

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

**Caracterização molecular e diversidade de fitoplasmas em pomares de citros
no Estado de São Paulo**

Júlio César Barbosa

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

**Piracicaba
2010**

Júlio César Barbosa
Engenheiro Agrônomo

**Caracterização molecular e diversidade de fitoplasmas em pomares de citros
no Estado de São Paulo**

Orientador:
Prof. Dr. **ARMANDO BERGAMIN FILHO**

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

Piracicaba
2010

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

Barbosa, Júlio César

Caracterização molecular e diversidade de fitoplasmas em pomares de citros no Estado de São Paulo / Júlio César Barbosa. - - Piracicaba, 2010.
100 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Citricultura 2. Doenças de plantas 3. Epidemiologia 4. Fitoplasmas 5. Insetos vetores
6. Laranja 7. Plantas daninhas I. Título

CDD 634.3
B238C

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

À Bárbara

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Armando Bergamin Filho, pela confiança e, sobretudo, por sempre respeitar minhas idéias.

Aos Professores Jorge Alberto Marques Rezende e Luis Eduardo Aranha Camargo, pela cooperação durante as análises moleculares deste estudo.

À Professora LÍlian Amorim pela cooperação durante os experimentos com insetos no Laboratório de Doenças de Pós-colheita.

Ao Professor Ivan Paulo Bedendo por compartilhar comigo seus conhecimentos e experiências sobre os fitoplasmas.

À Dra Alice Kazuko Inoue-Nagata pelos ensinamentos sobre clonagem e análise de seqüências.

Às Dras. Ana Clara de Souza Mello Lucena Gonçalves e Ketí Maria Rocha Zanol, pela identificação dos cicadélídeos.

Ao Renato Barbosa Salaroli pela ajuda na obtenção das fotos de microscopia eletrônica.

Aos amigo(a)s do Laboratório de Epidemiologia: Alécio, Ana Raquel, Carol, Felipe, Guilherme, Isabela, Juliana, Sílvia, Thaís e Thimotheo; e do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos: Daniela, Evandro, Rafaela e Thais, pela convivência agradável e muito descontraída.

À Dra. Maria Cândida de Godoy Gasparoto pelas incontáveis caronas nas idas e vindas a Araraquara e por sua amizade “de toda hora”.

Ao Dr. Fabrício Packer e o Msc. Geraldo José Silva Jr. pela ajuda nas coletas de amostras em Bebedouro e Taquarituba.

À Dra. Bárbara Eckstein pela grande ajuda na identificação dos fitoplasmas.

À Fapesp pela concessão da bolsa e por compreender as dificuldades enfrentadas durante o decorrer do meu doutorado.

A todos, que de alguma forma me ajudaram, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE ANEXOS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 DESENVOLVIMENTO	23
2.1 Revisão bibliográfica	23
2.1.1 Fitoplasmas	23
2.1.2 Classificação de fitoplasmas	24
2.1.3 Fitoplasmas no Brasil	27
2.1.4 Fitoplasmas em citros	31
2.2 Material e métodos	32
2.2.1 Coleta de amostras de plantas de citros em pomares do Estado de São Paulo	32
2.2.2 Identificação de inseto (s) candidato (s) a vetor	33
2.2.3 Identificação de plantas daninhas hospedeiras de fitoplasmas	34
2.2.4 Extração de DNA de amostras foliares de plantas de citros e plantas daninhas	34
2.2.5 Extração de DNA dos cicadelídeos	34
2.2.6 Detecção dos fitoplasmas por <i>nested</i> PCR	35
2.2.7 Análise de RFLP	35
2.2.8 Clonagem	36
2.2.9 Sequenciamento da região 16S rDNA “F2n/R2” dos fitoplasmas e análise das seqüências	37
2.2.10 Análise de RFLP <i>in silico</i>	37
2.2.11 Análise do coeficiente de similaridade	37
2.2.12 Análise filogenética	40

