

A todos os companheiros de curso pela boa convivência e laços de amizade formados ao longo deste tempo.

Aos dirigentes da Coordenadoria de Defesa Agropecuária CDA/SAA-SP pela permissão e autorização, para participação no curso, em especial a Miguel Antonio Guercio.

A todos os colegas de trabalho da CDA pelo incentivo e em especial ao grande amigo Luiz Carlos Rocha, maior incentivador desde o início.

Investigação da presença de fitoplasmas em *Crotalaria juncea* (L.), com ênfase ao fitoplasma associado ao HLB

Autor: LUÍS FERNANDO BIANCO

Orientador: Prof. Dr. NELSON ARNO WULFF

RESUMO

A citricultura brasileira e toda a sua cadeia produtiva tem no Huanglongbing (HLB), doença do citros mundialmente reconhecida como a mais destrutiva, a sua maior preocupação. No Estado de São Paulo a descoberta de um fitoplasma do grupo 16Sr IX, infectando plantas de citros, foi associado ao HLB, apresentando sintomas indistinguíveis daqueles observados pela infecção com *Ca. L. americanus* ou *Ca. L. asiaticus*. Em 2008, o fitoplasma do grupo 16Sr IX, associado aos sintomas do HLB foi detectado em plantas de crotalária (*Crotalaria juncea*), apresentando sintomas de vassoura de bruxa. Uma investigação da presença de fitoplasmas em crotalária, com ênfase ao fitoplasma do HLB, foi realizada neste estudo. Plantas de crotalária próximas ao estágio de florescimento, demonstrando sintomas associados à infecção por fitoplasmas, foram coletadas para extração de DNA e testes de detecção de fitoplasmas através da PCR. Foram utilizados oligonucleotídeos específicos para o fitoplasma do HLB (grupo 16Sr IX) e oligonucleotídeos universais para detectar fitoplasmas. Amostras positivas para testes com oligonucleotídeos específicos, foram sequenciadas e identificadas com similaridade ao fitoplasma associado ao HLB do grupo 16Sr IX. Amostras negativas na PCR com oligonucleotídeos grupo-específicos e positivas para oligonucleotídeos universais foram sequenciadas e identificados, tendo sido encontrados fitoplasmas dos grupos 16Sr I, III, VII e XV. O fitoplasma do HLB foi encontrado em amostras de plantas de crotalária na região central e norte de São Paulo e não foi detectado na região sul, estando presente em 70% das plantas com fitoplasma. O superbrotamento é um bom indicativo da ocorrência de fitoplasmas e a virescência mostrou-se relacionada e é um indicativo da ocorrência de fitoplasma do HLB em plantas de crotalária.

Palavras chave: Huanglongbing, fitoplasma, crotalária, PCR, sintomas.

Detection of 16Sr IX phytoplasmas in Sunn Hemp (*Crotalaria juncea*) in São Paulo State

Author: LUÍS FERNANDO BIANCO

Advisor: Prof. Dr. NELSON ARNO WULFF

ABSTRACT

Brazilian citrus industry is facing the occurrence of the most devastating citrus disease ever, Huanglongbing (HLB). HLB is worldwide known as the more serious citrus disease. In Sao Paulo State, besides the occurrence of *Candidatus Liberibacter americanus* and *Ca. L. asiaticus*, a 16Sr IX group phytoplasma was associated with HLB symptoms, indistinguishable from those caused by liberibacter. This phytoplasma is called HLB phytoplasma and was found widespread in citrus orchards, although at low incidence. The same phytoplasma was found in Sunn Hemp (*Crotalaria juncea*) in 2008 and witches'-broom was commonly found associated with 16Sr group IX detection. The aim of this work was to assess the phytoplasma diversity in Sunn Hemp with emphasis at the detection of group 16Sr IX phytoplasma and to establish an association between the occurrence of HLB phytoplasma and symptoms. Sunn Hemp samples were harvested close to the blooming period. Plants were selected in the field when showing symptoms associated to phytoplasma infection. Samples were photographed and tissue employed to DNA extraction and PCR detection of phytoplasmas. We employed universal primers to amplify phytoplasmas in general and group specific primers for 16Sr group IX. PCR products were sequenced to allow grouping of phytoplasmas. We identified five phytoplasma groups in 48 out of 99 Sunn Hemp plants, belonging to five phytoplasma groups 16Sr I, III, VII, IX and XV. The most prevalent phytoplasma was the group 16Sr IX, present in 70% of the samples, found in central and north São Paulo State. The occurrence of HLB phytoplasma in Sunn Hemp samples, showing 100% of similarity to the citrus phytoplasma, was highly related to virescence and the second most conspicuous symptom for this infection was witches'-broom.

Keywords: Huanglongbing, Phytoplasma, Sunn hemp, PCR detection, symptom.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Crotalária	2
2.2 Huanglongbing	3
2.3 Fitoplasmas.....	4
2.4 Fitoplasmas associados ao citros	5
2.5 Fitoplasmas do Grupo IX.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 Material Vegetal.....	8
3.2 Extração de DNA	9
3.3 PCR	9
3.3.1 Nested PCR com oligonucleotídeos universais para fitoplasma.....	10
3.3.2 Semi-Nested PCR com oligonucleotídeos específicos ao grupo 16Sr IX.....	11
3.4 Sequenciamento	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1 Sintomas observados nas plantas de crotalária.....	12
4.3 Ocorrência de fitoplasmas nas amostras de crotalária.....	14
4.4 Análise de sequenciamento do produto da PCR.....	18
5. CONCLUSÕES	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

A citricultura tem considerável importância econômica, podendo ser mensurada pelo tamanho de sua cadeia produtiva. Em 2010, com aproximadamente 165 milhões de árvores produzindo, gerou mais de 200 mil empregos diretos. A exportação de suco de laranja traz de US\$ 1,5 a 2,5 bilhões por ano ao país, com a arrecadação de US\$ 189 milhões em impostos (Neves et al., 2010).

Desde o início da exploração comercial, na década de 30, a expansão da citricultura esteve diretamente ligada, além de fatores econômicos, à ocorrência de pragas e doenças que influenciaram seu desenvolvimento. Como exemplo, podemos citar a ocorrência da “Tristeza” em 1937, que em poucos anos eliminou cerca de nove milhões de plantas, alastrando-se para todas as regiões citrícolas do País. A Tristeza afeta laranja doce enxertada no cavalo laranja azeda, restando vivas somente as plantas de pé-franco ou enxertadas em porta-enxertos tolerantes, como no caso do limoeiro cravo. Este fato determinou o limoeiro cravo a se constituir como porta-enxerto mais usado pelos citricultores (Donadio et al., 2005). Outro exemplo que influenciou no desenvolvimento da citricultura foi a ocorrência do cancro cítrico em 1957, em Presidente Prudente (SP). A campanha de erradicação dessa doença passou para o âmbito federal com a Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC). Para auxiliar financeiramente essa campanha foi criado o FUNDECITRUS em 1977, um fundo mantido pela associação de citricultores e produtores de suco, que ao longo de sua existência incorporou atividades de levantamento, erradicação, pesquisa e educação em doenças dos citros.

Estima-se que na última década, as pragas e doenças foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de árvores, sendo as principais a Clorose Variegada dos Citros, a Morte Súbita dos Citros, o Cancro Cítrico e o Huanglongbing (Neves et al., 2010). Atualmente o Huanglongbing é a preocupação mais séria dos citricultores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Crotalária

As leguminosas são espécies empregadas na adubação verde por formarem associações simbióticas com bactérias fixadoras de Nitrogênio (N_2) resultando em aporte de quantidades expressivas deste nutriente ao sistema solo-planta (Perin et al., 2003), contribuindo com a nutrição das culturas subsequentes (Andreola et al., 2000).

Segundo Igue (1984), cerca de 2/3 do N total das leguminosas são de origem atmosférica (N_2) e o restante absorvido, numa porcentagem total de N que varia entre 1,5 e 3,0% no resíduo orgânico vegetal produzido. Outra característica importante das leguminosas é a baixa relação C/N, quando comparada a plantas de outras famílias, este aspecto, aliado à presença de compostos solúveis, favorece sua decomposição e mineralização por microrganismos do solo e a reciclagem de nutrientes.

Na crotalária, uma planta da família das leguminosas, a fixação biológica de N_2 é de 57%, com produção de fitomassa 108% maior que a vegetação espontânea e incorporando ao solo 89 a 173 kg/ha de nitrogênio (Perin et al., 2004).

O desenvolvimento de leguminosas em cultivo intercalado ao citros sem manejo pós-plantio obteve resultados de reciclagem e incorporação de quantidades significativas de nutrientes ao solo, destacando-se o N, K, Ca e P, e possibilitando substituir ou reduzir uma parcela dos adubos nitrogenados químicos (Silva et al., 2002). Os maiores valores de biomassa e reciclagem de nutrientes foram obtidos com a crotalaria, feijão guandu e feijão-deporco. Para a crotalária foi obtido o maior valor de N, com 183 kg/ha considerando plantio em área total.

Prefeituras da região de Ribeirão Preto (SP) estimularam o plantio da leguminosa *Crotalaria juncea* que, segundo os relatos, diminui a proliferação do mosquito da dengue (Folha de São Paulo- Caderno Cotidiano/Ribeirão 05/02/2011). A crotalária é usada como um atrativo para as libélulas, insetos predador das larvas e dos adultos do mosquito *Aedes aegypti*. Taquaritinga foi a primeira cidade da região a distribuir sementes da planta, seguida por Orlândia, Morro Agudo e Batatais. As crianças recebem as sementes em projetos educativos e são instruídas a plantar em casa, as prefeituras também as utilizam em projetos paisagísticos nas praças e canteiros.

