

USO ATUAL E FUTURO DA BIOLOGIA MOLECULAR NA FITOPATOLOGIA. PARTE II – DIVERSIDADE DE APLICAÇÃO

**Paulo Sergio Torres Brioso, Luciana Pozzer &
Helena Gugliemi Montano**

*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

A ampla versatilidade, aliada com a precisão, sensibilidade e rapidez, das técnicas da biologia molecular, fazem com que as mesmas tenham grande aplicabilidade na Fitopatologia, indo muito além de possibilitar o maior conhecimento taxonômico e filogenético de determinado fitopatógeno ou mesmo da sua detecção no hospedeiro, no vetor ou em organismos de transmissão de fitopatógenos, como explorados na parte I dessa revisão. A parte II aborda como tais técnicas podem ser inseridas em diferentes áreas da Fitopatologia, como na epidemiologia, na indexação de material propagativo (sementes ou partes vegetativas), na quarentena, no controle biológico, no desenvolvimento de cultivares resistentes às doenças, no monitoramento de transferência de genes, na investigação das interações do patógeno com a planta ou com os vetores, bem como na elucidação sobre funções de determinados genes, no estudo da resistência dos fitopatógenos aos pesticidas. Todo esse conhecimento possibilitará uma maior compreensão do processo doença, permitindo que medidas de controle eficazes sejam adotadas de forma rápida e eficiente na atualidade ou em futuro muito próximo.

SUMMARY

CURRENT AND FUTURE USE OF MOLECULAR BIOLOGY IN PHYTOPATHOLOGY. PART II – DIVERSITY OF APPLICATION

The broad versatility of molecular biology techniques, associated with accuracy, sensitivity and rapidity, enable the applicability of these techniques in plant pathology. Part I of the present review has covered the utilization of molecular biology techniques for better understanding plant

pathogen taxonomy and phylogeny, as well as for detection of plant pathogens in hosts, vectors or in transmission agents. Part II focuses on the employment of these techniques in different fields of plant pathology, such as indexing of propagating material (true seeds or vegetative tissues or organs), quarantine, biological control, development of disease-resistant cultivars, monitoring of gene transfer, epidemiology, the study of plant pathogen resistance to pesticides, investigation of pathogen interaction with plant or vectors, and elucidation of certain gene functions. This knowledge will enable a major comprehension of disease as a process, allowing the adoption of rapid and efficient control measures, at present time or in the near future.

INTRODUÇÃO

As técnicas de biologia molecular têm dado uma contribuição para a Fitopatologia que extrapolam a possibilidade de obter maior conhecimento taxonômico e filogenético de um determinado fitopatógeno ou mesmo da sua detecção no hospedeiro ou no vetor. Atualmente, além da elucidação do agente causal da doença, os métodos moleculares revestem-se de importância em virtude de viabilizar um grande número de linhas de pesquisa dentro da Fitopatologia. Por exemplo, permitem diferenciar estirpes patogênicas das não patogênicas, assim como identificar genes envolvidos na patogenicidade, separar organismos quarentenários daqueles não quarentenários, detectar de modo rápido e preciso os fitopatógenos, mesmo quando estiverem presentes em baixos níveis. Além do que, o estudo das interações de fitopatógenos com seus hospedeiros (plantas e vetores) bem como o estudo das funções dos genes, constituem-se num campo de pesquisa muito atraente e de grandes perspectivas comerciais.

Na presente revisão (parte II) serão abordadas as formas como as técnicas de biologia molecular podem ser inseridas em diferentes áreas da Fitopatologia, como na epidemiologia, na indexação de material propagativo (sementes ou partes vegetativas), na quarentena, no controle biológico, no desenvolvimento de cultivares resistentes aos patógenos, no monitoramento de transferência de genes, na investigação das interações do patógeno com a planta, com os vetores ou com organismos de transmissão, na elucidação das funções de determinados genes, no estudo da resistência dos fitopatógenos aos pesticidas. De modo algum, esta revisão pretende esgotar qualquer dos tópicos abordados, visto a quantidade de informação disponível referentes aos mesmos; a mesma procura apenas ressaltar a enorme diversidade de aplicação das técnicas moleculares na Fitopatologia.

DETECÇÃO DE PATÓGENOS EM MATERIAL PROPAGATIVO

Iniciar um cultivo com material propagativo livre de patógenos é recomendação básica na agricultura. Quando não se procede desta forma, tais materiais constituem-se em excelente meio de manutenção e de propagação de fitopatógenos, possibilitando a sua introdução em áreas indenes, mesmo a longas distâncias. Além disso, por possibilitar a infecção da cultura já na sua fase inicial, podem acarretar danos consideráveis. Desse modo, fontes primárias de inóculo, como sementes e propágulos vegetativos infectados, devem ser pronta e corretamente detectadas. Outra necessidade é dispor de material de propagação sadio para intercâmbio de germoplasma. Contudo, em muitos casos, a detecção de patógenos nesses materiais é difícil devido à falta de testes adequados, a concentração dos mesmos estar abaixo do nível de detecção de tais testes ou ainda por ser demorada, quando envolve testes biológicos. Serão citados alguns exemplos de como as técnicas moleculares são sensíveis em detectar fitopatógenos, de forma rápida e segura, em partes vegetativas e sementes, para fins de propagação ou fins quarentenários.

SEMENTES

O maior problema no cultivo do manjerição é *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici*. Considerável potencial para a contaminação do solo e reinfestação através de sementes infectadas fazem com que medidas de controle, como a desinfestação do solo, sejam apenas parcialmente efetivas, necessitando de técnicas rápidas e sensíveis para a detecção e diferenciação das formas saprofíticas e antagonistas. Lotes de sementes têm sido descartados pela impossibilidade de diferenciar biotipos patogênicos dos não patogênicos através de observações morfológicas ou pelo crescimento em meio de cultura. Por outro lado, inoculação em planta hospedeira pode levar de três a quatro semanas para fornecer o resultado. Tais problemas foram contornados pelo uso de RAPD-PCR, permitindo diferenciar de modo rápido e preciso *F. oxysporum* f. sp. *basilici* de outras *formae speciales* e de estirpes não patogênicas de *F. oxysporum* (Chiocchetti et al., 1999). Por essa mesma técnica foi detectada *Alternaria radicina* em lotes de sementes de cenoura mesmo com taxas de infestação natural tão baixas quanto 0,3 %. Em lotes preparados com quantidades conhecidas de sementes infestadas, foi detectado o patógeno com taxas de infestação de 0,1% (Pryor & Gilbertson, 2001). Um ensaio baseado no PCR detectou especificamente *Rhynchosporium secalis*, em sementes de cevada, em quantidades do patógeno tão pequenas como 1 a 10 pg. Este método requer apenas um dia para ser concluído, contra os 10 dias

necessários para o método cultural (Lee et al., 2001a).

