

USO ATUAL E FUTURO DA BIOLOGIA MOLECULAR NA FITOPATOLOGIA. PARTE I – APLICAÇÕES EM FITOPATÓGENOS E VETORES

***Paulo Sergio Torres Brioso, Luciana Pozzer,
Helena Gugliemi Montano e João Pedro Pimentel***

*Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia,
Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Laboratório de Virologia
Vegetal e Viróides, Caixa Postal 74585, 23851-970 Seropédica, RJ
brioso@whouse.com.br*

RESUMO

Com o progresso dos métodos que exploravam o ácido nucléico, que culminou com o desenvolvimento e a automatização do PCR na década de 80, as técnicas de biologia molecular – mesmo aquelas até então utilizadas – tomaram uma nova dimensão dentro do campo da Biologia. Rapidamente, essas técnicas foram adaptadas para a Fitopatologia e se, inicialmente, estiveram praticamente restritas à estudos de detecção de patógenos nas plantas hospedeiras e em trabalhos de análise de variabilidade dos mesmos, hoje são exploradas nos mais diversos caminhos e objetivos, constituindo-se num auxílio ímpar para o avanço da Fitopatologia.

O assunto enfocado pela presente revisão é bastante amplo, tendo a mesma sido dividida em duas partes. Procurou-se enfocar, além de uma rápida abordagem sobre as principais técnicas da biologia molecular, como essas têm sido utilizadas pelos fitopatologistas, seja nos componentes do complexo causal de uma doença – fitopatógeno (e vetores, quando presentes) (Parte I), planta hospedeira e interação entre patógeno e hospedeira - ou na exploração das mesmas como ferramenta auxiliar no desenvolvimento de testes e produtos a serem utilizados nas medidas de controle dos fitopatógenos (Parte II). Discutir-se-ão também quais caminhos que tais técnicas e o seu uso poderão tomar no futuro da Fitopatologia (Parte I e II).

SUMMARY

CURRENT AND FUTURE USE OF MOLECULAR BIOLOGY IN PHYTOPATHOLOGY. PART I – APPLICATIONS IN PLANT PATHOGENS AND VECTORS

With the progress of DNA – based methods, that culminated with

the development and automatization of PCR in the 1980's, molecular biology techniques – even those utilized – got a new extent in biology. These techniques were adapted to be used in Phytopathology and although they were initially restricted to the study of pathogen detection in host plants and in works related to the analysis of variability of the organism, today the techniques are employed in different ways and with different aims, being a valuable approach to the development of Phytopathology.

Since the subject of the present review is very broad, it was divided into two parts. Besides a brief overview about the major molecular biology techniques, as they have been used by the phytopathologists, in studies of the causal complex of a disease – plant pathogen (and vectors, if present) (Part I), host plant and interaction between plant pathogen and host – or in the utilization of molecular biology techniques as a helper tool for the development of assays and products to be used in the control measures of the plant pathogens (Part II), and a discussion about the future perspectives of the use of the techniques (Part I and Part II).

INTRODUÇÃO

A Fitopatologia, definida de forma ampla como o estudo das doenças de plantas e, especificamente, como o estudo da interação entre patógeno, hospedeira e meio ambiente, passou a ter, progressivamente a partir da década de 1950, a Biologia Molecular como uma forte aliada, seja na taxonomia, na etiologia, na diagnose, no estudo da interação entre patógeno e hospedeira ou vetor e também no controle.

A Biologia Molecular praticamente iniciou em 1944, com o trabalho de Avery, MacLeod & McCarty, que indicou que o DNA contido no genoma de uma bactéria seria o material genético da célula e o responsável pela transmissão de seus caracteres hereditários. Isso foi confirmado em 1952, por Hershey & Chase, a partir do uso de um bacteriófago contendo o DNA viral marcado radioativamente que, injetado numa bactéria, promoveu o aparecimento de novas partículas virais, confirmando o papel do DNA como material genético; e culminou em 1953, com a proposta de modelo estrutural de dupla hélice da molécula de DNA desenvolvida por Watson & Crick (Lambais, 1995; Agrios, 1997; Barros & Moreira, 2000).

O marco inicial da Fitopatologia Molecular pode ser considerado o trabalho de Gierrer & Schramm (1956), utilizando como modelo o *Tobacco mosaic virus* (TMV) e plantas de fumo, confirmando que o RNA viral era o responsável pela infecção das células vegetais e pela reprodução de novas partículas virais, demonstrando assim o papel do RNA como material genético. Em 1960, a partir das informações obtidas por Anderer et al. e por Fraenkel-Conrat et al., através do sequenciamento de aminoácidos do

capsídeo do TMV, foi decifrado o código genético deste vírus (Matthews, 1991; Agrios, 1997). Outros avanços da Biologia Molecular, como o isolamento e uso de enzimas de restrição, a ligação de fragmentos de DNA através da DNA ligase e a construção de uma molécula de DNA circular recombinante, com o desenvolvimento em paralelo de inúmeras técnicas moleculares, impulsionaram a atual Fitopatologia Molecular, um híbrido entre a Fitopatologia e a Biologia Molecular.

A importância das técnicas que exploram o ácido nucléico pode ser comprovada pelo crescente número de trabalhos que são publicados nas revistas da área e relacionadas, bem como apresentados nos congressos científicos. Na verdade, tais técnicas têm representado um verdadeiro elo entre os fitopatologistas, pois devido a sua ampla versatilidade, podem ser aplicadas nas mais diferentes linhas de trabalho, independentemente do patógeno, do vetor e da cultura enfocada, tornando-se uma linguagem comum entre tais profissionais. Atualmente, a utilização das técnicas de biologia molecular passou a ser uma ferramenta ímpar para os fitopatologistas, sendo adotadas em grande parte dos laboratórios de universidades e de empresas, públicas ou privadas.

O assunto enfocado pela presente revisão é bastante amplo, tendo sido dividido em duas partes. Procurou-se enfocar, além de uma rápida abordagem sobre as principais técnicas da biologia molecular, como essas têm sido utilizadas pelos fitopatologistas, seja nos componentes do complexo causal de uma doença – fitopatógeno (e vetores, se presentes) (Parte I), planta hospedeira e interação entre patógeno e hospedeira - ou na exploração das mesmas como ferramenta auxiliar no desenvolvimento de testes e produtos a serem utilizados no controle dos fitopatógenos (Parte II). Discute-se também quais caminhos que tais técnicas e o seu uso poderão tomar no futuro (Parte I e II).

USO ATUAL DA BIOLOGIA MOLECULAR NA FITOPATOLOGIA

A descrição detalhada das técnicas moleculares utilizadas nos diversos laboratórios, independentemente da finalidade de cada estudo, não é o propósito desta revisão, visto que livros ou revisões, além de um grande número de artigos nacionais e internacionais, abordam especificamente esse tema. Assim, será feita uma rápida abordagem sobre as mesmas, enfatizando as mais utilizadas para o estudo dos fitopatógenos e dos vetores na etiologia, na taxonomia, na diagnose e na interação entre os mesmos.

TÉCNICAS MOLECULARES MAIS UTILIZADAS EM RELAÇÃO AOS FITOPATÓGENOS E VETORES

1. Extração e eletroforese do ácido nucléico

Consiste na extração do ácido nucléico (genômico, plasmidial ou sua forma replicativa) oriundo de tecido vegetal infectado de qualquer parte da planta, do vetor do patógeno ou do fitopatógeno, seja na forma fresca, desidratada, congelada, liofilizada ou emblocada em parafina. Essa etapa é seguida da eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida e coloração, geralmente com brometo de etídio, de forma a separar, identificar ou purificar os fragmentos visualizados na forma de bandas, através de um transiluminador de luz ultravioleta. Por vezes, antes da corrida eletroforética, trata-se o ácido nucléico com enzimas que o digerem, permitindo identificar a presença de RNA ou de DNA na forma de fita simples ou dupla e linear ou circular. Em Fitopatologia, tal técnica tem sido usada na identificação e na obtenção da massa molecular nucleotídica (RNA ou DNA – fita simples ou dupla, linear ou circular) do fitopatógeno, na identificação e massa molecular de fragmentos gênicos ou genes dos fitopatógenos inseridos em vetores apropriados, como plasmídios, por exemplo.

2. RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism")

Consiste na digestão do DNA com enzimas de restrição, que são enzimas que reconhecem especificamente determinadas seqüências nucleotídicas, clivando o DNA cada vez que as encontram. Essa reação é submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida ou de agarose e, após a coloração, sob luz ultravioleta, observa-se o perfil eletroforético, que é o conjunto de bandas formados pelos diferentes fragmentos. Cada seqüência apresenta uma série de bandas específicas para uma determinada enzima. Este conjunto de bandas, resultantes da digestão enzimática dos fragmentos de DNA, é chamada de perfil eletroforético. Essa técnica tem sido usada para fitopatógenos na identificação de fragmentos gênicos ou genes inseridos em vetores apropriados (por exemplo, plasmídios, bacteriófagos, etc), na detecção de mutações em genes específicos, na identificação de polimorfismo nucleotídico e para fins taxonômicos. Para vetores tem sido utilizada na identificação de polimorfismo nucleotídico, associando-os à transmissão do fitopatógeno.

3. Clonagem do ácido nucléico

Consiste em procedimentos de manipulação de DNA para produzir múltiplas cópias de um simples gene ou fragmento de DNA. Para tanto, utilizam-se enzimas de restrição, enzimas modificadoras, vetores e células hospedeiras (Lambais, 1995). No caso da amostra ser RNA, faz-se necessário, antes da clonagem, produzir uma fita de DNA complementar (cDNA) através

de uma enzima modificadora (DNA polimerase dependente de RNA). A clonagem tem sido usada para fitopatógenos na construção de fragmentos gênicos ou genes inseridos em vetores apropriados visando a produção de anticorpos e de sondas moleculares, na construção de mutações em genes específicos para estudos de sua função e de seus produtos gênicos.

4. Seqüenciamento

Consiste na determinação da seqüência de aminoácidos de uma proteína ou, como é mais utilizado, na determinação da seqüência nucleotídica de um fragmento de DNA ou de RNA. Dependendo da modalidade de seqüenciamento existem diferentes técnicas adotadas, disponíveis na literatura. Com a automatização do seqüenciamento houve um aumento expressivo no número de seqüências disponíveis dos diferentes fitopatógenos e seus vetores, podendo ser acessadas no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html> ou através de diversos sistemas computadoracionais (VAX/VMS, UNIX, IBM-PC, MACINTOSH, etc) associados a programas específicos (por exemplo, GCG Fragment Assembly System, Omiga™ 2.0) que acessam diferentes bancos de dados e permitem a manipulação e a análise a nível de nucleotídeos e de aminoácidos das inúmeras seqüências. O seqüenciamento tem sido usado para fitopatógenos (na identificação genômica e de fragmentos gênicos ou genes, na detecção de mutações em genes específicos, na identificação de polimorfismo nucleotídico ou de aminoácidos e para fins taxonômicos) e para vetores (na identificação de polimorfismo nucleotídico, associando-os à transmissão do patógeno e para fins taxonômicos).

5. Hibridização de ácidos nucléicos

O termo hibridização foi originalmente proposto para descrever híbridos de DNA-RNA, mas hoje é utilizado também para referir-se aos complexos DNA-DNA ou RNA-RNA. Testes de hibridização baseiam-se no pareamento específico entre as seqüências do ácido nucléico alvo (RNA ou DNA desnaturados) e uma sonda de oligonucleotídeos ou ácido nucléico complementar para formar uma fita dupla de ácido nucléico. Como sonda pode-se usar tanto o DNA como o RNA, sendo marcadas com substâncias radioativas ou não (Batista, 1993). Quando as sondas são usadas para detectar seqüências complementares nas células ou em finas secções de tecidos fixados, o teste chama-se hibridização *in situ*, sendo os RNAs ribossomais (rRNA) alvos atrativos devido a sua abundância (cada célula contém aproximadamente 10.000 ribossomos) o que aumenta o sinal obtido e reduz problemas de inespecificidade (Olsen et al., 1986). Quando o ácido nucléico é adicionado diretamente na membrana de nylon ou de nitrocelulose para ser realizada a hibridização, o teste chama-se Dot blot (se for adicionado na

forma de gotas) ou Squash-blot (se o tecido for friccionado). Já nos casos em que o DNA ou o RNA primeiramente são submetidos à eletroforese em gel e, então, transferidos para a membrana, os testes são chamados de Southern blot e Northern blot, respectivamente. A hibridização tem sido usada para fitopatógenos (identificação genômica, de fragmentos gênicos ou genes, na detecção de mutações em genes específicos, na identificação de polimorfismo nucleotídico, para fins taxonômicos e de diagnose) e para vetores (identificação de polimorfismo nucleotídico, associando-os à transmissão do fitopatógeno, na identificação de simbiontes envolvidos no processo de transmissão de fitopatógenos, para fins taxonômicos e de diagnose).