O cultivo da crotalária está amplamente distribuído no Estado de São Paulo (Figura 1), é utilizado como adubo verde em varias culturas, em diferentes épocas do ano, além de

possuir diversos métodos de plantio e incorporação da massa verde ao solo que podem resultar na sua existência como planta invasora ou planta “guaxa”.

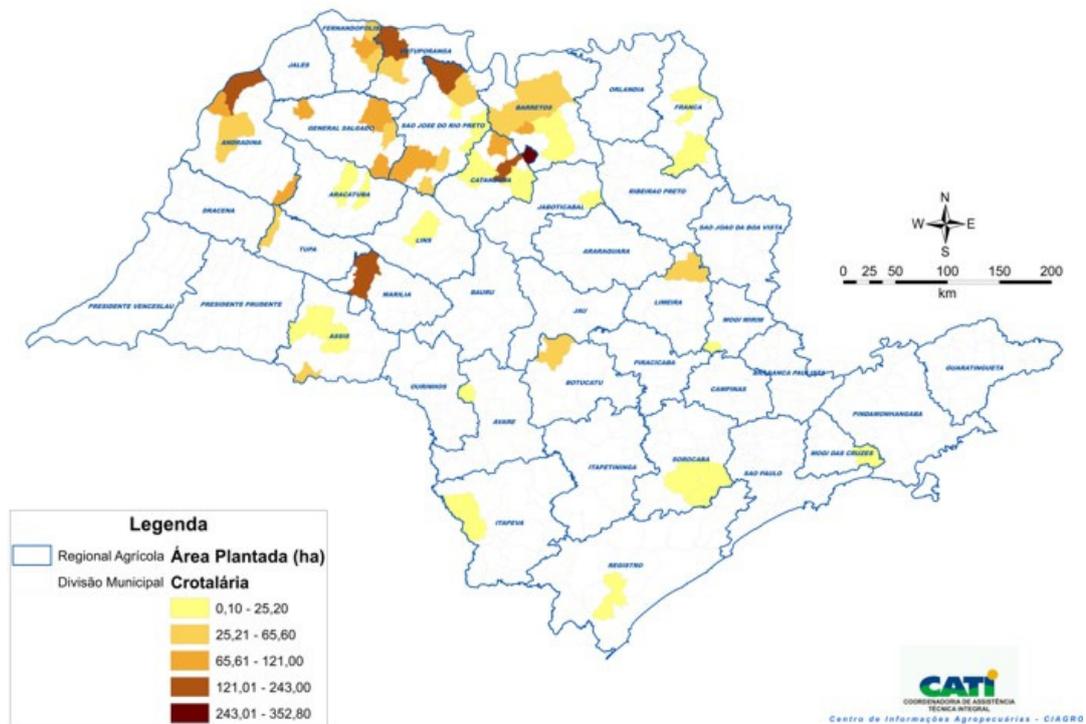


Figura 1. Distribuição do cultivo de crotalária no Estado de São Paulo de acordo com dados do biênio 2007/2007 em levantamento da CATI (<http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa/>).

2.2 Huanglongbing

O Huanglongbing (HLB) está associado à ocorrência das bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), *Ca. Liberibacter africanus* (Laf) e *Ca. Liberibacter americanus* (Lam) (Machado et al., 2010), é considerada por pesquisadores a doença mais importante e destrutiva da citricultura mundial (Bové, 2006; Gottwald et al., 2007).

No Brasil o HLB foi detectado na região de Araraquara, em março de 2004 (Colleta Filho et al., 2004), onde foi encontrada a espécie Las, posteriormente foi determinada uma nova espécie, denominada *Ca. L. americanus* (Teixeira et al., 2005). Não há relato da ocorrência da espécie Laf no Brasil (Teixeira et al., 2010). O HLB também ocorre nos Estados do Paraná e Minas Gerais, estando presente em todas as regiões citrícolas do Estado de São Paulo. Em 2010 a incidência atingiu 24% dos pomares paulistas, continuando a tendência de crescimento observada nos anos anteriores (Belasque Jr. et al., 2010).

As variedades comerciais são suscetíveis ao HLB (Boscariol-Camargo et al., 2010; Halbert & Manjunath, 2004) e não há métodos de controle curativos, não sendo recomendada a poda dos ramos afetados (Lopes et al., 2007) e não se conhece citros resistente ao HLB

(Folimonova et al., 2009). Recomenda-se o manejo regional do HLB, com o controle do vetor e erradicação de plantas sintomáticas sistematicamente (Bassanezi et al., 2010). A adoção de medidas de manejo impacta aumentando os custos de produção, com isso diminui o lucro líquido do citricultor, o que afeta a sustentabilidade do sistema de produção (Fukuda et al., 2010).

2.3 Fitoplasmas

Fitoplasmas são organismos semelhantes a bactérias, porém sem parede celular, pleomórficos, com tamanhos que variam entre 200 e 800 nm, não cultiváveis *in vitro*, residentes no floema de plantas infectadas, transmitidos por insetos sugadores e pertencentes à classe dos mollicutes (Lee et al., 2000).

Os fitoplasmas são transmitidos de planta a planta por insetos sugadores de seiva pertencentes a famílias Cicadellidea e Fulgoridea (Lee et al., 2000), assim como por psilídeos. Podem ser transmitidos por propagação vegetativa (Lee & Davis 1992), mas não por sementes, embora interfiram no vigor das plantulas originadas de sementes de plantas infectadas (Faghihi et al., 2011).

A partir dos estudos de Doi (1967), muitas doenças de plantas anteriormente conhecidas por amarelos, que eram atribuídas aos vírus, foram atribuídas aos “mycoplasma-like organisms” (MLOs). Atualmente estes organismos são identificados como fitoplasmas, com a designação *Candidatus* Phytoplasma para acomodar os organismos caracterizados e identificados. O termo *Candidatus* é utilizado para bactérias não cultiváveis, que tem caracterização exclusivamente molecular. Isto advém da incapacidade de cultivar os fitoplasmas em cultura axênica, o que impede que os postulados de Koch sejam cumpridos (Anônimo, 2004).

A classificação do fitoplasma é feita com base nos perfis de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*) de produtos da PCR ou do seqüenciamento de fragmentos amplificados por PCR do gene 16S rRNA (RNA ribossomal) (Anônimo, 2004). Por esse sistema, os fitoplasmas são classificados em 13 grupos denominados de 16Sr I a 16Sr XIII (além de outros grupos, em seqüência, designados posteriormente) e em subgrupos denominados por letras (por ex. subgrupo 16Sr III-A). Na nomenclatura, espécies tentativas de fitoplasmas são designadas com o termo *Candidatus*, seguido do binômio em latim Phytoplasma sp., como por exemplo foi designada a primeira espécie tentativa: *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia, para o agente associado à doença da vassoura de bruxa da lima ácida (Grupo 16Sr II) (Zreik et al., 1995).

Os sintomas de plantas infectadas por fitoplasmas são caracterizados por uma série de anormalidades relacionadas com o crescimento e desenvolvimento da planta, sugerindo a ocorrência de profundos distúrbios no balanço hormonal ou reguladores de crescimento (Chang 1998; Chang & Lee 1995). Os sintomas podem se expressar na forma de: amarelecimento de folhas; encurtamento de internódios; proliferação de ramos auxiliares; superbrotamento ou envassouramento (proliferação anormal de gemas); enfezamento generalizado com folhas pequenas e enroladas; folhas em roseta na porção terminal do caule; filodia (desenvolvimento dos órgãos florais em tecidos foliares); virescência de flores (desenvolvimento de flores verdes e perda do pigmento normal das flores); esterilidade de flores; frutos deformados e diminutos, entre outros. A caracterização de um produto gênico do fitoplasma *Candidatus Phytoplasma asteris*, demonstrou que este fitoplasma condiciona uma desregulação na distribuição de auxinas no hospedeiro, ocasionando os sintomas associados à vassoura de bruxa ou superbrotamento (Hoshi et al., 2009).

As doenças atribuídas aos fitoplasmas causam severos prejuízos em diversas culturas, como o amarelecimento letal do coqueiro (*Coconut lethal yellowing*), responsável pela morte de milhões de plantas no Caribe; o amarelo do pessegueiro (*Peach yellows*), causa de abandono de grandes áreas tradicionalmente produtoras de pêssego nos Estados Unidos; os amarelos da videira (*Grapevine yellows*), dentre as mais sérias doenças desta cultura na Europa; o superbrotamento do sândalo (*Sandal Spike*), causa de relevantes perdas na produção de madeira e óleo dessa espécie vegetal na Índia (Lee et al., 2000).

No Brasil, uma ampla diversidade de gêneros e espécies vegetais é afetada por doenças causadas por fitoplasmas (Kitajima, 1994). A presença de fitoplasmas tem sido relatada em culturas de grande importância econômica, como exemplo o enfezamento vermelho do milho (Bedendo et al., 1998), o superbrotamento do maracujazeiro (Ribeiro & Bedendo 2007), o superbrotamento do chuchu (Montano et al., 2000), o cálice gigante do tomateiro (Melo, 2007), o enfezamento da berinjela (Barros, 2002) o lenho mole da macieira (Ribeiro et al., 2007), a síndrome do amarelecimento foliar da cana de açúcar (Silva et al., 2006), entre outras.

2.4 Fitoplasmas associados ao citros

Em 2007 um fitoplasma do grupo 16Sr IX foi descoberto infectando plantas de citros com sintomas indistinguíveis dos sintomas associados ao Huanglongbing (Teixeira et al., 2008). Estas plantas apresentavam folhas com mosqueado, frutos assimétricos, com sementes abortadas, albedo com espessura maior que o normal e filetes alaranjados partindo da inserção

do pedúnculo e foram encontradas nos municípios de Barretos e Colômbia, até então livres do HLB (Teixeira et al., 2008).