Pela técnica de PCR, seguido da RFLP, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (sin. *X. campestris* pv. *vesicatoria*) associada a sementes de tomate e de pimentão pôde ser detectada, em concentrações de 10^2 a 10^3 ufc/ml, sendo que este teste foi considerado, no mínimo, 1000 vezes mais sensível que ELISA. O procedimento baseado na amplificação e análise de fragmentos relacionados ao gene *hrp* foi específico à detecção de isolados patogênicos (Leite Jr. et al., 1995). *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (sin. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) é submetida a rígidas leis quarentenárias em diversos países. Testes tradicionais têm falhado em detectá-la em lotes comerciais de sementes de feijão; no entanto, quando esses mesmos lotes foram testados por PCR, a bactéria foi inequivocadamente detectada (Prosen et al., 1993).

Elementos presentes em cópia única em DNA cromossomal, codificando fatores essenciais à patogenicidade e biocontrole, são alvos ideais ao desenvolvimento de sondas, pois o organismo alvo é definido de maneira única (Hartung, 1997). Tal abordagem foi usada, por exemplo, para o gene *tox* (phaseolotoxina), específico a *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*. A eficiência desse teste em extratos de sementes de feijão foi incrementada pelo bio-PCR, sendo esta uma metodologia sensível ao diagnóstico de rotina do patógeno em sementes e em trabalhos de quarentena. Entre as vantagens do bio-PCR sobre o PCR tradicional está a eliminação de resultados positivos devido à presença de células mortas que podem estar presentes nas sementes (Schaad et al., 1995).

O principal modo de transmissão de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* é por meio de sementes e de mudas infectadas. Em plasmídeos de uma estirpe dessa bactéria foram identificados o gene *pat-1* (envolvido com patogenicidade) e o gene *celA* (que codifica uma endocelulase). Por hibridização do tipo “Southern” com a sonda *celA*, seguida por RFLP, foram diferenciadas cinco subspécies de *C. michiganensis*, enquanto a sonda *pat-1* distinguiu estirpes virulentas das avirulentas de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Teste de PCR com oligonucleotídeos derivados da região do gene *pat-1* viabilizou a detecção de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* em tecidos de plantas e em sementes de tomateiro (Dreier et al., 1995). Audy et al. (1996) desenvolveram um procedimento rápido e sensível através de PCR para a detecção simultânea de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (sin. *X. campestris* pv. *phaseoli*) e *P. syringae* pv. *phaseolicola*, sendo este um método promissor para diagnose em sementes, em escala comercial, visto que poucas sementes infectadas por esses patógenos podem iniciar uma epidemia.

As sementes constituem a principal fonte de infecção do *Cucumber mosaic virus* (CMV) em tremoço. Embora ELISA seja o método usado mais

corriqueiramente para detectá-lo, testes mais sensíveis, capazes de detectar níveis tão baixos como próximos a 0%, são desejados. Dois métodos de extração viral foram testados, os quais foram seguidos de RT-PCR: um procedimento rápido, que foi efetivo quando o total de sementes infectadas foi igual ou superior a 0,5% e um procedimento mais laborioso, que foi capaz de detectar infecção entre 0% a 1%. Desta forma, o CMV pôde ser detectado por RT-PCR, em testes de rotina, nos cotilédones e no embrião e, freqüentemente, dentro ou sobre a testa (Wylie et al., 1993).

A detecção do RNA de viróides em sementes individuais também foi demonstrada ser efetiva; para isso foram utilizadas sementes verdadeiras de batata e de *Coleus*, estas pesando em torno de 300 µg cada, tendo sido necessárias apenas duas horas para processar 50 amostras (Singh et al., 1994).

Sondas marcadas com digoxigenina foram usadas para a diagnose de rotina de CMV, PVY, *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e *Tomato mosaic virus* (ToMV) em plântulas de tomate, visando a certificação fitossanitária, permitindo a análise de 400 a 500 amostras por dia, as quais representavam aproximadamente 1,15 milhões de plântulas de tomate (Saldarelli et al., 1996).

ELEMENTOS DE PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

O emprego de PCR tem se consagrado na diagnose de bactérias em material de propagação assexuada. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* é disseminada principalmente por manivas infectadas assintomáticas, sendo alvo de medidas fitossanitárias quarentenárias internacionais. Como consequência, o intercâmbio de germoplasma de mandioca é limitado e ocorre apenas através de sementes ou de material propagado *in vitro* (Lozano, 1986). Assim, técnicas sensíveis de diagnose são necessárias para evitar a introdução do patógeno em regiões livres da doença. A partir da clonagem e sequenciamento de um gene de patogenicidade de *X. axonopodis* pv. *manihotis* foi desenvolvido PCR, permitindo detectar o patógeno tanto em material de propagação vegetativa como em sementes de mandioca (Verdier et al., 1998).

A partir de uma estirpe de *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* foram isolados três fragmentos de DNA de cópias únicas, utilizando hibridização de subtração e o DNA de *Rhodococcus fascians*, *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* e de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, desenvolveu-se um método de PCR específico e sensível para a detecção de *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* em tubérculos de batata (Mills et al., 1997). Bio-PCR demonstrou aplicabilidade na detecção de *C.*

michiganensis subsp. *sepedonicus*, em tubérculos de batata, através de oligonucleotídeos específicos e sonda fluorescente para detecção via TaqMan-PCR (Real-time-PCR) (Schaad et al., 1999). O uso de PCR marcado com digoxigenina aliou a sensibilidade próxima ao do *nested*-PCR com a simplicidade de ELISA e permitiu detectar *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* em tubérculos de batata sem sintomas (Lee et al., 2001b). Hartung et al. (1996) relatam que IC-PCR ("Immunecapture - Polymerase Chain Reaction") foi 100 vezes mais sensível que *nested* PCR, sendo que a sua sensibilidade, velocidade e especificidade podem torná-lo um ensaio largamente utilizado em áreas onde *X. axonopodis* pv. *citri* é endêmica e programas de limpeza clonal tenham iniciado, bem como em programas de quarentena.

Não há evidências de transmissão de fitoplasmas por sementes, mas os mesmos podem ser disseminados por propagação vegetativa e enxertia. Montano et al. (2001) demonstraram, pela primeira vez, a presença de fitoplasma em seções de chuchu-semente oriundas de plantas com superbrotamento, através de PCR e *nested* PCR. Foi avaliada a viabilidade de utilizar *nested* PCR rotineiramente em programa de quarentena para detectar fitoplasmas em estacas dormentes de árvores frutíferas. Fitoplasmas associados a cinco doenças foram detectados em todas as amostras conhecidas como infectadas. Tal método substituiu a indexação por enxertia, que levava aproximadamente três anos para dar resultado (Waterworth & Mock, 1999).

Meloidogyne chitwood e *M. fallax* são considerados organismos quarentenários em vários países; porém *M. hapla*, que não é considerado praga quarentenária, está frequentemente associada as mesmas sob clima temperado. Morfologicamente, as três espécies são muito parecidas, de modo que técnicas simples e seguras são necessárias para identificá-las (Castagnone-Sereno et al., 1999). A separação dessas espécies foi possível com técnicas baseadas em PCR (Zijlstra, 1997) e com sondas de DNA satélite (Castagnone-Sereno et al., 1999).