6. PCR ("Polymerase Chain Reaction")

Embora testes explorando o ácido nucléico dos organismos já estivessem em uso, foi a partir do final da década de 80 que tiveram um enorme impulso, com o desenvolvimento e a automatização do PCR. Esta técnica é um processo cíclico, no qual a enzima DNA polimerase faz cópias de um DNA alvo, para o qual iniciadores (oligonucleotídeos, "primers") são fornecidos. O número de cópias é aumentado exponencialmente a cada ciclo. Como ácido nucléico pode-se utilizar DNA genômico, contendo ou não microsátélites, DNA mitocondrial (mtDNA), rDNA, DNA de gene para tRNA; extraídos de preparações dos patógenos ou de seus vetores (e simbiontes), isolados ou "*in vivo*", assim como de DNA clonado (DNA inserido em vetor específico) ou de DNA total de plantas ou de vetores infectados. No caso de utilizar amostra de RNA (RNA genômico, forma replicativa do RNA de alguns patógenos ou RNA total de plantas ou vetores), torna-se necessário a síntese inicial de DNA complementar (cDNA), através da enzima transcriptase reversa, sendo a técnica chamada de "Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction" (RT-PCR). Os iniciadores podem ser ao acaso ("random primers"), iniciadores específicos ou com algumas bases degeneradas, desenhados a partir das seqüências de nucleotídeos ou de aminoácidos disponíveis na literatura utilizando-se, em geral, programas de computador. Diversas variações do PCR foram desenvolvidas, podendo também estar combinada a outras técnicas (Brioso, 2000). Em geral, PCR tem sido utilizado em relação aos fitopatógenos na obtenção de clones genômicos, na clonagem de fragmentos gênicos ou genes em vetores apropriados, na identificação genômica e de fragmentos gênicos ou genes, na detecção de mutações em genes específicos, na identificação de polimorfismo nucleotídico, na potencialização do seqüenciamento do genoma, na produção de sondas moleculares específicas, na taxonomia e na diagnose. Para os vetores, seu uso tem sido na identificação de polimorfismo nucleotídico, associando-os à transmissão do fitopatógeno, na identificação de simbiontes envolvidos no processo de transmissão de fitopatógenos, na taxonomia, na diagnose, na potencialização do seqüenciamento do genoma. As modalidades

de PCR mais utilizadas para fins taxonômicos são AFLP, DDRT-PCR, DFA-PCR, nested-PCR, PCR, PCR-RFLP, RAPD, RT-PCR e SSCP-PCR; e para a diagnose, IC-PCR, nested-PCR, PCR, PCR-RFLP, RT-PCR, RT-PCR-ELISA.

USO ATUAL DA BIOLOGIA MOLECULAR EM FITOPATOLOGIA EXEMPLOS EM FITOPATÓGENOS

A Fitopatologia Molecular proporcionou um aumento significativo no conhecimento dos fitopatógenos, em relação às informações e composição nucleotídicas e de aminoácidos, aos possíveis genes (suas funções) e produtos gênicos presentes, à organização genômica, ao polimorfismo presente entre e dentro dos fitopatógenos, bem como no desenvolvimento e aprimoramento da taxonomia e da diagnose dos mesmos. A obtenção e análise da seqüência dos eucariotos e procariotos, principalmente na região do rRNA 18S e 16S, respectivamente, contribuiu para uma alteração relevante na classificação taxonômica. Já na diagnose, PCR e suas variações estão, progressivamente, passando a ser ferramentas de rotina, considerando-se os diferentes genes e regiões intergênicas dos fitopatógenos (Brioso, 2000).

• Bactérias (excetuando espiroplasmas e fitoplasmas)

Estudos iniciais envolvendo técnicas moleculares no diagnóstico de fitomoléstias de etiologia bacteriana foram conduzidos através de hibridização por Dot blot, com sondas específicas ao DNA ou ao cDNA (Miller & Joaquim, 1993), sendo empregadas na detecção de estirpes de diferentes espécies (Batista, 1993). Sondas dirigidas aos genes requeridos para a produção de produtos específicos a certas estirpes de bactérias fitopatogênicas têm sido usadas para detectá-las, revelando-se como um modo mais direto para avaliar o potencial toxicogênico dessas estirpes, se comparados aos bioensaios padrões. Podem ser citadas, como exemplos, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (= *P. syringae* pv. *phaseolicola*), com o gene para faseolotoxina (Schaad et al., 1989), *P. syringae* pv. *tomato* com o gene para coronatina (Cupples et al., 1990) e *P. syringae* pv. *syringae* com genes para siringomicina (Scheck et al., 1997). Nesse último caso, quando foram empregados exclusivamente os tradicionais testes LOPAT e GATTA para a separação de espécies e de patovares, respectivamente, o número de estirpes patogênicas foi subestimado em 30 % comparado ao uso da sonda. A combinação de sondas e RFLP foi usada na determinação do relacionamento genético dentre e entre as estirpes *P. syringae* pv. *tomato* e *P. syringae* pv. *syringae* (Batista, 1993).

O uso de PCR em estudos de bactérias iniciou-se em 1991 e, com

Xylella, em 1994. No Brasil, vem sendo usado desde 1996 (Brioso, 2000). A amplificação por PCR da sequência do gene 16S rRNA e da região intergênica 16S/23S permitiu realizar estudos comparativos entre isolados de *Candidatus Liberobacter asiaticum* ("greening" asiático) e isolados de *Candidatus Liberobacter africanum* ("greening" africano) (Subandiyah et al., 2000). Usando iniciadores específicos à região intergênica 16S/23S foram detectadas e diagnosticadas, de modo rápido, econômico e confiável, *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (Pan et al., 1998) e *Xanthomonas albilineans* (Pan et al., 1999).

A diversidade genética de estirpes de *Agrobacterium vitis* isoladas de *Vitis riparia* foi investigada através da obtenção de "fingerprints" de DNA da região cromossomal entre os genes 16S e 23S rRNA. Várias estirpes não-tumorigênicas foram discriminadas, incluindo estirpes capazes de evitar a formação de galhas quando inoculadas em videira (Burr et al., 1999).

Estirpes de *P. syringae* pv. *pisi* foram investigadas através de REP-PCR e ERIC-PCR, revelando alguma heterogeneidade dentro do patovar *pisi* (Cirvilleri et al., 1998). Dados combinados de RAPD e REP-PCR de estirpes de *Ralstonia solanacearum* indicaram polimorfismo genético, revelando diversos haplótipos, os quais foram reunidos em grupos genéticos, aparentemente não relacionados ao biovar ou à origem geográfica (Jaunet & Wang, 1999). Análise de REP-PCR e de um ensaio denominado IS-PCR ("insertion sequence") permitiram avaliar a diversidade genotípica de estirpes de *X. oryzae* pv. *oryzae* em vários haplótipos moleculares, que demonstraram associação parcial com os patótipos, pela comparação de similaridade de matrizes, indicando que o polimorfismo molecular observado através de PCR independe da virulência (Adhikari et al., 1999). REP-PCR de várias estirpes de *Xanthomonas*, isoladas de tomate e pimentão, provenientes de países do Caribe e da América Central, revelou a presença de diferentes grupos de "fingerprinting" genômico, com a maioria das estirpes sendo *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Bouzar et al., 1999).

A técnica de eletroforese em gel de campo pulsado ("pulsed-field gel electrophoresis", PFGE) pode ser empregada para análise genômica, após a digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, como observado para estirpes de *P. syringae* pv. *pisi* (Cirvilleri et al., 1998). Estirpes de *X. hortorum* pv. *hederae* (sin. *X. campestris* pv. *hederae*), isoladas de *Hedera helix*, *Schefflera arboricola*, *Brassica actinophylla* e *Polyscias* spp., procedentes dos EUA e da Nova Zelândia, foram comparadas através de testes metabólicos, de ácidos graxos e por análise de RFLP/PFGE. Através de PFGE, as estirpes foram divididas em 27 "fingerprints" genômicos e pelas análises, em conjunto, foram reunidas em dois grupos, correlacionados com a origem dos hospedeiros (Norman et al., 1999).

A análise de RFLP é uma ferramenta poderosa para avaliar a variação genética e a diferenciação de estirpes agressivas e não-agressivas em

populações de bactérias (Miller & Joaquim, 1993). Raymundo et al. (1999) aplicaram a técnica de RFLP para analisar a diversidade populacional de *X. oryzae* pv. *oryzicola*, avaliar as relações entre grupos de "fingerprint" de DNA e estudar a virulência de algumas estirpes em variedades de arroz.

Um grupo de genes com duplo fenótipo definido como *hrp* ("hypersensitive response and pathogenicity") é ubíquo entre bactérias fitopatogênicas, sendo responsável pela elicitação de resposta de hipersensibilidade em plantas não-hospedeiras e de patogenicidade em plantas hospedeiras não resistentes (Hartung, 1997; Destéfano, 2000). A amplificação de sequências do gene *hrp* de patovares de *X. campestris* forneceu um produto específico e conservado entre os diferentes patovares, demonstrando a viabilidade do uso de PCR com iniciadores específicos a essas sequências, nos casos em que a identificação de subespécies não é requerida (Hartung, 1997). Os genes *hrp* também podem ser explorados na forma de sondas. Nessa linha de pesquisa, a análise de RFLP de DNA genômico de várias estirpes de *X. campestris*, isoladas de cereais e forrageiras, demonstrou-se útil na diferenciação entre estirpes do patógeno e, embora com limitações, revelou a existência de variabilidade entre estirpes pertencentes ao mesmo grupo ou subgrupo de RFLP (Alizadeh et al., 1997). O grupo de genes *avr* (confere ao patógeno o fenótipo avirulento em plantas que possuem o gene de resistência correspondente) também pode ser utilizado na detecção e identificação de bactérias fitopatogênicas avirulentas em plantas que possuem o gene de resistência correspondente (Destéfano, 2000). No Brasil, o uso de iniciadores específicos correspondentes aos genes *hrp* e *avr* de diversas espécies de bactérias fitopatogênicas permitiu diferenciação de patovares por análise de RFLP (Destéfano, 2000). Com base nas sequências de DNA relacionadas aos genes *hrp*, a filogenia de espécies de *Xanthomonas* fitopatogênicas foi examinada, revelando uma relação evolucionária diversa para os genes *hrp* das estirpes de *X. axonopodis*, *X. campestris*, *X. fragariae*, *X. hortorum*, *X. vasicola* e *X. vesicatoria* (Leite Jr. & Stall, 1997). Iniciadores correspondentes à parte do gene *hrpC2*, descrito em *X. campestris*, possibilitou a diferenciação entre linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, patogênica ao pimentão e *X. vesicatoria*, patogênica ao tomate. Diferenciou, ainda, linhagens do grupo A de *X. axonopodis* pv. *citri*, daquelas dos grupos B ou C (Destéfano, 2000).

Pela análise de RFLP da região espaçadora 16S-23S foi possível agrupar as linhagens de *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, separando-a de outros patovares de *X. axonopodis* e *X. campestris* (Coltri et al., 2000). A análise de sequências dos genes 16S rRNA de estirpes fitopatogênicas de *Streptomyces* permitiu o agrupamento de 10 estirpes finlandesas, indicando que as mesmas pertenciam a três espécies fitopatogênicas já descritas. Foi demonstrado que os genes 16S rRNA de *S. scabies* apresentam alguma variabilidade intra-específica e que estirpes de *S. aureofaciens* inserem-se num grupo filogenético distinto, junto a *Kitosatospora* spp., sugerindo que *S.*

aureofaciens pertence ao gênero *Kitosatospora*, reabilitado recentemente (Kreuze et al., 1999).

RAPD-PCR foi utilizado para diferenciar estirpes de *X. fastidiosa* e agrupá-las numa árvore filogenética de resultados consistentes em relação a outros dados obtidos. Vários desses produtos foram clonados e seqüenciados, objetivando a criação de iniciadores específicos à estirpe relacionada à clorose variegada dos citros (CVC) (Hartung, 1997). Resultados da análise de RAPD mostraram a existência de cinco grupos de estirpes de *X. fastidiosa*, que incluíam um grupo amplamente divergente, composto apenas por estirpes isoladas de citros do Brasil (Pooler & Hartung, 1995). Iniciadores desenhados a partir da seqüência derivada da região consensual do tRNA, quando utilizados em PCR, possibilitaram distinguir a estirpe causadora da CVC de outras estirpes da bactéria. A diversidade genética de estirpes brasileiras de *X. fastidiosa* associadas às plantas de citros e de café foi investigada através do uso de enzimas de restrição e PFGE, demonstrando que essas estirpes são estreitamente relacionadas (Leite Jr. et al., 1998). De Lima et al. (1998) confirmaram a suposta relação existente entre estirpes associadas à requeima do cafeeiro e estirpes associadas à CVC. A análise dos produtos amplificados por PCR mostraram que elas são estreitamente relacionadas, apesar da diferença na distribuição geográfica, e que diferem das estirpes norte-americanas. DNAs genômicos isolados de estirpes de *X. fastidiosa* associadas à CVC, à requeima do café, à doença de Pierce da videira e à requeima da ameixeira foram analisados por AP-PCR. Apesar das estirpes de café e de citros serem estreitamente relacionadas, podem ser distinguíveis por essa metodologia (Costa et al., 2000).

Técnicas moleculares são empregadas na investigação de DNA extra-cromossomal presentes em diferentes estirpes de *X. fastidiosa* associadas à CVC (Mehta et al., 1998). A análise das seqüências do gene 16S de rDNA e da região espaçadora 16S-23S também foi utilizada para inferir as relações filogenéticas entre linhagens de *X. fastidiosa* isoladas de diferentes hospedeiros e espécies relacionadas (Mehta & Rosato, 2000).

No atual sistema taxonômico existem 28 gêneros de bactérias fitopatogênicas, agrupando diferentes espécies (Takatsu, 2000). Embora a maioria dessas bactérias tenha sido seqüenciadas parcialmente, o principal marco foi o seqüenciamento completo do genoma da *X. fastidiosa*, cujo cromossoma constitui-se de 2.679.305 pares de bases (<http://www.cnr.berkeley.edu/xylella>), realizado no Brasil e concluído no ano de 2000, permitindo a identificação de inúmeros genes e abrindo caminho para o seqüenciamento total de outras importantes bactérias (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>).

• Espiroplasmas

Os espiroplasmas fitopatogênicos estão compreendidos no gênero

Spiroplasma, contendo as espécies *S. citri*, *S. kunkelii* e *S. phoeniceum* (Takatsu, 2000). Há cerca de 100 isolados caracterizados, fitopatogênicos ou não, inseridos em 34 grupos e em 14 subgrupos. Os membros dentro dos grupos ou dos subgrupos têm o status de espécie (Williamson et al., 1998; Gasparich, 1999).

A utilização de técnicas moleculares na detecção de espiroplasmas é ainda pouco difundida, mas o seu uso é viável, especialmente o PCR e suas variações, que começaram a ser usados nessa área a partir de 1991 (Brioso, 2000). Recentemente, Barros et al. (2001) desenvolveram um protocolo de PCR para a detecção específica do *S. kunkelii*, agente causal do enfezamento pálido do milho. No caso de *S. citri*, a análise de AP-PCR do cDNA para diferentes linhas do patógeno, sugere um alto grau de divergência genética entre as mesmas (Rascoe et al., 1998).

