

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB

POLIANA COQUEIRO DIAS

**ESTUDOS SOBRE A ETIOLOGIA DO MOSAICO AMARELO DA
MADEIRA NOVA (*Pterogyne nitens* Tull.)**

Vitória da Conquista – BA
2009

POLIANA COQUEIRO DIAS

ESTUDOS SOBRE A ETIOLOGIA DO MOSAICO AMARELO DA
MADEIRA NOVA (*Pterogyne nitens* Tull.)

Monografia apresentada à Universidade Estadual
do Sudoeste da Bahia – UESB / Campus de
Vitória da Conquista – BA, para obtenção do
título de Bacharel em Engenharia Florestal.

Orientador: Quelmo Silva de Novaes

Vitória da Conquista – BA
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
CURSO DE ENGENHARIA FLORESTAL

Campus de Vitória da Conquista – BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: Estudos sobre a etiologia do mosaico amarelo da madeira nova (*Pterogyne nitens* Tull.)

Autora: Poliana Coqueiro Dias

Data de realização: _____

Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de BACHAREL EM ENGENHARIA FLORESTAL, pela Banca Examinadora:

Prof. Dr. Quelmo Silva de Novaes – UESB
Presidente

Prof. Ms. Gilmar Correia Silva – UESB

Prof. Ms. Rita de Cássia Antunes Lima de Paula – UESB

“Pedi e vos será dado. Buscai e achareis. Batei e vos será aberto. Porque todo aquele que pede, recebe. Quem busca, acha. A quem bate, abrir-se-á.”

(Mateus, 7, 7-8)

“Põe tuas delícias no Senhor, e os desejos do teu coração ele atenderá. Confia ao senhor a tua sorte, espera nele, e ele agirá.”

(Salmos, 36, 4-5)

Aos meus pais, José da Silva Dias e Evânia Pinheiro Coqueiro Dias, por todo amor, carinho, apoio, pelas oportunidades que me deram na vida e pela confiança que em mim depositaram. Às minhas irmãs Renata e Jouse Eliane, aos meus avós Evandro, Zenaide, Ednon e Odilia, e demais parentes e amigos pelo convívio, carinho e apoio em todos os momentos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por me ensinar a valorizar cada momento da minha vida, por me permitir concluir mais uma etapa da minha vida, pela força e perseverança nos diversos momentos, pelos amigos e pela família maravilhosa que tenho;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pelos conhecimentos adquiridos e pela oportunidade de conviver com pessoas que fizeram diferença em minha vida;

Ao professor Quelmo Silva de Novaes, pela orientação, confiança, paciência, amizade, estímulo, conselhos e compreensão durante os dois anos de orientação;

A todos os professores da Engenharia Florestal, em especial ao professor Gilmar Correia e a professora Maria de Lurdes, pelos ensinamentos, oportunidades, amizade e cobranças nas disciplinas e nos trabalhos realizados;

Aos meus colegas de graduação, pela amizade e companheirismo;

Ao trio Lícia, Rafael e Tiago que juntos formamos um quarteto fantástico, sempre me apoiando, dando força, discutindo os trabalhos, juntos nas noites sem dormir (isso quando Tiaguinho não arcava com o ônus), nas risadas de desespero e de alegria, nos momentos difíceis, sempre compartilhando conhecimentos e amizade. Obrigada por me ajudar a concluir o curso (sem vocês tudo teria sido mais sem graça);

Aos amigos do laboratório de fitopatologia, Rebeca, Gileno e Margarida pelo bom convívio e amizade;

A todo(a)s o(a)s grandes amigo(a)s que eu “abandonei” ao decorrer do curso devido aos trabalhos e as provas, e que souberam entender a minha ausência;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Madeira Nova (<i>Pterogyne nitens</i> Tul.).....	15
2.2 Vírus e doenças de plantas.....	17
2.2.1 Vetores de viroses.....	20
2.2.2 Diagnose de doenças associadas a Vírus.....	20
2.3 Fitoplasma e doenças de plantas.....	23
2.3.1 Vetores de Fitoplasmas.....	26
2.3.2 Diagnose de doenças associadas à Fitoplasma.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Observação visual da sintomatologia no campo.....	29
3.2 Acúmulo de amido na folha.....	29
3.3 Transmissão por semente.....	29
3.4 Detecção de vírus	29
3.4.1 Plantas-teste.....	30
3.4.2 Inoculação mecânica.....	30
3.4.3 Transmissão por enxertia.....	30
3.4.4 Transmissão por afídeo.....	31
3.4.5 Detecção de begomovirus por PCR.....	31
3.5 Detecção de Fitoplasma.....	32
3.5.1 Coleta das amostras.....	32
3.5.2 Extração rápida de DNA total.....	32
3.5.3 Purificação do DNA.....	33
3.5.4 Detecção de fitoplasmas por PCR.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Sintomatologia e distribuição das plantas sintomáticas em campo.....	35
4.2 Acúmulo de amido na folha.....	36

4.3 Transmissão por sementes.....	37
4.4 Detecção de vírus.....	38
4.5 Detecção de fitoplasma.....	40
5 CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Folhas de <i>Pterogyne nitens</i> com sintomas.....	35
Figura 2 – Plantas de <i>Pterogyne nitens</i> com sintomas de amarelo apenas nas folhas novas.....	35
Figura 3 – Plantas de <i>Pterogyne nitens</i> assintomática (à esquerda) e sintomática (à direita) em campo.....	36
Figura 4 – Acúmulo de amido na folha de <i>Pterogyne nitens</i> sendo em A folha assintomática e em B sintomática.....	37
Figura 5 – Plantas de <i>Pterogyne nitens</i> assintomáticas provenientes de sementes de matrizes sintomáticas.....	38
Figura 6 – Enxertia realizada com plantas de <i>Pterogyne nitens</i> sintomáticas (enxerto) em plantas assintomáticas (porta-enxerto).....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Plantas-teste, inoculadas mecanicamente com extrato proveniente de plantas de madeira nova (<i>Pterogyne nitens</i>) apresentando sintomas de mosaico amarelo.....	39
---	----

RESUMO

DIAS, P. C. Estudos sobre a etiologia do mosaico amarelo da madeira nova (*Pterogyne nitens* Tull.). Vitória da Conquista: UESB, 2009. 53 p. (Monografia - Graduação em Engenharia Florestal).*

A madeira nova (*Pterogyne nitens* Tull.) é uma espécie florestal nativa da Mata Atlântica, sua madeira é normalmente utilizada na construção de móveis finos, obtenção de folhas faqueadas, para construção civil, como vigas, caibros, ripas, tacos e tábuas para assoalhos, para construção de carrocerias, interiores de embarcações e vagões, como lenha e carvão, etc.. Recentemente foi observado no Município de Vitória da Conquista – BA, plantas desta espécie apresentando fortes sintomas de mosaico amarelo e pouco desenvolvimento das plantas. Devido à existência de plantas de madeira nova na região sudoeste da Bahia estar com sintomas semelhantes aos provocados por vírus e fitoplasmas foi proposta a realização do presente trabalho que teve como objetivos determinar a etiologia, os possíveis vetores e as formas de transmissão do possível patógeno do mosaico amarelo da madeira nova. Para tanto foi feita a observação visual da sintomatologia no campo, teste para verificar o acúmulo de amido nas folhas sintomáticas e assintomáticas, inoculação mecânica em plantas-teste utilizando como fonte de inóculo folhas de madeira nova sintomáticas, transmissão por enxertia dos tipos garfagem e borbúlia, transmissão utilizado o afídeo *Myzus persicae* Sulzer como vetor, análise via PCR para Begomovírus, e por fim uma análise via PCR duplo para fitoplasma utilizando os iniciadores R16 mF1/mR2 ou P1/P7 na primeira reação e R16 F2n / R2 na segunda reação. Pela sintomatologia e distribuição das plantas afetadas em campo, acredita-se que existe algum patógeno associado à doença. Os testes de acúmulo de amido, transmissão por semente, inoculação mecânica, transmissão por enxertia, transmissão por afídeos e a detecção de begomovirus por PCR, foram negativos para doenças causadas por vírus, no entanto o PCR duplo utilizando os primers R16 mF1/mR2 ou P1/P7 na primeira reação e R16 F2n / R2 na segunda reação, foi positivo para fitoplasma. Desta forma conclui-se que o amarelo da madeira nova, possivelmente está associado a um fitoplasma. Outros testes serão necessários para a confirmação desta hipótese.

Palavras-chave: Vírus. Fitoplasma.

ABSTRACT

DIAS, P. C. Studies on the etiology of yellow mosaic of new wood (*Pterogyne nitens* Tull.). Vitória da Conquista: UESB, 2009. 53 p. (Monograph - Degree in Forest Engineering).*

The *madeira nova* (*Pterogyne nitens* Tull.) is a species of native Atlantic forest, the wood is normally used in the construction of fine furniture, collection of leaves for construction, as beams, cramps, strips, boards and clubs for floors for construction of body, interior of boats and wagons, as firewood and charcoal, etc.. Recently been observed in the city of Vitória da Conquista - BA, plants of this species displayed strong symptoms of yellow mosaic and little development of plants. Due to new timber plants in the region southwest of Bahia being with symptoms similar to those caused by viruses and phytoplasma was proposed the realization of this work we aimed to determine the etiology, the possible vectors and the possible ways of transmission of the pathogen yellow mosaic of new wood. For this was the visual observation of symptoms in the field, test to check the accumulation of starch in leaves symptomatic and asymptomatic, mechanical inoculation to test plants, using as source of inoculum new symptomatic leaves of wood, types of transmission by grafting and bubbles, transmission using the aphid *Myzus persicae* Sulzer as a vector, by PCR analysis for Begomovirus, and finally an analysis by PCR using two primers for phytoplasma R16 mF1/mR2 or P1/P7 in the first reaction and R16 F2n / R2 in the second reaction. The symptomatology and distribution of affected plants in the field, believes that there is a pathogen associated with disease. Tests for starch accumulation, transmission by seed, mechanical inoculation, transmission by grafting, transmission by aphids and the detection of begomovirus by PCR were negative for diseases caused by viruses, but the double PCR using the primers R16 mF1/mR2 or P1 / P7 in the first reaction and R16 F2n / R2 in the second reaction was positive for phytoplasma. Thus it is concluded that the new yellow wood, is possibly associated with a phytoplasma. Other tests are needed to confirm this hypothesis.

Keywords: Virus. Phytoplasma.

1 INTRODUÇÃO

A madeira nova (*Pterogyne nitens* Tull., Leguminosae – Caesalpinioideae), também conhecida como amendoim-bravo, amendoim, viraró, pau-amendoim, pau-de-fava, óleo-branco, carne de vaca, bálsamo, bassourinha, sucupira e vilão (LORENZI, 2002), é uma espécie florestal nativa da Mata Atlântica, a qual ocorre do nordeste do Brasil até o oeste do Estado de Santa Catarina, principalmente na floresta latifoliada semidecídua (NASCIMENTO et al., 2006). Essa espécie corre risco de extinção tendo em vista a redução do número de indivíduos em ocorrência natural em todos os Estados brasileiros (ITOMAN et al., 1992), sendo necessária sua conservação genética (SIQUEIRA E NOGUEIRA, 1992).

Plantas de madeira nova têm apresentado fortes sintomas de mosaico amarelo e pouco desenvolvimento de plantas jovens na Região Sudoeste da Bahia. A presença de árvores com e sem sintomas, sugere a ocorrência de algum agente patogênico associado às plantas afetadas. Os sintomas observados são parecidos com aqueles provocados por vírus em algumas leguminosas. No entanto, os sintomas observados podem também estar relacionados com a presença de fitoplasma. Na literatura, até o momento não foi encontrado nenhum relato de vírus ou fitoplasma afetando esta espécie de planta.

Doenças associadas à fitoplasma no Brasil ainda são pouco conhecidas, sendo comum atribuir a outras causas as moléstias de etiologia fitoplasmática devido à semelhança com os sintomas provocados pelos vírus, distúrbios genéticos e fatores abióticos, como desbalanços nutricionais e anomalias provocadas por herbicidas (MACIEL, 2007). As patologias causadas por fitoplasmas têm provocado danos relevantes para várias espécies vegetais como a macieira, pereira, pessegueiro, coqueiro, dendezeiro e hibiscus.