A ausência ou a incidência muito baixa de viroses é um pré-requisito na produção de batata-semente, sendo a indexação realizada principalmente por ELISA. Por esse teste é difícil detectar viroses diretamente nos tubérculos, necessitando, em muitos casos, que os mesmos sejam induzidos a brotar. Isso torna o teste mais demorado, requerendo no mínimo cinco a seis semanas, além de exigir espaço físico para a manutenção dos mesmos, o que aumenta os custos do diagnóstico. Técnicas moleculares têm permitido sucesso na detecção de viroses diretamente de tubérculos não brotados. Sondas marcadas com digoxigenina mostraram-se adequadas à detecção do *Potato leaf roll virus* (PLRV) em tubérculos dormentes, tanto em amostras coletadas na região das gemas como entre os mesmos, não havendo reação cruzada com outros vírus que infectam batata (Loebenstein et al.,

1997). Diversos testes baseados no RT-PCR têm detectado *Potato virus Y* (PVY) e PLRV em minitubérculos e tubérculos dormentes (Schoen et al., 1996; Singh & Singh, 1996).

A batata-doce é cultivada a partir de ramas, as quais quando infectadas com *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), frequentemente não exibem sintomas. Abad & Moyer (1992) detectaram SPFMV em ramas de batata-doce usando sondas marcadas radioativamente, enquanto Brioso et al. (1996) detectaram fragmento específico do SPFMV por RT-PCR.

Algumas estirpes de CMV que infectam bananeira não são transmitidas mecanicamente e nem detectadas por sorologia, tornando-se um problema, na diagnose, visto que o germoplasma da bananeira é, em geral, indexado por ELISA. Utilizando RT-PCR, Figueiredo et al. (2001) detectaram uma estirpe do CMV, a qual não é detectada por ELISA.

A indexação de vírus por testes biológicos, em diversas fruteiras lenhosas, pode levar de meses a anos. Os testes sorológicos, uma alternativa para a indexação biológica, são limitados ao curto período da estação de crescimento e, aparentemente, são inadequados para tecidos lenhosos dormentes. RT-PCR foi eficiente na detecção de viroses nessas plantas, podendo ser interessante o seu uso em programas de quarentena ou de erradicação de viroses (Marinho et al., 1998). O uso de gemas como fonte de RNA viral permite a detecção de rotina, por RT-PCR, de diversas viroses em macieira, pereira, pessegueiro e videira durante todo o ano, não se restringindo aos meses em que folhas e flores estão disponíveis (MacKenzie et al., 1997).

Na França, *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) foi detectado por RT-PCR e/ou imunoensaio, em serviço de quarentena, em variedades de cana-de-açúcar importadas de diversos países, inclusive do Brasil. Mesmo naqueles toletes previamente tratados com água quente, técnica recomendada para o movimento seguro de germoplasma de cana-de-açúcar, SCYLV estava presente (Chatenet et al., 2001).

Expressivo crescimento no intercâmbio de germoplasma de plantas ornamentais tem sido relatado. Muitas destas espécies são propagadas por partes vegetativas. Em tais órgãos, nem sempre é possível detectar, por sorologia, ISEM ou testes biológicos, os patógenos a eles associados. Isso tem sido registrado para *Iris severe mosaic virus* (ISMV) em bulbos de íris (Van der Vlugt et al., 1988) e *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) em bulbos de gladiolo, mesmo que os mesmos tenham sido facilmente detectados sorologicamente em amostras foliares. Foi observado que folhas com alta concentração de BYMV desenvolveram-se a partir de bulbos de gladiolo nos quais não havia sido detectado o vírus por teste sorológico. A detecção na parte reprodutiva é importante para fornecer estoques livres de vírus, sendo

que com a padronização do RT-PCR foi possível detectar BYMV diretamente dos bulbos (Vunsh et al., 1991).

Utilizando sondas marcadas com digoxigenina, Singh et al. (1994) detectaram estirpes fracas e severas do PSTVd em tubérculos dormentes de batata, com sensibilidade comparável à obtida nas amostras foliares. *Apple scar skin viroid* (ASSVd), *Dapple apple viroid* (DAVd) e *Pear rusty skin viroid* (PRSVd) têm sido usualmente detectados através de enxertia em cultivares sensíveis. Como, na maioria dos casos, a infecção produz somente manchas no fruto e não sintomas foliares, esses testes demoram de três a cinco anos, pela necessidade de produzir frutos para expressar a infecção. O uso de sondas permitiu a detecção dos mesmos em amostras foliares, com considerável redução no tempo necessário à diagnose (Podleckis et al., 1993).

CONTROLE BIOLÓGICO

O controle de fitopatógenos através de agentes biológicos constitui-se em excelente alternativa ao uso de pesticidas. As técnicas moleculares mostram-se como importantes ferramentas para auxiliar na distinção dos possíveis agentes de biocontrole daqueles fitopatogênicos.

A crescente utilização de isolados antagonistas de *F. oxysporum* na proteção de materiais de propagação vegetal requer a identificação precisa do agente de controle. O procedimento mais adotado é o crescimento do fungo em meio seletivo, o que não permita discriminar *F. oxysporum* patogênico de não patogênico, além de ser economicamente impraticável testar cada isolado. Em sementes de tomate e de pimentão essa discriminação foi possível utilizando RAPD-PCR (Chiocchetti et al., 1999).

Nas condições brasileiras, o parasitismo de ovos de *Heterodera glycines* por fungos de solo é de extrema importância para a sua redução populacional. Várias espécies de fungos têm sido encontradas associadas aos ovos e cistos de *H. glycines*, sendo as espécies do gênero *Fusarium* as mais comuns. Por outro lado, plantas de soja têm sido infectadas por *F. solani*, agente da podridão vermelha da raiz (PVR). As poucas características taxonômicas (morfológicas e fisiológicas) tornam difícil a diferenciação entre isolados de uma mesma espécie de *Fusarium*. O uso de marcadores moleculares RAPD provou ser uma ferramenta promissora (Silva et al., 2000b). Nesse trabalho os autores separaram em três grupos *F. solani* que parasita ovos de nematóide e não patogênico à soja; *F. solani* causador da PVR e, no terceiro grupo, isolados de *F. oxysporum*. Foram identificadas bandas específicas para cada grupo, o que poderá facilitar o estudo da dinâmica populacional de isolados de *F. solani*, benéficos ou prejudiciais à

cultura da soja.

A bactéria *Pasteuria penetrans* tem demonstrado grande potencial como agente de controle biológico de nematóides formadores de galha. Anderson et al. (1999) realizaram a primeira análise filogenética desses parasitas de nematóides fitopatogênicos, explorando a região 16S rRNA. Isso forneceu uma base genômica para estabelecer o relacionamento e comparação de espécies de *Pasteuria* parasitas de diferentes nematóides fitopatogênicos. Além disso, a comparação das seqüências 16S rDNA de *P. thornei*, parasita de *Pratylenchus* spp., e de *P. nishizawae*, parasita de *Heterodera* spp. e de *Globodera* spp., pode ajudar a definir evolutivamente os hospedeiros preferenciais das mesmas.