A mais recente revisão de taxonomia dos espiroplasmas (Williamson et al., 1998) apresenta a metodologia de classificação adotada para a designação de espécie, que inclui cultivo e clonagem, determinações genômicas, estudos morfológicos, testes sorológicos e bioquímicos (Gasparich, 1999). Os dados de hibridização DNA-DNA continuam a ser o critério de último recurso na decisão de agrupar estirpes numa única espécie (Williamson et al., 1998). O uso de dados de seqüência do gene 16S rRNA em estudos taxonômicos de espiroplasmas é muito útil na distinção de diversas espécies e em todos os níveis taxonômicos mais elevados; já os dados obtidos com hibridização DNA-DNA e sorologia se restringem às espécies de espiroplasmas (Whitcomb et al., 1999). Os dados de seqüenciamento das espécies (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>) têm revelado a presença de diferentes genes.

• Fitoplasmas

Sendo um parasita obrigatório, intracelular e de localização, predominantemente, no floema das plantas infectadas e, ser de difícil purificação, a única forma de identificar taxonomicamente os diferentes representantes de fitoplasma é através de RFLP dos produtos de nested-PCR do gene 16S rRNA. A técnica de PCR é utilizada desde 1992 no estudo de fitoplasmas, tendo sido introduzida no Brasil, para esse fim, em 1994 (Brioso, 2000). Recentemente, foi adotada por Montano et al. (2001) para caracterizar a primeira espécie brasileira de fitoplasma, denominada *Candidatus Phytoplasma brasiliense*, que integra o gênero *Phytoplasma*, com outras cinco espécies *Candidatus*.

Importantes características filogenéticas têm sido reveladas a partir do seqüenciamento das espécies de fitoplasmas (Harrison, 1999).

Estudos a respeito da filogenia dos fitoplasmas são conduzidos com base no gene 16S rRNA, que apresenta regiões altamente conservadas entre os

organismos procariontes, confirmando que os fitoplasmas derivam-se de *Bacillus subtilis* e se aproximam, em termos filogenéticos, aos *Acholeplasma*, distanciando-se dos micoplasmas e dos espiroplasmas. Confirmaram também que os fitoplasmas representam um grupo monofilético da classe *Mollicutes* (Lim & Sears, 1989; Gundersen et al., 1994; Davis, 1995).

O uso de sondas moleculares tem permitido a detecção sensível e específica de fitoplasmas, bem como torna possível a comparação de variabilidade entre diferentes fitoplasmas ou em isolados de um mesmo organismo. Tal abordagem possibilitou a organização do esquema de classificação de diferentes "grupos" de isolados genômicos, sendo os fitoplasmas agrupados segundo a extensão da homologia da sequência (Davis, 1995). O teste PCR é, provavelmente, o método mais sensível entre todos aqueles disponíveis para a detecção de fitoplasmas, sendo muito útil no diagnóstico de doenças, na diferenciação e na identificação de fitoplasmas, na detecção de infecções mistas por organismos pertencentes a dois ou mais grupos filogeneticamente distintos e nos estudos de filogenia desses organismos (Davis, 1995).

No Brasil, a aplicação de testes moleculares para a detecção de fitoplasmas associados a diversas enfermidades iniciou-se no final da década de 1980, com ensaios de hibridização e PCR, e os resultados têm demonstrado a diversidade de fitoplasmas no país (Barros et al., 1998; Kitajima et al., 1999; Montano et al., 1999; Bedendo et al., 2000; Montano et al., 2000; Pavan et al., 2000).

A análise da sequência do gene 16S oferece um panorama detalhado da diversidade e das relações filogenéticas entre fitoplasmas. A caracterização tem sido facilitada pela sua amplificação, via PCR, seguida do sequenciamento (Schneider et al., 1995). Através da análise RFLP do 16S rDNA amplificado por PCR, os fitoplasmas detectados podem ser diferenciados e classificados. Os resultados decorrentes do estudo do 16S rDNA demonstram coincidência com o sistema inicial de classificação dos isolados em grupos, estabelecido anteriormente por meio de homologia DNA-DNA e de sorologia (Davis et al., 1990; Davis et al., 1992; Lee et al., 1992; Lee et al., 1993a; Davis, 1995; Lee et al., 1998). A análise de RFLP do 16S rDNA amplificado é um método rápido e simples que fornece informações valiosas a respeito da classificação taxonômica e filogenética de fitoplasmas desconhecidos (Schneider et al., 1995; Lee et al., 1998). Essa metodologia viabilizou a obtenção de esquemas de classificação taxonômica independentes, cujos resultados finais foram coincidentes (Lee et al., 1993a; Schneider et al., 1993). Dentre os esquemas de classificação mais abrangentes encontra-se o de Lee et al. (1993a), no qual foram reunidos, inicialmente, 11 grupos distintos de genes 16S rRNA (denominados grupos 16Sr) e 14 subgrupos, com base nos padrões de polimorfismo de 16S rDNA, produzidos por enzimas de restrição. Recentemente, novas estirpes de fitoplasmas foram

incluídas no referido esquema, atualizando-o e expandindo-o para quatorze grupos de 16S rRNA (denominados 16SrIa XIV) e, pelo menos, 32 subgrupos de estirpes de fitoplasmas (Lee et al., 1998; Harrison, 1999). A investigação das características moleculares do fitoplasma associado ao "superbrotamento do chuchuzeiro" demonstrou que esse patógeno está afiliado ao grupo 16SrIII (Kitajima et al., 1999; Montano et al., 2000). Estudos mais avançados realizados por Montano et al. (2000) o identificaram como um novo *taxon*, designado subgrupo 16SrIII-J, *sensu* Lee et al. (1993a). Pela análise de RFLP e da sequência de nucleotídeos do 16S rDNA, o novo fitoplasma, denominado ChWBIII, foi classificado num novo subgrupo (III-J) (Montano et al., 2000). Demonstrou-se que o fitoplasma envolvido com o "superbrotamento do *Hibiscus*" pertence a um novo grupo taxonômico *sensu* Lee et al. (1993a), designado grupo 16SrXV. As propriedades moleculares do DNA desse fitoplasma demonstraram tratar-se de um novo *taxon*, para o qual propôs-se o reconhecimento como nova espécie (Montano et al., 2001).

O sistema de classificação taxonômica de fitoplasmas baseado em RFLP, *sensu* Lee et al. (1993a), teve sua validade corroborada, pois verificou-se a concordância entre o agrupamento taxonômico baseado na análise de sítios de restrição da sequência do gene 16S rRNA desses organismos e aquele baseado na análise filogenética de sequências extensas do gene 16S rRNA (Gundersen et al., 1994; Lee et al., 1998). A adoção em conjunto da análise de RFLP das sequências de 16S rDNA e dos genes da proteína ribossomal que, embora conservados, são mais variáveis do que os genes 16S rRNA, é bastante promissora para a diferenciação mais refinada de subgrupos. Lee et al. (1998) conseguiram identificar 45 subgrupos ao considerarem dados de RFLP do gene da proteína ribossomal em paralelo àqueles de 16S rRNA.

Os resultados da análise filogenética de sequências do gene 16S rRNA permitiram a inserção dos fitoplasmas como membros da classe *Mollicutes*, e demonstraram que os mesmos encontram-se mais estreitamente relacionados uns aos outros do que a quaisquer outros mollicutes. A classificação dos fitoplasmas como um grupo monofilético dentro da classe *Mollicutes* foi confirmada através de dados de análise filogenética utilizando-se marcadores evolutivos menos conservados, como a sequência da região espaçadora 16S-23S rRNA (Kirkpatrick et al., 1994), as sequências dos genes *rps3* e *rp12* da proteína ribossomal (Lim & Sears, 1992; Gundersen et al., 1994; Toth et al., 1994) e o gene que codifica o fator de alongamento Tu (gene *tuf*) (Schneider et al., 1997). Segundo Kirkpatrick & Smart (1995), encontram-se em consonância as relações filogenéticas baseadas nas sequências "full-length" de 16S rRNA, nas sequências de dois genes da proteína ribossomal e nas regiões espaçadoras 16/23S.

A utilização de marcadores filogenéticos no estudo de fitoplasmas possibilitou a formação de um sólido banco de dados, que confirmou o posicionamento dos fitoplasmas como um grupo monofilético, culminando na

proposta de que a taxonomia de fitoplasmas viesse a ser baseada nos genes 16S rRNA e que cada grupo principal 16Sr constituísse uma espécie distinta (Harrison, 1999).

• Fungos

Grande parte dos estudos de identificação e de taxonomia de fungos baseiam-se nas características morfológicas e de crescimento, as quais podem apresentar variabilidade e, associadas à subjetividade durante a avaliação, podem levar a erros de classificação, além de dificilmente permitir identificação infra-específica (Martin & Kistler, 1990; Lee et al., 1993b; Mesquita et al., 1998). Comparações do rDNA de *P. arrhenomanes* e *P. graminicola* revelam que são espécies distintas; porém, devido à similaridade morfológica e à variação intra-específica, erros na identificação de isolados dessa espécies têm ocorrido (Chen & Hoy, 1993). Desse modo, o uso de técnicas que exploram o ácido nucléico pode representar um caminho para sobrepor tais dificuldades.

Análises de seqüências de ácidos nucléicos, cujos resultados são altamente reproduzíveis e informativos, são consideradas como técnicas ideais para a determinação de indicadores filogenéticos, variando em níveis de indivíduos e espécies para grupos taxonômicos superiores (Palm, 1996). Com os dados de seqüenciamento de diversos fungos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>), muito dos trabalhos relativos à diagnose e à taxonomia têm evoluído. Genes eucarióticos codificando rRNA contêm dois espaçadores transcritos, ITS1 e ITS2, os quais separam as três seqüências do rRNA maduro (18S, 5.8S e 25S rRNAs). Numerosas análises de seqüência de genes de rRNA de diferentes origens têm indicado a existência de rRNAs altamente conservados, enquanto as seqüências dos espaçadores são, em geral, pobremente conservadas e podem conter grandes diferenças (Nazar et al., 1991; Moukhamedov et al., 1994). As pequenas subunidades nucleares do rDNA, como o 16S, evoluem mais lentamente e são úteis para estudar organismos relacionados distantemente, enquanto os genes rRNA mitocondriais evoluem rapidamente e podem ser úteis nos estudos a nível de ordem ou de família. Já a região do ITS e dos espaçadores intergênicos (IGS) evoluem ainda mais rápido e podem variar entre espécies de um mesmo gênero ou ainda entre populações (White et al., 1990). Assim, a seqüência nucleotídica dos genes do rRNA e das regiões espaçadoras têm sido usadas para determinar o relacionamento filogenético numa ampla faixa de organismos (Olsen et al., 1986).

Para que se obtenham padrões nítidos e reproduzíveis de bandas de DNA, é desejável que o DNA molde apresente um razoável grau de pureza, o que pode ser facilmente obtido a partir do micélio dos fungos que se reproduzem "in vitro". Entretanto, esse não é o caso dos parasitas obrigatórios, como *Uromyces appendiculatus*. Nesse caso, a fonte disponível

para a extração do DNA são os esporos que, normalmente, são recalcitrantes a este processo. Quando tais esporos foram submetidos à pré-germinação, a quantidade de DNA extraída foi, aproximadamente, três vezes superior à obtida dos esporos sem pré-germinação (Faleiros et al., 1996). Alguns protocolos têm simplificado a extração do ácido nucléico, como quando as hifas ou os ascósporos de *Gaeumannomyces graminis* foram submetidos a apenas uma fervura e liberaram mtDNA suficiente para os testes de PCR (Henson et al., 1993); em outros casos, a extração do DNA não foi necessária, usando diretamente as estruturas reprodutivas dos fungos, como conídios de *Colletotrichum* spp. e de *Oidiopsis sicula* e uredósporos de *Puccinia psidii* (Buzeto et al., 1999a) ou o micélio de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubensis*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Colletotrichum* spp., crescido em meio de cultura (Buzeto et al., 1999b).

A técnica de PCR começou a ser usada no estudo de fungos em 1991; sendo adotada para esse fim, no Brasil, a partir de 1995, para diferentes espécies fúngicas (Brioso, 2000). Através de PCR foi possível amplificar um fragmento do mtDNA de *G. tritici* (Henson et al., 1993).

Os genes ribossomais de *Verticillium dahliae* e *V. albo-atrum* são praticamente idênticos; porém, pequenas diferenças foram identificadas pelo seqüenciamento das regiões ITS1 e ITS2 das duas espécies, correspondendo a três e a dois nucleotídeos não homólogos, respectivamente. Essas diferenças permitiram a síntese de oligonucleotídeos que anelaram diferencialmente com o rDNA das duas espécies, revelando uma amplificação espécie-específica. Os produtos gerados pelo PCR foram utilizados como sondas que hibridizaram diferencialmente com o rDNA de cada espécie, mostrando ser útil para a diferenciação de espécies intimamente relacionadas, mesmo quando o rRNA for muito homólogo ou não continha notáveis diferenças na seqüência de nucleotídeos (Nazar et al., 1991). Pelo mesmo método, foi confeccionada sonda para *V. tricorpus*, que mostrou-se divergente daquelas duas espécies, embora mais relacionado com *V. albo-atrum* (Moukhamedov et al., 1994).