No que se refere às doenças causadas por vírus, conhecemos poucos relatos em essências florestais no Brasil. A ocorrência de mosaico, de clorose e deformação de limbos de folhas de seringueira, foi relatada por Gama et al. (1983), sendo esta doença atribuída a um carlavírus.

Na literatura até o presente momento não há relatos da existência de doenças em plantas de madeira nova, no entanto em sementes já foram relatados alguns fungos, tais como: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phoma* sp. e *Alternaria alternata* (NASCIMENTO et al., 2006).

As doenças florestais são responsáveis, em parte, pela diminuição da produtividade das espécies arbóreas. Até o momento, as doenças registradas em florestas têm sido

provocadas principalmente por fungos, com alguns registros de ocorrência de bactérias e raros registros da ação de vírus ou outros microorganismos. Para a maioria das espécies florestais nativas, existem poucas informações sobre a ocorrência de doenças. Nas regiões tropicais, a umidade e a temperatura elevadas são favoráveis ao crescimento e desenvolvimento de patógenos, fazendo com que as espécies nativas dessas regiões tornem-se vulneráveis ao ataque dos mesmos, bem como aos insetos que provocam danos diretos e indiretos, com a transmissão de doenças.

Os patógenos que atacam as espécies florestais não têm recebido a devida atenção ao longo dos anos e conseqüentemente, há um desconhecimento sobre os mecanismos de transmissão, métodos utilizados de penetração na planta, modos de ação e danos causados pelos mesmos (HOMECHIN et al., 1986; SINGH, 1997), bem como sobre as perdas econômicas provocadas (CARNEIRO, 1987).

Diante da escassez de trabalhos voltados para a identificação de doenças em espécies florestais e da preocupação com o crescente aumento do número de plantas de madeira nova com sintomas de mosaico amarelo, fez-se necessária a investigação sobre a possível causa desta doença. Estudos de transmissão, os quais permitem conhecer o possível veículo de disseminação desta doença em campo, podem ajudar nas tomadas de decisões quanto a medidas de controle, sendo importante para a manutenção dessa espécie no ambiente, já que a mesma é nativa e necessita de conservação genética, devido ao grande risco de extinção ocasionado pela redução do número de indivíduos em ocorrência natural em todos os Estados brasileiros.

A madeira nova é uma espécie que, também, pode ser aproveitada com finalidade econômica na região de Vitória da Conquista, devido à mesma ser uma espécie nativa adaptada às condições climáticas dessa área, possuir múltiplos usos da madeira, ser utilizada em sistemas agroflorestais e suas folhas servir como forragem.

Desta forma, este trabalho teve como objetivos determinar a etiologia, os possíveis vetores e formas de transmissão do possível patógeno do mosaico amarelo da madeira nova.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Madeira Nova (*Pterogyne nitens* Tul.)

A espécie *Pterogyne nitens* Tul. é perenifólia a semicaducifólia, heliófita, monóica, pertencente à família Leguminosae, sub-família Caesalpinoideae, com 10 a 15 m de altura e 50 cm de diâmetro a 1,30 m do solo, podendo atingir até 35 m de altura e 120 cm de diâmetro a altura do peito (DAP) na idade adulta (CARVALHO, 1994). Na região Nordeste, mede de 6 a 15 m de altura e apresenta de 20 a 50 cm de DAP (TIGRE, 1970). As folhas são imparipenadas, com 10 a 30 cm de comprimento, compostas de 8 a 12 folíolos de consistência subcoriácea, em geral, as flores são bissexuais de coloração amarelo-clara de 3 a 6 mm de comprimento, perfumadas com 10 a 14 flores em racemos localizados na axila foliar, o fruto é do tipo sâmara falciforme indeiscente, de coloração pardo-avermelhada a marrom-clara, de 3,5 a 6 cm de comprimento (CARVALHO, 1994). A semente é de coloração castanha, e de formato variando de elíptica a oval-elíptica, lisa, lustrosa, com 1 a 2 cm de comprimento por 0,5 a 1 cm de largura (GÓES et al., 2000), germinação epígea, o sistema reprodutivo é, de planta alógama (NOGUEIRA et al., 1986), a dispersão é anemocórica (SOUZA-STEVAUX et al., 1994).

Pterogyne nitens possui madeira com massa específica aparente moderadamente densa possuindo 0,70 a 0,87 g.cm⁻³, a 15 % de umidade (JANKOWSKY et al., 1990), com albarno distinto do cerne, possui grã direita a regular, textura média, superfície brilhante, irregular, lisa ao tato. Resistência moderada ao apodrecimento, não devendo estar em contato com o solo ou com umidade prolongada, a vida média da madeira dessa espécie é inferior a 15 anos quando soterradas (ROCHA et al., 2000), estacas de cerne dessa espécie é altamente resistente ao ataque de fungos e cupins (CAVALCANTE et al., 1982). Os métodos de preservação dessa madeira são ineficientes, já que à mesma possui baixa permeabilidade às soluções preservantes devido apresentar os vasos parcialmente obstruídos por óleo-resina e fibras de lume reduzido. Durante o processo de secagem tende a apresentar rachaduras, no entanto apresenta fácil trabalhabilidade e bom acabamento (CARVALHO, 2003).

Ocorre naturalmente no norte da Argentina, sul da Bolívia, noroeste do Paraguai e nos Estados brasileiros de Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraíba, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do

Norte, Rio Grande do Sul e São Paulo (ITOMAN et al., 1992; LORENZI, 1992; SIQUEIRA e NOGUEIRA, 1992).

No grupo sucessional a espécie é secundária inicial (DURIGAN e NOGUEIRA, 1990), comportando-se como pioneira em sítios arenosos e degradados (LOPEZ et al., 1987), a secundária tardia (FERRETTI et al., 1995). A espécie ocorre comumente em vegetação secundária como capoeiras, em altitudes de 120 a 920 m, em solos de baixa fertilidade natural e em solos calcários, com precipitação pluvial média anual desde 700 mm na Bahia a 2.200 mm em Alagoas (CARVALHO, 1994).

Essa espécie apresenta dormência tegumentar, sendo recomendados como tratamentos pré-germinativos: imersão em água quente fora do aquecimento a 65 ° C, seguido de repouso por 12 horas (CAPELANES, 1991), Escarificação em ácido sulfúrico concentrado por 10 e 15 minutos (DURIGAN et al., 1997), escarificação mecânica (LEONART et al., 2000) e punção do tegumento (NASSIF E PEREZ, 1997).

A produção de mudas de madeira nova é realizada via semeadura em sementeiras, para posterior repicagem, ou em sacos de polietileno com dimensões mínimas de 20 cm de altura e 7 cm de diâmetro, ou em tubetes de polipropileno de tamanho médio. Mudas produzidas em sacos plásticos por Bomfim et al. (2009), apresentaram valores estatisticamente superiores em todas as fases de avaliação das variáveis morfológicas no viveiro e também de desempenho no campo, 24 meses após o plantio. A propagação vegetativa pode ser realizada através das raízes, já que a madeira nova possui raízes gemíferas que permitem uma regeneração agâmica (CASTIGLIONI, 1975). Segundo Parodi (1938), estacas radiciais de 5 cm ou mais de comprimento, com diâmetros acima de 0,5 cm, emitem brotações caulinares e novas raízes. Gurgel Filho (1959), utilizando o método da borbulhia, conseguiu 55% de pegamento contra 20% de enxertia pelo método da garfagem.

Dentre os tratos culturais para a produção comercial da madeira nova está a desrama que só se realiza quando as plantas estão sob sombra ou bastante adensadas, necessitando de poda frequente e periódica, para a condução e poda dos galhos, durante os primeiros anos. As podas são feitas com dificuldade e a cicatrização é difícil (CARVALHO, 2003). O crescimento é lento a moderado, em plantios seu crescimento máximo foi de 7 m³ha⁻¹.ano⁻¹, com fator de forma de 0,85 (PAULA E ALVES, 1997). No entanto, segundo Sebbem et al. (1999), estudando variabilidades de crescimento entre progênies de madeira nova revelaram que a espécie é altamente potencial para programas de melhoramento voltados para o aumento da produtividade, devido a espécie apresentar altos valores do coeficiente de herdabilidade e o

coeficiente de variação fenotípica está dentro das progênies para os caracteres altura e DAP, o que pode facilitar o desenvolvimento de programas de melhoramento florestal da espécie.

A espécie é recomendada para plantios em vias urbanas, arborização de margens de rodovias e reposição de matas ciliares em locais com inundações periódicas de rápida duração e recomposição e restauração de áreas degradadas (LORENZI, 2002). A madeira de *Pterogyne nitens*, segundo Carvalho (2003), é elástica, tenaz e resistente, indicada para móveis finos, carpintaria em geral, construção civil; mourões, postes, estacas, fabricação de tonéis, barris e tanques para bebidas e produtos ácidos. Também é recomendada para construção de barcos, além de ser aproveitada na produção de lenha e carvão de boa qualidade.

A literatura apresenta poucos dados das aplicações medicinais e da constituição química de *P. nitens*. Estudos etnofarmacológicos em comunidades guaranis do nordeste da Argentina revelam o uso das cascas do caule no tratamento de infestações parasitárias, principalmente no combate ao "tacho", nome popular de *Ascaris lumbricoides*. Em trabalhos fitoquímicos foram isolados cinco alcalóides guanidínicos das folhas e caules de *P. nitens*, os quais mostraram atividade citotóxica sobre linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, sugerindo atividade antitumoral potencial desses alcalóides (REGASINI, et al., 2008).

Diante do grande potencial econômico e ambiental que essa árvore apresenta, é de suma importância estudos que agreguem conhecimentos para a sua maior produtividade.

2.2 Vírus e doenças de plantas

A palavra vírus originária do latim significa veneno. A definição de vírus é um assunto extremamente complexo, ao longo dos anos várias definições foram elaboradas, tornando-se, inadequadas à medida que a ciência da virologia avança, pois as definições, geralmente, baseiam-se no tamanho da partícula viral, na patogenicidade, na presença de um ácido nucléico e na incapacidade da partícula multiplicar-se fora de uma célula viva (BERGAMIN FILHO et al, 1995).

Segundo Zerbine Junior et al. (2002), os vírus de plantas, na sua maioria, são nucleoproteínas, compostas de ácido nucléico (RNA ou DNA) revestido por uma camada ou "capa" protetora (o capsídeo), constituída de moléculas de proteína (as subunidades) compactadas lateralmente umas as outras, sendo que alguns vírus de plantas possuem,

também, lipídios, glicoproteínas e até membranas como constituintes, podem ser alongados, baciliformes, pleiomórficos ou icosaédricos (isométricos).

Todos os vírus conhecidos, dentro e fora do reino vegetal, são parasitas intracelulares obrigatórios, incapazes de multiplicar-se fora de uma célula hospedeira. Os vírus utilizam os ribossomos e aminoácidos da célula para síntese de suas proteínas, além dos nucleotídeos e de certas enzimas para a síntese de novas cópias do ácido nucléico viral (HAVEN et al., 2001). Além disso, toda a energia necessária para esse processo também é proveniente da célula hospedeira. Desta forma todos os vírus causam algum nível de dano ao hospedeiro, sendo potencialmente patogênicos (ZERBINE JUNIOR et al., 2002). Embora os vírus possam conservar-se viáveis fora da célula, em alguns casos, por períodos relativamente longos, somente no interior desta é que são capazes de desempenhar a sua função fundamental, ou seja, produzir replicas de si mesmo (AGRIOS, 2005).

De acordo com Zerbine Junior et al. (2002), a replicação viral envolve, basicamente, a replicação do ácido nucléico e a síntese das proteínas virais. Esses eventos, em muitos casos, são interdependentes, pois a replicação do genoma quase sempre exige o emprego de proteínas virais, e a síntese de todas as proteínas virais muitas vezes só é possível durante ou após a replicação do ácido nucléico. O vírus, uma vez introduzido dentro da planta, pode ser distribuído através de um movimento lento célula a célula e de forma mais rápida via sistema vascular, geralmente através do floema (BERGAMIN FILHO et al, 1995).