Com a descoberta do fitoplasma ficou caracterizado que no estado de São Paulo o HLB está associado a três bactérias, duas alfaproteobactérias (*Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus*) ambas transmitidas pelo vetor *Diaphorina citri* (Yamamoto et al., 2006) e um fitoplasma (grupo 16Sr IX), possivelmente transmitido pela cigarrinha *Scaphytopius marginelineatus* (Marques, 2011).

Plantas infectadas com o fitoplasma associado ao HLB foram encontradas em diferentes regiões do estado, indicando que fontes externas de inoculo e vetor estejam bem distribuídos pelo Estado de São Paulo, podendo ser fonte de inoculo plantas daninha, culturas anuais, leguminosas utilizadas como adubo verde, plantas ornamentais ou da flora nativa (Teixeira et al., 2008; Teixeira et al., 2009).

O primeiro relato de um fitoplasma infectando plantas do gênero *Citrus* ocorreu no Sultanato de Omã, na Ásia. *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia foi associado à ocorrência da vassoura de bruxa da lima ácida ou “Witches’s-Broom Disease of Lime” (Zreik et al., 1995). Esta doença, que tem como característica a presença do sintoma de vassoura de bruxa nos ramos atacados, causa grandes perdas em plantas de limão galego, não tendo ainda relato da sua ocorrência no Brasil.

Posterior à detecção do fitoplasma do grupo IX, associado aos sintomas do HLB em São Paulo, foi detectado um fitoplasma do grupo 16SrI-B causando sintomas semelhantes ao HLB em citrus na província de Guangdong, na China (Chen et al., 2009). No Brasil fitoplasmas dos grupos 16SrII e 16SrVII também foram detectados em citrus, sem estarem associados aos sintomas do Huanglongbing ou qualquer outra doença descrita (Barbosa et al., 2010).

2.5 Fitoplasmas do Grupo IX

Fitoplasmas do grupo 16Sr IX (Pigeon pea witches’-broom group) encontram-se presentes em diferentes regiões do mundo infectando uma gama de plantas como feijão guandu, vinca, amendoeira, videira, berinjela e citros (Martini et al., 2007; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Dois fitoplasmas pertencentes ao grupo 16Sr IX recebem o “status” taxonômico de *Candidatus* Phytoplasma sendo eles o *Ca. Phytoplasma omanense*, associado à vassoura de bruxa da *Cassia itálica* (*Cassia witches'-broom*, CWB) em Omã (Al-Saady et al., 2008) e *Ca.*

Phytoplasma phoenicium para o fitoplasma associado a vassoura de bruxa da amêndoa no Líbano e no Irã (Verdin et al., 2003).

Além dos citrus, fitoplasmas do grupo 16Sr IX foram detectados no Brasil em vinca (*Catharanthus roseus*, Apocynaceae) (Barros et al., 1998; Eckstein et al., 2009; Bedendo et al., 1999), podendo esta planta atuar como fonte de inóculo.

Em 2008, o fitoplasma do Grupo 16Sr IX associado aos sintomas do huanglongbing foi detectado em plantas de crotalária (*Crotalaria juncea*), apresentando sintomas de vassoura de bruxa. (Wulff et al., 2009).

Em função da ocorrência do fitoplasma, associado ao HLB, em crotalária, é necessário investigar a distribuição deste fitoplasma neste hospedeiro nas regiões citrícolas do estado de São Paulo e associar a sintomatologia em plantas de crotalária com a ocorrência do fitoplasma do HLB.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Plantas de *Crotalaria juncea* próximas ao estágio de florescimento foram coletadas em regiões citrícolas do Estado de São Paulo, entre os meses de maio de 2010 e fevereiro de 2011, nos municípios de Angatuba, Agudos, Bocaina, Catanduva, Ibirá, Itápolis, Lençóis Paulista, Promissão e Votuporanga (Tabela 1).

Para cada área de cultivo de crotalária encontrada, intercalada com citrus ou não, foram delimitados cinco blocos ao acaso, com área de cem metros quadrados por bloco (5 x 20 m). Dentro de cada bloco, todas as plantas de crotalária foram inspecionadas, sendo coletadas amostras das plantas que apresentaram anormalidades relacionadas com o crescimento e desenvolvimento, passíveis de serem sintomas de infecção por fitoplasmas como: amarelecimento de folhas; encurtamento de internódios; proliferação de ramos auxiliares; superbrotamento ou vassouramento; enfezamento generalizado, com folhas pequenas e enrolado; folhas em roseta na porção terminal do caule; filodia; virescência de flores.

Nas coletas de Angatuba, Agudos, Bocaina e Itápolis também foram coletadas amostras externas aos cinco blocos. Em Lençóis Paulista, as plantas com sintomas foram coletadas em meio ao cultivo de cana de açúcar, onde não foi possível estabelecer os cinco blocos para coleta.

Tabela 1. Georreferenciamento da área de cultivo de crotalária onde foram feitas amostragens para análise de sintomas e detecção de fitoplasmas.

Município	Coordenadas do talhão (WGS 84)
Agudos	S 22° 28' 49,0" / W 48° 56' 54,1"
Angatuba	S 23° 27' 07,9" / W 48° 34' 40,3"
Bocaina	S 22° 10' 31,8" / W 48° 30' 18,6"
Catanduva	S 21° 09' 28,7" / W 48° 59' 24,2"
Ibirá	S 21° 06' 45,5" / W 49° 08' 00,0"
Itápolis	S 21° 36' 00,7" / W 48° 53' 48,6"
Lençóis Paulista	S 22° 41' 33,2" / W 48° 49' 59,1"
Promissão	S 21° 29' 11,9" / W 49° 46' 31,3"
Votuporanga	S 20° 27' 21,9" / W 50° 03' 50,9"

No laboratório as amostras foram lavadas com água e detergente neutro, secas em papel toalha, fotografadas e classificadas quanto aos sintomas apresentados.

Para a extração de DNA foram empregados as nervuras das folhas ou os ramos na região do sintoma ou anomalia apresentada. Estes órgãos foram picados com lâmina de aço e armazenados a - 20°C.

3.2 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada com 500 mg do material (partes de caule, folhas ou flores picadas) colocadas em saco plástico com rede plástica interna e maceradas no homogeneizador Homex 6 (Bioreba, Suíça) seguindo o protocolo de extração com CTAB (Murray & Thompson, 1980) adaptado conforme Teixeira et al. (2005, 2008). O macerado foi transferido para microtubo, sendo incubado por 30 minutos em banho Maria a 65°C, seguido de centrifugação a 17.900 g por 5 minutos. O sobrenadante (0,9 mL) foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 0,6 V de uma mistura de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v). As fases foram misturadas com a inversão do tubo e o sobrenadante foi precipitado através de centrifugação a 17.900 g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 0,6 V de isopropanol, sendo armazenado 30 minutos a - 4°C. O DNA foi precipitado por centrifugação a 17.900 g por 20 minutos, com posterior lavagem do pelete com etanol 70%. Esta etapa foi repetida uma vez. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao pelete 0,9 mL de etanol 70%, centrifugado a 17.900 g por 10 minutos. Esta etapa foi efetuada duas vezes. O pelete foi seco por 6 minutos em evaporador rotativo a vácuo e dissolvido em 50µL de água ultrapura. O DNA foi armazenado a - 20°C até sua utilização.

Como controle positivo para a ocorrência do fitoplasma foi utilizado uma amostra de crotalária positiva em PCR e confirmada por sequenciamento como fitoplasma do HLB. Como controle negativo foi empregado uma amostra de citros sadio proveniente de estufa telada.

3.3 PCR

Foram feitos testes de detecção através da PCR para identificar as amostras portadoras de fitoplasma. Foram realizados dois tipos de análise para cada amostra. Todas as amostras foram avaliadas para a presença de fitoplasma com os oligonucleotídeos universais para fitoplasma e com os oligonucleotídeos específicos para o fitoplasma do HLB. Desta maneira

podemos avaliar a ocorrência de fitoplasma do HLB, assim como, a presença de fitoplasma de outros grupos na amostra.

Na reação da PCR foram incluídos amostras controle negativo (citros sadio), controle positivo (crotalaria com fitoplasma do grupo 16Sr IX) e controle da reação (somente componentes da PCR sem DNA alvo).

3.3.1 Nested PCR com oligonucleotídeos universais para fitoplasma

A primeira reação da PCR foi feita com oligonucleotídeos P1 e P7 (Tabela 2) empregando-se 1 µL de DNA genômico obtido conforme descrito no item 3.2. O mix para a reação foi preparado em volume final de 40 µL, contendo tampão da PCR (Tris-HCl pH 8,4 20 mM; KCl 50 mM), dNTPs a 0,2 mM; MgCl₂ a 2 mM, oligonucleotídeos a 0,5 µM e 1,5 U de Taq polimerase (Invitrogen). A amplificação foi feita em um termociclador (Eppendorf Master Cycler Gradient) programado para um ciclo inicial de 94° C por 4 minutos seguidos de 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 58° C por 30 segundos e 72° C por 1 minuto e trinta segundos, seguidos de um ciclo final de 72° C por 7 minutos.

Tabela 2. Sequencia dos oligonucleotídeos utilizados nas reações da PCR e no sequenciamento do produto da PCR.