A análise do polimorfismo obtido pela digestão com enzimas de restrição do mtDNA de isolados representando 29 espécies de *Pythium* mostraram um alto grau de variação interespecífica e uma baixa variação intra-específica (Martin & Kistler, 1990). Amplificação por PCR seguida pela digestão com enzimas de restrição tem sido usada para estudar a variação na região ITS. O polimorfismo espécie-específico apresentado permitiu a separação de cinco espécies de *Pythium*, mas com pouca variação intra-específica (Chen et al., 1992). A diversidade genética de isolados de *Fusarium* spp., oriundos de diversos estados brasileiros e da Argentina, obtidos de tubérculos de batata com sintomas de olho preto ou de podridão seca, revelaram grupos distintos quando a região amplificada do ITS foi analisada por RFLP: um grupo englobou os isolados de *F. oxysporum*

associados à podridão seca e o outro grupo representou os isolados de *F. solani*, independentemente da região geográfica de origem dos isolados ou da doença por eles causada. Já a análise da região IGS apresentou maior diversidade, tanto no tamanho do produto amplificado como no perfil de restrição dos fragmentos. Em relação ao tamanho do fragmento foi possível diferenciar um grupo representando *F. oxysporum* e dois grupos dentro de *F. solani*, distinguindo os isolados causadores de olho preto ou de podridão seca. Assim, pela análise da região ITS concorda-se com a atual corrente taxonômica, que considera *F. solani* como o agente causal tanto da podridão seca como do olho preto, enquanto a análise da região IGS demonstra a presença de grupos subespecíficos, separando os dois patógenos (Miller et al., 1999). Não há, necessariamente, uma correlação entre a região geográfica da coleta dos isolados com o agrupamento resultante dos dados obtidos por RAPD, como observado com *Cercospora sojina* (Machado et al., 1997) e com *Colletotrichum lindemuthianum*. No último caso, isso foi atribuído ao método de melhoramento do feijoeiro normalmente empregado no Brasil, o qual introduz um grande número de linhagens de diferentes origens, criando alta variabilidade de fungos nos locais de cultivo (Alzate-Marin et al., 1997).

Quatro sondas foram desenvolvidas para distinguir o DNA de isolados de *Phytophthora capsici*, *P. cinnamomi*, *P. megakarya* e *P. palmivora*. Cada uma dessas sondas complementava diferentes seqüências da região ITS, as quais exibiam variação entre espécies, mas não dentro das espécies, de acordo com prévias comparações das seqüências. Cada sonda somente hibridizou especificamente com os seus respectivos alvos. Uma quinta sonda foi desenvolvida, sendo complementar à seqüência idêntica entre todos os isolados representantes das quatro espécies testadas, sendo considerada como uma sonda para o gênero *Phytophthora*. Essa sonda hibridizou com os 30 isolados das quatro espécies citadas, mas não com isolados de outros nove gêneros de *Oomycetes* (Lee et al., 1993b).

A identificação de raças de *C. lindemuthianum* usualmente é feita por inoculação em plantas diferenciadoras. Esse método é extremamente útil para fins fitopatológicos ou de melhoramento, mas requer um controle rígido em relação ao número de esporos e às condições de incubação; além do mais, esse procedimento pode resultar em erros na classificação dos isolados devido à subjetividade da avaliação de sintomas. O uso de RAPD permitiu isolar um conjunto de bandas de DNA que identificaram especificamente determinadas raças, além de reclassificar isolados equivocadamente considerados como membros de outras raças (Mesquita et al., 1998) e possibilitou, ainda, alocar as raças que diferiram daquelas definidas pelo uso de variedades diferenciadoras (Vilarinhos et al., 1995). Essa técnica também foi útil para diferenciar raças de *F. oxysporum* f. sp. *cucurbitae* (Crowhurst et al., 1991), de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Assigbetse et al., 1994) e de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Woo et al., 1996).

Os dados obtidos a partir da amplificação da região IGS do rDNA, seguida por RFLP, sugerem variação nesta região entre *F. moniliforme*, *F. moniliforme* var. *subglutinans* e *Giberella fujikuroi*, bem como variação intra-específica entre os isolados de *F. moniliforme* var. *subglutinans* (Ramalho-Neto et al., 1998).

A árvore gerada pela análise das seqüências de nucleotídeos das regiões ITS de quatro *formae specialis* de *F. oxysporum* e de duas raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* corrobora com aquela resultante por RAPD (Rosa Jr. et al., 1999).

• Nematóides

DNAs satélites (satDNA) estão presentes no genoma de quase todos os organismos eucarióticos e são compostos de seqüências altamente repetitivas, presentes de 10^3 a 10^5 cópias por genoma haplóide. Recentemente, seqüências de satDNA de alguns nematóides parasitas de plantas foram caracterizadas e mostraram ser espécie-específicas, constituindo-se em uma ferramenta para a identificação das espécies intimamente relacionadas de interesse agrônomo (Grenier et al., 1997). O uso de tais seqüências de satDNA como sondas, marcadas radioativamente ou não, mostrou-se eficaz, tanto quando a amostra constituiu-se de DNA extraído do nematóide como quando o indivíduo, a massa de ovos ou ainda uma única fêmea coletada nas galhas da raiz foram macerados na membrana (Piotte et al., 1995; Castagnone-Sereno et al., 1999). Um satDNA isolado de *M. hapla* deu sinal de hibridização somente com as cinco populações dessa espécie testadas através de Southern blot, indicando que essa seqüência do satDNA é espécie-específica e foi hábil para discriminar entre espécies de *Meloidogyne* e entre populações de *M. hapla*, com polimorfismo caracterizando cada uma dessas três populações analisadas (Piotte et al., 1995).

Em 1990, o PCR começou a ser utilizado para fitonematóides. A partir do mtDNA extraído de ovos e de juvenis, foi possível distinguir espécies e populações de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* através de PCR seguido de RFLP (Harris et al., 1990). A separação das espécies *M. chitwood* e/ou *M. fallax* de *M. hapla*, que são morfologicamente muito semelhantes, foi possível com técnicas baseadas no PCR (Zijlstra et al., 1995; Petersen et al., 1997; Zijlstra, 1997) e com sondas de satDNA (Piotte et al., 1995; Castagnone-Sereno et al., 1999).

Análise de restrição de seqüências do DNA ribossomal amplificadas por PCR contendo a região do ITS foi usada com sucesso para distinguir entre isolados de *M. hapla* e de *M. chitwood* (Zijlstra et al., 1995). Do mesmo modo, a amplificação da região IGS produziu fragmentos polimórficos entre as espécies *M. hapla*, *M. chitwood* e *M. fallax*, embora a diferença de tamanho dos fragmentos amplificados foi muito pequena entre as

duas últimas espécies. O uso de iniciadores específicos derivados da sequência da região ITS amplificada resultou em fragmentos de tamanhos diversos que permitiram diferenciar essas três espécies, sem posterior análise por RFLP (Zijlstra, 1997), o mesmo acontecendo com iniciadores específicos à região IGS (Petersen et al., 1997).

A variabilidade genética entre isolados de *Heterodera schachtii* é demonstrada pelas diferenças no círculo de hospedeiras e nos danos causados às mesmas, na rapidez do aumento da população e na habilidade de penetração nas plântulas. Utilizando RAPD, Caswell-Chen et al. (1992) detectaram variação genética entre seis populações de *H. schachtii*, enquanto Kaplan et al. (1999) detectaram, por RAPD e AFLP, diferenças genotípicas entre três isolados. Recentemente, foi descoberta uma raça do nematóide de cisto da soja, *H. glycines*, que apresentou a capacidade de quebrar a resistência da cultivar Hartwig, até então considerada resistente a todas as raças conhecidas do nematóide. Essa população foi coletada no Município de Sorriso (MT) e caracterizada como raça 4. Para verificar a diversidade genética entre esta e outras populações pertencentes às raças 4 e 9, foi feita uma caracterização molecular por RAPD. Foram utilizadas nove populações do *H. glycines*, das quais quatro apresentavam a capacidade de parasitar 'Hartwig'. Foi verificado que as populações capazes de parasitar 'Hartwig' foram bastante diferentes das demais. Por meio de análise de agrupamento, com base nas distâncias genéticas encontradas, foram obtidos três grupos: o primeiro, constituído por indivíduos classificados como raça 4, mas que não parasitam 'Hartwig'; o segundo, constituído por quatro populações capazes de parasitar 'Hartwig', e o terceiro, por apenas uma população, classificado como raça 9, e que também não parasita 'Hartwig'. Este estudo confirmou que a população de *H. glycines*, encontrada em Sorriso, é geneticamente distinta das demais populações da raça 4 encontradas e constitui uma nova raça, denominada 4+ (Abdelnoor et al., 2001). Tal trabalho marcou o início da Biologia Molecular em Fitopatologia no estudo deste fitopatógeno no Brasil.

Após um período em que os estudos envolvendo técnicas de biologia molecular para fitonematóides limitavam-se aos nematóides de galhas e aos de cisto começam agora a ser usadas também para outros gêneros cujos representantes são migradores e apresentam o corpo fusiforme (Ferraz, 1999), como *Pratylenchus vulnus*, onde foi possível constatar a variabilidade intra-específica através de RAPD (Pinochet et al., 1994). Espécies dentro do grupo *Xiphinema americanum* (Vrain, 1993) e do gênero *Ditylenchus* (Wendt et al., 1993) têm sido identificadas pela análise por RFLP a partir do fragmento amplificado da região ITS e do gene 5.8S.

Amplificação por PCR da região ITS1 e parte dos genes 18S e 5.8S foi obtida para diversos gêneros, como: *Aorolaimus*, *Belonolaimus*, *Criconemella*, *Geocenamus*, *Globodera*, *Helicotylenchus*, *Heterodera*, *Heteroderamani*, *Hoplolaimus*, *Longidorus*, *Meloidogyne*, *Nacobbus*,

Pratylenchus, *Quinisulcius*, *Rotylenchus*, *Scutellonema*, *Tylenchorhynchus*, *Tylenchus* e *Xiphinema*; sendo que o tamanho do fragmento gerado diferiu, em muitos casos, entre os gêneros (<http://nematode.unl.edu/wormhome.htm>).

Seqüenciamento da região ITS de *H. glycines* e *D. dipsaci* revelou pouca diferença dentro das espécies, sendo sugeridas outras regiões, como IGS, que são maiores e mais variáveis, como fortes candidatas para diferenciar populações de raças dessas espécies (Leal-Bertioli et al., 1998). Observou-se que o genoma de *Radopholus similis* é altamente conservado, independentemente da região geográfica, e compreende dois patótipos: um que parasita citros e o outro não (Kaplan et al., 2000).

As seqüências nucleotídicas dos diferentes fitonematóides podem ser acessadas em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>.

• Protozoários

O único gênero de protozoários fitopatogênicos é *Phytophthora*, agrupando diferentes espécies (Agrios, 1997). Através do seqüenciamento de algumas dessas espécies (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>) foi possível identificar regiões gênicas de importância taxonômica para estes agentes, como o RNA ribossomal 18S do cinetoplasto, permitindo a diferenciação das espécies.

A versatilidade da Biologia Molecular na Fitopatologia é tão grande que é possível, desde 1998, identificar o gênero *Phytophthora* através de Dot blot e de PCR (Podlipaev & Bulat, 1998; Podlipaev, 2000).

• Vírus

Métodos biológicos, sorológicos e físico-químicos, com suas vantagens e desvantagens, têm sido utilizados para detectar, diagnosticar e classificar os vírus vegetais durante décadas. Com o avanço da Biologia Molecular, parâmetros moleculares também começaram a ser amplamente explorados no estudo desse fitopatógeno. Dependendo do princípio e das condições de condução, os testes moleculares podem ser eficientes para discriminar gêneros, espécies, estirpes e subgrupos de fitovírus.

Eiras et al. (1997), explorando várias regiões do genoma do *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), confeccionaram sondas não radioativas para testá-las com outras seis espécies de *Tospovirus*. Foi observado que a sonda gerada do L RNA (gene da transcriptase) do TSWV detectou todas as espécies testadas, revelando-se como uma região conservada dentro do gênero; enquanto sondas geradas do M RNA (gene das glicoproteínas e gene da proteína de movimento) só não detectaram uma e duas espécies, respectivamente. Já a sonda desenvolvida do S RNA (gene da proteína capsidial) detectou especificamente TSWV. A hibridização também permite a separação rápida e segura de estirpes virais, como demonstrado por Brioso et

al. (1997) que, a partir de produtos amplificados por PCR da estirpe B e da estirpe C do *Andean potato mottle virus* (APMV), produziu sondas que hibridizaram mais fortemente com o isolado homólogo. Em geral, a identificação dessas estirpes é baseada nos sintomas induzidos nas plantas hospedeiras; tal método tem a vantagem da simplicidade, mas além de ser demorado, pode sofrer influência ambiental. Testes de hibridização também foram hábeis para demonstrar que isolados do *Barley yellow mosaic virus* (BYMV) que, até então eram considerados como o mesmo vírus, não eram homólogos e, portanto, passaram a ser considerados como espécies distintas (Batista, 1993).

O primeiro fitopatógeno estudado no Brasil pela técnica de PCR foi um vírus, em 1992 (Brioso, 2000). Desde então, essa é uma das técnicas moleculares mais adotadas na virologia. A partir de iniciadores degenerados correspondentes às sequências do gene da capa protéica, conservadas no gênero *Comovirus*, foi possível obter padrão de amplificação distinto entre as três espécies do gênero que foram testadas, permitindo a identificação das mesmas (Brioso et al., 1996b).

Identificação infra-específica de vírus também tem sido registrada pela combinação de RT-PCR com RFLP: isolados dos subgrupos I e II do *Cucumber mosaic virus* (CMV) amplificaram um fragmento de igual tamanho, abrangendo parte do gene da proteína capsidial e da região 3' não traduzida. Porém, quando tais fragmentos foram submetidos à clivagem por enzimas de restrição, foi possível separá-los. Esta técnica tem sido adequada para diferenciar os subgrupos I e II, pois a sequência genômica dessa região é altamente conservada dentro de cada subgrupo, sendo que os sítios de restrição da enzima *Eco* RI estão localizados na região 3' não traduzida para o subgrupo I, e na região pertencente ao gene da capa protéica para o subgrupo II (Boari et al., 2000).