Quanto à distribuição, alguns vírus que provocam lesões locais praticamente ficam confinados às áreas do tecido compreendidas por estas lesões, enquanto outros se movimentam pelo corpo da planta e são denominados sistêmicos (AGRIOS, 2005). Movimentos a curta distância, de célula a célula, ocorrem via plasmodesmos lentamente, esse movimento é facilitado por proteínas codificadas pelos vírus, chamadas proteínas de movimento, que provocam um aumento no tamanho dos plasmodesmos e permitem a passagem das partículas virais (HAVEN et al., 2001). Existem outros vírus que são rapidamente transportados pelos canais condutores, ou tubos crivados, dos tecidos do floema, onde se move sistematicamente para regiões de crescimento e órgãos de reserva, nesse caso o inseto vetor introduz a partícula viral diretamente neste tecido (BERGAMIN FILHO et al, 1995).

A descoberta de fitovírus foi feita através de plantas de fumo que apresentava uma doença conhecida por mosaico. A partir da descoberta desses agentes, um número cada vez maior de doenças passou a ser descrito em várias espécies vegetais, sendo que as culturas

anuais e as olerícolas são as que possuem um maior número de vírus em estudos devido aos relevantes danos causados nestas culturas (HAVEN et al., 2001). As curcubitáceas podem reduzir substancialmente a sua produtividade em função da presença de vírus como o mosaico da abobora (*Squash mosaic virus* – SqMV) (CHAGAS, 1970), do mosaico do mamoeiro – estirpe melancia (*Papaya ringspot virus* – type W) (ALBUQUERQUE et al., 1972) e da clorose letal da abobrinha (*Zucchini lethal chlorosis virus*) (REZENDE et al., 1995).

Existem poucos estudos das doenças florestais causadas por vírus no Brasil, isso se deve não a inexistência de doenças, mas sim à falta de profissionais florestais, especialistas em virologia (FERREIRA, 1989). Segundo Cooper (1993), dentre as espécies florestais que possuem patologias associadas a vírus estão deformações cloróticas em *Ailanthus altissima* ocasionada por um Potyvirus, *Cornus sanguinea* com sintomas de amarelecimento causados por vírus, clorose em *Fraxinus pennsylvanica* ocasionada pelo tobamovirus, *Fraxinus americana* também possui sintomas de clorose em suas folhas provocada pelo nepovirus, amarelos e cloroses necróticas em folhas de *Juglans regia* estão associados à nepovirus, clorose em folhas de *Ulmus glabra* provocada por um irlavirus, mosaico amarelo em folhas de *Aesculus carnea* associado a um irlavirus. Em *Pinus sylvestris* L., foi encontrado o vírus Scots pine mosaic virus, *Quercus* spp. foi encontrado nos Estados Unidos com clorose provocada por *Tobacco mosaic virus*, mosaico amarelo em folhas de *Quercus marilandica* ocasionado por vírus nos Estados Unidos (NIENHAUS e CASTELLO, 1989).

Não existem muitos estudos sobre vírus de árvores florestais. Mas muitas árvores de qualquer idade que se infectar por vírus podem sofrer degeneração e perda de vitalidade. Levantamentos de áreas florestais e em viveiros de mudas parecem confirmar a presença de sintomas e a dispersão de vírus em muitas plantas. Qualquer infecção de plantas tem que ser considerado como uma fonte de infecção, pois plantas jovens infectadas em viveiros podem mais tarde ser plantadas em jardins públicos e áreas comerciais provocando a infecção de uma área grande. Do ponto de vista econômico, estes patógenos podem aumentar custos de produção devido à diminuição do crescimento e produtividade do povoamento (COOPER, 1993).

Viroses de muitas plantas lenhosas, como fruteiras, uva ou citros mostraram que organismos patogênicos podem acabar com a cultura de uma espécie arbórea em uma ampla região. Com este grande perigo vários pesquisadores têm se preocupado com as doenças florestais, havendo um grande impulso nas pesquisas voltadas à patologia florestal e, em particular nas investigações sobre virologia, contudo investigações sobre vírus no ecossistema

florestal são extremamente raras, em comparação com as pesquisas desenvolvidas com os vírus do ambiente agrícola (NIENHAUS e CASTELLO, 1989).

2.2.1 Vetores de viroses

Existe uma imensa diversidade de vírus e quaisquer espécies de organismo podem ser infectados por diferentes vírus. Todos os vírus estão associados com certo tipo específico de hospedeiro. A sobrevivência dos vírus na natureza esta relacionada à sua transmissão, já que são parasitas obrigatórios e necessitam de células vivas. Agentes de disseminação do tipo vento e água não possuem importância na disseminação direta de vírus, pois os vírus não conseguem ultrapassar os limites da célula hospedeira por mecanismos próprios e não conseguem penetrar na célula diretamente através da cutícula (ZERBINE JUNIOR et al., 2002).

Assim, a saída e a entrada dos vírus em uma célula, ficam na dependência de agentes que promovam a passagem das partículas de um tecido infectado para outro sadio, tornando possível a perpetuação do vírus na natureza. Para isso faz-se necessário o envolvimento de agentes diversos ou de técnicas utilizadas pelo homem (BERGAMIN FILHO et al, 1995). Portanto a transmissão mecânica através da seiva, a propagação vegetativa de plantas, o movimento do pólen infectado, o transporte de sementes contaminadas, a ação parasitária da planta cuscuta sobre vegetais superiores, a alimentação de insetos sugadores ou mastigadores sobre hospedeiros vegetais e o parasitismo exercido por ácaros, nematóides e fungos constituem-se em formas de disseminação de vírus (AGRIOS, 2005).

2.2.2 Diagnose de doenças associadas a Vírus

A diagnose de uma doença de etiologia viral envolve uma série de testes até que realmente seja comprovado que o agente causal é um vírus. Além de detectar o vírus em uma planta doente estes testes têm, também, como objetivo a caracterização ou identificação do vírus.

As doenças causadas por vírus são geralmente reconhecidas através da observação de sintomas. Os sintomas mais aparentes são aqueles que aparecem nas folhas, frutos, caule ou aqueles que estão envolvidos no crescimento da planta (HAVEN et al., 2001). Os vírus interferem na produção de clorofila, afetando por tanto a fotossíntese o que ocasionará

sintomas como amarelecimento, bronzeamento, clorose, mosaico, mosqueado, mancha anelar e lesões cloróticas. Os vírus, também, podem causar sintomas ligados à deformação da planta como um todo ou de partes da planta, dentre esses sintomas estão à redução de crescimento, bolhas, canelura, enação, enrolamento, enrugamento, epinastia e tumor. A necrose é um sintoma que pode aparecer nas folhas, no meristema apical e frutos. Já os sintomas citológicos normalmente consistem em alterações em organelas, como o cloroplasto ou o núcleo, ou em inclusões formadas por proteínas ou partículas virais, conseqüentes do efeito direto ou indireto da multiplicação viral no interior da célula (ZERBINE JUNIOR et al., 2002).

A diagnose do vírus baseada nos sintomas é mais fácil e mais segura quando a doença em questão é comum e bem conhecida. No entanto, fatores como deficiências nutricionais, toxinas produzidas por insetos, distúrbios de origem genética, toxidez de inseticidas ou herbicidas, podem induzir sintomatologia semelhante àquela provocada por vírus tornando a diagnose confusa e exigindo a realização de testes mais apurados para que se obtenha um resultado confiável (BERGAMIN FILHO et al, 1995) .

Os testes mais comumente empregados para a diagnose das viroses vegetais podem ser divididos em três grupos a começar pelos testes biológicos, baseados nas propriedades biológicas dos vírus, como morfologia e gama de hospedeiros; sorológicos, baseados na detecção da proteína capsidial do vírus; e moleculares baseados na detecção do ácido nucléico viral.

Dentre os métodos biológicos está a microscopia ótica e eletrônica, onde partículas virais e inclusões citoplasmáticas podem ser observadas diretamente em tecidos infectados, tendo importância na diagnose do gênero, família e em alguns casos da espécie do vírus. As principais limitações do uso de microscopia eletrônica para a diagnose de rotina são o custo elevado e mão-de-obra especializada (ZERBINE JUNIOR et al., 2002). Outro método biológico são os testes de gama de hospedeiros que consiste na inoculação do vírus em uma serie de espécies e variedades de plantas, ditas indicadoras, e na observação e registro posteriores dos sintomas induzidos pelo vírus em cada uma delas, sendo o diagnóstico feito com base na comparação dos sintomas observados com aqueles relatados na bibliografia. Um vírus pode passar de uma planta doente para uma sadia por meios mecânicos ou através de vetores. Na transmissão mecânica, o suco celular obtido de tecido doente é inoculado em tecido sadio previamente ferido, já na transmissão por vetores, o vírus é adquirido durante a alimentação do vetor numa planta doente e transmitido quando o vetor se alimenta numa

planta sadia. De modo geral, o teste de gama de hospedeiros proporciona resultados bastante precisos e possui custo reduzido (BERGAMIN FILHO et al, 1995).

Os métodos sorológicos constituem a ferramenta mais comumente utilizada para a identificação rápida, simples e precisa da grande maioria dos vírus de plantas. A maior limitação para o uso da sorologia é a disponibilidade de anti-soros de boa qualidade. Essa técnica tem por base a reação antígeno-anticorpo, sendo que o vírus atua como um antígeno quando inoculado em um animal de sangue quente e a substância formada em reação ao vírus funciona como anticorpo. Uma vez obtida uma substância do tipo anticorpo, esta poderá ser armazenada e testada contra qualquer vírus, permitindo relacionar este vírus com o vírus original que provocou a síntese do anticorpo (HAMPTON et al., 1993). O teste de imunoadsorção com enzima ligada ao anticorpo (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), é um padrão em testes sorológicos, em virtude de sua sensibilidade, versatilidade e simplicidade, esse teste baseia-se numa reação enzimática que amplia a reação sorológica o que aumenta sua sensibilidade (FALK E PURCIFULL, 1983).

Os métodos moleculares por serem mais precisos estão substituindo a sorologia. As duas técnicas moleculares mais conhecidas são a hibridização de ácidos nucléicos e a reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR). A hibridização de ácidos nucléicos é uma técnica extremamente sensível, baseada na imobilização do ácido nucléico a ser detectado (na forma de fita simples) em um suporte sólido (geralmente na forma de membrana de nitrocelulose ou náilon) e na formação de híbridos de fita dupla, com a sonda utilizada para a detecção (ZERBINE JUNIOR et al., 2002). A PCR é uma técnica bastante simples baseada na amplificação, em progressão geométrica, de uma seqüência de DNA delimitada por dois oligonucleotídeos (primers), essa técnica é usada na virologia para a clonagem de genes virais, seqüenciamento e detecção de vírus em amostras vegetais, no caso dos vírus cujo material genético é o RNA deve-se realizar a transcrição reversa através da enzima transcriptase reversa, onde o RNA é convertido em uma fita de DNA complementar (SING E SING, 1995).

A identificação precisa do agente causal de uma doença é um requisito essencial para a recomendação de medidas de controle. Um teste diagnóstico ideal proporciona resultados rápidos e precisos, a um custo reduzido. Entretanto, a rapidez e precisão do teste geralmente são inversamente proporcionais ao seu custo. Testes biológicos são precisos e de custo reduzido, porém, o tempo necessário para a diagnose é longo, já os testes sorológicos e moleculares proporcionam respostas rápidas e precisas, mas a um custo bem mais elevado.

Assim o teste a ser utilizado depende da disponibilidade de recursos tecnológicos e financeiros, e também de tempo (ZERBINE JUNIOR et al., 2002).

A detecção de vírus em árvores decíduas é difícil, devido à elevada quantidade de compostos fenólicos, a propagação irregular de agentes patogênicos nas árvores e à baixa concentração do vírus. Por isso quanto mais detalhado for o diagnóstico para a determinação de cada um dos vírus conhecidos e desconhecidos melhor é a diagnose (COOPER, 1993).

2.3 Fitoplasma e doenças de plantas

Fitoplasmas são organismos procariotos, pertencem ao Reino Monera, Domínio Bactéria, Filo tenericutes (bactéria gram positivas com baixo conteúdo G+C e desprovidas de parede celular), Classe Mollicutes, são fitopatogênicos, unicelulares, desprovidos de parede celular, pleomórficos, que vivem e multiplicam-se em vasos do floema e na hemolinfa de insetos (BEDENDO, 1995; BERTACCINI, 2007; DAVIS, 1995). Internamente sua ultraestrutura compreende grânulos densos, semelhantes aos ribossomos, e áreas contendo filamentos de DNA. A dimensão compreende entre 200-800 nm, sendo que o genoma possui de 530-1350 kilobases (AGRIOS, 2005). Estudos de homologia de DNA em genes altamente conservados, que codificam RNA, DNA e proteínas ribossômicas, têm mostrado que os fitoplasmas compreendem um grupo distinto de todos os outros procariotos (HARRISON et al., 1996). Uma diversidade de plantas de valor comercial incluindo aquelas alimentícias, ornamentais e florestais tem sido afetada por anomalias incitadas por estes organismos.