Diferentes espécies de *Trichoderma* estão entre os mais promissores agentes de biocontrole e têm atividade contra uma ampla faixa de fungos fitopatogênicos. O micoparasitismo é considerado um importante mecanismo de controle biológico dessas espécies e, provavelmente, depende da produção de enzimas líticas, como quitinases, β -1,3-glucanases e proteases. Transformantes de *T. longibrachiatum* com cópia extra do gene *egl1*, que codifica para EGL1 β -1,4-endoglucanase, demonstraram em relação ao tipo selvagem, nível significativamente superior de expressão desse gene. Quando sementes de pepino foram tratadas com esses transformantes e semeadas em solo infestado com *Pythium ultimum*, observou-se que os mesmos foram mais supressivos que o tipo selvagem, reduzindo a incidência de tombamento (Migheli et al., 1998). Do mesmo modo, transformantes de *T. harzianum* super-expressando uma quitinase foram mais efetivos em inibir o crescimento de *Rhizoctonia solani* que o tipo selvagem (Limón et al., 1999). O aumento da atividade de biocontrole por *T. harzianum* obtida pela super-expressão do gene *prb1*, que codifica uma proteinase (Flores et al., 1997) reforça a idéia da necessidade da mistura de várias enzimas para eficiente lise da parede celular, nas interações patógeno-micoparásita, o que poderia ser obtido pela transformação de uma estirpe de biocontrole com múltiplos genes codificantes de enzimas líticas ou pela combinação de antagonistas com atividades enzimáticas específicas (Migheli et al., 1998).

Espécies fluorescentes de *Pseudomonas* produtoras de 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG) têm ação contra diversos fungos causadores de tombamento, podridão de raiz, murcha e mal do pé (Gardener et al., 2001; Mavrodi et al., 2001). Foi desenvolvido um ensaio de PCR para caracterizar a abundância e a diversidade dessas populações, tendo como alvo o *phlD*, gene essencial à biossíntese do 2,4-DAPG. Análise por RFLP da seqüência amplificada permitiu a determinação direta dos genótipos mais eficientes na produção de 2,4-DAPG, acreditando-se que a rápida caracterização dessas populações aumentará o entendimento dos seus papéis na supressão de

doenças de raízes (Gardener et al., 2001). A diversidade dentro do gene *phlD* de isolados produtores de 2,4-DAPG foi analisada por RFLP. Grupos definidos por RFLP correlacionaram-se intimamente com grupos definidos por BOX-PCR, indicando a adequabilidade do *phlD* como marcador de diversidade genética e estrutura de *Pseudomonas* produtoras de 2,4-DAPG (Mavrodi et al., 2001).

O gene *pupA*, presente em cópia única no DNA cromossomal de bactérias, codifica uma proteína da família pseudobactina de sideróforos férricos. Esse gene foi clonado a partir de *Pseudomonas putida* e usado como base para sondas de DNA e testes de PCR. Essa abordagem apresenta utilidade potencial à identificação de estirpes com potencial para o biocontrole, devido a presença de diferentes pseudobactinas nesse gênero de bactérias (Hartung, 1997).

A estirpe *P. chlororaphis* PCL1391 controla a podridão da raiz e do pé de tomateiro causadas por *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, sendo a atividade de biocontrole mediada pela produção de PCN. As estirpes *P. fluorescens* 2-79 e *P. aureofaciens* 30-84, que produzem PCA, também utilizadas no biocontrole, mas não para controlar essas doenças. O gene *phzH* foi mostrado ser requerido para a presença de PCN, pois um *phzH* mutante da estirpe PCL1391 acumulou PCA, sendo que a conversão de PCA a PCN ocorre por reação catalisada pelo *phzH*. Mutação do *phzH* causou perda da atividade de biocontrole, mostrando que o PCN é crucial ao controle de podridão da raiz e do pé de tomateiro. A transferência do *phzH* para as estirpes 2-79 de *P. fluorescens* e 30-84 de *P. aureofaciens* permitiu que essas produzissem PCN ao invés de PCA e, então, suprimissem *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. Desse modo, a introdução de um único gene pode eficientemente estender a faixa de habilidade de biocontrole de estirpes bacterianas (Woeng et al., 2001).

A proteção cruzada, em que a infecção prévia com um vírus (protetor) evita ou interfere com a infecção por outra estirpe ou espécie intimamente relacionada (desafiante), pode ser aproveitada para uso no controle biológico. O primeiro trabalho utilizando RT-PCR para identificar ambos os vírus, protetor e desafiante, foi realizado por Mahmood & Rush (1999), com plantas de beterraba infectadas com *Beet soil borne mosaic virus* (BSBMV) e *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV). Os resultados revelaram alto grau de proteção recíproca entre esses vírus, os quais são intimamente relacionados mas sorologicamente distintos. O RNA, tanto do protetor como do desafiante, em ambas combinações, foi detectado por RT-PCR nas plantas duplamente infectadas, indicando a presença do RNA do vírus desafiante nas plantas protegidas, embora a proteína capsidial do mesmo não tenha sido detectada por ELISA e “Western-blot”. Esses dados sugerem que o RNA do vírus desafiante foi incapaz de se traduzir na planta,

suportando a teoria de que mecanismo(s) para evitar a infecção envolva(m) a proteína capsidial do mesmo.

Buscando um maior entendimento do processo de proteção cruzada comparações entre as sequências nucleotídicas de isolados protetores e desafiantes têm sido realizadas, sendo que alguns exemplos já foram citados na parte I dessa revisão (Brioso et al., 2001).

MELHORAMENTO VEGETAL

Há muitos anos as plantas cultivadas vêm sendo manipuladas geneticamente pelo homem, por meio do melhoramento clássico, no qual as características fenotípicas de interesse, determinadas por genes, são transferidas à progênie através de cruzamentos (Brasileiro & Cançado, 2000). Já há várias décadas melhoristas de plantas vêm usando genes de resistência (genes *R*) para controlar doenças de plantas. O isolamento de genes *R* fornece a oportunidade para produzir variedades de plantas com aumento de resistência às doenças, podendo ser pelas técnicas de melhoramento clássico ou por aquelas que envolvem direta engenharia de plantas (Staskawicz et al., 1995). A combinação de métodos clássicos de melhoramento com tecnologias moleculares de análise genômica abre uma nova perspectiva para a ampliação do conhecimento genético e permite aceleração de programas de melhoramento de plantas (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

MELHORAMENTO GENÉTICO CLÁSSICO

O primeiro trabalho utilizando PCR para avaliar resistência de plantas a patógenos foi realizado por Takahashi et al. (1993), analisando diferentes cultivares de arroz inoculadas com o *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV). Muitas das plantas quando testadas por ELISA apresentaram-se como negativas, mas, quando submetidas ao PCR, confirmaram indubitavelmente a presença viral. Tais resultados demonstram a efetividade do PCR para avaliar tolerância ou resistência do hospedeiro a patógeno, podendo ser utilizado após uma avaliação inicial, a qual poderia ser mesmo por ELISA.