A geração de fragmentos amplificados por PCR correspondentes à região conservada do gene da capa protéica dos *Tospovirus*, com o posterior sequenciamento, foi usada para estabelecer parâmetros para delinear espécies dentro desse gênero, servindo também para revelar a alta variabilidade desse vírus no Brasil (de Ávila et al., 1993; Bezerra et al., 1999; Pozzer et al., 1999).

Informações provenientes da sequência nucleotídica podem contribuir para o conhecimento de muitos aspectos da virologia vegetal, como: a localização, o número e o tamanho de genes no genoma viral; a sequência de aminoácidos de conhecidos ou supostos produtos gênicos; os mecanismos moleculares pelos quais os produtos gênicos são transcritos; as prováveis funções de um produto gênico; o controle e o reconhecimento de sequências no genoma que modulam a expressão de genes virais e a replicação genômica; a base molecular para a variabilidade e evolução dos vírus; o início de uma taxonomia para vírus baseada no relacionamento evolucionário (Matthews, 1991). O sequenciamento, parcial ou completo, tem

sido praticamente uma exigência do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) para reconhecer um isolado como uma nova espécie ou para modificações no posicionamento taxonômico das mesmas. O primeiro vírus sequenciado por completo, no Brasil, foi o *Andean potato mottle virus* (APMoV), em 1992 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>). Atualmente, diversas espécies virais têm, pelo menos, alguma parte do seu genoma sequenciada, visando distintas finalidades.

A proteção cruzada é um fenômeno no qual a infecção de uma planta com uma estirpe fraca evita ou diminui a infecção com uma estirpe forte (Matthews, 1991). Desse modo, torna-se atraente o conhecimento das diferenças a nível de genoma entre tais estirpes. Assim, a sequência nucleotídica correspondendo a diferentes regiões de uma estirpe severa do *Papaya ring spot virus* (PRSV) foi comparada com uma estirpe fraca e com uma estirpe que não infecta mamão. Na região da capa protéica, somente dois nucleotídeos diferiram entre a estirpe severa e a estirpe fraca, o que resultou na mudança de dois aminoácidos. Porém, um total de 18 nucleotídeos foram diferentes entre a estirpe severa e a estirpe que não infecta mamão, resultando em seis aminoácidos mudados. Na região do gene da inclusão nuclear b, dez nucleotídeos mostraram-se diferentes entre a estirpe severa e a estirpe fraca, causando cinco trocas de aminoácidos. Os 22 nucleotídeos diferentes entre a estirpe severa e a estirpe que não infecta mamão resultou em apenas quatro mudanças de aminoácidos (Wang & Yeh, 1992). Dados oriundos de sequenciamento mostraram a diferença genômica entre o isolado fraco do *Citrus tristeza virus* (CTV), com capacidade de proteção cruzada, quando comparado com isolados severos, de hospedeiros distintos. A sequência nucleotídica do gene da capa protéica dos isolados severos foi homóloga, mas diferiu em duas bases com o isolado fraco, nas posições 52 e 428 (Targon et al., 2000).

O RNA2 tem sido reconhecido como responsável pelo controle do fenótipo virulento/avirulento em plantas infectadas pelo CMV. Estudos comparativos da sequência nucleotídica dessa região, incluindo estirpes que induzem reação de hipersensibilidade em caupi e estirpes capazes de quebrarem essa resistência, demonstraram que ocorre a mudança de dois aminoácidos, nas posições 631 e 641. Mutações introduzidas no RNA2 das estirpes estudadas, designadas para a mudança de aminoácido na posição 631, resultou na mudança de sintomas, indicando que uma única mudança nucleotídica determina as reações elicitadas pelas estirpes (Karasawa et al., 1999).

Dados provenientes da sequência nucleotídica permitem também analisar filogeneticamente os fitovírus. Por exemplo, a comparação das sequências de nucleotídeos correspondentes à extremidade 3' do genoma viral de isolados do *Potato virus Y* (PVY) permitiu reuni-los em dois grupos distintos, um compreendendo a maioria das estirpes comuns (PVY^O) e o outro

englobando as estirpes necróticas (PVY^N) (Inoue-Nagata et al., 2001). Do mesmo modo, o alinhamento das seqüências nucleotídicas permitiu comparar isolados brasileiros de *Lettuce mosaic virus* (LMV) com isolados de diversas partes do mundo, podendo agrupá-los em três ramos, de acordo com a origem geográfica (Krause et al., 1999).

O seqüenciamento tem permitido a identificação de diversos genes no genoma viral, como da proteína do capsídeo, da replicase, da protease, de proteínas de movimento, entre outros, que codificam proteínas relevantes para o processo de infecção e de transmissão do vírus (van Regenmortel et al., 2000). Tais conhecimentos podem levar a uma maior compreensão da interação planta-patógeno-vetor, gerando informações que possam vir a ser utilizadas, inclusive, em medidas de controle, como será discutido na parte II dessa revisão.

• Estirpes Virais Defectivas e Agentes Subvirais

Um dos fatos mais relevantes da Biologia Molecular na Fitopatologia foi a identificação de mutantes virais defectivos. A análise do genoma de mutantes do TSWV, denominados de RNAs defectivos interferentes (DI RNAs), através da caracterização por Northern blot e pela análise da seqüência nucleotídica, mostrou que tais isolados apresentam um segmento extra de RNA, além dos três que compõem o genoma viral. Esse segmento é originado exclusivamente do L RNA, através de uma deleção interna de 60 % a 80 % da molécula original e causa considerável atenuação dos sintomas na planta infectada (Resende et al., 1992). Já em trabalhos conduzidos com um mutante morfológicamente defectivo do TSWV, o qual perdeu a habilidade de produzir glicoproteínas, foi observado que o seu M RNA não apresentou diferenças significativas no tamanho, indicando que o defeito está relacionado com mutações de ponto ou com pequenas deleções no M RNA. Tais mutações foram detectadas no gene que codifica o precursor das glicoproteínas G1 e G2 (proteínas envolvidas na interação vírus-vetor), sem alteração na sintomatologia das plantas infectadas (Resende, 1993).

Através das técnicas da biologia molecular tem sido possível identificar agentes subvirais, como os RNAs satélites, os DNAs satélites e os vírus satélites (van Regenmortel, 2000). Estudos têm concluído que alterações nas doenças induzidas pela presença de um RNA satélite dependem de mudanças na seqüência nucleotídica do RNA. A comparação das seqüências nucleotídicas de seis RNAs satélites do CMV sugerem que somente algumas poucas trocas nucleotídicas podem ser necessárias para modificar a resposta do hospedeiro e que diferentes tipos de respostas (amarelecimento ou necrose, por exemplo) podem estar associadas a diferentes domínios da seqüência nucleotídica (Matthews, 1991).

• Viróides

A Biologia Molecular contribuiu muito para a atual tendência taxonômica de agrupar os viróides em família, gênero e espécie, compreendendo sete gêneros e várias espécies (van Regenmortel et al., 2000), cujas seqüências podem ser acessadas em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>.

Embora o seqüenciamento de nucleotídeos seja a mais definitiva resposta à identificação dos viróides, sua aplicação ainda tem limitações. Nesse sentido, PCR pode ser uma alternativa prática (Singh & Dhar, 1998). No entanto, a possibilidade de comparar as seqüências nucleotídicas facilita o desenho de iniciadores complementares ao RNA viroidal (Fonseca & Boiteux, 1997) e é vantajosa porque variantes de um particular viróide podem existir na natureza, fornecendo uma faixa de mutantes viáveis (Matthews, 1991). Informações obtidas a partir das seqüências nucleotídicas dos viróides têm permitido identificar as regiões genômicas relacionadas à patogenicidade, assim como produzir modelos da estrutura dos mesmos (van Regenmortel, 2000).

Exceto para o CEVd, há pouca informação sobre a variabilidade molecular de viróides de citros, apesar da maioria deles já ter sido seqüenciada. Embora conhecida a existência dessa variabilidade, os estudos da mesma têm praticamente se limitado à caracterização biológica, sendo denominados de isolados fracos, moderados ou fortes, de acordo com os sintomas que induzem na hospedeira (Rodrigues et al., 1999).

A identificação de uma possível molécula de viróide pode ser feita através da utilização de perfis eletroforéticos. Geralmente, esses padrões envolvem o uso de dois viróides purificados, preferencialmente incluindo um dos menores viróides conhecidos, como *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) ou *Collet yellow viroid* (CYVd) e um dos maiores, como *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) ou *Citrus exocortis viroid* (CEVd). As moléculas que migram em torno ou entre as posições correspondentes aos padrões são consideradas como candidatas a RNAs do tipo viroidal (Fonseca & Boiteux, 1997).

A primeira aplicação com sucesso de um método de diagnose baseado no ácido nucléico, realizado em suporte sólido (membrana de nitrocelulose, no caso), para testes em larga escala, foi realizado por Owens & Diener, em 1981, para detectar PSTVd em tubérculos de batata brotados. Inicialmente, foram utilizadas sondas marcadas radioativamente, mas atualmente a sensibilidade de detecção de sondas não radioativas (biotina, fotobiotina ou digoxigenina) têm sido registradas serem tão sensíveis quanto às radioativas. Sano et al. (1986) demonstraram que sondas dirigidas às regiões conservadas dos viróides detectam membros de um mesmo grupo; enquanto as sondas dirigidas às regiões variáveis podem ser específicas às

estirpes.

A técnica de RT-PCR e suas variações foram introduzidas em 1989, a nível mundial, no estudo de viróides. No Brasil, foram utilizadas a partir de 1994, em espécies distribuídas nos gêneros *Apscaviroids*, *Cocadviroids*, *Hostuviroids*, *Pospiviroids* (Fonseca & Boiteux, 1997; Rodrigues et al., 1999). RT-PCR mostrou-se eficiente para detectar ASBVd a partir de ácido nucléico total, sem a necessidade de purificação do mesmo por cromatografia de coluna; porém, quando submetido à mesma, o produto da amplificação apresentou menos artefatos. Por RT-PCR foi possível detectar o viróide mesmo em plantas assintomáticas (folhas novas, folhas velhas e flores), o que nem sempre ocorre através de eletroforese em gel de poliacrilamida (Schnell et al., 1997). A taxa de detecção do ASBVd por RT-PCR foi similar à detectada pelos bioensaios; porém, os mesmos podem demorar de oito meses (em condições de alta temperatura) a mais de um ano, sob baixa temperatura. Logo, a detecção usando RT-PCR tem a vantagem de apresentar maior sensibilidade que a eletroforese em gel de poliacrilamida e o tempo requerido para o teste ser reduzido significativamente em comparação aos bioensaios (Schnell et al., 1997).

VETORES OU ORGANISMOS DE TRANSMISSÃO DE FITOPATÓGENOS

A presença de vetores ou organismo de transmissão é, por vezes, condição essencial para alguns fitopatógenos acarretarem doença. Desse modo, a detecção do patógeno nesses organismos pode representar importante auxílio na predição de epidemias, na identificação de possíveis vetores ou transmissores do patógeno, no exame dos mecanismos de transmissão a nível de interações entre o patógeno e o vetor. O mais comum é o estudo dos organismos vetores de vírus, onde vários métodos (microscopia eletrônica, ELISA, etc) têm sido usados para detectar os vírus nos seus vetores e para estudar o mecanismo de transmissão a nível de interação vetor-patógeno. Porém, tais métodos têm demonstrado uso limitado, especialmente nos casos de transmissão não persistente, devido aos curtos períodos de aquisição e à pequena quantidade de patógeno adquirida (López-Moya et al., 1992). Com a maior sensibilidade oferecida pelos métodos moleculares, onde é possível detectar o patógeno a partir da análise de um único organismo vetor, registros de detecção do patógeno no vetor têm sido demonstrados. Serão exemplificados alguns trabalhos, sendo que os insetos representam o maior grupo de vetores, abrangendo também o maior número de estudos realizados.

Afídio: A partir de preparações do RNA total extraído do afídio vetor *Myzus persicae*, após período de aquisição viral, obteve-se por RT-

PCR, um fragmento específico ao *Potato leaf roll virus* (PLRV), o qual não foi detectado nos insetos que alimentaram-se somente nas plantas sadias (Brioso et al., 1996a). Foram detectados isolados de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) em indivíduos de *M. persicae*, tanto isolados transmissíveis como os não transmissíveis por afídios, após esses terem realizado breves picadas de prova (um minuto ou menos) em plantas infectadas, mostrando esse ser tempo suficiente para o vírus ser adquirido. Como a perda da transmissão por afídios pelo isolado não transmissível parece ser devido a uma única alteração dos aminoácidos no fator de transmissão codificado pela ORF II, o qual modifica sua funcionabilidade e/ou acúmulo nas plantas infectadas, a presença desse fator na forma funcional parece não ser requerido para eficiente aquisição pelos afídios de partículas virais não transmissíveis (López-Moya et al., 1992). Foi detectado o CTV nos afídios vetores *Toxoptera citricida* e *Aphis gossypii*, mas também em *M. persicae*, que não é seu vetor. Aparentemente, o CTV é adquirido por diferentes espécies de afídios, independentemente da habilidade dos mesmos em transmiti-lo. Então, se o vetor e o não vetor contêm partículas virais no seu aparelho bucal, somente a habilidade em liberá-las os diferenciam (Mehta et al., 1997). Interessante trabalho visando estudar a interação do *Banana bunchy top virus* (BBTV) com o seu vetor, *Pentalonia nigronervosa*, foi realizado por Hu et al. (1996), que determinaram através de monitoramento por PCR, a eficiência de transmissão, os períodos mínimos de aquisição e de inoculação, o tempo de retenção do vírus no vetor e a não ocorrência de transmissão transovariana.