A primeira doença causada por fitoplasmas foi relatada em 1902, sendo identificada como um amarelecimento na planta ornamental “China áster” (*Callistephus chinensis* Nees), conhecida, popularmente, no Brasil como rainha margarida. Na época, os sintomas da doença, denominada de “Aster yellow”, foram descritos por Smith, sendo caracterizada por esse pesquisador como sendo uma das mais obscuras e peculiares doenças (HEWITT, 1987), por não se conhecer sua etiologia e pelos sintomas serem muito típicos. Nessa época não foi possível identificar o agente causal desta doença através dos métodos utilizados devido ao seu tamanho e impossibilidade de cultivá-lo *in-vitro*. A descoberta do agente causal desta doença só foi conhecida em 1967, onde o reconhecimento dos fitoplasmas como agentes de doença foi feito a partir da associação destes procariotos com plantas portadoras de sintomas do tipo “amarelo” por pesquisadores japoneses que através da microscopia eletrônica identificaram a presença de fitoplasmas nos vasos do floema de plantas doentes, e não nos tecidos de plantas

sadias, e naquela época, denominaram estes microorganismos de MLO (“Mycoplasma Like Organism”) (DOI et al., 1967), devido à semelhança morfológica e ultraestrutural, revelada ao microscópio eletrônico, com os micoplasmas tipicamente encontrados em animais e humanos, assim como com os micoplasmas saprófitos.

No entanto, o genoma dos fitoplasmas não é tão similar ao genoma desses verdadeiros micoplasmas. Os fitoplasmas são procariotos unicelulares, onde o material genético não é envolto por uma membrana, não apresentando um núcleo organizado. O citoplasma é circundado apenas pela membrana celular e a ausência da parede celular lhe confere o pleomorfismo. São patógenos sensíveis à tetraciclina, pois quando plantas doentes são imersas em solução de tetraciclina ocorre o desaparecimento temporário de sintomas e a eliminação temporária dos fitoplasmas presentes nos tecidos vegetais (DAVIS, 1981).

Até o momento, não se obteve sucesso para o isolamento destes microorganismos em meio de cultura, uma das explicações é que em função da evolução, os fitoplasmas perderam grande parte de genes relevantes para seu metabolismo básico, porém mantiveram um conjunto de funções necessárias para a sua sobrevivência no floema e para colonização de tecidos de insetos vetores (FIRRA et al., 2007). Devido estes microorganismos não se desenvolverem em meio de cultura dificulta estudos das doenças associadas a estes patógenos.

A associação constante entre fitoplasmas e planta doente, transmissão por insetos vetores, enxertia ou planta parasita (*Cuscuta* spp), bem como o desaparecimento da doença por antibiótico do grupo das tetraciclinas têm sido usadas como ferramentas úteis para demonstrar a patogenicidade. O tratamento com tetraciclina impede a manifestação dos sintomas nas plantas, mas não elimina o patógeno, pois a interrupção do tratamento com antibiótico conduz novamente ao aparecimento dos sintomas da doença (RUEGG e COUSIN, 1974).

O primeiro esquema de classificação tomava por base os sintomas da planta hospedeira e o inseto vetor do fitoplasma, pois a microscopia eletrônica não permitia a diferenciação entre os diversos fitoplasmas. No entanto, este tipo de determinação era laboriosa, consumia muito tempo e muitos insetos vetores eram desconhecidos (LEE et al., 2000). Também, fitoplasmas relacionados podem induzir diferentes sintomas no mesmo hospedeiro vegetal, e diferentes fitoplasmas podem induzir sintomas similares em determinada planta (DAVIS, 1995). Com o desenvolvimento das técnicas moleculares foi

possível demonstrar que o mesmo fitoplasma pode causar diferentes doenças em diversos hospedeiros distintos.

Atualmente são classificados em grupos com base em análises de RFLP de fragmentos do gene 16SrDNA amplificados pela reação de PCR e digerido por diversas enzimas de restrição (LEE et al., 1998). Vários grupos de fitoplasmas têm sido diferenciados com base na variação de sequências de nucleotídeos do gene 16S ribossômico. A classificação é baseada primariamente no tamanho do genoma e na filogenia deduzida da sequência de nucleotídeos do gene 16SrRNA (HARRISON et al., 1996). Atualmente, com base nesta técnica, os fitoplasmas são classificados em 17 grupos e mais de 50 subgrupos (LEE et al., 1998; MONTANO et al., 2001). Recentemente foi proposto um novo esquema de classificação em 28 grupos com base em análise virtual de RFLP de mais de 800 sequências do gene 16S rDNA de fitoplasmas depositados no Gen Bank (WEI et al., 2007). A maior parte das doenças associadas à fitoplasmas já relatadas em todo o mundo, caracterizadas pelos mais variados tipos de sintomas, estão associados a fitoplasmas pertencentes a seis grandes grupos (16SrI, 16SrIII, 16SrV, 16SrX, 16SrXI e 16SrXII).

O principal mecanismo envolvido na patogênese é o desequilíbrio no balanço hormonal das plantas infectadas (DAVIS e LEE, 1991). Os danos provocados pela presença do patógeno podem estar relacionados com o genótipo da planta suscetível, a estirpe do patógeno e as condições do ambiente, podendo, em alguns casos, a doença ter um efeito devastador sobre a cultura (DAVIS, 1995). Em geral, plantas doentes podem exibir sintomas de clorose generalizada das folhas, desenvolvimento de super brotamento, clareamento ou avermelhamento das nervuras, enfezamento, deformações dos órgãos florais, esterilidade, filodia e virescência (KITAJIMA E COSTA, 1970).

Há relatos de diversas doenças causadas por este tipo de fitopatógeno, entre elas, o lenho mole da macieira (RIBEIRO et al., 2007), o superbrotamento da crotalária (AMARAL MELLO et al., 2004), o super brotamento da abobrinha (MELO et al., 2007), o super brotamento do maracujazeiro (RIBEIRO E BEDENDO, 2007). As espécies ornamentais nas quais os fitoplasmas foram associadas a algum tipo de patologia são: crista-de-galo (*Celosia* sp.), margaridinha (*Crysanthemum parthenium*), rainha margarida (*Callistephus chinensis*), sempre viva (*Helychrisia bracteatum*) (KITAJIMA, 1994), hibisco (*Hibiscus sinensis*) (MONTANO et al., 2001), vinca (*Catharanthus roseus*) (BEDENDO et al., 1999), bico-de-papagaio (*Euphorbia pulcherrima*) (RIBEIRO E BEDENDO, 2006), begônia (*Begônia* sp.) (RIBEIRO et al., 2006) e primavera (SILVA, 2008).

Em espécies florestais existem poucos relatos da ocorrência de fitoplasmas causando doenças. Até o momento, os fitoplasmas foram associados a algum tipo de doenças em: manga (*Mangifera indica* L.) (KAZMI et al., 2007), faveiro (*Dimorphandra gardneriana* Tul.) que é uma leguminosa nativa do Brasil onde fitoplasmas estão causando crescimento reduzido e amarelecimento foliar (MONTANO et al., 2007). Foi observado por Marcone et al. (1996), em eucalipto (*Eucalyptus* spp.) sintomas de amarelecimento e declínio da planta na Itália causados por fitoplasma, em papoula (*Populus nigra* L.), foi observada a presença de fitoplasmas causando desde quedas de folhas à morte de árvores na França (COUSIN, 1996), Alemanha (BERGES et al., 1997) e Croácia (SERUGA et al., 2002). Outras espécies de papoulas foram encontradas com doenças provocadas por fitoplasmas, a *P. alba* L. (COUSIN, 1996) e a *P. tremula* L. (SEEMULLER E LEDERER, 1988). Outras espécies arbóreas possuem patologias associadas à fitoplasmas a exemplo da *Fraxinus velutina* (BRICKER E STUTZ, 2004), *Ulmus minor* (MARCONE et al., 1997), *Magnolia* spp. (KAMINSKA et al., 2001), *Robinia pseudoacacia*, *Corylus maxima* e *C. colurna*, *Quercus rubra*, *Crataegus monogina* e *Salix babylonica* (MARCONE et al., 1999). Na América Central foi observado em gliricidia (*Gliricidia sepium*) amarelecimento das folhas provocado por fitoplasmas (KENION, et al., 1998).

2.3.1 Vetores de Fitoplasmas

Na natureza, os fitoplasmas são comumente transmitidos e disseminados por insetos sugadores das famílias Cicadellidea (cigarrinhas) e Fulgoridea (psilídeos) (LEE et al., 2000), porém existem relatos de representantes da família Coreidae (percevejos) como vetores (MITCHELL, 2004). A característica desses insetos de se alimentarem no floema está diretamente relacionada com a aquisição desse patógeno, o qual é estritamente um habitante do floema (GRANADOS, 1969).

Dentre os insetos transmissores de fitoplasma a cigarrinha é o principal vetor. Os fitoplasmas podem ser adquiridos com maior eficiência por ninfas do que por cigarrinhas adultas e sobreviver através de subseqüentes ecdises. Apesar dos relatos de transmissão transovariana (ALMA et al., 1997), a capacidade da progênie transmitir o agente patogênico ainda não foi comprovada. Desta forma, os indivíduos da progênie devem se alimentar em plantas infectadas para se tornarem vetores infectivos (AGRIOS, 2005).

2.3.2 Diagnose de doenças associadas à Fitoplasma

A diagnose, quando feita precocemente e de forma acurada, constitui-se num componente relevante para o sistema de manejo da doença (MILLER e MARTIN, 1988). Seu reconhecimento é o primeiro passo para o controle, pois a partir do diagnóstico é possível selecionar o método de controle mais eficiente, objetivando diminuir ao máximo os prejuízos econômicos que possam ser causadas pelos patógenos.

Os fitoplasmas induzem alterações no desenvolvimento da planta hospedeira, os quais se expressam na forma de diversos tipos de sintomas. A diagnose pode ser realizada com base na observação dos sintomas, as anormalidades típicas das plantas infectadas podem se apresentar como: superbrotamento de ramos em desenvolvimento, filoidia (aparecimento de folhas no lugar de flores), virescência, avermelhamento de folhas e hastes, amarelecimento generalizado, declínio e enfezamento de plantas, necrose do floema (HOGENHOUT et al., 2008). Diagnose de patologias associadas à fitoplasmas baseada na observação dos sintomas nem sempre é confiável, podendo induzir a erros, devido à similaridade existente entre os sintomas associados a esses mollicutes e aqueles provocados por patógenos de natureza viral, a difícil observação destes organismos nos tecidos das plantas doentes e a característica dos fitoplasmas de não serem cultiváveis em meio de cultura são fatores que também dificultam a diagnose de doenças causadas por fitoplasmas (DAVIS, 1995).

Outra dificuldade na detecção de fitoplasmas em plantas é a distribuição desuniforme dos mesmos nas plantas nas diferentes partes do hospedeiro (LEE E DAVIS, 1992). Este fator pode impedir a detecção do patógeno, a depender da técnica empregada.

A microscopia eletrônica, os testes sorológicos e as técnicas moleculares são recursos empregados para a detecção e identificação de fitoplasmas de forma mais precisa que a detecção pela sintomatologia apresentada pela planta. A diagnose com base nos sintomas tem sido confirmada pela detecção do fitoplasma no floema, usando a microscopia de transmissão eletrônica, no entanto a utilização do microscópio eletrônico não permite a identificação do organismo detectado, sendo, portanto, uma técnica aplicada nos casos que necessitam de informações gerais a respeito da associação fitoplasma e a doença (HARRISON et al., 1996).