Nome do oligonucleotídeo	Sequencia nucleotídica (5' – 3')	Referência	Fitoplasma Alvo
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	Deng & Hiruki, 1991	Universal
P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	Schneider et al., 1995	Universal
fU5	CGGCAATGGAGGAAACT	Seemüller et al., 1994	Universal
rU3	TGTTACAAAGAGTAGCTGAA	Seemüller et al., 1994	Universal
rp(IX)F2	GCACAAGCTATTTTAATGTTTACACCC	Martini et al., 2007	Grupo IX
rp(IX)R2	CAAAGGGACTAAACCTAAAG	Martini et al., 2007	Grupo IX
rp_citrus_fw3	CGCACCTCAGTTATCTGAAAAA	Wulff, N.A. (dados não publicados)	Grupo IX HLB

A segunda reação da PCR ou Nested PCR, foi feita com os oligonucleotídeos fU5e rU3 (Tabela 2) empregando-se 1 µL do produto da primeira PCR diluído 100 vezes. O mix para a reação foi preparado em volume final de 40 µL, contendo tampão da PCR (Tris-HCl pH 8,4 20 mM; KCl 50 mM), dNTPs a 0,2 mM; MgCl₂ a 2 mM, oligonucleotídeos a 0,5 µM e

1,5 U de Taq polimerase (Invitrogen). A amplificação foi feita em um termociclador (Eppendorf Master Cycler Gradient) programado para um ciclo inicial de 94° C por 4 minutos seguidos de 35 ciclos de 94° C por 45 segundos, 55° C por 45 segundos e 72° C por 45 segundos, seguido por um ciclo final de 72° C por 7 minutos.

3.3.2 Semi-Nested PCR com oligonucleotídeos específicos ao grupo 16Sr IX

A primeira reação da PCR foi feita com oligonucleotídeos rp(IX)F2 e rp(IX)R2 (Tabela 2) empregando-se 1 µL de DNA genômico obtido conforme descrito no item 3.2. O mix para a reação foi preparado conforme descrito no item 3.3.1. A amplificação foi feita em um termociclador (Eppendorf Master Cycler Gradient) programado para um ciclo inicial de 95°C por 2 minutos seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido por um ciclo final de 72°C por 7 minutos.

A segunda reação, Semi-Nested, foi feita com oligonucleotídeos rp_citrus_fw3 e rp(IX)R2 (Tabela 2) empregando-se 1 µL do produto de PCR da primeira reação diluído 100 vezes e repetindo os demais componentes. A amplificação foi feita em um termociclador (Eppendorf Master Cycler Gradient) programado para um ciclo inicial de 95°C por 2 minutos seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos, seguido por um ciclo final de 72°C por 7 minutos.

A análise dos produtos de amplificação na PCR foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM. O DNA foi corado com brometo de etídio e visualização em transluminador com luz UV.

3.4 Sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit “Wizard clean up PCR and gel extraction” (Promega), conforme recomendação do fabricante. As amostras foram checadas quanto à qualidade e quantidade em eletroforese de agarose.

Os produtos da Nested PCR (item 3.3.1) foram sequenciados com os oligonucleotídeos fU5 e rU3 (Tabela 2) e os produtos da Semi-Nested PCR (item 3.3.2) foram sequenciados com o oligonucleotídeo rp(IX)R2 (Tabela 2). O sequenciamento de Sanger foi realizado com o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems) no centro de sequenciamento da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Jaboticabal.

As sequências de nucleotídeos obtidas foram editadas com o auxílio do programa CodonCodeAligner vs 3.7.1 (CodonCode Corporation) e analisadas quanto a similaridade com o algoritmo Blastn na base de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para a identificação dos fitoplasmas foram avaliados os parâmetros cobertura da sequência, E-value e a identidade máxima da sequência nucleotídica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sintomas observados nas plantas de crotalária

Os sintomas observados em amostras de crotalária testadas para fitoplasmas foram caracterizados conforme a seguinte descrição. Amarelecimento (AM), planta com folhas amareladas, aspecto de amarelecimento generalizado (Figura 2 A); brotação anormal (BA), brotação anormal no caule principal e ramos da planta, porém não excessiva a ponto de ser considerado superbrotamento ou vassoura de bruxa (Figura 2 B); clorose (CL), manchas cloróticas no limbo foliar delimitada ou não pela nervura (Figura 2 C); encaracolamento (EC), talo afilado, encaracolado no ápice com excessiva brotação de folhas normais ou



Figura 2. Sintomas observados nas plantas de crotalária amostradas. A – amarelecimento; B – brotação anormal; C – clorose; D – encaracolamento; E – desfolha; F – folhas miúdas.

miúdas (Figura 2 D); desfolha (DF), falta de folhas em regiões da planta como ápice ou ramos (Figura 2 E); folhas miúdas (FM), planta com folhas de tamanho menor em relação a folhas saudáveis (Figura 2 F); folha retorcida (FR), folha com o limbo retorcido (Figura 2 G); mosaico (MS) (Figura 2 H); ramificação anormal (RA), planta com emissão de ramos menores, maiores ou em maior número que as plantas normais (Figura 2 I); virescência (VR), flor verde, com pétalas verdes ou com aparência de órgãos foliares ou botões florais modificados (Figura 2 J); superbrotamento ou vassoura de bruxa (WB), brotações excessivas ao longo do caule principal (Figura 2 L); ou superbrotamento com a ocorrência de folhas pequenas e uniformes em tamanho (Figura 2 M).



Figura 2 (continuação). Sintomas observados nas plantas de crotalária amostradas. G – folha retorcida; H – mosaico; I – ramificação anormal; J – virescência; L – superbrotamento ou vassoura de bruxa; M – superbrotamento com folhas pequenas e uniformes.

Avaliação da metodologia de amostragem

A amostragem foi inicialmente programada em cinco blocos de 100 m², distribuídos a partir de um ponto ao acaso na área de plantio de crotalária, intercalada com citros ou não, onde todas as plantas de crotalária dos blocos foram analisadas quanto à presença de anomalias características para a presença de fitoplasmas. As plantas com sintomas foram coletadas para análise em laboratório.

Devido à dificuldade de se encontrar plantas sintomáticas nos blocos, quando lançados ao acaso na área de plantio de crotalária, a amostragem programada foi aplicada a partir da primeira planta sintomática encontrada em caminhamento ao acaso. As plantas sintomáticas geralmente foram encontradas próximas umas das outras em um raio de até 5 m. Estas plantas formavam reboleiras, podendo estar localizadas na bordadura, ou na base do terraço de curva de nível, próximo a imperfeições do terreno, ou lugares onde havia plantas de crotalária com melhor desenvolvimento vegetativo. Na coleta em Lençóis Paulista não foi possível estabelecer os cinco blocos para coleta, pois as plantas foram coletadas em meio ao cultivo de cana de açúcar.

Desta forma observamos que a melhor maneira para encontrar plantas sintomáticas de crotalária foi através de caminhamento ao acaso dentro da área de cultivo de crotalária, sendo que o posicionamento e lançamento ao acaso dos blocos não se mostrou efetivo em encontrar as plantas sintomáticas. Entretanto, o uso de bloco é necessário para delimitar uma área a ser amostrada para a coleta de plantas com sintomas associados à infecção por fitoplasma.

Em todas as localidades amostradas, foram encontradas plantas de crotalária com sintomas suspeitos de infecção por fitoplasma. Após a análise previamente estabelecida, externamente aos blocos foram encontradas plantas com sintomatologia de superbrotamento ou virescência, que também foram coletadas para análise. Nas localidades de Angatuba, Agudos, Bocaina e Itápolis também foram coletadas amostras fora dos cinco blocos experimentais.

4.3 Ocorrência de fitoplasmas nas amostras de crotalária

Nos nove municípios onde houve a coleta de amostras de plantas de crotalária (Figura 2), houve a detecção de fitoplasmas através dos testes de PCR utilizando oligonucleotídeos universais. Entretanto a detecção de fitoplasmas do grupo IX em amostras de crotalária somente foi positiva em seis municípios (Figura 2).

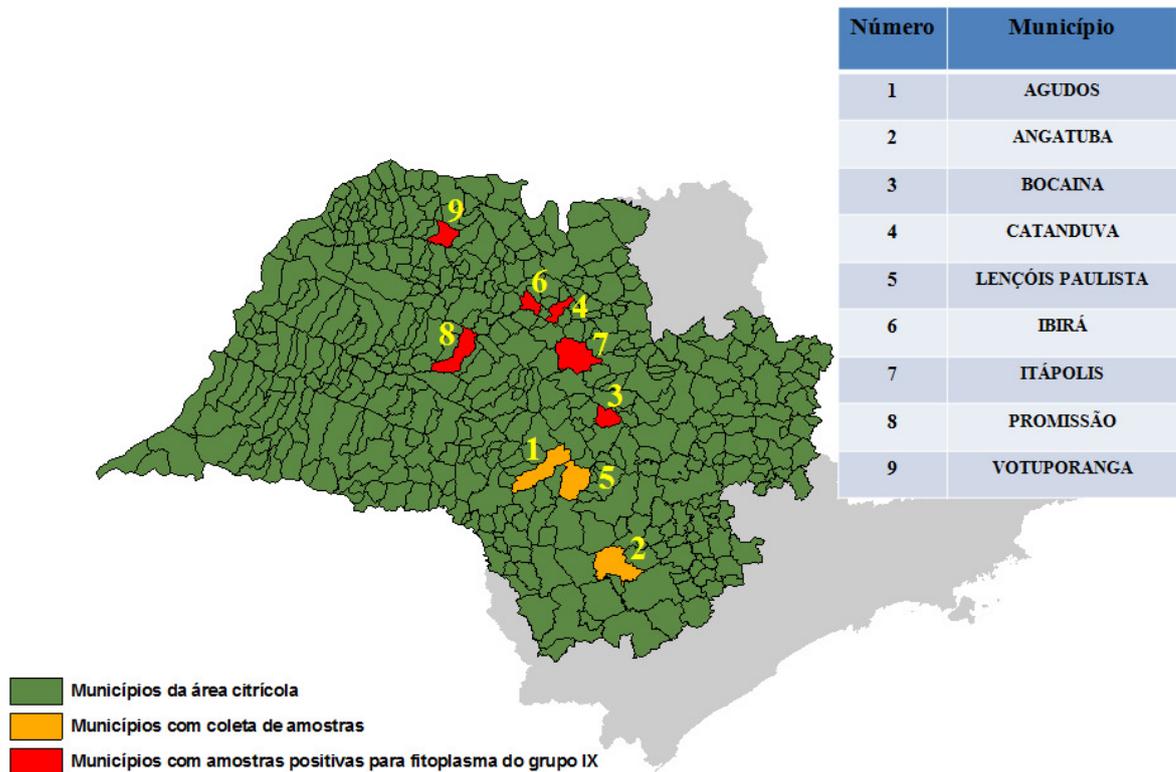


Figura 3. Municípios onde foram feitas amostragens em áreas de crotalária para análise de sintomas e detecção de fitoplasmas, com destaque aos municípios onde foi detectada a presença de fitoplasmas do HLB (hachurados em vermelho).