A falta de um sistema preciso para seleção de plantas resistentes pode ser um obstáculo aos programas de melhoramento, fazendo com que os mesmos evoluam lentamente. Este é o caso do melhoramento do tomateiro visando resistência ao TYLCV, onde a seleção depende da expressão fenotípica dos genes *R* e os sintomas atenuados exibidos pelos tipos selvagens ou cruzamentos deles derivados impedem o seguro manejo de populações

segregantes. No entanto, “squash blot” seguido de PCR foi considerado um método adequado para testar amostras inconclusivas na seleção de novas fontes de resistência ao TYLCV entre plantas assintomáticas de *Lycopersicon* spp., permitindo diferenciar graus de resistência em acessos selvagens com baixa concentração viral (Pico et al., 1999). Foi através dessas mesmas técnicas que Vidavsky & Czosnek (1998) separaram indivíduos resultantes de cruzamentos visando resistência ao TYLCV em resistentes (sem sintoma, sem DNA viral) e tolerantes (sem sintomas, com DNA viral), mostrando que o nível de acumulação viral nas plantas pode servir como um indicador de resistência (Pico et al., 1999).

Técnicas moleculares podem antecipar a resposta dos trabalhos de melhoramento, como no caso do patossistema cevada - *Ustilago hordei* que, embora o fungo infecte a cevada ainda quando plântula, são necessários de dois a três meses de crescimento da planta antes dos sintomas tornarem-se visíveis. Inoculações resultam em infecções inconsistentes, mesmo em linhagens altamente suscetíveis. Através de PCR, foi demonstrado que algumas variedades tidas como altamente resistentes continham o DNA fúngico nas primeiras folhas, mas não nas posteriores. Então, embora o fungo possa infectar ambas, cultivares suscetíveis e resistentes, nessas últimas o seu crescimento fica restrito e as plantas permanecem sem sintomas. Assim sendo, a amostragem da quinta ou sexta folha pode ser a maneira mais adequada para identificar plantas resistentes, ainda nos estádios iniciais de desenvolvimento (Willits & Sherwood, 1999).

Uma potente ferramenta para auxiliar o melhoramento são os marcadores moleculares, os quais fornecem um número ilimitado de polimorfismos com base no DNA e são independentes dos efeitos ambientais e do estágio fisiológico da planta, permitindo a identificação precoce e precisa de indivíduos com uma melhor combinação de alelos favoráveis (Lanza et al., 2000). Diferentes técnicas da biologia molecular têm sido empregadas com sucesso para revelar classes distintas de marcadores moleculares, os quais têm uma ampla aplicação no melhoramento de plantas, seja no melhoramento clássico ou no transgênico (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Um dos usos mais comuns dos marcadores moleculares em programas de melhoramento vegetal é para selecionar genótipos com genes *R* às doenças, os quais podem ser usados para desenvolver cultivares resistentes, bem como para monitorar a transferência de genes específicos de uma cultivar para outra. Por exemplo, o fungo *Phaeoisariopsis griseola*, agente causal da mancha angular do feijoeiro, é altamente variável. Desse modo, os programas de melhoramento dependem do estudo dessa variabilidade e da identificação de novos genes *R* que precisam ser transferidos às cultivares comerciais. Utilizando RAPD foi analisada a geração F2 do cruzamento entre cultivar resistente e cultivar suscetível a *P. griseola*. Foram observadas três bandas polimórficas em todas

as plantas resistentes e não nas suscetíveis. Quando foram desenhados oligonucleotídeos a partir de uma dessas bandas, o polimorfismo nas amplificações foi idêntico ao revelado pelo marcador RAPD (Sartorato et al., 2000).

Alzate-Marin et al. (1999) utilizaram marcador molecular RAPD como método complementar na avaliação visual de plantas de feijoeiro com sintomas da antracnose, mas que seriam de difícil classificação em suscetíveis ou resistentes, através de notas no sistema de classificação.

Plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) contendo o gene *Rk*, que confere resistência contra as raças 1 e 3 de *M. incognita*, mostram resposta de hipersensibilidade à infecção por nematóide e, usualmente, não desenvolvem galhas. Através de análise por RAPD foi mapeada a região genômica do fumo ao redor do gene *Rk*, obtendo-se seis marcadores, os quais podem ser efetivamente usados para selecionar linhagens de fumo resistentes aos nematóides formadores de galhas (Yi et al., 1998). O gene *Mi* do tomate confere resistência a *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*. Marcadores baseados no PCR foram desenvolvidos possibilitando a rápida diagnose de genótipos virulentos selecionados nessas espécies, sem necessitar da realização de vários experimentos de inoculação (Xu et al., 2001).

Seleção assistida por marcadores fornece uma conveniente e rápida avaliação para seleção durante os programas de melhoramento, permitindo a detecção molecular de genes *R*. Para acelerar o desenvolvimento de cultivares de trigo resistentes à giberela (*Fusarium graminearum*), marcadores moleculares ligados aos genes *R* têm sido identificados pelo uso de linhagens recombinantes derivadas de cruzamento entre cultivar resistente à disseminação deste fungo na espiga e cultivar suscetível. Onze marcadores AFLP apresentaram significativa associação com o gene de resistência a *F. graminearum*, alguns deles podem ser úteis em programas de melhoramento assistido por marcadores para resistência a este fungo em trigo (Bai et al., 1999).

A identificação de uma variedade de genes *R* baseada na conservação da sequência de aminoácidos pode permitir aos melhoristas monitorar a segregação desses genes utilizando sondas apropriadas ao invés de testar a progênie para a resistência ou a suscetibilidade (Staskawicz et al., 1995).

TRANSGÊNICOS

Os métodos de melhoramento genético clássico esbarram, por vezes, em uma série de problemas, como redução da variabilidade genética, ligação gênica, seleção de características poligênicas, mutações espontâneas e

incompatibilidade sexual, além do longo tempo necessário para transferência de características. Atualmente, o melhoramento de plantas pode recorrer às modernas técnicas de engenharia genética para auxiliar na resolução de algumas dessas limitações (Brasileiro & Cançado, 2000). As plantas transgênicas surgiram a partir da técnica de DNA recombinante. Podem ser definidas como plantas obtidas por manipulação genética, com incorporação ao seu genoma de genes de outras espécies, mesmo daquelas que não se cruzam sexualmente com ela, ou mesmo de genes provenientes de organismos geneticamente muito diferentes, como vírus e bactérias (Cançado, 2000). Uma vez incorporado no seu genoma e expresso de maneira estável, o inserto passa a fazer parte do patrimônio genético da planta, não alterando sua constituição genética global (Brasileiro & Cançado, 2000).

Um dos principais usos da biologia molecular na Fitopatologia, principalmente no que se refere a função de genes de um fitopatógeno ou ao controle do fitopatógeno, foi o de permitir a introdução de características genéticas em um determinado organismo através da manipulação direta dos genes. Em Fitopatologia, o desenvolvimento de plantas transgênicas vem sendo explorado na busca de resistência aos diferentes fitopatógenos. Devido ao seu genoma menos complexo, os fitovírus são os organismos mais explorados com relação à aplicação dessa tecnologia. Plantas transgênicas de diferentes espécies botânicas, com resistência a vírus, têm sido desenvolvidas carregando, de um modo geral, diferentes seqüências genômicas ou genes virais (capsídeo viral, replicase viral, proteína de movimento, entre outros). Tais plantas têm sido produzidas com resistência aos vírus dos gêneros: *Alfavirus*, *Begomovirus*, *Bromovirus*, *Carlavirus*, *Caulimovirus*, *Comovirus*, *Cucumovirus*, *Curtovirus*, *Ilarvirus*, *Polerovirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*, *Tombusvirus*, *Tospovirus* (Resende, 1994).