O emprego de testes sorológicos como ELISA, dot-ELISA, imunomicroscopia e microscopia de imunofluorescência permitem a detecção e a diferenciação de isolados de fitoplasma associados à doença (LEE E DAVIS, 1992). A necessidade de se determinar métodos para o controle de doenças tem sido o principal fator responsável pelas pesquisas que

vem sendo feitas com fitoplasmas. Os recentes avanços da biologia molecular e da biotecnologia estão sendo aplicados no desenvolvimento de ferramentas sensíveis, específicas e rápidas para a detecção de fitoplasmas. Entre elas estão a reação em cadeia da polimerase (PCR), o polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP) e a análise da sequência nucleotídica da região do gene 16S rDNA (MARTIN et al., 2000).

A técnica de PCR consiste na amplificação enzimática *in vitro* de fragmentos específicos de DNA, em progressão geométrica, visando à produção de milhões de cópias desta sequência. Os produtos de PCR podem ser observados através de eletroforese em gel de agarose. Os iniciadores derivados de sequência do gene 16S rDNA têm se mostrado altamente sensíveis para fins de detecção de fitoplasma em plantas e insetos (GUNDERSEN E LEE, 1996). Oligonucleotídeos universais e específicos para a detecção têm sido amplamente utilizados na comprovação de diagnoses em plantas presumivelmente infectadas por fitoplasmas (DAVIS, 1995). A técnica de RFLP consiste em promover a digestão do fragmento genômico alvo amplificado no PCR, com o uso de enzimas de restrição, gerando perfis eletroforéticos utilizados para identificação do patógeno e sua classificação em grupos (MONTANO et al., 2001). Estudos dessa natureza têm contribuído para melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade do organismo, sua evolução, expressão de genes de resistência da planta em resposta às infecções e mecanismos de transmissão por vetores, além de auxiliar no desenvolvimento de métodos mais efetivos para o controle das doenças nos campos de cultivo (LEE et al., 2000).

A detecção de fitoplasmas constitui importante suporte para a diagnose das doenças. A disponibilidade de métodos rápidos, sensíveis e acurados, tem sido de grande valia para complementar a diagnose baseada em sintomas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Observação visual da sintomatologia no campo

As análises visuais da sintomatologia foram baseadas na severidade dos sintomas e na dispersão das plantas sintomáticas em campo.

3.2 Acúmulo de amido na folha

Plantas infectadas por vírus, geralmente, apresentam um acúmulo de amido nas áreas sintomáticas das folhas. Para a verificação deste, folhas sadias e sintomáticas de madeira nova foram coletadas e analisadas. Toda a clorofila foi extraída, colocando as folhas em um frasco de vidro, fazendo perfurações nas mesmas, adicionando 100 ml de álcool e colocando esse frasco em banho-maria, até as folhas ficarem incolores. Posteriormente, as folhas foram colocadas em uma placa de petri e acrescentou – se Lugol para que ocorresse a reação. Na presença do Iodo, o amido fica azulado.

3.3 Transmissão por semente

Para verificar a possível transmissão dos sintomas por esta prática foram coletadas 40 sementes de plantas de madeira nova com sintomas de mosaico amarelo e posteriormente plantadas em vasos plásticos em casa de vegetação para observação dos sintomas.

3.4 Detecção de vírus

Os testes de transmissão foram conduzidos em casa de vegetação, no Laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Fitotecnia e Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Campus de Vitória da Conquista – BA e os testes moleculares foram realizados no Laboratório de Virologia Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Campus de Piracicaba (ESALQ/USP). As amostras foram compostas de folhas obtidas de plantas sintomáticas localizadas no município de Vitória da Conquista – BA. As plantas foram amostradas no campo e as sementes foram coletadas e plantadas em vasos mantidos em casa de vegetação.

3.4.1 Plantas-teste

Para o teste de inoculação foram utilizadas plantas de *Pterogyne nitens*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. murale*, *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum* TNN, *N. t. Turkish*, *N. t. "samsun"*, *N. t. havana*, *N. t. xanthi*, *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. rustica* e *N. clevelandii*. Estas plantas foram obtidas através de semeadura em vasos plásticos, contendo substrato devidamente adubado, e mantidas sob condições de casa de vegetação no Departamento de Fitotecnia e Zootecnia da UESB.

3.4.2 Inoculação mecânica

Os inóculos para a transmissão mecânica foram preparados através da maceração, em almofariz, de pedaços de folhas de ponteiros de madeira nova sintomática numa diluição de 1:20, em tampão de fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0. As plantas sadias a serem inoculadas foram previamente polvilhadas com carborundum e o inóculo foi aplicado por meio de fricção das folhas com o indicador umedecido com o extrato vegetal obtido. Após a inoculação as folhas foram lavadas para retirar o excesso de inóculo e de abrasivo. As plantas foram mantidas em casa de vegetação para observação dos sintomas.

3.4.3 Transmissão por enxertia

Plantas sadias de madeira nova foram obtidas a partir da semeadura em vasos plásticos, contendo uma mistura de terra mais matéria orgânica. As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação. Quando atingiram uma altura de aproximadamente 30 cm foram decapitadas e na região central da haste foi aberta uma fenda longitudinal, de aproximadamente 2 cm de comprimento, com um canivete. Na fenda dessa planta considerada o porta-enxerto, foi inserido um pedaço de haste obtido de planta de madeira nova com sintomas de mosaico amarelo. Para isso, na base dessa haste foram feitos dois cortes em bisel, formando uma cunha, de aproximadamente 1,5 cm. As partes foram mantidas juntas por meio de fitilho apropriados para essa prática. Após o pegamento do enxerto o fitilho foi retirado e as plantas foram avaliadas por um período de 90 dias, para se verificar a possível manifestação de sintomas nos porta-enxertos.

Para a transmissão por enxertia, do tipo borbulhia em T invertido, foram usados como enxertos as gemas de plantas apresentando sintomas de mosaico amarelo às quais foram justapostas a porta-enxertos sadios da mesma espécie. No porta-enxerto de 1 a 1,5 cm de diâmetro realizou-se dois cortes na casca em forma de T invertido, com auxílio de um canivete. Em seguida, inseriu-se a gema abaixo da casca. Após a inserção da gema, amarrou-se com amarril de baixo para cima. Após a enxertia todas as plantas foram avaliadas por um período de 90 dias, para se verificar a possível manifestação de sintomas nos porta-enxertos.

3.4.4 Transmissão por afídeo

O afídeo vetor utilizado na inoculação foi o *Myzus persicae* Sulzer. Colônias sadias desse afídeo foram obtidas em plantas de rabanete selvagem (*Raphanus raphanistrum* L.) mantidas em insetário no Laboratório de Virologia Vegetal.

No processo de inoculação, os afídeos foram removidos das folhas de rabanete com um pincel fino e macio, passando-o levemente sobre os afídeos. Estes, após coletados, foram mantidos em jejum numa caixa plástica por um período de, no mínimo, 30 minutos. Em seguida, estes foram colocados sobre plantas de madeira nova sintomáticas. O período de aquisição, no qual os afídeos permaneceram sobre a planta infectada, foi de 20 minutos. Em seguida, os afídeos foram transferidos para as plantas sadias, utilizando 10 afídeos por planta. As plantas foram pulverizadas com inseticida aproximadamente 1 hora após a inoculação e mantidas em casa de vegetação.

3.4.5 Detecção de begomovirus por PCR

Para a extração do DNA total das plantas de madeira nova foi usado o protocolo desenvolvido por Zhang et al. (1998) com algumas alterações. Amostras de folhas das plantas-teste, do controle positivo (planta com sintoma) e do controle negativo (planta sadia) foram maceradas em nitrogênio líquido adicionando-se 800 µl de tampão CTAB (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris 100 mM, pH 8,0 e 0,2% de mercaptoethanol) aquecido a 65°C. As amostras foram agitadas em vortex e mantidas em banho-maria a 65°C durante 30 minutos, agitando-as a cada dez minutos. A seguir, foi adicionado um volume de CIA 24:1 (clorofórmio: álcool isoamílico), agitado em vortex e centrifugado por dez minutos a 10.000 g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionado um volume de isopropanol e

0,25 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5. A seguir as amostras foram colocadas em freezer por no mínimo uma hora e em seguida centrifugadas a 8.000 g por 10 minutos. O precipitado foi lavado por duas vezes com 500 µl de etanol 70%, centrifugando por um minuto a 8.000 g após cada lavagem. O precipitado foi seco a temperatura ambiente e dissolvido em 20 µl de água deionizada (Milli Q).

Para a reação de PCR foram utilizados dois µl de DNA total extraído para a amplificação como descrito por Wyatt e Brown (1996). Foram usados separadamente oligonucleotídeos que amplificam parte do DNA-A que contém o gene da proteína capsidial (AV494 /Ac1048) e do DNA-B (PCRC1/PBL1v 2040). Em termociclador, as amostras foram aquecidas a 94°C por 2 minutos e após passaram por 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu em 1 min. a 94°C, 1 min. a 55°C e 2 min. a 72°C, sendo completado por 10 min. a 72°C. O produto desta reação foi identificado juntamente com marcador de 1Kb (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) em gel de agarose 1%, corado com Syber safe (1:10000, Invitrogen).

3.5 Detecção de Fitoplasma

3.5.1 Coleta das amostras

As amostras foram compostas de folhas obtidas de três plantas sintomáticas e uma assintomática, localizadas no município de Vitória da Conquista – BA e analisadas no Laboratório de Fitopatologia Molecular da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Campus de Piracicaba (ESALQ/USP).

3.5.2 Extração rápida de DNA total

Cerca de 0,2 g de material vegetal fresco foi macerado em almofariz de porcelana com o auxílio de nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para microtubos de 1,5 mL, sendo adicionados 800µL de tampão de extração 2X CTAB a 60°C. Os tubos foram incubados em “banho-maria” a 65°C por 60 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos para homogeneizar a suspensão. A cada tubo foram adicionados 600 µL de CIA (clorofórmio/álcool isoamílico 24:1). Centrifugou-se o lisado por 15 minutos a 14.000 rpm. A fase superior (aquosa) foi retirada e transferida para outro tubo de 1,5 mL no qual foram adicionados 540 µL de

isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos por uma noite a -20°C . No dia seguinte, fez-se a centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 80% e incubou-se por um período de 10 minutos. Em seguida, o etanol foi descartado e esta operação foi repetida mais uma vez. Foram adicionados 500 μL de NaCl 1M e procedeu-se à incubação por 30 a 60 minutos a 4°C . Novamente fez-se centrifugação por 14.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80% por 10 minutos e a operação foi realizada mais uma vez. O etanol foi descartado e os tubos foram mantidos abertos e invertidos sobre papel toalha para secar o precipitado. Após a secagem, o precipitado foi ressuscitado em 100 μL de água deionizada ou solução tampão 1xTE e armazenado a -20°C .

Para o preparo do tampão de extração 2X CTAB foi seguido o seguinte protocolo: Foram pesados 2 g de CTAB; 8,18 g de NaCl; 0,74 g de EDTA; 1,57g de Tris-HCl e 1,0 g de PVP. Os materiais foram dissolvidos em água deionizada, completando o volume para 100 mL. O pH foi acertado para 8,0. No momento de uso do tampão, acrescentou-se 0,2 mL de mercaptanol.

3.5. 3 Purificação do DNA

Após a extração, parte do DNA extraído foi purificado, com o objetivo de aumentar a sensibilidade de detecção nos testes de PCR. Para isto foi empregado um conjunto de reagentes pertencentes ao “Gene Clean Kit – BIO 101” (Vista/CA). O procedimento para a purificação seguiu as instruções do fabricante.

3.5.4 Detecção de fitoplasmas por PCR

O DNA total de cada amostra, purificado ou não, foi diluído nas proporções de 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100 em água destilada deionizada (‘miliq’). Para a detecção de fitoplasmas foram empregados os iniciadores (“primers”) universais R16mF2/mR1, P1/P7 e R16F2n/R2, em PCR duplo. Na primeira reação, foi usado o par R16mF1/mR2 ou P1/P7, sendo o produto amplificado diluído em água deionizada na proporção 1:50 e usado como molde para a segunda reação com o par R16F2n/R2. Esses últimos iniciadores amplificam uma determinada seqüência de 1,2Kb do DNA genômico dos fitoplasmas, correspondente ao 16S rDNA.