Das 99 plantas de crotalária com sintomas suspeitos para a presença de fitoplasma, 48 foram positivas para a presença de fitoplasmas quando testado pelo Nested PCR, com oligonucleotídeos universais para fitoplasmas. Destas, 30 foram positivas para a presença do fitoplasma do HLB quando testado com Semi-Nested PCR com oligonucleotídeos específico para este fitoplasma (Tabela 3). Nos municípios de Bocaina, Catanduva, Ibirá, Itápolis, Promissão e Votuporanga (Figura 3), foram coletadas as 30 plantas de crotalária que foram positivas para o fitoplasma do HLB.

Tabela 3. Plantas de crotalária com amplificação positiva para a presença de fitoplasma nas reações da PCR.

Municípios	Amostras		
	Total	Positiva para fitoplasma ^a	Positivas para fitoplasma do HLB ^b
Agudos	5	L119; L121; L122	–
Angatuba	17	L17	–
Bocaina	6	L92; L93; L94; L95; L96	L92; L93; L94; L95; L96
Catanduva	18	L42; L49; L50; L54; L57	L50
Ibirá	22	L19; L23; L25; L31; L32; L33; L34	L19; L23; L25
Itápolis	10	L110; L111; L112; L113; L114; L115; L116	L110; L111; L112; L113; L114
Lençóis Paulista	4	L124; L125; L126	–
Promissão	7	L74; L75; L76; L85; L86; L87; L88	L74; L76; L85; L86; L87; L88
Votuporanga	10	L64; L65; L66; L67; L68; L69; L70; L71; L72; L73	L64; L65; L66; L67; L68; L69; L70; L71; L72; L73
Total	99	48	30

^a – Plantas de crotalária infectadas por fitoplasmas, testadas positivas na reação Nested PCR para ocorrência de fitoplasmas (oligonucleotídeos fU5 e rU3); Cada amostra está indicada por um código iniciando pela letra L.

^b – Plantas de crotalária positivas na reação de semi-Nested PCR para ocorrência do fitoplasma do HLB (oligonucleotídeos rp_citrus_fw3 e rp (IX)R2).

As 30 plantas positivas para o fitoplasma do HLB apresentaram como sintomas predominantes a virescência (13 plantas) e o superbrotamento (14 plantas), sendo que 7 plantas apresentaram ambos os sintomas (Tabela 4). Os outros sintomas variaram de brotação anormal (14 plantas), ramificação anormal (5 plantas) a sintomas foliares (amarelecimento, folha retorcida, deficiência, clorose e mosaico). Assim, podemos categorizar como principais sintomas comuns à ocorrência de infecção do fitoplasma do HLB o superbrotamento e a virescência. Como não sabemos em que estágio de desenvolvimento a planta foi afetada, o sintoma de brotação anormal pode ser um estágio inicial do sintoma de superbrotamento ou

vassoura de bruxa. Todas as 30 amostras que foram positivas na Semi-Nested PCR, específica para o fitoplasma do HLB, também foram positivas na Nested PCR universal, com oligonucleotídeos para detectar a presença de todos os grupos de fitoplasmas (Tabela 3). A amostra positiva na Semi-Nested PCR, específico para o fitoplasma do HLB, não descarta a possibilidade de infecção por mais de uma espécie de fitoplasma. Por este motivo, foi realizado o sequenciamento dos produtos da Nested PCR universal para identificar o(s) fitoplasma(s) presente(s) nestas plantas.

Tabela 4. Amostras de crotalária (*C. juncea*) categorizadas de acordo com os sintomas apresentados e resultado da amplificação na reação da PCR para fitoplasma (universal) e na reação da PCR para fitoplasma do grupo 16Sr IX (específico).

Sintomas ^a	Número de plantas com o sintoma ^b	Número de plantas positivas para fitoplasma ^c	Número de plantas positivas para fitoplasma do HLB ^d
AM	9	8	3
BA	43	22	14
CL	11	8	2
EC	18	2	0
DF	1	0	0
FM	32	8	2
FR	5	2	0
MS	1	1	1
RA	13	6	5
VR	13	13	13
WB	20	18	14

^a – sintomas descritos na Figura 3;

^b – número de plantas de crotalária que apresentaram o sintoma descrito. Uma mesma planta pode apresentar mais do que um dos sintomas descrito nesta tabela;

^c – número de plantas de crotalária que apresentaram o sintoma descrito, positiva na Nested PCR;

^d – número de plantas de crotalária que apresentaram o sintoma descrito, positiva na Semi-nested PCR;

4.4 Análise de sequenciamento do produto da PCR

Amostras com resultado negativo na Semi-Nested PCR para fitoplasma do HLB (item 3.3.2), mas com resultado positivo para a ocorrência de fitoplasmas (Nested PCR com oligonucleotídeos universais, item 3.3.1), foram sequenciadas para seu posicionamento dentro dos grupos de fitoplasmas através do Blastn (Tabela 5). Amostras que foram positivas para a ocorrência do fitoplasma do HLB também foram incluídas no sequenciamento, para confirmação da identificação.

Tabela 5. Identificação dos fitoplasmas através do sequenciamento da Nested PCR com os oligonucleotídeos fU5 e rU3.

Grupo	Quantidade de amostras	Fitoplasma (número de acesso ^a)	E-value ^b
16Sr I	5	Grass-male plant phytoplasma (HM579902)	0.0
16Sr III	5	Passion fruit witches'-broom phytoplasma (GU292082)	0.0
16Sr VII	4	Artemisia witches'-broom phytoplasma (DQ989180)	0.0
16Sr IX	28	Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma (HQ423159)	0.0
16Sr XV	3	<i>Candidatus</i> Phytoplasma brasiliense (FR717540)	0.0

^a – GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

^b – E-value obtido pela análise no algoritmo blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Vinte e quatro amostras (L19, L50, L64, L65, L66, L67, L68, L69, L70, L71, L72, L73, L74, L76, L86, L88, L92, L93, L94, L95, L96, L110, L112, L113) que foram positivas na Semi-Nested PCR específica ao fitoplasma do HLB, foram amplificadas e sequenciadas com oligonucleotídeos universais (fU3 e rU5, Tabela 2) e foram identificadas como fitoplasma do HLB, pois apresentaram 100% de identidade, cobertura de sequência e e-value de 0 (Tabela 5). Desta forma, confirmam a análise específica da Semi-Nested PCR para fitoplasma do HLB.

Três amostras (L23, L25 e L85) que foram positivas na Semi-Nested PCR para fitoplasma do HLB (item 3.3.2) e que tiveram o produto da PCR universal sequenciado (Nested PCR com oligonucleotídeos universais, item 3.3.1) foram identificadas com a ocorrência de fitoplasmas de outros grupos (Tabela 5). Na amostra L23 foi detectado

fitoplasma do grupo 16Sr III e na amostras L25 e L85 foi detectado o fitoplasma do grupo 16Sr I. Como estas amostras foram positivas na Semi-Nested PCR para fitoplasma do HLB, podemos sugerir que há ocorrência de infecção mista ou dupla infecção nestas amostras, do fitoplasma do HLB com o outro fitoplasma detectado. A especificidade da PCR para o grupo 16Sr IX (Martini et al., 2007) foi confirmada com o sequenciamento do produto da PCR de L23 com o oligonucleotídeo rp(IX)R2, tendo sido obtido alta similaridade no Blastn com fitoplasmas do HLB (grupo 16Sr IX). O produto de L25 e L85 somente foram sequenciados com os oligonucleotídeos universais fU5 e rU3. A amplificação majoritária do fitoplasma do grupo 16Sr III (L23) e 16Sr I (L25 e L85) pode ter sido obtida pela maior quantidade de células destes fitoplasmas em relação ao fitoplasma do HLB (grupo 16Sr IX).

Quatro amostras (L31, L75, L115 e L116) negativas na Semi-Nested PCR para fitoplasma do HLB foram sequenciadas com oligonucleotídeos universais e foram identificadas como fitoplasma do HLB (Tabela 5). Assim, embora o Semi-Nested PCR para fitoplasma do HLB seja mais apropriado para a identificação direta do tipo de fitoplasma presente na amostra de crotalária, a Nested PCR universal é mais sensível na detecção dos fitoplasmas. Entretanto, a Nested PCR universal não identifica o fitoplasma infectante, sendo necessária uma análise adicional, como o sequenciamento do produto da Nested PCR ou uma análise de PCR-RFLP (“restriction fragment length polymorphism” do produto da PCR) (Lee et al., 2000; Seemüller et al., 1994). A maior eficiência da Nested PCR universal pode advir do fato que o Nested PCR empregado tem como molde sequencias gênicas do operon ribossomal, o qual está presente em duas cópias no genoma dos fitoplasmas. Os genes de proteínas ribossomais, como os genes *rpl* e *rps*, são genes de cópias únicas e são o alvo da Semi-Nested PCR para fitoplasma do HLB. Assim, comparando número de alvos por genoma ou por cromossomo, temos duas cópias no caso da Nested PCR universal e uma cópia no caso da Semi-Nested PCR para fitoplasma do HLB. Além disso, a eficiência das reações pode não ser idêntica, aliado ao fato da PCR grupo específico ser uma reação de Semi-Nested PCR. Assim, sugere-se que para aumentar a sensibilidade da Semi-Nested PCR para o fitoplasma do HLB, seja empregado uma Nested PCR ou preferencialmente uma PCR em tempo real.