No Brasil, os trabalhos com plantas transgênicas visando resistência a vírus (*Begomovirus*, *Comovirus*, *Potyvirus*, *Tospovirus*) têm sido desenvolvidos em diversos Centros da EMBRAPA (CENARGEN, CNPAF, CNPH), Universidade de Brasília, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e Universidade Federal de Viçosa.

A transformação de plantas com genes de defesa tem sido alvo de muitos estudos nos últimos anos. Diferentes genes que fazem parte do mecanismo de defesa foram clonados e introduzidos em plantas. Estratégias como a super-expressão ou a supressão de um gene permitiram a obtenção com sucesso de plantas transgênicas resistentes a diferentes patógenos. Como exemplo, pode-se citar aquelas modificadas com genes que codificam para as proteínas CF9 (proteína de resistência a *Cladosporium fulvum*, em tomate), quitinases, glucanases, enzimas hidrolíticas e enzimas que participam do metabolismo secundário (Cordeiro & Sá, 1999). O gene *NIMI*

(“noninducible immunity”) é requerido para a ativação biológica e química de resistência sistêmica adquirida em *Arabidopsis*. A super-expressão de *NIMI* nessas plantas resultou em graus variados de resistência a diferentes patógenos. Além disso, foi observado um aumento na eficiência de três fungicidas nas plantas transformadas, sugerindo que a combinação de pesquisa transgênica e química pode levar a estratégias de controle efetivas e duráveis (Friedrich et al., 2001).

O primeiro exemplo de sucesso na geração de plantas transgênicas capazes de detoxificar toxinas patogênicas envolve plantas de fumo e a bactéria *P. syringae* pv. *tabaci*, a qual produz tabtoxina durante o processo de colonização das plantas de fumo. A tabtoxina é desativada por acetilação; então, o gene responsável pela codificação da enzima tabtoxina acetiltransferase foi transferido para as plantas de fumo com o objetivo de conferir às mesmas tolerância à tabtoxina. As plantas transformadas (que receberam o gene que codifica a enzima) não desenvolveram sintomas da doença, ou seja, as plantas tornaram-se resistentes à bactéria (Pascholati et al., 1998).

Um dos usos da biologia molecular em Fitopatologia foi a introdução, em espécies vegetais suscetíveis, de genes que codificam anticorpos específicos ao patógeno. Nessa linha, foi obtido algum sucesso com plantas transgênicas na expressão dos genes de defesa à doença causada por “mollicutes” (Fletcher, 1999). A partir de uma linha de células de hibridoma, produtora de uma imunoglobulina direcionada contra uma proteína (anticorpo monoclonal) de membrana do fitoplasma “stolburn”, Le Gall et al. (1998) construíram um anticorpo “single-chain variable-fragment” (scFv) funcional e específico para o “stolburn”. O gene *scFv* foi clonado, expresso em *E. coli* e usado para a transformação de plantas de fumo. O fumo transgênico mostrou-se protegido contra a infecção por fitoplasma, quando enxertado em plantas infectadas, indicando a presença da molécula scFv no tecido floemático. A utilização de “plantibody” ou “phytoantibody” constitui-se em alternativa promissora para o controle de fitoplasmoses, embora haja necessidade de repetição dos experimentos em larga escala (Garnier, 1997). De maneira análoga, construiu-se um gene *scFv* a partir de anticorpos com forte ação inibitória contra *Spiroplasma kunkeli*, agente do enfezamento pálido do milho. O gene construído foi utilizado na transformação de plantas de milho e expressou-se em ambas, células de calo transformadas e em plantas regeneradas; entretanto, os anticorpos não conferiram resistência à infecção pelo *S. kunkeli* nas linhas testadas. Não obstante os resultados desfavoráveis na obtenção de milho resistente, a hipótese de que o gene *scFv* pode ser empregado no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes não deve ser invalidada (Chen & Chen, 1998). Segundo Fletcher (1999),

dentre os desafios desses esquemas, encontra-se o de assegurar que anticorpos anti-mollicutes expressos pela planta tenham o floema como alvo. Além disso, seria apropriado procurar por fontes adicionais de resistência, em parentais selvagens de plantas cultivadas e, até mesmo, em organismos não estreitamente relacionados.

No endereço eletrônico <http://www.colostate.edu/programs/lifesciences/transgeniccrops>, pode ser consultada uma relação atualizada de plantas transgênicas com resistência a fitopatógenos, em escala comercial.

EPIDEMIOLOGIA

As características patogênicas e epidemiológicas dos fitopatógenos variam, necessitando não só da correta identificação, mas também da quantificação e distribuição para determinar a real importância dos mesmos e estabelecer as melhores estratégias de controle. Técnicas moleculares têm contribuído de diferentes maneiras no estudo da dinâmica das populações de fitopatógenos associados aos seus hospedeiros e vetores.

Freeman et al. (2001) trabalhando com o patossistema morango e *Colletotrichum acutatum*, mostrou que mesmo plantas não hospedeiras podem servir como fonte potencial de inóculo e permitir a sobrevivência do patógeno entre as estações. A especificidade e a gama de hospedeiros de *C. acutatum*, isolado de morango, foram testados em pimentão, berinjela, tomate, feijão e morango. Embora o fungo tenha sido recuperado de todas espécies testadas, sintomas foram observados em morango. Crescimento epifítico e endofítico do fungo nas diferentes espécies foi confirmado, por reisolamento a partir de tecidos foliares e por PCR. Ess fungo foi também isolado de plantas daninhas assintomáticas e identificado por PCR. Assim, embora cause doença somente em morango, *C. acutatum* pode persistir em muitas outras espécies de plantas.

O monitoramento de infecção latente e da colonização de plantas pode ter importância na avaliação da infecção inicial, antes dos sinais fúngicos aparecerem, contribuindo para estudos epidemiológicos e definição de estratégias de controle das doenças. Produto de PCR foi obtido, mesmo em plantas e em sementes de soja com infecção latente por *Phomopsis longicolla* (Zhang et al., 1997). “Real-time PCR” (TaqMan) é o único método atualmente disponível para quantificar a colonização inicial de *Phaeocryptopus gaeumannii*, em abeto, no primeiro ano do processo de colonização, sendo que a quantificação do fungo nas acículas já foi possível um mês após a inoculação inicial (Winton et al., 2002).