Cigarrinha: O geminivírus *Maize streak virus* (MSV) foi detectado em cigarrinha através de Squash-blot, utilizando sonda radioativa, em 1986, por Boulton & Markhan (citados por Matthews, 1991). A maior sensibilidade do PCR permitiu a detecção do *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV) nas cigarrinhas *Nephotettix virescens*, um dos seus vetores semi-persistentes, o que até então não havia sido possível obter por ELISA (Takahashi et al., 1993). Fitoplasmas foram detectados através de hibridização *in situ*, com sondas não radioativas, nos corpos de cigarrinhas *Euscelidius variegatus*. Forte sinal de hibridização foi detectado nos lobos posteriores das glândulas salivares de todos os indivíduos 30 dias após a aquisição do patógeno, indicando que, potencialmente, essas cigarrinhas estavam infectadas pelo fitoplasma; enquanto que, após 20 dias da aquisição, havia sido detectado o fitoplasma na glândula salivar de apenas um indivíduo. A hibridização *in situ* mostra-se como uma técnica poderosa para confirmar o status de vetor (Webb et al., 1999). A investigação sobre o envolvimento de diferentes cigarrinhas com moléstias de natureza fitoplasmática vem sendo facilitada pela adoção de PCR, podendo identificar *Hyalesthes obsoletus* como vetor de fitoplasmoses que afetam a videira (Sforza et al., 1998). A amplificação de uma sequência específica do fitoplasma associado ao "aster yellows" foi detectada, em extratos de ácido nucléico da cigarrinha

Macrostes fascifrons, seu vetor. Porém, foi detectada também nos extratos de *Dalbulus maidis*, cigarrinha não vetora desse patógeno, mesmo 14 dias após ter sido removida da planta infectada. Tal resultado, confirmado por Southern blot, demonstra que a detecção do patógeno no inseto não necessariamente o identifica como vetor (Vega et al., 1993). A combinação de PCR e análise de RFLP possibilitou examinar a fenologia de populações de cigarrinhas e auxiliou investigações preliminares sobre os possíveis vetores do fitoplasma do grupo "ash yellows" (Hill & Sinclair, 2000). O PCR é uma técnica promissora no estudo da transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas, tendo sido confirmada a sua presença em *Oncometopia facialis*, *Acrogonia* sp. e *Dilobopterus costalimai*, cigarrinhas transmissoras do patógeno (Miranda et al., 2000). Pooler et al. (1997) desenvolveram um método sensível e específico, combinando a separação imunomagnética da bactéria e inseto e nested-PCR, para a detecção de potenciais vetores de *X. fastidiosa*, em cigarrinhas capturadas em olmo americano.

Cochonilha: *Grapevine virus A* (GVA) e *Grapevine virus B* (GVB) são vírus que infectam videira, sendo transmitidos pelas cochonilhas *Planococcus ficus* e *Pseudococcus longispinus*. A detecção do GVA em cochonilhas foi eficiente por RT-PCR e facilitada por IC-RT-PCR, pois nesse caso não se necessitou extrair o ácido nucléico do inseto, sendo os resultados confirmados por Southern blot. Os insetos podem ser armazenados a 4 °C, em etanol 50 %, até o seu processamento (Minafra & Hadidi, 1994).

Mosca Branca: A amplificação por PCR de um fragmento específico ao *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) foi obtida a partir de extração do DNA total de um único indivíduo de mosca branca (*Bemisia tabaci*), coletado em campo de feijão naturalmente infectado. A detecção mostrou-se positiva mesmo quando um indivíduo virulífero foi misturado com mil indivíduos não virulíferos ou quando o ácido nucléico do indivíduo virulífero foi diluído com água a 10^{-9} . A possibilidade de detectar um indivíduo virulífero numa população de milhões de outros insetos não virulíferos, por esse método, é sugerida (Navot et al., 1992). Também foi detectado *Indian tomato leaf curl virus* (IToLCV) em *B. tabaci*, após essas terem sido congeladas e secas (Deng et al., 1994). Dados obtidos por monitoramento por PCR sugerem que, embora indivíduos de mosca branca pertencentes às espécies vetoras e não vetoras do *Squash leaf curl virus* (SLCV) tenham ingerido partículas virais, somente na espécie vetora haveria a passagem efetiva dessas partículas do intestino para a hemocele (Rosell et al., 1999).

Percevejo: Já foi possível identificar *Phytomonas* no percevejo vetor utilizando PCR (Podlipaev & Bulat, 1998).

Trips: Através de PCR, utilizando iniciadores complementares a uma região interna do gene da proteína do nucleocapsídeo, foi detectado TSWV em indivíduos de *Thrips setosus* adultos que, quando ninfas, haviam

alimentado-se em plantas infectadas. A presença viral foi confirmada mesmo naqueles indivíduos que não foram capazes de transmitir o vírus às plantas (Tsuda et al., 1994). Diagnóstico através de sondas para TSWV foi aplicado a indivíduos de *Frankliniella occidentalis* e grande variabilidade na quantidade de vírus foi detectada (Rice et al., 1990).

Fungos e Nematóides: Técnicas de biologia molecular ainda são pouco exploradas no estudo desses vetores de vírus, havendo limitada informação nesse aspecto. Um dos poucos exemplos é o trabalho de Van der Wilk et al. (1994), que usaram RT-PCR para identificar *Tobacco rattle virus* (TRV) em nematóides tricodódeos. No entanto, diversos trabalhos foram conduzidos, via técnicas moleculares, na investigação de determinantes genéticos para a transmissibilidade dos vírus por esse vetores; porém, os estudos são no genoma viral e não no vetor, tema que será abordado na parte II dessa revisão.

SIMBIONTES ASSOCIADOS A FITOPATÓGENOS E A VETORES

Inúmeros microrganismos têm sido descritos como simbioses citoplasmáticas de eucariotos. Muitos endosimbiontes obrigatórios só se transmitem através das fêmeas, inclusive alterando a proporção entre machos e fêmeas para seu próprio benefício, a ponto da população de machos ser extremamente rara. É o caso, por exemplo, da bactéria *Wolbachia pipientis*, detectada em artrópodes e nematóides. E, mais recentemente, das espécies de bactéria *Candidatus Xiphinematobacter americani*, *C. Xiphinematobacter rivesi* e *C. Xiphinematobacter brevicolli*, que incidem sobre os nematóides *X. americanum*, *X. rivesi* e *X. brevicollum*, respectivamente. Tais bactérias foram identificadas através da análise da sequência do gene rDNA 16S (Vandekerckhove et al., 2000).

Buchnera GroEL, uma bactéria endossimbionte presente em *Myzus persicae*, é tida como responsável pela transmissão do tipo persistente de luteovírus por este inseto. Tal fato foi comprovado através de análises moleculares do DNA da bactéria (Hogenhout, 1999).

USO DA BIOLOGIA MOLECULAR EM FITOPATOLOGIA NO FUTURO

Há de se considerar que as técnicas moleculares são extremamente adequadas, rápidas, sensíveis e seguras para detectar a presença do ácido nucléico de um fitopatógeno, mesmo que este esteja em quantidades

extremamente reduzidas. No entanto, para determinados estudos da Fitopatologia não basta somente detectar o ácido nucléico, mas também deve-se conhecer a viabilidade do mesmo em infectar a planta e, então, ocorrer a doença. Do mesmo modo, ressalta-se que a detecção de um fitopatógeno numa determinada espécie de organismo não indica necessariamente a sua identificação como vetor. Assim, por mais interessante que seja o uso de tais técnicas, não se pode abrir mão dos tradicionais testes biológicos e das chamadas Regras de Patogenicidade (Postulados de Koch). Apesar de tais questionamentos, a Fitopatologia Molecular evolui rapidamente e passa definitivamente à ser uma poderosa ferramenta no campo de estudo de fitopatógenos e de seus vetores; sem desconsiderar, no entanto, as técnicas biológicas e sorológicas que tantas contribuições têm trazido à Fitopatologia. Apesar dos avanços e da evolução das técnicas moleculares empregadas, algumas questões, por exemplo, a identificação no genoma de gene(s) relacionado(s) à patogenicidade, bem como a identificação a nível de biótipos ou de raças de alguns fitopatógenos, continuam em aberto. Em relação aos vetores, a identificação dos fatores envolvidos na transmissão de alguns fitopatógenos ainda não foram elucidados. No entanto, possivelmente, tais questões brevemente serão solucionadas e a Fitopatologia Molecular será, cada vez mais, parte integrante da rotina dos laboratórios nos aspectos de etiologia, diagnose e taxonomia relativa aos fitopatógenos e aos seus vetores.

LITERATURA CITADA

- ABDELNOOR, R.V.; DIAS, W.P.; SILVA, J.F.V.; MARIN, S.R.R. & KIIHL, R.A.S. 2001. Caracterização molecular de populações do nematóide-de-cisto-da-soja com diferentes índices de parasitismo na cultivar Hartwig. *Pesq. Agropec. Bras.* 36:331-7.
- ADHIKARI, T.B.; MEW, T.W. & LEACH, J.E. 1999. Genotypic and pathotypic diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal. *Phytopathology* 89:687-94.
- AGRIOS, G.N. 1997. *Plant Pathology*. San Diego, Academic Press.
- ALIZADEH, A.; ARLAT, M.; SARAFI, A.; BOUCHER, C.A. & BARRAULT, G. 1997. Restriction fragment length polymorphism analyses of Iranian strains of *Xanthomonas campestris* from cereals and grasses. *Plant Dis.* 81:31-5.
- ALZATE-MARIN, A.L.; BAÍA, G.S.; FALEIRO, F.G.; CARVALHO, G.A.; PAULA JR., T.J.; MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G. 1997. Análise da diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões do Brasil por marcadores RAPD. *Fitopatol. Bras.* 22:85-8.
- ASSIGBETSE, K.B.; FERNANDEZ, D.; DUBOIS, M.P. & GAIGER, J.P.

1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology* 84:622-6.
- BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. 2000. Biotecnologia: um breve histórico. *Inform. Agropec.* 21:3-13.
- BARROS, T.S.L.; DAVIS, R.E., RESENDE, R. & DALLY, E.L. 2001. Design of a polymerase chain reaction for specific detection of *corn stunt spiropasma*. *Plant Dis.* 85:475-80.
- BARROS, T.S.L.; KITAJIMA, E.W. & RESENDE, R.O. 1998. Diversidade de isolados brasileiros de fitoplasmas através da análise do 16S rDNA. *Fitopatol. Bras.* 23:459-65.
- BATISTA, M.F. 1993. Métodos moleculares para identificação de patógenos de plantas. *Rev. Anu. Patol. Plant.* 1:165-96.
- BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E. & DALLY, E.L. 2000. Detection and identification of the maize bushy stunt phytoplasma in corn plants in Brazil using PCR and RFLP. *Internat. J. Pest Man.* 46:73-6.
- BEZERRA, I.C.; RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; KORMELINK, R.; DE ÁVILA, A.C. 1999. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new *Tospovirus* species, one from chrysanthemum and one from zucchini. *Phytopathology* 89:823-30.
- BOARI, A.J.; MACIEL-ZAMBOLIN, E.; CARVALHO, M.G. & ZERBINI, F.M. 2000. Caracterização biológica e molecular de isolados do "*Cucumber mosaic virus*" provenientes de oito espécies vegetais. *Fitopatol. Bras.* 25:49-58.
- BOUZAR, H.; JONES, J.B.; STALL, R.E.; LOUWS, F.J.; SCHNEIDER, M.; RADEMAKER, J.L.W.; BRUJIN, F.J. & JACKSON, L.E. 1999. Multiphasic analysis of xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: Evidence for common lineages within and between countries. *Phytopathology* 89:328-35.
- BRIOSO, P.S.T. & OLIVEIRA, D.E. 1997. Diferenciação sorológica e molecular das estirpes B e C do "*Andean potato mottle virus*". *Fitopatol. Bras.* 22:131-6.
- BRIOSO, P.S.T. 2000. Emprego de PCR na identificação de fitopatógenos. *Fitopat. Bras.* 25:251-4.
- BRIOSO, P.S.T., SOUZA DIAS, J.A.C., COSTA, A.S. & OLIVEIRA, D.E. 1996a. Detecção de vírus da batata em plantas infectadas e em afídeos virulíferos através dos testes de "Polymerase Chain Reaction" e de "Dot - Blot". *Fitopatol. Bras.* 21:328-35.
- BRIOSO, P.S.T.; SANTIAGO, L.J.M.; ANJOS, J.R.N. & OLIVEIRA, D.E. 1996b. Identificação de espécies do gênero *Comovirus* através de "polymerase chain reaction". *Fitopatol. Bras.* 21:219-5.