Cada reação de PCR foi processada utilizando um volume final de 25 μ L, contendo os seguintes componentes: 1 μ L de extrato de DNA diluído de cada amostra de madeira nova; 18,3 μ L de água destilada deionizada; 0,5 μ L de cada iniciador (solução 20 pmol/ μ L); 2 μ L de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo); 2,5 μ L de solução tampão 10X PCR e 0,17 μ L de Amplitaq 5U/ μ L.

Como controles negativos foram usados o DNA extraído de planta assintomática madeira nova e água destilada deionizada autoclavada. Os padrões positivos foram representados pelos DNA extraído de plantas de milho e de chuch comprovadamente infectadas por fitoplasma. O padrão de peso molecular utilizado foi 1 Kb ladder.

O termociclador foi programado para 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 do “primer”. Um tempo adicional de 1 minuto e de 7 minutos foram permitidos para a etapa de desnaturação do primeiro ciclo e para a etapa de extensão do último ciclo, respectivamente.

As seqüências dos iniciadores utilizados encontram-se descritas abaixo:

- a) R16 P1- 5'AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T 3' (DENG e HIRUKI, 1991);
- b) R16 P7- 5'CGT CCT TCA TCG GCT CTT 3' (SMART *et al.*, 1996);
- c) R16 mF2 - 5'CAT GCA AGT CGA ACG A 3' (GUNDERSEN e LEE, 1996);
- d) R16 mR1- 5'CTT AAC CCC AAT CAT CGA C 3' (GUNDERSEN e LEE, 1996);
- e) R16 F2n- 5'GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG 3' (GUNDERSEN e LEE, 1996);
- f) R16 R2- 5'TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G 3'(GUNDERSEN e LEE, 1996).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sintomatologia e distribuição das plantas sintomáticas em campo

Os sintomas visíveis nos indivíduos de madeira nova que estão doentes em campo são a presença de folhas com regiões amareladas (Figura 1), baixo desenvolvimento quando comparadas com plantas assintomáticas de mesma idade, os sintomas nem sempre estão distribuídos uniformemente, podendo algumas plantas apresentarem somente nas folhas mais novas o amarelecimento (Figura 2).



Figura 1 – Folhas de *Pterogyne nitens* com sintomas.



Figura 2 – Plantas de *Pterogyne nitens* com sintomas de amarelo apenas nas folhas novas.

A distribuição da doença em campo não é uniforme, podendo ser observado indivíduos sintomáticos e assintomáticos adjacentes (Figura 3). Assim, possivelmente o amarelo da madeira nova não está relacionado a fatores climáticos ou nutricionais.



Figura 3 – Plantas de *Pterogyne nitens* assintomática (à esquerda) e sintomática (à direita) em campo.

4.2 Acúmulo de amido na folha

As folhas assintomáticas que receberam o Lugol ficaram escuras (azul escuro/ preto) rapidamente (Figura 4A), demonstrando a presença de amido na folha. Isso ocorreu devido à amilose presente no amido reagir com o iodo (I_2) presente na solução de Lugol gerando essa coloração. Já nas folhas sintomáticas, ao pingar lugol apresentaram uma coloração menos escura onde havia as manchas amareladas (Figura 4B), demonstrando a baixa quantidade de amido armazenado nos locais da folha onde existiam os sintomas de mosaico amarelo. Segundo Agrios (1997), plantas infectadas por vírus teriam resultado divergente deste, pois em áreas afetadas por vírus há uma maior concentração de amido apesar da baixa produção deste fotoassimilado devido a não translocação de substâncias em células afetadas. Diante deste resultado é possível que as manchas amareladas nas folhas de madeira nova não estejam relacionadas a um vírus.

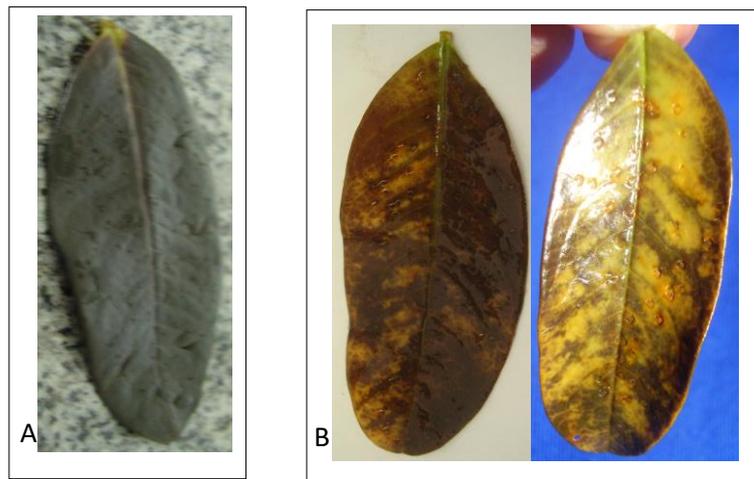


Figura 4 – Acúmulo de amido na folha de *Pterogyne nitens* sendo em A folha assintomática e em B sintomática.

Segundo Taiz e Lincoln (2004), os constituintes celulares dos vegetais são muitos e estão distribuídos em diversos locais na planta. Entre eles estão os carboidratos, lipídeos, proteínas e sais minerais. Os carboidratos são fontes energéticas, sintetizados através da fotossíntese, por exemplo, na forma de amido que é um polissacarídeo de glicose composto de dois tipos de cadeias: amilose e amilopectina. Assim, o mosaico amarelo nas folhas de madeira nova está impedindo a realização da fotossíntese nas regiões onde há presença das manchas amarelas o que é demonstrado através da não reação do Iodo com o amido que é um produto da fotossíntese. Em outras espécies florestais doenças como a clorose provocada por Tobacco mosaic vírus em *Quercus* spp., também provoca a diminuição da área fotossintética das árvores afetadas o que ocasiona baixo crescimento nas plantas (NIENHAUS E CASTELLO, 1989). Segundo Montano et al. (2007), em faveiro (*Dimorphandra gardneriana* Tul.) fitoplasmas estão causando amarelecimento foliar o que, também, diminui a área fotossintética das plantas afetadas ocasionando crescimento reduzido.

4.3 Transmissão por sementes

Nas quarenta plantas provenientes de sementes de madeira nova coletadas de matrizes sintomáticas não foi observada nenhuma manifestação dos sintomas de mosaico amarelo como pode ser visto na Figura 5. Desse modo, descarta-se a possibilidade desta anomalia estar associada a algum fator genético da planta e se houver algum agente patogênico associado à mesma, este não é transmitido por sementes. De acordo com os estudos de Lin et

al (1980), em plantas de caupi com sintomas de viroses, coletadas em Goiânia, GO, isolou-se e caracterizou-se um Cucumovírus que foi transmitido por sementes. No entanto, Segundo Bedendo (1995), existem plantas com mosaico amarelo que não transmite a doença para a progênie, sendo em muitos casos atribuída esta doença aos vírus e fitoplasmas. Sendo confirmado por Krause-Sakate et al. (2008), que em estudos afirmaram não haver indícios da transmissão do *Lettuce mosaic virus* (LMV) via semente em cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.). Kenion et al. (1998), também não observaram a transmissão via semente do amarelo em glicidia (*Gliricidia sepium*) provocado por fitoplasmas.



Figura 5 – Plantas de *Pterogyne nitens* assintomáticas provenientes de sementes de matrizes sintomáticas.

4.4 Detecção de vírus

Após a inoculação mecânica com extrato foliar de plantas de madeira nova sintomáticas em plantas de madeira nova assintomáticas e em plantas hospedeiras, estas ficaram em casa de vegetação por quatro semanas, nas quais foram feitas observações diárias onde se constatou o não aparecimento de sintomas nas plantas inoculadas. O procedimento foi repedido por três vezes e em nenhuma foi observada a existência de plantas com sintomas da doença. A relação completa das plantas inoculadas, bem como a não presença de sintomas estão listadas na Tabela 1. Diferentemente vários autores conseguiram a transmissão de vírus via inoculação mecânica em plantas teste, a exemplo de Cooper (1993), que conseguiu via transmissão mecânica a expressão dos sintomas em plantas-teste ocasionados pelo

tobamovirus em árvores de *Fraxinus pennsylvanica* e pelo nepovírus em *Fraxinus americana*, ambas possuía sintomas de clorose nas folhas.

Tabela 1- Plantas-teste, inoculadas mecanicamente com extrato proveniente de plantas de madeira nova (*Pterogyne nitens*) apresentando sintomas de mosaico amarelo.

Plantas-teste	Plantas sintomáticas/ plantas inoculadas
<i>Pterogyne nitens</i>	0/10
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	0/3
<i>Chenopodium quinoa</i>	0/3
<i>Chenopodium murale</i>	0/3
<i>Gomphrena globosa</i>	0/3
<i>Datura stramonium</i>	0/3
<i>Nicotiana tabacum TNN</i>	0/3
<i>Nicotiana tabacum Turkish</i>	0/3
<i>Nicotiana tabacum "samsun"</i>	0/3
<i>Nicotiana tabacum havana</i>	0/3
<i>Nicotiana tabacum xanthi</i>	0/3
<i>Nicotiana benthamiana</i>	0/3
<i>Nicotiana glutinosa</i>	0/3
<i>Nicotiana rustica</i>	0/3
<i>Nicotiana clevelandii</i>	0/3

Realizou-se 15 enxertias em plantas de madeira nova em casa de vegetação e somente em cinco houve brotação do enxerto (Figura 6). Isso provavelmente ocorreu devido à madeira nova ser bastante fibrosa o que dificultou a aderência do enxerto ao porta-enxerto.



Figura 6 - Enxertia realizada com plantas de *Pterogyne nitens* sintomáticas (enxerto) em plantas assintomáticas (porta-enxerto).

Após 45 dias da realização da enxertia não houve manifestação de sintomas nas plantas enxertadas, no entanto se forem avaliadas por mais tempo podem apresentar sintomas da doença. Segundo Cooper (1993) deformações cloróticas em *Ailanthus altissima* ocasionada por um Potyvirus pode ser transmitido via enxertia. Em eucalipto (*Eucalyptus* spp) sintomas de amarelecimento ocasionado por fitoplasma foi observado por Marcone et al. (1996) em plantas enxertadas.

O mosaico amarelo também não foi transmitido pelos afideos às plantas de madeira nova sadias. Impossibilitando, assim, a identificação deste inseto como vetor do mosaico amarelo da madeira nova nas condições experimentais estabelecidas neste trabalho. É possível que o inseto empregado no teste não seja realmente vetor da clorose da madeira nova. De acordo com Silva et al. (2006), em mudas sadias das gravioleiras ‘AB’, ‘Crioula’, ‘Lisa’ e ‘Morada’ e das anonáceas ata (*A. squamosa* L.), araticum (*A. crassiflora* Mart.), araticum do brejo (*A. glabra* L.), biriba (*Rollinia mucosa*), condessa (*A. reticulata* L.) e ylang ylang (*Cananga odorata*), também não foi observada a transmissão viral por meio de soldadinho - *Membrancis foliata* Richter (Homoptera: Membracidae), pulgão-verde da graviola - *Aphis* sp. (Homoptera: Aphididae) e cigarrinha-verde - *Empoasca* sp. (Homoptera: Cicadellidae).

Como os sintomas de mosaico amarelo e baixo desenvolvimento apresentados pelas plantas de madeira nova em campo são semelhantes àqueles apresentados pelas fitopatologias ocasionadas pelos Begomovírus, grupo de vírus, foi feita uma análise via PCR específica para Begomovírus, no entanto seu resultado foi negativo, não sendo detectado nenhum vírus deste grupo por PCR associado ao mosaico amarelo da madeira nova. Diferente destes resultados, Santos et al. (2004), encontram em tomateiro sintomas de mosaico, comumente acompanhado de amarelecimento, enrolamento do limbo foliar e graus variados de nanismo associado a Begomovírus via análise de PCR. Andrade et al. (2002), também encontraram Begomovírus associado a sintomas de mosaico em *Sida rhombifolia*, *S. spinosa*, *Cleome aculeata*, *Blainvillea rhomboidea*, *Allamanda* sp.

4.5. Detecção de fitoplasma

Os sintomas de amarelecimento do limbo e nervuras e pequeno desenvolvimento presentes nas plantas de madeira nova são semelhantes àqueles relatados em outras regiões do mundo em plantas suspeitas de infecção por fitoplasma. A exemplo de *Populus alba* L.