A aplicação de PCR não se restringe ao diagnóstico de *X.*

fastidiosa em citros, mas pode ser utilizada no monitoramento da distribuição do patógeno em plantas, mesmo naquelas assintomáticas (Coletta Filho et al., 1998). Através de DAS-ELISA e PCR foi demonstrada a existência de translocamento de *X. fastidiosa* para o sistema radicular de plantas cítricas e a transmissão dessa bactéria através de enxerto natural de raízes (He et al., 2000). A hibridização foi considerada como uma técnica adequada para avaliar a distribuição de TYLCV ao longo de plantas de tomate, permitindo detectar o vírus até mesmo nas raízes, após oito dias da inoculação (Pico et al., 1999).

Com a possibilidade de genes marcadores serem inseridos no genoma fúngico, diversos registros têm sido feitos da aplicação do gene GUS (β -glucuronidase), como marcador para detectar e quantificar a biomassa de fitopatógenos em tecidos vegetais infectados (Green & Jensen, 1995). Liljeroth et al. (1993) observaram correlação positiva entre a atividade GUS e a biomassa fúngica, bem como com o tamanho das lesões em raízes de cevada infectadas com uma estirpe transformada de *Bipolaris sorokiniana*. Estirpes transformadas com o gene GUS podem ser monitoradas após a sua liberação no ambiente, parecendo ser este um meio bastante promissor para estudos ecológicos, pois a enzima é muito estável e pode ser facilmente analisada por diferentes métodos, tendo atividade ausente ou muito baixa em plantas e fungos não transformados. Explorando essa linha, uma estirpe de *T. harzianum* transformada com o gene GUS foi usada como marcador para monitorar a presença, o desenvolvimento populacional e a atividade de outra estirpe de *T. harzianum* deliberadamente introduzida no ambiente (Green & Jensen, 1995).

A hipótese de que plantas hospedeiras exercem pressão de seleção nas populações do nematóide *H. schachtii* pôde ser confirmada com a utilização de marcadores AFLP e RAPD. Diferenças genotípicas foram maiores entre nematóides presentes em plantas mais resistentes, que possibilitam a menor reprodução do patógeno. Os resultados enfatizaram a rapidez da seleção induzida pelo hospedeiro nas populações desse fitopatógeno e o potencial dos marcadores moleculares para identificar e monitorar a variabilidade genética intraespecífica do mesmo (Kaplan et al., 1999). Através de marcadores RAPD específicos para *H. glycines*, em soja, foi possível monitorar populações geneticamente distintas deste fitopatógeno oriundas de diferentes regiões do Brasil (Silva et al., 2000a). A estrutura genômica de uma população natural de *X. oryzae* pv. *oryzae* foi analisada por rep-PCR e RFLP. A diversidade de 10 dos 25 blocos foram significativamente maior que a diversidade total da coleção no campo inteiro; porém, entre blocos individuais as diversidades não foram significativamente diferentes. Análise da diversidade genética em escala microgeográfica fornece

informações da variação de *X. oryzae* pv. *oryzae* numa escala mais fina, as quais são úteis no desenho de experimentos para estudar efeitos da resistência do hospedeiro na estrutura da população dessa bactéria (Cruz et al., 1996). A identificação da variabilidade genética e o entendimento das respostas das populações dos fitopatógenos às plantas hospedeiras, potencialmente auxiliarão na identificação de genes de resistência mais estáveis e possibilitam a elaboração de programas de manejo das doenças (Kaplan et al., 1999).

Técnicas moleculares, como RFLP e “DNA fingerprints”, foram usadas com sucesso para avaliar a variação temporal, durante seis anos, e para estimar o tamanho efetivo da população de *Mycosphaerella graminicola* na ocorrência de epidemias de septoriose na cultura do trigo (Zhan et al., 2001).

Os vetores têm papel preponderante na ocorrência ou não de uma epidemia. A presença de diferentes fitopatógenos nos seus respectivos vetores, nas mais diversas combinações, tem sido possível ser detectada de forma rápida e segura através de métodos moleculares (Briosso et al., 2001). Como a presença de um determinado fitopatógeno em outro organismo não significa necessariamente que este esteja atuando como vetor, técnicas moleculares permitem determinar o real “status” desses organismos como vetores (Webb et al., 1999).

RESISTÊNCIA A PESTICIDAS

O desenvolvimento de resistência de fitopatógenos aos pesticidas é um dos principais problemas no manejo de doenças de plantas. Embora a ocorrência de patógenos resistentes aos pesticidas, de um modo geral, seja bem documentada, a base genética e molecular da resistência ainda está obscura.

O principal mecanismo de resistência aos fungicidas corresponde a alterações no sítio de ação do produto; sendo que em alguns fungos este processo é controlado por genes maiores, resultando em resistência qualitativa, enquanto em outros genes menores controlam vários mecanismos que, no conjunto, promovem resistência quantitativa. Diversos genes maiores para resistência aos fungicidas benzimidazóis, carboxanilidas, fenilamidas e à kasugamicina foram isolados e caracterizados, tendo sido relatado que uma simples mutação em um desses genes leva a uma rápida ocorrência de resistência (Forcelini et al., 2001).

Para comparar a base da insensibilidade ao metalaxil por diferentes isolados de *Phytophthora infestans*, foram realizados cruzamentos entre isolados sensíveis e com níveis variados de insensibilidade, provenientes de diferentes regiões geográficas. Os modelos de herança da resistência foram

interpretados usando marcadores RAPD ligados à insensibilidade. Estudando a ligação entre esses marcadores e a insensibilidade em cada cruzamento pela análise por RAPD ou RFLP, acredita-se que o mesmo *locus* cromossomal confere insensibilidade a isolados da Alemanha e do México; porém, um gene numa posição cromossômica diferente em relação a esses isolados foi responsável pela insensibilidade no isolado britânico. Marcadores de DNA ligados aos *loci* da insensibilidade ao metalaxil podem ter outras aplicações, como serem usados para estudar o desenvolvimento e a disseminação da insensibilidade nas populações ou para avaliar a predita insensibilidade. Com o auxílio de marcadores de DNA podem ser determinados se isolados resistentes homozigotos resultaram de “crossing-over” mitóticos ou de mutações secundárias em heterozigotos (Fabritius et al., 1997).

Estudos conduzidos por Schnabel & Jones (2001) mostraram que a super-expressão do gene *CYP51A1* foi significativamente maior em nove de 11 isolados de *Venturia inaequalis* resistentes ao fungicida miclobutanil, sugerindo que este seja um importante mecanismo de resistência ao fungicida, embora outros mecanismos de resistência também pareçam existir. O gene *CYP51A1* foi completamente sequenciado de estirpes sensíveis e resistentes ao miclobutanil, mas nenhuma variação nucleotídica foi achada entre as sequências. A análise por PCR indicou que uma mutação num par de bases que está correlacionada com resistência a fungicidas em isolados de outros fungos filamentosos foi ausente nos isolados 19 S e 32 R de *V. inaequalis*. Os resultados de sequenciamento e análise de PCR sugerem que a resistência nessas estirpes não foi devido à mutação, mas que a alta expressão foi correlacionada com a presença de uma inserção de 553 pb localizada anteriormente ao gene *CYP51A1*. Super-expressão do gene *CYP51A1* foi também detectada em oito de nove isolados fúngicos resistentes oriundos de três viveiros comerciais, mas a inserção não foi detectada na maioria desses isolados.