- BURR, T.J.; REID, C.L.; ADAMS, C.E. & MOMOL, E.A. 1999. Characterization of *Agrobacterium vitis* strains from feral *Vitis riparia*. Plant Dis. 83:102-7.
- BUZETO, A.L.; KURAMAE-IZIOKA, E.; TAKAHASHI, S.S. & SOUZA, N.L. 1999a. Amplificação direta da região ITS a partir de estruturas reprodutivas de fungos fitopatogênicos provenientes do tecido lesionado. Fitopatol. Bras. 24:270 (abstr.).
- BUZETO, A.L.; KURAMAE-IZIOKA, E.; TAKAHASHI, S.S. & SOUZA, N.L. 1999b. Micélio de fungos fitopatogênicos como substrato para PCR. Fitopatol. Bras. 24:270 (abstr.).
- CASTAGNONE-SERENO, P.; LEROY, F.; BONGIOVANNI, M.; ZIJLSTRA, C. & ABAD, P. 1999. Specific diagnosis of two root-knot nematodes, *Meloidogyne chitwood* and *M. fallax*, with satellite DNA probes. Phytopathology 89:380-4.
- CASWELL-CHEN, E.P.; WILLIAMSON, V.M. & WU, F.F. 1992. Identification of *Heterodera cruciferae* e *H. schachtii* and assessment of within-species genetic variation using random amplified polymorphic DNA. J. Nematol. 24:343-51.
- CHEN, W. & HOY, J.W. 1993. Molecular and morphological comparison of *Pythium arrhenomanes* e *P. graminicola*. Mycol. Res. 97:1371-8.
- CHEN, W.; HOY, J.W. & SCHNEIDER, R.W. 1992. Species-specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNA of five *Pythium* species. Exper. Micol. 16:22-34.
- CIRVILLERI, G.; CATARA, V.; CALDARERA, G. & CARUSO, P. 1998. Genomic fingerprinting of some *Pseudomonas syringae* pv. *psis* strains from Sicily. J. Plant Pathol. 80:187-95.
- COLTRI, P. P.; GONÇALVES, E. R.; RODRIGUES NETO, J. & ROSATO, Y. B. 2000. *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* podem ser diferenciadas de outros patógenos de *X. axonopodis* através de SDS-PAGE e RFLP da região espaçadora 16S-23S. In: XXIII Congresso Paulista de Fitopatologia. p.214.
- COSTA, P.I.; FRANCO, C.F.; MIRANDA, V.S.; TEIXEIRA, D.C. & HARTUNG, J.S. 2000. Strains of *Xylella fastidiosa* rapidly distinguished by arbitrarily primed-PCR. Curr. Microbiol. 40:279-82.
- COVELLO, V.N.; SUASSUNA, N.D.; LORENA, A.J. & COUTO, E.F. 2000. Técnicas moleculares no estudo de bactérias fitopatogênicas. In: Mariano, R.L.R. (Ed.). Manual de práticas em fitobacteriologia. Ed. Universitária, Recife, p.159-71.
- CROWHURST, R.M.; HAAWTHORNE, B.T.; RIKKERINK, E.H.A. & TEMPLETON, M.D. 1991. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplified polymorphic. Curr. Genet. 20:391-6.
- CUPPLES, D.A.; MOORE, R.A. & MORRIS, V.L. 1990. Construction and

- use of a nonradioactive DNA hybridization probe for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato plants. Appl. Environ. Microbiol. 56:1743-9.
- DAVIS, R.E. 1995. Fitoplasmas: fitopatógenos procarióticos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodes. Rev. Anu. Patol. Plant. 3:1-27.
- DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; BERTACCINI, A.; CREDI, R.; OSLER, R.; SAVINO, V.; CARRARO, L.; DI TERLIZZI, B.; BARBA, M. & LEE, I.M. 1992. RFLP analyses and dot hybridizations of chromosomal DNA distinguish two mycoplasma-like organisms (MLOS) associated with grapevine yellows disease. Phytopathology 82:242.
- DAVIS, R.E.; LEE, I.M.; DOUGLAS, S.M. & DALLY, E.L. 1990. Molecular cloning and detection of chromosomal and extrachromosomal DNA of the mycoplasma-like organism associated with little leaf disease in periwinkle (*Catharanthus roseus*). Phytopathology 80:789-93.
- DE ÁVILA, A.C.; HAAN, P.; KORMELINK, R.; RESENDE, R.O.; GOLDBACH, R.W. & PETERS, D. 1993. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. J. Gen. Virol. 74:153-9.
- DE LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.; HARTUNG, J.S.; BRLANSKY, R.H.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S.R. & CARLOS, E.F. 1998. Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. Plant Dis. 82: 94-7.
- DENG, D.; MCGRATH, P.F.; ROBINSON, D.J. & HARRISON, B.D. 1994. Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. Ann. Appl. Biol. 125:327-36.
- DESTÉFANO, S.L. 2000. Detecção e identificação de bactérias fitopatogênicas através da utilização de *primers* específicos. Summa Phytopathol. 26:158-60.
- EIRAS, M.; MISSIAGIA, A.A.; RESENDE, R.O.; BEZERRA, I.C. & DE ÁVILA, A.C. 1997. Non-radioactive molecular probes for *Tospovirus* detection. Fitopatol. Bras. 22:334 (abstr.).
- FALEIRO, F.G.; BARROS, E.G.; VILARINHOS, A.D.; CORRÊA, R.X.; PAULA JR., T.J. & MOREIRA, M.A. 1996. Otimização da extração de DNA de esporos de *Uromyces appendiculatus*. Fitopatol. Bras. 21:304-7.
- FERRAZ, L.C.C.B. 1999. Gênero *Pratylenchus* - os nematóides das lesões radiculares. Rev. Anu. Patol. Plant. 7:157-95.
- FONSECA, M.E.N. & BOITEUX, L.S. 1997. Viróides: minúsculos RNAs parasitas de plantas vasculares dotados de características biológicas e estruturas únicas. Rev. Anu. Patol. Plant. 5:387-425.
- GASPARICH, G. E. 1999. Current taxonomy of spiroplasmas and phytoplasmas. IOM Newsletter 23. URL: <http://www.mycoplasmas.vm>.

- iaestate.edu/iom/iomhomepage.html.
- GRENIER, E.; CASTAGNONE-SERENO, P. & ABAD, P. 1997. Satellite DNA sequences as taxonomic markers in nematodes of agronomic interest. *Parasitol. Today* 13:398-401.
- GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.M.; REHNER, S.A.; DAVIS, R.E. & KINGSBURY, D.T. 1994. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (Phytoplasmas): a basis for their classification. *J. Bacteriol.* 176:5244-54.
- HARRIS, T.S.; SANDALL, L.J. & POWERS, T.O. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction of mitochondrial DNA. *J. Nematol.* 22:518-24.
- HARRISON, N.A. 1999. Phytoplasma taxonomy. Proceedings of the First Internet Conference on Phytopathogenic *Mollicutes*. URL: <http://www.uniud.it/phytoplasma/conf.html>.
- HARTUNG, J.S. 1997. Molecular probes and assays useful to identify plant pathogenic fungi, bacteria, and marked biocontrol agents. In: Bolland, G.J. & Kuykendall, L.D. (Eds.) *Plant-Microbe Interactions and Biological Control*. Marcel Dekker, p. 393-413.
- HENSON, J.M.; GOINS, T.; GREY, W.; MATHRE, D.E. & ELLIOTT, M.L. 1993. Use of polymerase chain reaction to detect *Gaeumannomyces graminis* DNA in plants grown in artificially and naturally infested soil. *Phytopathology* 83:283-7.
- HILL, G.T. & SINCLAIR, W.A. 2000. Taxa of leafhoppers carrying phytoplasmas at sites of ash yellows occurrence in New York State. *Plant Dis.* 84:134-8.
- HOGENHOUT, S.A. 1999. The molecular basis of the interactions between luteoviruses and their aphid vectors. Wageningen, AUW. Tese de Doutorado.
- HU, J.S.; WANG, M.; SETHI, D.; XIE, W. & LEONHARDT, K.W. 1996. Use of polymerase chain reaction (PCR) to study transmission of banana bunchy top virus by the banana aphid (*Pentalonia nigronervosa*). *Ann. Appl. Biol.* 128:55-64.
- INOUE-NAGATA, A.; FONSECA, M.E.N.; LOBO, T.O.T.A.; DE ÁVILA, A.C. & MONTE, D.C. 2001. Analysis of the nucleotide sequence of the coat protein and 3'-untranslated regions of two Brazilian *Potato virus Y* isolates. *Fitopatol. Bras.* 26:45-52.
- JAUNET, T.X. & WANG, J.F. 1999. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. *Phytopathology* 89:320-7.
- KAPLAN, D.T.; THOMAS, W.K.; FRISSE, L.M.; SARAH, J.L.; STANTON, J.M.; SPEIJER, P.R.; MARIN, D.H. & OPPERMAN. 2000. Phylogenetic analysis of geographically diverse *Radopholus similis* via rDNA sequence reveals a monomorphic motif. *J. Nematol.* 32:134-42.
- KAPLAN, M.; CASWELL-CHEN, E.P. & WILLIAMSON, V.M. 1999.

- Assessment of host-induced selection on three geographic isolates of *Heterodera schachtii* using RAPD and AFLP markers. *Phytopathology* 89:68-73.
- KARASAWA, A.; OKADA, I.; AKASHI, K.; CHIDA, Y.; HASE, S.; NAKAZAWA-NASU, Y.; ITO, A. & EHARA, Y. 1999. One amino acid change in *Cucumber mosaic virus* RNA polymerase determines virulent/avirulent phenotypes on cowpea. *Phytopathology* 89:1186-92.
- KIRKPATRICK, B.C. & SMART, C.D. 1995. Phytoplasmas: can phylogeny provide the means to understand pathogenicity? *Adv. Bot. Res.* 21:187-212.
- KIRKPATRICK, B.C.; SMART, C.; GARDNER, S.; GAO, J.L.; AHRENS, U.; MÄURER, R.; SCHNEIDER, B.; LORENZ, K.H.; SEEMÜLLER, E.; HARRISON, N.; NAMBA, S. & DAIRE, X. 1994. Phylogenetic relationships of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences. *IOM Letters* 3:228-9.
- KITAJIMA, E.W.; MARTINS, M.C.; BARROS, T.S.L.; BEDENDO, I.P. & FRARE, P.M. 1999. Ocorrência do irizado do chuchuzeiro na região de Amparo, SP. *Fitopatol. Bras.* 24: 467 (abstr.).
- KRAUSE, R.; LEGALL, O.; PAVAN, M.A.; MACIEL-ZAMBOLIN, E.; CARVALHO, M.G. & ZERBINI, M.F. Phylogenetic analysis of the capsid protein gene of two Brazilian isolates of *Lettuce mosaic virus* (LMV) belonging to distinct pathotypes. *Virus Rev. Res.* 4:153-4 (abstr.).
- KREUZE, J.F.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L. & VALKONEN, J.P.T. 1999. Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the *necl* gene from *Streptomyces* spp. causing common scab, pitted scab, and netted scab in Finland. *Phytopathology* 89:462-9.
- LAMBAIS, M.R. 1995. Biologia molecular e engenharia genética na Fitopatologia. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H. & Amorim, L. (Eds.). *Manual de fitopatologia*. São Paulo, Ceres, p.507-39.
- LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; TENENTE, R.C.V.; RAZUK, R.S.C.R.; SILVA, J.F.V. & COSTA MANSO, E.S.B. 1998. Utilização de RAPD-PCR e sequenciamento de ITS para a diferenciação de raças de *Heterodera glycines* e de *Ditylenchus dipsaci*. *Fitopatol. Bras.* 23:302.
- LEE, I.M.; DAVIS, R.E.; CHEN, T.A.; CHIYKOWSKI, L.N.; FLETCHER, J.; HIRUKI, C. & SCHAFF, D.A. 1992. A genotype-based system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. *Phytopathology* 82:977-86.
- LEE, I.M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; DAVIS, R.E. & BARTOSZYK, I.M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 48:1153-69.
- LEE, I.M.; HAMMOND, R.W.; DAVIS, R.E. & GUNDERSEN, D.E. 1993a. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for

- classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:834-42.
- LEE, S.B.; WHITE, T.J. & TAYLOR, J.W. 1993b. Detection of *Phytophthora* species by oligonucleotide hybridization to amplified ribosomal DNA spacers. *Phytopathology* 83:177-81.
- LEITE JR., R.P. & STALL, R.E. 1997. Análise filogenética de *Xanthomonas* fitopatogênica baseadas em seqüências de DNA relacionadas aos genes *hrp*. In: XX CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA. p.109. (abstr.).
- LEITE JR., R.P.; MEHTA, A.; CARVALHO, F.M.S. & UENO, B. 1998. Genetic diversity of Brazilian strains of *Xylella fastidiosa* associated with citrus and coffee. In: XIV CONFERENCE OF IOCV. p.156 (abstr.).
- LIM, P.O. & SEARS, B.B. 1989. 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *J. Bacteriol.* 171:5901-6.
- LIM, P.O. & SEARS, B.B. 1992. Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *J. Bacteriol.* 174:2606-11.
- LÓPEZ-MOYA, CUBERO, J.; LÓPEZ-ABELLA, D. & DIAZ-RUIZ, J.R. 1992. Detection of cauliflower mosaic virus (CaMV) in single aphids by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Virol. Meth.* 37:129-38.
- MACHADO, M.A.; BARROS, E.G.; VASCONCELOS, M.J.V.; GOMES, J.L.L. & MOREIRA, M.A. 1997. RAPD analysis for the characterization of *Cercospora sojina* isolates. *Fitopatol. Bras.* 22:366-9.
- MARTIN, F.N. & KISTLER, H.C. 1990. Species-specific banding patterns of restriction endonuclease-digested mitochondrial DNA from the genus *Pythium*. *Exp. Micol.* 14:32-46.
- MATTHEWS, R.E.F. 1991. *Plant Virology*. San Diego, Academic Press.
- MEHTA, A. & ROSATO, Y.B. 2000. Análise filogenética de *Xylella fastidiosa* baseada no gene 16S de rDNA e na região espaçadora 16S-23S. In: XXIII CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA. p.279 (Abstr.).
- MEHTA, A.; UENO, B. & LEITE JR., R. P. 1998. Plasmid DNA profile of Brazilian strains of *Xylella fastidiosa* associated with citrus variegated chlorosis. XIV CONFERENCE OF IOCV. p.157. (abstr.).
- MEHTA, P.; BRLANSKY, R.H.; GOWDA, S. & YOKOMI, R.K. 1997. Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of *citrus tristeza virus* in aphids. *Plant Dis.* 81:1066-9.
- MESQUITA, A.G.G.; PAULA JR., T.J.; MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G. 1998. Identification of races of *Colletotrichum lindemuthianum* with the aid of PCR-based molecular markers. *Plant Dis.* 82:1084-7.
- MILLER, R.N.G.; QUEZADO-SOARES, A.M. & LOPES, C.A. 1999. Molecular comparison of *Fusarium* populations causing eumartii wilt and dry rot of potato in Brazil. *Fitopatol. Bras.* 24:149-55.
- MILLER, S. A & JOAQUIM, T. R. 1993. Diagnostic techniques for plant pathogens. *Biotechnol. Plant Dis. Contr.* p. 321-39.
- MINAFRA, A. & HADIDI, A. 1994. Sensitive detection of *grapevine virus A, B*, or *leafroll*-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *J. Virol. Meth.* 47:175-88.
- MIRANDA, V.S.; TEIXEIRA, D.C.; ROBERTO, S.R.; YAMAMOTO, P.T.; PRIA JR., W.D.; AYRES, A.J. & HARTUNG, J.S. 2000. Detecção da bactéria *Xylella fastidiosa* dos citros em cigarrinhas de xilema pela técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR). *Fitopatol. Bras* 25:326 (abstr.).
- MONTANO, H.G.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; HOGENHOUT, S.; PIMENTEL, J.P. & BRIOSO, P.S.T. 2001. "*Candidatus Phytoplasma brasiliense*", a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. *Intern. J. Syst. Evolut. Microbiol.* 51:1109-18.
- MONTANO, H.G.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; PIMENTEL, J.P. & BRIOSO, P.S.T. 2000. Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. *Plant Dis.* 84:429-36.
- MONTANO, H.G.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; PIMENTEL, J.P. & BRIOSO, P.S.T. 1999. Superbrotamento em *Catharanthus roseus* no Rio de Janeiro, enfermidade provocada por fitoplasma do grupo 16S rRNA I. In: XXII CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA. p.98 (abstr.).
- MOUKHAMEDOV, R.; HU, X.; NAZAR, R.N. & ROBB, J. 1994. Use of polymerase chain reaction-amplified ribosomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology* 84:256-9.
- NAVOT, N.; ZEIDAN, M.; PICHERSKY, E.; ZAMIR, D. & CZOSNEK, H. 1992. Use of the polymerase chain reaction to amplify *tomato yellow leaf curl virus* DNA from infected plants and viruliferous whiteflies. *Phytopathology* 92:1199-202.
- NAZAR, R.N.; HU, X.; SCHMIDT, J.; CULHAM, D. & ROBB, J. 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *verticillium* wilt pathogens. *Physiol. Mol. Pl. Pathol.* 39:1-11.
- NORMAN, D.J.; CHASE, A.R.; STALL, R.E. & JONES, J.B. 1999. Heterogeneity of *Xanthomonas campestris* pv. *hederae* strains from araliaceous hosts. *Phytopathology* 89:646-52.
- OLSEN, G.J.; LANE, D.J.; GIOVANNONI, S.J. & PACE, N.R. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.* 40:337-65.
- OWENS, R.A. & DIENER, T.O. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of *potato spindle tuber viroid* disease by nucleic acid spot hybridization. *Science* 213:670-2.