(COUSIN, 1996), *Fraxinus velutina* (BRICKER E STUTZ, 2004) e *Ulmus minor* (MARCONE et al., 1997), que apresentaram sintomas de amarelecimento e crescimento reduzido provocados por fitoplasma.

Diante desta hipótese Foram coletadas e submetidas aos testes de PCR amostras de plantas de madeira nova, sintomáticas e assintomáticas, sendo que fitoplasmas foram detectados nas amostras de folhas sintomáticas desta planta. Os fragmentos do 16S rDNA dos fitoplasmas foram amplificados pelos pares de iniciadores R16 mF2/R1 e P1/P7 . E re-amplificados sempre pelo par R16 F2n/R2. Os materiais positivos para a presença de fitoplasmas foram identificados pela visualização de bandas de aproximadamente 1,2Kb, no gel de agarose, após a eletroforese. Os padrões positivos das folhas de madeira nova sintomáticas apresentaram bandas típicas de 1,2Kb, enquanto nenhuma amplificação ocorreu nos padrões negativos, representados pelas folhas das plantas de madeira nova assintomática e pela água deionizada.

Outros trabalhos realizados com fitoplasmas em plantas lenhosas relatam que apesar da sensibilidade, a diagnose através da técnica de PCR pode ser confundida pela distribuição irregular e baixa concentração do fitoplasma na planta (DAIRE et al.,1992), o que não ocorreu com as amostras de madeira nova, devido, provavelmente, as mesmas apresentarem alta concentração de fitoplasma na planta e pouca irregularidade na distribuição do patógeno.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram a associação dos sintomas de amarelo com a presença de fitoplasma nos tecidos foliares das plantas de madeira nova que apresentavam este tipo de sintomatologia. Sendo, estes resultados concordantes com aqueles relatados por Montano et al. (2007), os quais constataram a presença de fitoplasmas em tecidos foliares da leguminosa *Dimorphandra gardneriana* Tul., known (fava d'anta , faveiro), que apresentavam a mesma doença que a madeira nova no Maranhão-BR. Em ambos os casos a mesma técnica de detecção e os mesmos oligonucleotídeos foram utilizados. Pode-se observar que os sintomas nas plantas naturalmente infectadas de madeira noiva eram indicativos da ocorrência de doença associada à fitoplasmas e semelhantes àqueles anteriormente descritos para outras espécies de leguminosas que apresentavam anomalias típicas de amarelos.

Apesar da confirmação da presença de fitoplasma associado aos sintomas de amarelecimento nas folhas de madeira nova, novos estudos devem ser realizados com um número maior de amostras para ser feita a identificação do fitoplasma causador da patologia, a detecção do vetor e o controle para este vetor.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

1. O mosaico amarelo está interferindo na produção fotossintética das plantas de madeira nova;
2. O mosaico amarelo da madeira nova não está relacionado com anomalias genéticas;
3. O mosaico amarelo da madeira nova não é transmitido mecanicamente;
4. O mosaico amarelo da madeira nova não está associado a um Begomovírus e possivelmente a nenhum outro vírus;
5. O afídeo *Myzus persicae* Sulzer não é vetor do mosaico amarelo;
6. Fitoplasmas, possivelmente estão associados com o mosaico amarelo da madeira nova.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4 ed. Amsterdam: Elsevier, 1997, p. 635.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 ed. Amsterdam: Elsevier, 2005, p. 952.
- ALBUQUERQUE, F. C.; IKEDA, H.; COSTA, A. S. Ocorrência do vírus do mosaico da melancia (*Citrullus vulgaris* Schrad.) em plantações de melão (*Cucumis melo* L.) na região de Belém – PA. **Revista de Olericultura**, v. 12, p. 94, 1972.
- ALMA, A.; BOSCO, D.; DANIELLI, A.; BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; ARZONE, A. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titamus* Ball reared on health plants. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 115-121, 1997.
- AMARAL-MELLO, A. P. O.; RIBEIRO, L. F. C.; MASSOLA JUNIOR, N. S.; BEBENDO, I. P. Um fitoplasma do grupo 16SrV associado ao super brotamento da crotalária . **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 432-435, 2004.
- ANDRADE, L. G. S.; ASSUNCAO, I. P.; VILELA RESENDE, L.; JUSTINIANO, F. M. A.; PEDROZA, V. T. H.; GALLINDO, F. A.T.; AGUIAR, F. N. S. Detecção de begomovírus associados a plantas invasoras no estado de Pernambuco e caracterização molecular parcial de um isolado de *Sida rhombifolia*. **Summa Phytopatológica**, v. 28, n. 4, p. 353-356, 2002.
- BEDENDO, I. P.; DAVIS, R. E.; DALLY, E. L. detecção e caracterização de fitoplasmas em plantas de vinca (*Cataranthus roseus*) e de pimenta (*Capsicum frutescens*) através de técnicas de duplo PCR e RFLP. **Summa Phytopathologica**, Botuvatu, v. 25, n. 3, p. 197-201, 1999.
- BEDENDO, I. P. Micoplasmas e espiroplasmas. In: Bergamin Filho, a.; Kimati, H.; Amorim, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. Cap. 9, v. 1, p. 202-210.
- BERGAMIM FILHO , A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, v. 2, p. 132-160.
- BERGES, R., COUSIN, M. T., ROUX, J., MAURER, R., SEEMÜLLER, E. Detection of phytoplasma infections in declining *Populus nigra* L. 'Italica' trees and molecular differentiation of the aster yellows phytoplasmas identified in various *Populus* species. **Europe Journal For Pathology**, v. 27, p. 33–43, 1997.
- BERTACCINI, A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemilody. **Frontiers in Biosciene**, Alberston, v. 12, n. 1, p. 673-689, 2007.
- BOMFIM, A. A.; NOVAES, A. B. de.; SÃO JOSÉ, A. R.; GRISI, F. A. Avaliação morfológica de mudas de madeira-nova (*Pterogyne nitens* tull.) produzidas em tubetes e sacos plásticos e de seu desempenho no campo. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 39, n. 1, p. 33-40, 2009.
- BRICKER, J. S., STUTZ, J. C. Phytoplasma associated with ash decline. **Journal Arboriculture**, v. 30, p. 193–199, 2004.

CAPELANES, T. M. Tecnologia de sementes florestais na Companhia Energética de São Paulo. In: Simpósio Brasileiro sobre tecnologia de sementes florestais, 2., 1989, Atibaia. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal, 1991, p. 49-57.

CARNEIRO, J.S. Teste de sanidade de sementes de essências florestais. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.) **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987, p.363-393.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003, v.1, p. 1039.

CARVALHO, P.E.R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira. Colombo: **Embrapa-CNPQ**, 1994, 640p.

CASTIGLIONI, J. A. Descripción botánica, forestal y tecnológica de las principales especies indígenas de la Argentina. In: COSSO, D. **Arboles forestales, maderas y silvicultura de la Argentina**. Buenos Aires: Acme, 1975. p. 38-60.

CAVALCANTE, M. S.; MONTAGNA, R. G.; LOPEZ, G. A. A.; MUCCI, E. S. F. Durabilidade natural de madeiras em contato com o solo. **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v. 16 A, PT. 2, p. 1383-1389, 1982.

CHAGAS, C. M. Mosaico da abóbora em pepino. **O Biológico**, v. 36, p. 326, 1970.

COOPER, J. I. **Virus Diseases of Trees and Shrubs**. Australia: Chapman & Hall. 2 ed. 1993.

COUSIN, M. T. Witches' broom: a phytoplasma disease of poplar. In: MARAMOROSCH, K., RAYCHAUDHURI, S. P. (Ed.) **Forest trees and palm diseases and control**. Oxford and IBH Publishing Company, New Delhi, p. 245-262, 1996.

DAIRE, X.; BOUDON-PADIEU, E.; BERVILLÉ, A.; SCHNEIDER, B.; CAUDWELL, A. Cloned DNA probes for detection of grapevine flavescence dorée mycoplasma-like organism (MLO). **Annals of Applied Biology**, v.121, p.95-103, 1992.

DAVIS, R. E. Fitoplasmas: Fitopatogênicos procarióticos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodes. In: LUIZ, W. C.; FERNANDES, J. M. C.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Ed.). **Revisão Anual de Fitopatologia de Plantas**. Passo Fundo: RAPP, v. 3, p. 1-17, 1995.

DAVIS, R. E.; LEE, I. M. Mycoplasma-like organisms as plant disease agents – a review. **ATCC, Quarterly Newsletter**, Rockville, v. 11, p. 1-11, 1991.

DAVIS, R. E. Antibiotic sensitivities in vitro in diverse spiroplasma strains associated with plants and insects. **Applied Environmental Microbiology**, v. 41, p. 329-331, 1981.

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

DHINGRA, O.D.; MAIA, C.B.; LUSTOSA, D.C.; MESQUITA, J.B. Seedborne pathogenic fungi affect seedling quality of red angico (*Anadenanthera macrocarpa*) trees in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v.150, p.451-455, 2002.

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

DURIGAN, G.; FIGLIOLIA, M. B.; KAWABATA, M.; GARRIDO, M. A. de O.; BATIELLO, J. B. **Sementes e mudas de árvores tropicais**. São Paulo: Páginas & Letras, 1997, p. 65.

DURINGAN, G.; NOGUEIRA, J. C. B. **Recomposição de matas ciliares**. São Paulo: Instituto florestal, 1990, p. 14.

FALK, B. W.; PURCIFULL, D. E. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test to index lettuce seeds for lettuce mosaic virus in Florida. **Plant Disease**, v. 67, p. 413-416, 1983.

FERREIRA, F. A. **Patologia Florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa, Sociedade de Investigações Florestais, p. 515, 1989.

FERRETTI, A. R.; KAGEYAMA, P. Y.; ÁRBOCZ, G de F.; SANTOS, J. D. dos; BARROS, M. I. A. de; LORZA, R. F.; OLIVEIRA, C. de. Classificação das espécies arbóreas em grupos ecológicos para revegetação com nativas no Estado de São Paulo. **Florestar Estatístico**, São Paulo, v. 3, n. 7, p. 73-84, 1995.

FIRRÃO, G.; GARCIA-CHAPA, M.; MARZACHI, C. Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant insect host. **Frontiers in Bioscience**, Alberston, v. 12, n. 1, p. 1353-1375, 2007.

GAMA, M.I.C.; KITAJIMA, E.W.; ÁVILA, A.C.; LIN, M.T. Um carlavírus em seringueira (*Hevea brasiliensis*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, p.621, 1983.

GOÉS, R. R. T. de A.; LEONART, C. T.; AMARAL, L. I. V. do ; RIBEIRO, D. G. Caracterização anatômica de sementes de *Pterogyne nitens* Tul. In: Congresso Nacional de Botânica , v. 51, 2000, Brasília. [Resumos]. Brasília : Sociedade Botânica do Brasil, 2000. p.122.

GRANADOS, R. R. Electron microscopy of plants and insect vectors infected with the common stunt disease agent. **Contribution Boyce Thompson Institute**, v. 24, p. 173-187, 1969.

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

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

GURGEL FILHO, O. do A. A propagação vegetativa de essências florestais. **Revista de Agricultura**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 118-130, 1959.

HAMPTON, R.; BALL, E.; DE BOER, S. **Serological methods for the detection and identification of viral and bacterial plant pathogens**. St. Paul: APS Press, 1993. p. 389.

HARRISON, N. A.; RICHARDSON, P. A.; TSAI, J. H. PCR Assay for detection of the phytoplasma associated with bushy stunt disease. **Plant Disease**, v. 80, n. 3, p. 263-268, 1996.

HARRISON, N. A.; RICHARDSON, P. A.; TSHAI, J. H. PCR Assay for detection of the phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. **Plant Disease**, v. 80, n. 3, p. 263-268, 1996.

HEWITT, W. B. Smith: pioneer in phytopatology. **Annual Reviews of Phytopatology**, Palo Alto, v. 25, p. 41-50, 1987.

HOGENHOUT, S. A.; AMMAR, E.; WHITFIELD, A. F.; REDINBAUGH, M. G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review of Phytopatology**, Palo Alto, v. 46, p. 327-359, 2008.

HOMECHIN, M.; PIZZINATTO, M.A.; MENTEN, J.O.M. Sanidade de sementes de *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Pinus taeda* e patogenicidade de *Fusarium oxysporum* em plântulas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.12, n.12, p.103-112, 1986.