2.3 Resultados e Discussão	40
2.3.1 Fitoplasmas em plantas de citros	40
2.3.1.1 Detecção e identificação de fitoplasmas em plantas de citros por <i>nested</i> PCR	40
2.3.1.2 Identificação de fitoplasmas por RFLP	43
2.3.1.3 Identificação de fitoplasmas por RFLP <i>in silico</i>	46
2.3.1.4 Cálculo do coeficiente de similaridade	48
2.3.1.5 Análise filogenética	51
2.3.2 Fitoplasmas em plantas daninhas	55
2.3.2.1 Detecção e identificação de fitoplasmas em plantas daninhas por PCR	55
2.3.2.2 Identificação de fitoplasmas por RFLP	58
2.3.2.3 Identificação de fitoplasmas por RFLP <i>in silico</i>	61
2.3.2.4 Cálculo do coeficiente de similaridade	64
2.3.2.5 Análise filogenética	66
2.3.3 Fitoplasmas em cicadelídeos	69
2.3.3.1 Identificação de possíveis vetores de fitoplasmas em pomares de citros	69
2.3.3.2 Detecção e identificação de fitoplasmas em cicadelídeos por <i>nested</i> PCR	69
2.3.3.3 Identificação de fitoplasmas por RFLP	72
2.3.3.4 Identificação de fitoplasmas por RFLP <i>in silico</i>	73
2.3.3.5 Cálculo do coeficiente de similaridade	74
2.3.3.6 Análise filogenética	76
3 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	83
ANEXOS	95

RESUMO

Caracterização molecular e diversidade de fitoplasmas em pomares de citros no Estado de São Paulo

Recentemente, um fitoplasma do grupo 16SrIX foi associado a plantas de citros com sintomas de huanglongbing (HLB) no Estado de São Paulo. No entanto, em razão da ampla diversidade de fitoplasmas que tem se observado em várias culturas no Brasil, seria possível que além do fitoplasma do grupo 16SrIX, outros fitoplasmas também pudessem estar associados a plantas de citros no Estado de São Paulo. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar se outros fitoplasmas, além daquele do grupo 16SrIX, estão associados a plantas de citros no Estado de São Paulo. Amostras foliares de plantas de citros, plantas daninhas e cicadelídeos foram coletados entre os meses de Junho a Outubro de 2010, em pomares localizados em quatro municípios: Araraquara, Bebedouro, Piracicaba e Taquarituba. Análises de *nested* PCR evidenciaram a presença de fitoplasmas associados a plantas de citros (sintoma: clorose foliar); a plantas daninhas: *Bidens pilosa* (sintomas: filodia e virescência), *Leonorus sibiricus* (sintoma: deformação foliar), *Solanum americanus* (sintoma: superbrotamento foliar), *Erigeron bonariensis* (sintomas: avermelhamento e superbrotamento foliar) e *Euphorbia heterophylla* (sintoma: deformação foliar); e a cicadelídeos da espécie *Agallia albidula* (Uhler, 1895) (subfamília Agalliinae). A confirmação da presença e caracterização molecular dos fitoplasmas foi realizada através de análises de RFLP e seqüenciamento da região 16S rDNA. Uma ampla diversidade de fitoplasmas foi identificada. Fitoplasmas dos grupos 16SrIII e 16SrIX foram associados a plantas de citros em Piracicaba, enquanto um fitoplasma do grupo 16SrVII foi associado a plantas de citros em Bebedouro. Fitoplasmas do grupo 16SrIII foram associados a plantas daninhas das espécies *B. pilosa*, *L. sibiricus* e *S. americanus* em Piracicaba e fitoplasmas do grupo 16SrVII foram associados a plantas de *E. bonariensis* e *E. heterophylla* em Piracicaba e Taquarituba, respectivamente. Um fitoplasma do grupo 16SrIII foi associado a *A. albidula* em Taquarituba, sugerindo ser este um potencial inseto vetor de fitoplasmas em pomares de citros. Com base na análise da região 16S rDNA, muitos dos fitoplasmas encontrados apresentaram-se distintos dos fitoplasmas já relatados. Em virtude disto, estes fitoplasmas foram propostos como representantes de novos subgrupos pertencentes aos grupos 16SrIII, 16SrVII e 16SrIX. Os resultados obtidos neste estudo não nos permite a associação dos fitoplasmas encontrados com o HLB ou qualquer outra doença já descrita, sendo, portanto, necessários mais estudos visando confirmar o papel destes fitoplasmas como patógenos de citros e plantas daninhas.

Palavras-chave: Citricultura; Doenças de plantas; Epidemiologia; Fitoplasmas; Insetos vetores; Laranja; Plantas daninhas

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