- PALM, M.E. 1996. Sistemática de fungos, biodiversidade e desenvolvimento sustentável. Rev. Anu. Patol. Plant. 4: 245-60.
- PAN, Y.B.; GRISHAM, M.P.; BURNER, D.M.; DAMANN, K.E., JR. & WEI, Q. 1998. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. Plant Dis. 82:285-90.
- PAN, Y.B.; GRISHAM, M.P.; BURNER, D.M.; LEGENDRE, B.L. & WEI, Q. 1999. Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. Plant Dis. 83:218-22.
- PAVAN, M.A.; SOUZA, N.L.; BIANCHINI, L. & BEDENDO, I.P. 2000. Constatação de fitoplasma em plantas de solidago (*Solidago microglossa*) comercial com sintomas de superbrotamento. Fitopatol. Bras. 25:350.
- PETERSEN, D.J.; ZIJLSTRA, C.; WISHART, J.; BLOK, V. & VRAIN, T.C. 1997. Specific probes efficiently distinguish root-knot nematode species using signature sequences in the ribosomal intergenic spacer. Fundam. Appl. Nematol. 20:619-26.
- PINOCHET, P.; CENIS, J.L.; FERNANDEZ, C.; DOUCET, M.E. & MARULL, J. 1994. Reproductive fitness and random amplified polymorphic DNA variation among isolates of *Pratylenchus vulnus*. J. Nematol. 26:271-7.
- PIOTTE, C.; CASTAGNONE-SERENO, P.; BONGIOVANNI, M.; DALMASSO, A. & ABAD, P. 1995. Analysis of a satellite DNA from *Meloidogyne hapla* and its use as a diagnostic probe. Phytopathology 85:458-62.
- PODLIPAEV, S.A. & BULAT, S.A. 1998. Characterisation of trypanosomatids from insects and plants: UP-PCR (universally primed PCR) and cross hybridization of PCR products. Proc. Zoological Inst. St. Petersburg 276:155-60.
- PODLIPAEV, S.A. 2000. Insect Trypanosomatids: the Need to Know More. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95:517-22.
- POOLER, M.R. & HARTUNG, J.S. 1995. Genetic relationships among strains of *Xylella fastidiosa* from RAPD-PCR data. Curr. Microbiol. 31:134-7.
- POOLER, M.R.; MYUNG, I.S.; BENTZ, J.; SHERALD, J. & HARTUNG, J.S. 1997. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. Lett. Appl. Microbiol. 25:123-6.
- POZZER, L.; BEZERRA, I.C.; KORMELINK, R.; PRINS, M.; PETERS, D.; RESENDE, R.O.; DE ÁVILA, A.C. 1999. Characterization of a distinct *Tospovirus* isolate of *Iris yellow spot virus* associated with a disease in onion fields in Brazil. Plant Dis. 83:345-50.
- RAMALHO-NETO, C.E.; HEALE, J.B. & BAINBRIDGE, B.W. 1998. PCR

- amplification and genetic mapping of the rDNA repeat unit in *Fusarium moniliforme*, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* and *Giberella fujikuroi* var. *subglutinans*. Fitopatol. Bras. 23:298 (abstr.).
- RASCOE, J.; MELCHER, U. & FLETCHER, J. 1998. Arbitrarily-primed PCR of cDNA for determination of differential gene presence and expression among lines of *Spiroplasma citri*. Phytopathology 88:S75.
- RAYMUNDO, A.K.; BRIONES, A.M., JR.; ARDALES, E.Y.; PEREZ, M.T.; FERNANDEZ, L.C.; LEACH, J.E.; MEW, T.W.; YNALVEZ, M.A.; McLAREN, C.G. & NELSON, R.J. 1999. Analysis of DNA polymorphism and virulence in Philippine strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. Plant Dis. 83:434-40.
- RESENDE, R.O. 1993. Generation and characterization of mutants of tomato spotted wilt virus. Wageningen, AUW. Tese de Doutorado.
- RESENDE, R.O.; DE HAAN, P.; VAN DE VOSSEN, E.; DE ÁVILA, A.C.; GOLDBACH, R.W. & PETERS, D. 1992. Defective interfering (DI) L RNA segments of *tomato spotted wilt virus* (TSWV) retain both virus genome termini and have extensive internal deletions. J. Gen. Virol. 73:2509-16.
- RICE, D.J.; GERMAN, T.L.; MAU, R.F.L. & FUJIMOTO, F.M. 1990. Dot blot detection of tomato spotted wilt virus RNA in plant and thrips tissues by cDNA clones. Plant Dis. 74:274-6.
- RODRIGUES, M.I.S.; BARBOSA, C.J.; SANTOS FILHO, H.P.; VILARINHOS, A.D. & MEISSNER FILHO, P.E. 1999. Caracterização biológica e molecular de viróides associados a exocorte de citros. Fitopatol. Bras. 24:528-33.
- ROSA JR., V.E.; KURAMAE-IZIOKA, E.E.; THEODORO, G.F. & SOUZA, N.L. 1999. Sequenciamento de regiões ITS de *formae specialis* de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Fitopatol. Bras. 24:322 (abstr.).
- ROSELL, R.C.; TORRES-JEREZ, I. & BROWN, J.K. 1999. Virus racing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph, and honeydew. Phytopathology 89:239-46.
- SANO, T.; KUDO, H.; SUGIMOTO, T. & SHIKATA, E. 1988. Synthetic oligonucleotide hybridization probes to diagnose *hop stunt viroid* strains and *citrus exocortis viroid*. J. Virol. Meth. 19:109-20.
- SCHAAD, N.W.; PEET, R.C. & PANOPOULOS, N.K. 1989. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by a DNA hybridization probe. Phytopathology 79:903-7.
- SHECK, H.J.; CANFIELD, M.L.; PSCHIEDT, J.W. & MOORE, L.W. 1997. Rapid evaluation of pathogenicity in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* with a lilac tissue culture bioassay and syringomycin DNA probes. Plant Dis. 81:905-10.

- SCHNEIDER, B.; AHRENS, U.; KIRKPATRICK, B.C. & SEEMÜLLER, E. 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Microbiol.* 139:519-27.
- SCHNEIDER, B.; GIBB, K.S. & SEEMULLER, E. 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor *Tu* gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143:3381-9.
- SCHNEIDER, B.; SEEMULLER, E.; SMART, C.D. & KIRKPATRICK, B.C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin, S. & Tully, J.G. (Eds.). *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. p.369-80.
- SCHNELL, R.J.; KUHN, D.N.; RONNING, C.M. & HARKINS, D. 1997. Application of RT-PCR for indexing avocado sunblotch viroid. *Plant Dis.* 81:1023-6.
- SFORZA, R.; CLAIR, D.; DAIRE, X.; LARRUE, J. & BOUDON-PADIEU, E. 1998. The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera:Cixiidae) in the occurrence of bois noir of grapevines in France. *J. Phytopathol.* 146:549-56.
- SINGH, R.P. & DHAR, A.K. 1998. Detection and management of plant viroids. In: Hadidi, A.; Khetarpal, R.K. & Koganezawa, H. (Eds.). *Plant virus disease control*. St. Paul, APS Press, p.428-47.
- SUBANDIYAH, S.; IWANAMI, T.; TSUYUMU, S. & IEKI, H. 2000. Comparison of 16S rDNA and 16S/23S intergenic region sequences among citrus greening organisms in Asia. *Plant Dis.* 84:15-18.
- TAKAHASHI, Y.; TIONGCO, E.R.; CABAUTAN, P.Q.; KOGANEZAWA, H.; HIBINO, H. & OMURA, T. 1993. Detection of rice tungro bacilliform virus by polymerase chain reaction for assessing mild infection of plants and viruliferous vector leafhoppers. *Phytopathology* 83:655-9.
- TAKATSU, A. 2000. Classificação atual das bactérias fitopatogênicas. *Rev. Anu. Patol. Plant.* 8:93-120.
- TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A.; COLETTA FILHO., H.D.; SOUZA, A.A. & MÜLLER G.W. 2000. Sequence of coat protein gene of three citrus tristeza virus Brazilian isolates. *Summa Phytopathol.* 26:201-5.
- TOTH, K.F.; HARRISON, N. & SEARS, B.B. 1994. Phylogenetic relationships among members of the class *Mollicutes* deduced from *rps3* gene sequences. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 44:119-24.
- TSUDA, S.; FUJISAWA, I.; HANADA, K.; HIDAKA, S.; HIGO, K.; KAMEYA-IWAKI, M. & TOMARU, K. 1994. Detection of tomato spotted wilt virus S RNA in individual thrips by reverse transcription and polymerase chain reaction. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 60:99-103.
- VAN DER WILK, F.; KORSMAN, M. & ZOON, F. 1994. Detection of Tobacco rattle virus in nematodes by reverse transcription and polymerase chain reaction. *Eur. J. Plant Pathol.* 100:109-22.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M. MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R. & WICKNER, R.B. 2000. *Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. San Diego, Academic Press.
- VANDEKERCKHOVE, T.T.M.; WILLEMS, A.; GILLIS, M. & COOMANS, A. 2000. Occurrence of novel verrucomicrobial species, endosymbiotic and associated with parthenogenesis in *Xiphinema americanum*-group species (Nematoda, Longidoridae). *Intern. J. Syst. Evolut. Microb.* 50: 2197-2205.
- VEGA, F.E.; DAVIS, R.E.; BARBOSA, P.; DALLY, E.L.; PURCELL, A.H. & LEE, I.M. 1993. Detection of a plant pathogen in a nonvector insect species by the polymerase chain reaction. *Phytopathology* 83:621-4.
- VILARINHOS, A.D.; PAULA JR., T.J.; BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. 1995. Characterization of races of *Colletotrichum lindemuthianum* by the random amplified polymorphic DNA technique. *Fitopatol. Bras.* 20:194-8.
- VRAIN, T.C. 1993. Restriction fragment length polymorphism separates species of the *Xiphinema americanum* group. *J. Nematol.* 25:361-64.
- WANG, C.H. & YEH, S.D. 1992. Nucleotide comparison of the 3'-terminal regions of severe, mild, and non-papaya infecting strains of papaya ringspot virus. *Arch. Virol.* 127:345-54.
- WEBB, D.R.; BONFIGLIOLI, R.G.; OSLER, R. & SYMONS, R.H. 1999. Oligonucleotides as hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and insect vectors. *Phytopathology* 89:894-901.
- WENDT, K.R.; VRAIN, T.C. & WEBSTER, J.M. 1993. Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. *J. Nematol.* 25:555-65.
- WHITCOMB, R.F.; WILLIAMSON, D.L.; GASPARICH, G.E.; TULLY, J.G. & FRENCH, F.E. 1999. *Spiroplasma Taxonomy*. 1999. First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes. URL: <http://www.uniud.it/phytoplasma/conf.html>.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press, p.315-22.
- WILLIAMSON, D.L.; WHITCOMB, R.F.; TULLY, J.G.; GASPARICH, G.E.; ROSE, D.L.; CARLE, P.; BOVÉ, J.M.; HACKETT, K.J.; ADAMS, J.R.; HENEGAR, R.B.; KONAI, M.; CHASTEL, C. & FRENCH, F.E. 1998. Revised group classification of the genus *Spiroplasma*. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 48:1-12.
- WOO, S.L.; ZOINA, A.; DEL SORBO, G.; LORITO, M.; NANNI, B.;

- SCALA, F. & NOVIELLO, C. 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs and RAPD. *Phytopathology* 86:966-73.
- ZIJLSTRA, C. 1997. A fast PCR assay to identify *Meloidogyne hapla*, *M. chitwood*, and *M. fallax*, and to sensitively differentiate them from each other and from *M. incognita* in mixtures. *Fundam. Appl. Nematol.* 20:505-11.
- ZIJLSTRA, C.; LEVER, A.E.M.; UENK, B.J. & VAN SILFHOUT, C.H. 1995. Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwood*. *Phytopathology* 85:1231-7.