As amostras L19, L23, L50, L70, L74, L92 e L110, positivas na Semi-Nested PCR (item 3.3.2) específico para o fitoplasma do HLB, foram sequenciadas com o oligonucleotídeo rp(IX)R2 e identificadas com similaridade ao fitoplasma associado ao HLB (Wulff et al., dados não publicados). Este PCR amplifica uma região gênica codificante de proteínas associadas ao ribossomo, conhecidas como genes *rpl* e *rps* (Martini et al., 2007). Isto demonstra que a reação Semi-Nested PCR foi eficiente na detecção do fitoplasma do HLB.

As outras amostras que foram negativas na Semi-Nested PCR para fitoplasma do HLB e que tiveram seu produto de Nested PCR universal seqüenciado foram classificadas em 4 grupos (Tabela 5). Quatro amostras (L17, L119, L121 e L122) foram identificadas como fitoplasma do grupo 16Sr VII (*Artemisia witches'-broom phytoplasma*). Cinco amostras (L23, L33, L124, L125 e L126) foram identificadas como fitoplasma do grupo 16Sr III (*Passion fruit witches'-broom phytoplasma* ou grupo X-disease). Cinco amostras (L25, L49, L54, L57 e L85) foram identificadas como fitoplasma do grupo 16Sr I (*Grass-male plant phytoplasma*). Três amostras (L32, L34 e L42) foram identificadas como fitoplasma do grupo 16Sr XV (*Candidatus Phytoplasma brasiliense*).

O sintoma de superbrotamento ou vassoura de bruxa foi encontrado em duas formas distintas. No primeiro tipo (Fig 2 L) o superbrotamento foi acompanhado de folhas parcialmente enroladas ou retorcidas, folhas de diversos tamanhos e frequentemente acompanhado de virescência. Todas as plantas com estas características foram positivas para o fitoplasma do HLB, o que pode ser um indício de relação do sintoma com a presença deste fitoplasma. No segundo tipo (Figura 2 M) o superbrotamento foi caracterizado pela presença de folhas menores, uniformes em tamanho e sem deformidades, não sendo observado virescência. Foram encontradas três plantas com estas características (Figura 2 M) em Lençóis Paulista e estas foram negativas para fitoplasma do HLB, embora tenha sido detectada a ocorrência de fitoplasma do grupo III nestas amostras.

Os sintomas de superbrotamento ou vassoura de bruxa (WB) e o sintoma virescência (VR), foram observados em 20 e 13 amostras, respectivamente. Quando testados para presença de fitoplasmas (oligonucleotídeos universais), 90 e 100% destas amostras, respectivamente, foram positivas indicando que estes sintomas estiveram diretamente relacionados com a presença de fitoplasmas (Tabela 4).

Do mesmo modo, os sintomas de brotação anormal (BA) (43 amostras) e folhas miúdas (FM) (32 amostras) foram positivos para a presença de fitoplasma em 51% e 25% das amostras respectivamente, indicando baixo relacionamento do sintoma com a presença de fitoplasma.

As amostras com sintomas de amarelecimento (AM) (9 amostras), clorose (CL) (11 amostras) e mosaico (MS) (1 amostra) foram positivas para a presença de fitoplasma em 88%, 72% e 100%, das amostras, indicando relacionamento com a presença de fitoplasma. Entretanto, o número pequeno de amostras com estes sintomas limita a correlação de sintomas com a presença de fitoplasmas.

Os sintomas de encaracolamento da haste (EC) (18 amostras) e folhas retorcidas (FR) (2 amostras), com 11% e 40% de amostras positivas, respectivamente, apresentaram um baixo relacionamento com a presença de fitoplasmas. Uma análise prévia de plantas de crotalaria com encaracolamento indicou que este sintoma está fracamente associado com a ocorrência de fitoplasma do HLB (Wulff, comunicação pessoal) e, portanto somente uma pequena quantidade de amostras com este sintoma foi coletado. Nos testes específicos para detectar a presença do fitoplasma do HLB, todas as 13 amostras com sintoma de virescência foram positivas para este fitoplasma, indicando a existência de relação entre o sintoma e a presença do fitoplasma do HLB em plantas de crotalaria. Este sintoma foi encontrado sempre em associação com outro sintoma de brotação excessiva, sendo 14 amostras com superbrotamento (WB) e 1 amostra com brotação anormal (BA).

O sintoma de superbrotamento (WB) apresentou 14 plantas positivas nos testes para detecção do fitoplasma do HLB (70% das amostras deste sintoma). Como temos dois tipos distintos de WB (Figura 2 L e Figura 2 M) e considerando o sintoma de WB encontrado nas três amostras de Lençóis Paulista como uma categoria diferente (Figura 2 M), podemos considerar 82% das amostras com superbrotamento (Figura 2 L) positivas para este fitoplasma, sendo um sintoma indicativo de sua presença.

As outras categorias de sintomas apresentaram poucas amostras para permitir relação com a ocorrência de fitoplasmas.

A identificação de quatro fitoplasmas, além do fitoplasma do HLB (grupo 16Sr IX) nas amostras de crotalaria, indica que esta planta hospeda uma alta diversidade de fitoplasmas. Além dos fitoplasmas dos grupos 16Sr I, III, VII, IX e XV, identificados neste trabalho, já foram detectados fitoplasma do grupo 16Sr II (GenBank AB558143), grupo 16Sr III (Barros et al., 1998), grupo 16Sr V (Mello et al., 2004) e fitoplasma do grupo 16Sr IX em crotalaria (*C. juncea*) (Wulff et al., 2009). Fitoplasma do grupo 16Sr III foi detectado em *Crotalaria lanceolata* (Eckstein, 2010). Fitoplasma do grupo 16Sr I (*Ca. P. asteris*) foi identificado em *C. spectabilis* na Índia (Kumar et al., 2010). Fitoplasmas pertencentes ao grupo 16Sr VII foram descritos no Brasil por Barros et al., (2002). Fitoplasmas deste grupo estão presentes em uma ampla área geográfica da América do Sul e até o momento somente foram detectados em hospedeiras herbáceas (Meneguzzi et al., 2008). Fitoplasma do grupo 16Sr XV (*Candidatus Phytoplasma brasiliense*) foi encontrado em vinca (Montano et al., 2001) e recentemente foi detectado em guanxuma (*Sida rhombifolia*) (Eckstein et al., 2011) no Brasil. Fitoplasmas do grupo 16Sr I foram identificados no Brasil infectando Erigeron (Bianchini e Bedento, 2000), videira (Neroni et al., 2006), cana-de-açúcar (Silva et al.,

2006a), milho (Bedendo et al., 1998), primavera – *Bougainvillea spectabilis* (Silva et al., 2006b) e no dendezeiro (Brioso et al., 2006). Fitoplasmas destes grupos (16Sr I, III, VII, IX e XV) já haviam sido relatados no Brasil em diversas plantas. Entretanto, a detecção de fitoplasmas do grupo 16Sr I, VII e XV em crotalária não está relatada na literatura consultada.

As cinco amostras identificadas como fitoplasma do grupo 16Sr III (L23, L33, L124, L125 e L126) apresentaram sintomas de brotação anormal e superbrotamento (vassoura de bruxa). A identificação de crotalária portadora de fitoplasma do HLB através de sintoma é até o momento imprecisa, pois as características analisadas não são excludentes. O superbrotamento é um bom indicativo, mas está associado à ocorrência de fitoplasmas dos grupos 16Sr III e IX. Ademais, Mello et al., (2004) relatam um fitoplasma do grupo 16Sr V infectando crotalaria e incitando sintomas de superbrotamento, assim como em Myanmar um fitoplasma do grupo 16Sr II causa superbrotamento (AB558143). Entretanto, a virescência está diretamente relacionada com a ocorrência de fitoplasma do HLB. Desta forma, a associação de virescência com superbrotamento, é um bom indicativo da ocorrência de fitoplasma do HLB em crotalária. Porém, devemos ressaltar que plantas sem estes sintomas podem estar infectadas pelo mesmo fitoplasma. Das quatro amostras que foram positivas para fitoplasma do grupo 16Sr I (L25, L49, L54 e L57), três apresentavam amarelecimento. Das três amostras que foram positivas para fitoplasma do grupo 16Sr XV (L32, L34 e L42) o sintoma associado foi de brotação anormal. Assim, não há relação absoluta entre sintomatologia e presença de fitoplasmas destes grupos. Fitoplasma do grupo 16Sr IX foram detectados no Brasil em vinca (*Catharanthus roseus*) (Barros et al., 1998; Eckstein et al., 2009; Bedendo et al., 1999), em citros (Teixeira et al., 2008) e em crotalária (*C. juncea*) (Wulff et al., 2009). Neste trabalho mostramos que 30 plantas de crotalária estavam infectadas com o fitoplasma do HLB. Outras quatro amostras que foram negativas nesta PCR foram amplificadas com oligonucleotídeos universais e o sequenciamento deste produto da PCR as identificou como fitoplasma do HLB. Assim, do universo de 48 plantas de crotalária amostradas com fitoplasma, ao menos 34 estavam infectadas com o fitoplasma do HLB (70% das plantas).