ITOMAN, M.K.; SIQUEIRA, A.C.M. de F.; CAVASSAN, O. Descrição de quinze espécies arbóreas de mata mesófila do Estado de São Paulo ameaçadas de extinção. **Salusvita**, Bauru, v.11, n.1, p.1-38, 1992.

ITOMAN, M.K.; SIQUEIRA, A.C.M. DE F.; CAVASSAN, O. Descrição de quinze espécies arbóreas de mata mesófila do Estado de São Paulo ameaçadas de extinção. **Salusvita**, v.11, n.1, p.1- 38, 1992.

JANOWSKY, I. P.; CHIMELO, J. P.; CAVANCANTE, A. de A.; GALINA, I. C. M.; NAGAMURA, J. C. S. **Madeiras brasileiras**. Caxias do Sul: Spectrum, 1990. 172 p.

KAMINSKA, M., SLIWA, H., RUDZINSKA-LANGWALD, A. The association of phytoplasma with stunting, leaf necrosis and Witches' Broom symptoms in *Magnolia* plants. **Journal Phytopathol**, v. 149, p. 719–724, 2001.

KAZMI, M. R.; FAROOQ, S. I.; FATEH, F. S.; HAMEED, S.; FAHMEED, F.; ASHRAF, M.; AHMED, M. Identification of phytoplasma from mango trees showing sudden death phenomenon through molecular techniques. **Journal Botanic**, 2007. Disponível em: <[http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/39\(6\)/PJB39\(6\)2153.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/39(6)/PJB39(6)2153.pdf)>. Acessado em: 04 de jun. 2009.

KENYON, L.; HARRISON N. A.; ASHBURNER, G. R.; BOA, E. R.; RICHARDSON, P. A. Detection of a pigeon pea witches'-broom-related phytoplasma in trees of *Gliricidia sepium* affected by little-leaf disease in Central America. **Plant pathology**, v. 47, n. 5, p. 671-680, 1998.

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

KRAUSE-SAKATE, R.; FIRMINO, A. C.; JADÃO, A. S.; PAVAN, M. A.; SILVA, N. da; HANAI, S. M.; ANBO, R. H.; NIETZSCHE, T. Occurrence of *Lettuce mottle virus* on three lettuce producing areas from São Paulo State. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 1, 2008.

LEE, I. M.; DAVIS, R. E. Mycoplasmas which infect plants and insects. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; SASEMAN, J. B. **Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis**. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 378-390, 1992.

LEE, I. M.; DAVIS, R. E.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E. Phytoplasma: phytopathogenic Mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 221-225, 2000.

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

LEONART, C. T.; GÓES, R. R. T. de A.; AMARAL, L. I. V. do. Germinação e dormência em sementes de *Pterogyne nitens* Tull. In: Congresso Nacional de Botânica, v. 51, 2000, Brasília. [Resumos]. Brasília: Sociedade Botânica do Brasil, 2000, p. 40-41.

LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W.; RIOS, G.P. Detecção sorológica de dois vírus previamente desconhecidos em caupi no Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, v. 5, 1980.

LOPEZ, J. A.; LITTLE JUNIOR, E. L.; RITZ, G. F.; ROMBOLD, J. S.; HAHN, W. J. **Arboles communes del Paraguay: ñande yuyra mata kuera**. Washington: Cuerpo de Paz, 1987, p. 425.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992, p. 368.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002, v. 1, 384p.

MARCONE C.; RAGOZZINO A.; SEEMÜLLER E. Detection of an elm yellows-related phytoplasma in eucalyptus trees affected by little-leaf disease in Italy. **Plant disease**, v. 80, n. 6, p. 669-673, 1996.

Marcone, C., Ragozzino, A., Cousin, M.T., Berges, R. and Seemüller, E. PHYTOPLASMA DISEASES OF TREES AND SHRUBS OF URBAN AREAS IN EUROPE. **Acta Horticultura**, v. 496, p. 69-76. 1999.

MARCONE, C., RAGOZZINO, A., SEEMÜLLER, E. Identification and characterization of the phytoplasma associated with elm yellows in southern Italy and its relatedness to other phytoplasmas of the elm yellows group. **Forest Pathology**, v. 27, p. 45-54, 1997.

MARTIN, R. R.; JAMES, D.; LÉVESQUE, C. A. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 207-239, 2000.

MELO, L. A.; YUKI, V. A.; BEBENDO, I. P. Ocorrência de um fitoplasma do grupo 16SrIII associado ao super brotamento de abobrinha no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 44, 2007.

MILLER, S. A.; MARTIN, R. R. Molecular diagnoses of plant disease. **Annual Review Phytopatology**, v. 26, p. 409-432, 1988.

MITCHELL, P. L. Heteroptera as vectores of plant pathogens. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 519-545, 2004.

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

MONTANO, H. G.; PIMENTEL, J. P.; POZZER, L.; BRIOSO, P. S. T. Identificação de fitoplasma do grupo 16S rNNAIII associado ao super brotamento da abóbora no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 508, 2001.

MONTANO, H. G.; SILVA, G. S.; ROCHA, R. C.; JIMENEZ, N. Z. A.; PEREIRA, R. C.; BRIOSO, P. S. T. Phytoplasma in "fava d'anta" tree (*Dimorphandra gardneriana*) in Brazil. **Bulletin of Insectology**, 2007. Disponível em: <http://www.bulletino.fins.ectology.org/pdfarticles/vol60-2007-147-148_montano.pdf>. Acessado em: 04 de jun. 2009.

NAGATA T, KITAJIMA EW, ALVES DM, CARDOSO JE, INOUE-NAGATA AK, OLIVEIRA MRV, DE ÁVILA AC. Isolation of a novel carlavirus from melon in Brazil. **Plant Pathology**, v. 52, 2003.

NASCIMENTO, W.M.O.; 2, CRUZ, E.D.; MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M. Qualidade sanitária e germinação de sementes de *Pterogyne nitens* Tull. (Leguminosae – Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 28, n. 1, p.149-153, 2006

NASSIF, S. M. L.; PEREZ, S. C. G. de A. Germinação de sementes de amendoim-do-campo (*Pterogyne nitens* tul.): influência dos tratamentos para superar a dormência e profundidade de semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 19, n. 2, p.171-178, 1997.

NIENHAUS, F.; CASTELLO, J. D. Viruses in forest trees. **Annual Reviews Phytopathology**. v. 27, p. 165-168, 1989.

NOGUEIRA, J.C.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; MORAIS, E.; IWANE, M.S.S. Estudo de progênies e procedências de *Pterogyne nitens* TulTul. **Boletim técnico do Instituto Florestal**, v.40A, n.2, p.357-366, 1986.

PARODI, L. P. Nota sobre la multiplicación vegetativa de "*Pterogyne nitens*". **Physis**, Buenos Aires, n. 12, p. 364-364, 1938.

PAULA, J. E. de; ALVES, J. L. de H. **Madeiras nativas: anatomia, dendrologia, dendrometria, produção e uso**. Brasília: Fundação Mokiti Okada – MOA, 1997. p. 543.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Trad. COSTA, A. P. P. ... [et al.]. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2001. p. 287-293.

REGASINI, L. O.; et al. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Química Nova**, v.31, n.4, 2008.

REZENDE, J. A. M.; GALLETI, S. R.; SCAGLIUSI, S. M. M.; POZZER, L.; RESENDE, R. de O.; ÁVILA, A. C. de. Incidência e algumas características biológicas e sorológicas de um tospovirus em abobrinha de moita em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 343-344, 1995. Suplemento.

RIBEIRO, L. F. C.; AMARAL MELLO, A. P. O.; BEBENDO, I. P.; GLÓRIA, R. Phytoplasmas associated with shoot proliferation in begonia. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, p. 475-477, 2006.

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

RIBEIRO, L. F. C.; BEBENDO, I. P. Proliferação de ramos em plantas comerciais de bico-depapagaio associada a fitoplasma do grupo 16SrIII. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 367-371, 2006.

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

ROCHA, F. T.; LOPEZ, G. A. C.; SPEGEORIN, L.; YOKOMIZO, N.K. S.; MONTAGNA, R.G.; FLORSHEIM, S. M. B. durabilidade natural de madeiras em contato com o solo: V – avaliação final (20 anos). **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 59-66, 2000.

RUEGG, E. F.; COUSIN, M. T. Ação da oxitetraciclina sobre o cálice gigante , moléstia causada por micoplasmas. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 39-46, 1974.

SANTOS, Carmem D. G.; D'AVILA, Antonio C.; INOUE-NAGATA, Alice K. and RESENDE, Renato O. Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, 2004, vol.29, n.4, p. 450-455.

SANTOS, M.F.; RIBEIRO, R.C.W.; FAIAD, M.G.R., SANO, S.M. Fungos associados às sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.19, n.1, p.135-139. 1997.

SEBBENN, A. M.; SIQUEIRA, A. C. M. de F.; KAGEYAMA, P. Y.; DIDIO JUNIOR, O. J. Variação genética entre e dentro de populações de amendoim – *Pterogyne nitens*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 56, p. 29-40, 1999.

SEEMULLER, E., LEDERER, W. MLO-associated decline of *Alnus glutinosa*, *Populus tremula* and *Crataegus monogyna*. **Journal Phytopathol**, v. 121, p. 33–39, 1988.

SERUGA, M.; SKORIC, D.; BOTTI, S.; PALTRINIERI, S.; JURETIC, N.; BERTACCINI, A. Molecular identification of a phytoplasma naturally infecting *Populus nigra* L. 'Italica' trees in Croatia. **Plant Protection**, v. 38, p. 28–30. 2002.

SILVA, E. G. Identificação molecular de fitoplasmas associados à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar e ao superbrotamento da primavera (*Boungainvillea spectabilis*). 2008. 97p. **Tese** (doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SILVA, M. do C. L. da; SANTOS, C. D. G.; SANTOS, A. A. dos; LIMA, J. A. de A. Vírus da mancha amarela da gravioleira: transmissão, hospedeiros, purificação e produção de anti-soro. **Revista Ciência Agronômica**, v.37, n.2, p.160-165, 2006.

SINGH, P. Tree seed pathogens and seed diseases: their detection and management in sustainable forestry. In: PROCHÁZKOVÁ, Z.; SUTHERLAND, J.R. (Ed.) **Proceedings of the ISTA Tree Seed Pathology Meeting**. Opocno: ISTA, 1997, p.9-22.

SINGH, R. P.; SINGH, M. Digoxigenin-labelled cDNA probes for the detection of potato virus Y in dormant potato tubers. **Journal of Virological Methods**, v. 52, p. 133-143, 1995.

SIQUEIRA, A.C.M.F.; NOGUEIRA, J.C.B. Essências brasileiras e sua conservação genética no Instituto Florestal de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.4, p.1187, 1992.

SIQUEIRA, A.C.M.F.; NOGUEIRA, J.C.B. Essências brasileiras e sua conservação genética no Instituto Florestal de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, v.4, p.1187, 1992.

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

SOUZA-STEVAUX, M. C. de; NEGRELLE, R. R. R.; CITADINI-ZANETTE, V. Seed dispersal by the fish *Pterodoras granulosus* in the Paraná River Basin, Brasil. **Journal of Tropical Ecology**, Melbourne, v. 10, n. 4, p. 621-626, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER. **Fisiologia Vegetal**. Trad. SANTARÉM, E. R.... [et al.]. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 719.

TIGRE, C. B. **Silvicultura para as matas xerófilas**. Fortaleza: Dnocs, 1970, p.176.

WEI, W.; DAVIS, R. E.; LEE, I. M.; ZHAO, Y. Computer-simulated FRLP analysis of 16SrRNA genes: identification of tem new phytoplasma group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 57, n. 8, p. 1855-1867, 2007.

WYATT, S.D.; BROWN, J.K. Detection of subgroup II geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. **Phytopathology**, Lancaster, v. 86, p. 1288-1293, 1996.

ZERBINI JUNIOR, F. M.; CARVALHO, M. G. de.; ZAMBOLIM, E. M. **Introdução a virologia vegetal**. Viçosa: UFV, 2002.

ZHANG, Y; UYEMOTO, J.K.; KIRKPATRICK, B.C. A small procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 71, p. 45-50, 1998.