Recentemente foi demonstrada a capacidade da cigarrinha *Scaphytopius marginelineatus* em adquirir o fitoplasma do HLB a partir de plantas de citros sintomáticas (Marques, 2011). No mesmo trabalho o autor relata a possível transmissão deste fitoplasma de citros para citros, com uma baixa eficiência de transmissão (Marques, 2011). A capacidade desta cigarrinha em transmitir o fitoplasma do grupo 16Sr IX, associado ao HLB, de plantas de crotalária para plantas cítricas está sendo avaliada em projeto de pesquisa realizado no

Fundecitrus. Toloy et al. (2011) relataram que *S. marginelineatus* adquire o fitoplasma do grupo 16Sr IX de crotalária com maior eficiência do que adquirido de citros. Entretanto, experimentos de transmissão do fitoplasma com esta cigarrinha de crotalaria para citros estão em andamento. Pela capacidade de aquisição do fitoplasma na crotalária, há possibilidade da cigarrinha *S. marginelineatus* transmitir o fitoplasma da crotalária para citros. Teixeira et al. (2008) relatam que provavelmente a fonte de inoculo do fitoplasma não seja as plantas cítricas, devido a baixa incidência de plantas afetadas. Cabe lembrar que a crotalária é utilizada como adubo verde, seja nas entrelinhas de pomares cítricos, como na renovação de cana-de-açúcar e outras situações, onde não é feito o controle de pragas através da aplicação de inseticidas. Assim, podemos especular que o número de insetos vetores, como por exemplo as cigarrinhas de floema, que visitam a cultura de crotalária não estão sob nenhuma forma de controle químico e isto pode responder pela diversidade de fitoplasmas encontrados na cultura. Além disso, a crotalária é suscetível a uma ampla gama de fitoplasmas e particularmente pode ser um reservatório de fitopatógenos de importância para culturas agrícolas, como no caso de citros.

Neste trabalho observamos que é mais fácil encontrar plantas sintomáticas através de caminhamento aleatório e que para encontrar plantas de crotalária com fitoplasma do HLB devem-se observar plantas com sintomas de virescência e superbrotamento. O fitoplasma do HLB foi o predominante em nossa amostragem, presente em 70% das plantas com fitoplasma. Plantas de crotalária com o fitoplasma do HLB foram encontradas na região central e norte e não foi detectada na região sul (Figura 2). Esta distribuição coincide com o predomínio da cultura (Figura 1) e com a área de maior incidência do fitoplasma do HLB em citros (Teixeira et al., 2009). Porém para uma avaliação mais precisa da ocorrência do fitoplasma do HLB em crotalária e sua comparação com a incidência em citros, uma maior amostragem é necessária.

5. CONCLUSÕES

A amostragem por caminhamento aleatório é mais eficiente para encontrar amostras com sintomas relacionados à ocorrência de fitoplasma, pois o número de plantas com sintomas é baixo.

A crotalária (*C. juncea*) hospeda uma alta diversidade de fitoplasmas identificados através do sequenciamento do produto da PCR universal (fitoplasmas do grupo I, III, VII, IX e XV).

A PCR universal é mais sensível na detecção dos fitoplasmas do que a PCR grupo específico.

A identificação da ocorrência de fitoplasma do HLB em crotalária através de sintomas mostra-se imprecisa: a virescência está relacionada e é um indicativo da ocorrência de fitoplasma do grupo 16Sr IX, enquanto o superbrotamento é um bom indicativo da ocorrência de fitoplasmas. A virescência esteve frequentemente associada ao superbrotamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Saady, N.A., Khan, A.J., Calari, A., Al-Subhi, A.M. & Bertaccini, A.F. 2008. '*Candidatus* Phytoplasma omanense', associated with witches' -broom of *Cassia italica* (Mill.) Spreng. in Oman. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 58:461-466.
- Andreola, F., Costa, L.M., Olszewski, N. & Jucksch, I. 2000. A cobertura vegetal de inverno e a adubação orgânica e, ou, mineral influenciando a sucessão feijão/milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 24: 867-874.
- Barbosa J.C. 2010. Caracterização molecular e diversidade de fitoplasmas em pomares de citros no Estado de São Paulo. **Tese de Doutorado**. Piracicaba SP. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".
- Barros, T. S. L., Davis, R. E., Resende R. O. & Dally, E. L. 2002. Erigeron witches' -broom phytoplasma in Brazil represents new subgroup VII-B in 16S rRNA gene group VII, the ash yellows phytoplasma group. **Plant Disease**. 86:1142-1148.
- Barros, T.L.S.; Kitajima, E.W. & Resende, R.O. 1998. Diversidade de isolados brasileiros de fitoplasmas através da análise de 16S rDNA. **Fitopatologia Brasileira** 23: 459-465.
- Bassanezi, R.B., Lopes, S.A., Belasque Júnior, J., Spósito, M.B., Yamamoto, P.T., Miranda, M.P., Teixeira, D.C. & Wulff, N.A. 2010. Epidemia do *huanglongbing* e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology**. 31: 11-23.
- Bedendo, I.P., Davis, R.E. & Dally, E.L. 1998. Identificação molecular do fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho. **Fitopatologia Brasileira**. 23: 329.
- Bedendo, I.P., Davis, R.E. & Dally, E.L. 1999. Detecção e caracterização de fitoplasmas em plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) e de pimenteira (*Capsicum frutescens*) através das técnicas de duplo PCR e RFLP. **Summa Phytopatologica**. 25: 197-201.
- Belasque Junior, J., Barbosa, J.C., Massari, C.A. & Ayres, A.J. 2010. Incidência e distribuição do *huanglongbing* no estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology**. 31: 1-9.
- Bianchini, L. & Bedendo, I.P. 2000. Presença de um fitoplasma do grupo I, evidenciado por PCR, em plantas de Erigeron (*Erigeron bonariensis*) com superbrotamento. **Fitopatologia Brasileira** (Resumo) 25:348.
- Boscariol-Camargo, R.L., Cristofani-Yaly, M., Malosso, A., Coletta-Filho, H.D. & Machado, M.A. 2010. Avaliação de diferentes genótipos de citros à infecção por *Candidatus* Liberibacter asiaticus. **Citrus Research & Technology**. 31: 85-90

- Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology** 88:7-37.
- Brioso, P. S. T., Montano, H. G., Figueirado D. V., Poltronieri L. S. & Furlan, J.J. 2006. Amarelecimento fatal do dendezeiro: seqüenciamento parcial do fitoplasma associado. **Summa Phytopathologica**. 32: 50.
- Chang, C. J. 1998. Pathogenicity of aster yellows phytoplasma and *Spiroplasma citri* on periwinkle. **Phytopathology**. 88: 1347-1350.
- Chang, C.J. & Lee, I.M. 1995. Pathogenesis of diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: Singh, U.S., Singh, R.P., Kohmoto, K. (Eds.) **Pathogenesis and Host Specificity in Plant Disease**. New York: Elsevier 1: 237-46.
- Chen, J., Pu, X., Deng, X., Liu, S., Li, H. & Civerolo, E. 2009. A phytoplasma related to ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ detected in citrus showing *huanglongbing* (Yellow Shoot Disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. **Phytopathology**. 99: 236-242.
- Coletta-Filho, H.D., Targon, M.L.P.N., Takita, M.A., De Negri, J.D., Pompeu, Jr. J., Machado, M.A., do Amaral, A.M., & Muller, G.W. 2004. First Report of the Causal Agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**. 88: 1382
- Deng, S. & Hiruki, C. 1991. Genetic relatedness between two non-culturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. **Phytopathology**. 81: 1475-79
- Doi, Y.M., Teranaka, M., Yora, K. & Asuyama, H. 1967. 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. **Phytopathol. Soc. Japão**. 33:259-66
- Donadio, L.C., Mourão Filho, F.A.A. & Moreira, C.S. 2005. Centro de Origem, Distribuição Geográfica das Plantas Cítricas e Histórico da Citricultura no Brasil. In: Mattos Junior, D., De Negri, R.M., Pio, R.M. & Pompeu Junior, J. (Eds.) **Citrus**. Cordeirópolis, pp. 1-18.
- Eckstein B., Barbosa J. C., Rezende J. A. M., & Bedendo I. P. 2011. A *Sida* sp. Is a New Host for “*Candidatus Phytoplasma brasiliense*” in Brazil. **Disease Notes**. 95: 363
- Eckstein, B. 2010. Enfezamento do brocólis: identificação molecular de fitoplasmas, potenciais insetos vetores e hospedeiros alternativos, e análise epidemiológica da doença. **Tese de Doutorado**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

- Eckstein, B., Barbosa, J.C. & Bedendo, I.P. 2009. Ocorrência de fitoplasmas do grupo 16SrIX em vinca na região do Alto Paranaíba. **Summa Phytopathologica**. 35: 1.
- Faghihi, M.M., Bagheri, A.N., Bahrami, H.R., Hasanzadeh, H., Rezazadeh, R., Siampour, M., Samavi, S., Salehi, M., & Izadpanah, K. 2011. Witches'-broom disease of lime affects seed germination and seedling growth but is not seed transmissible. **Plant Disease**. 95: 419-422.
- Folimonova, S. Y., Robertson, C. J., Garnsey, S. M., Gowda, S., & Dawson, W. O. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. **Phytopathology**. 99:1346-1354.
- Fukuda, L.A., Franco, D., Facio, S.L. & Lima Neto, R.A. 2010. Sustentabilidade econômica da citricultura perante o *huanglongbing*. **Citrus Research & Technology**. 31: 107-114.
- Gottwald, T. R., da Graça, J. V. & Bassanezi, R. B. 2007. Citrus Huanglongbing: The Pathogen and Its Impact. **Plant Health Progress**. 6 September 2007. Online (doi: 10.1094/PHP-2007-0906-01-RV).
- Halbert, S.C. & Manjunath, K.L. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**. 87: 330-353.
- Hoshi, A., Oshima, K., Kakizawa, S., Ishii, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K., Kagiwada, S., Yamaji, Y. & Namba, S. 2009. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. **PNAS**. 106: 6416-6421.
- Igue, K. 1984. Dinâmica da matéria orgânica e seus efeitos nas propriedades do solo. In: Fundação Cargill. Adubação verde no Brasil. Fundação Cargill. 232-67.
- Anônimo. 2004. IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group. Description of the genus '*Candidatus Phytoplasma*', a taxon for the wall-less nonhelical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 54: 1243-1255.
- Kitajima, E. W. 1994. Enfermidades de plantas associadas a organismos do tipo micoplasma. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo. 2: 153-174.
- Kumar, S., Singh, V. & Lakhanpaul, S. 2010. First Report of *Crotalaria spectabilis* Fasciation Associated with '*Candidatus Phytoplasma asteris*' in India. **Plant Disease**. 94: 1265.
- Lee I.M. & Davis, R.E. 1992. Mycoplasmas which infect plants and insects. In: Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis. Maniloff, J., McElhansey, R.N., Finch, L.R. & Baseman, J.B. Washington. (Eds.) DC: Am. Soc. Microbiol. 379-90

- Lee, I.M., Davis, R.E., & Gundersen-Rindal, D.E. Phytoplasma: phytopatogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto. 2000. p. 221-255.
- Lopes, S.A., Frare, G.F., Yamamoto, P.T., Ayres, A.J. & Barbosa, J.C. 2007. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. **European Journal of Plant Pathology**. 119: 463-468.
- Machado, M.A., Locali-Fabris, E.C. & Coletta-Filho, H.D. 2010. *Candidatus Liberibacter* spp., agentes do *huanglongbing* dos citros. **Citrus Research & Technology**. 3: 25-35.
- Marques R.N. 2011. Cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) potenciais vetoras de um fitoplasma (grupo16SrIX) associado a sintomas de Huanglongbing dos citros, suas plantas hospedeiras e quantificação do patógeno. **Tese de Doutorado**. Piracicaba SP. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.
- Martini, M., Lee, I.M., Bottner, K.D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N.A., Carraro, L., Marcone, C., Khan, A.J. & Osler, R. 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 57: 2037-2051.
- Melo, L.A., Ventura, J.A., Costa, H. & Bedendo, I.P. 2007. Fitoplasmas do grupo 16SrXIII associados a plantas de mamão com a anomalia conhecida por vira-cabeça. **Fitopatologia Brasileira**. 32: 214.
- Mello, A.P.O.A., Ribeiro, L.F.C., Massola, N.S.J. & Bedendo, I.P., 2004. Um fitoplasma do grupo 16SrV associado ao superbrotamento da crotalaria. **Summa Phytopathologica**. 30: 432-435.
- Meneguzzi, N.G., Torres, L.E., Galdeano, E., Guzmán, F.A., Nome S.F & Conci, L.R. 2008. Molecular characterization of a phytoplasma of the ash yellows group (16Sr VII-B) occurring in *Artemisia annua* and *Conyza bonariensis* weeds. **Agriscientia**. 15: 7-15.
- Montano, H. G., Dally, E. L., Davis, R. E., Pimentel, J. P. & Brioso, P. S. T. 2001. First Report of Natural Infection by “*Candidatus Phytoplasma brasiliense*” in *Catharanthus roseus*. **Disease Notes**. 85: 1209.
- Montano, H.G., Davis, R.E., Dally, E.L., Pimentel, J.P. & Brioso, P.S.T. 2000. Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from chayote in Brazil. **Plant Disease**, 84: 429-436.
- Murray, M. G., & Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Res**. 8: 4321-4325.
- Neroni, R. C., Bedendo, I. P., & Kuniyuki KI H. 2006. Identificação molecular de fitoplasmas associados ao amarelo da videira. **Fitopatologia Brasileira**. 31: 243.

- Neves, M.F., Trombin, V.G., Milan, P., Lopes, F.F., Cressoni, F. & Kalaki, R. 2010. **Retrato da Citricultura Brasileira**. MARKESTRAT: Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, FEA-USP, Ribeirão Preto.
- Perin, A., Santos, R. H. S., Urquiaga, S., Guerra, J. G. M. & Cecon, P. R. 2004. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 39: 35-40.
- Perin, A., Guerra, J.G.M. & Teixeira, M.G. 2003. Cobertura do solo e acumulação de nutrientes pelo amendoim forrageiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 38: 791-796.
- Ribeiro, L. F., Bedendo, I. P. & Sanhuezar, R. M. V. 2007. Evidência molecular da ocorrência de um fitoplasma associado ao lenho mole da macieira. *Summa Phytopathologica*. 33: 30-33.
- Ribeiro, L.F.C., Silva, E.G. & Bedendo, I.P. 2008. Evidência molecular da ocorrência de fitoplasma associado ao superbrotamento do maracujazeiro em cinco estados brasileiros. *Tropical Plant Pathology*. 33: 323-325.
- Seemüller, E., Schneider, B., Mäurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K. H., Firrao, G., Avinent, L., & Sears, B. B. 1994. Phylogenetic classification of hytopathogenic mollicutes by sequence analyses of 16S ribosomal DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 440-446.
- Schneider, B., Cousin, M.T., Klinkong, S. & Seemüller, E. 1995. Taxonomic relatedness and phylogenetic positions of phytoplasmas associated with diseases of faba bean, sunhemp, sesame, soybean, and eggplant. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*. 102: 225-32.
- Silva, E. G., Bedendo, I. P., Haas, I. C. H. & Casagrande M. 2006. Identificação de um fitoplasma do grupo 16SrI em plantas de cana-de-açúcar com sintomas da síndrome do amarelecimento foliar. *Fitopatologia Brasileira*. 31: 189-190.
- Silva, E. G., Haas I. C. H., Flores D. & Bedendo I. P. 2006. Detecção de fitoplasma em plantas de primavera (*Bougainvillea spectabilis*) com sintomas de superbrotamento. *Summa Phytopathologica*. 32: 45.
- Silva, J. A. A., Vitti, G. C., Stuchi, E. S. & Sempionato, O. R. 2002. Reciclagem e incorporação de nutrientes ao solo pelo cultivo intercalar de adubos verdes em pomar de laranja 'Pêra'. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 24: 225-230.
- Teixeira, D.C., Ayres, J., Kitajima, E.W., Danet, L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C. & Bové, J.M. 2005. First Report of a Huanglongbing-Like Disease of Citrus in Sao Paulo State, Brazil and Association of a New Liberibacter Species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the Disease. *Plant Disease*. 89: 107.

- Teixeira, D.C., Wulff, N.A., Martins, E.C., Kitajima, E.W., Bassanezi, R., Ayres, A.J., Eveillard, S., Saillard, C. & Bové, J.M. 2008. A phytoplasma closely related to the Pigeon Pea Witches'-Broom Phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus *huanglongbing* symptoms in the São Paulo, Brazil. **Phytopathology**. 98: 977-984.
- Teixeira, D. C., Wulff, N. A., Leite A. P. R., Martins, E. C., Ayres, A. J. & Bove, J. M. 2009. Identification, PCR detection and occurrence in São Paulo state, Brazil, of citrus huanglongbing-associated agents: *Candidatus* Liberibacter americanus, *Ca. L. asiaticus*, and the 16Sr group IX phytoplasma. XLII **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Rio de Janeiro.
- Teixeira, D.C., Wulff, N.A., Lopes, S.A., Yamamoto, P.T., Miranda, M.P., Spósito, M.B., Belasque Júnior, J. & Bassanezi R.B. 2010. Caracterização e etiologia das Bactérias associadas ao *huanglongbing*. **Citrus Research & Technology**. 31: 115-128.
- Toloy, R.S., Martins, E.C., Coletti, D.A.B., Teixeira, D.C., & Wulff, N.A. 2011. Acquisition of 16SrIX, HLB associated phytoplasma, by *Scaphytopius marginelineatus* (Hemiptera: Cicadellidae) from *Crotalaria juncea*. **Hemipteran-Plant Interactions Symposium**. Piracicaba, Brazil, July 11-14, 2011.
- Verdin, E., Salar, P., Danet, J.-L., Choueiri, E., Jreijiri, F., El Zammar, S., Gelie, B., Bove, J.M. & Garnier, M. 2003. '*Candidatus* Phytoplasma phoenicium' sp. nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 53:833-838.
- Wulff, N.A., Teixeira, D.C., Martins, E. C., Leite, A.P.R., Mariano, A.G. Da Silva, A.C.B., Augusto, M.L.V., Ayres, A.J., Bove, J.M. The 16Sr group IX phytoplasma associated with citrus huanglongbing symptoms in São Paulo state, Brazil, has been detected in crotalaria plants (*Crotalaria juncea*). **Congresso Brasileiro De Fitopatologia**. Resumos. Rio de Janeiro: **Tropical Plant Pathology**. 2009. p. 115.
- Yamamoto, P.T., Felipe, M.R., Garbim, L.F., Coelho, J.H., Ximenes, N.L., Martins, E.C., Leite, A.P.R., Sousa, M.C., Abrahão, D.P. & Braz, J.D. 2006. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus* Liberibacter americanus. **Proceedings of the huanglongbing-greening international workshop**. Ribeirão Preto. p. 96.
- Zreik, L., Carle, P., Bové, J.M. & Garnier, M. 1995. Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a *candidatus*

taxon for the organism, "*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*". **International Journal of Systematic Bacteriology**. 45: 449-453.