INTERAÇÃO PATÓGENO – HOSPEDEIRA

O entendimento dos mecanismos de reconhecimento entre patógenos e hospedeiros é uma das principais questões da Fitopatologia. Uma série de respostas decorre do encontro dos fitopatógenos e de seus potenciais hospedeiros e envolve a liberação de sinais moleculares, reconhecimento e transdução desses sinais, bem como a ativação de genes de defesa (Leite et al., 1997). A interação entre uma planta e um patógeno pode ser dividida, basicamente, em compatível (ocorre doença) ou incompatível (não ocorre doença), sendo que a principal diferença entre ambas está relacionada à

presença ou ausência de um gene *R* na planta e de um gene de avirulência (*Avr*) no patógeno (Cordeiro & Sá, 1999).

O primeiro gene *R* clonado de plantas, que está de acordo com a relação gene a gene, foi o *Pto*, em 1992, isolado de tomate e que confere resistência contra as estirpes de *P. syringae* pv. *tomato* que carregam o gene de avirulência *avrPto* (Staskawicz, 1995). Desde então, outros genes *R* têm sido caracterizados. O gene *I-2* confere resistência ao tomate contra a raça 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, a qual expressa correspondente gene de avirulência *avrI-2*. Para elucidar a base molecular desta interação gene a gene, foi gerado um mutante do fungo, que mostrou a esperada perda de avirulência. Análise por "Southern blot" demonstrou a translocação de um cromossoma de 3,75 Mb no mutante, enquanto que análises RAPD e AFLP identificaram, no mínimo, nove polimorfismos entre o tipo-selvagem e o mutante. A maioria desses polimorfismos aparecem como fragmentos extras no mutante que contêm seqüências repetitivas de DNA (Mes et al., 1999). Trabalho conduzido por Redondo et al. (2001) indicou que a habilidade para quebrar a proteção oferecida pelos genes *R* e para induzir sintomas severos são fenômenos independentes.

LMV-0 e LMV-E são isolados de *Lettuce mosaic virus* (LMV), os quais diferem na patogenicidade em cultivares de alface. Enquanto LMV-0 induz mosaico suave em plantas suscetíveis, LMV-E causa atrofiamento severo, deformação foliar e mosaico necrótico. Em plantas carregando um dos dois genes *R* (*mo1*¹ ou *mo1*²), LMV-0 mantém-se parcialmente restrito às folhas inoculadas, enquanto o LMV-E supera a proteção fornecida pelos genes *R*, resultando em mosaico sistêmico. Análise do comportamento de recombinantes construídos entre os dois isolados revelaram que a proteína HC-Pro de LMV-E induziu o atrofiamento severo e mosaico necrótico em cultivares suscetíveis. Em contraste, a habilidade para superar a resistência conferida pelos genes *R* e induzir sintomas nas cultivares resistentes/tolerantes foi mapeada na metade 3' do genoma do LMV-E. Por outro lado, a ausência de alguns genes pode alterar a patogenicidade, como sugerido no trabalho de Oshima et al. (2001): a partir da linhagem original do fitoplasma *onion yellows* (OY-W) foram isoladas duas linhagens (OY-M e OY-NIM) causadoras de sintomas suaves, sendo que OY-NIM não é transmitida por inseto. Análise por PCR sugeriu que OY-NIM não pode atravessar o intestino ou sobreviver na hemolinfa da cigarrinha vetora. A nível sintomatológico, enquanto OY-W causa superbrotamento e atrofiamento na planta hospedeira, OY-M e OY-NIM só causam superbrotamento. Como o genoma de OY-M tem, aproximadamente, 130 kpb a menos que a linhagem original, alguns dos genes presentes em OY-W responsáveis pela patogenicidade podem não estar presentes em OY-M.

Os patógenos virulentos não possuem o gene *avr*, cujo produto

gênico é reconhecido por uma proteína de resistência da planta, permitindo a rápida ativação do processo de defesa. Um dos casos interessantes, é o de *Xylella fastidiosa* que quando comparada com outras bactérias fitopatogênicas, como *Ralstonia* spp. e *Xanthomonas* spp., apresenta um número baixo de enzimas envolvidas no processo de degradação da parede celular, provavelmente porque ela não necessita penetrar ativamente nos vasos do xilema, uma vez que é injetada diretamente pelo vetor. Essa inoculação direta é apontada como um dos principais fatores da ausência de genes *avr* no seu genoma (Machado et al., 2001).

Atualmente, cerca de 30 genes *avr* de diferentes fitopatógenos já foram caracterizados, sendo que os produtos desses genes não só estão relacionados ao mecanismo de ativação da resistência, como também à especificidade por uma cultivar. Já os patógenos avirulentos, além do produto do gene *avr*, sintetizam produtos a partir dos genes chamados *hrp*, que estão relacionados com a patogenicidade e a hipersensibilidade. As proteínas Hrp estudadas estão relacionadas, em geral, com quimiotaxia, transporte de moléculas da planta à bactéria, síntese e exportação de fatores de virulência, elicitação e sistema de secreção tipo III de bactérias fitopatogênicas (Cordeiro & Sá, 1999).

Na relação incompatível, é fundamental uma interação gene a gene entre a planta e o patógeno para ocorrer ativação rápida dos mecanismos de defesa e resistência da planta. Os mecanismos de resistência nesse tipo de interação envolvem, dois processos: a resposta de hipersensibilidade (HR) e resistência sistêmica adquirida, onde a atividade do mecanismo de defesa e resistência propicia à planta uma imunidade temporária a outros patógenos, não relacionados com aquele que desencadeou o processo (Cordeiro & Sá, 1999).

Vários genes relacionados com o sistema de defesa da planta foram isolados; dentre esses, estão os genes envolvidos na síntese de fitoalexinas, genes codificando hidrolases com atividades de quitinases e glucanases, proteínas estruturais (HRGPs, GRPs) e PR-proteínas. Os mecanismos de regulação de alguns desses genes foram elucidados através dos estudos de cinética de acumulação de proteínas (análise de Western blot) ou de mRNA (análise de Northern blot) nos tecidos vegetais, e da localização espacial dos seus respectivos sítios de acumulação (hibridização *in situ*) durante o processo de infecção e colonização do tecido vegetal. Seqüências genômicas desses genes foram isoladas e suas regiões promotoras identificadas (Lambais, 1995).

Os genes são transcritos em moléculas mRNA que são traduzidas em proteínas, as quais são transportadas para locais específicos dentro da célula de um determinado tecido ou organismo. A localização de uma

pesquisa das interações planta-patógeno. Em *A. alternata* o estudo do modo de ação de HSTs têm resultado no entendimento da real importância das mesmas, na indução de necrose e na supressão das defesas da planta, preparando-a para a infecção fúngica (Akamatsu et al., 1997). Hartung (1997) utilizou um fragmento de DNA cromossomal envolvido em parte da via metabólica da toxina coronatina como sonda de hibridização para *P. syringae* pv. *tomato*. Embora essa toxina não seja requerida para a patogenicidade, ela tem um papel importante no desenvolvimento de lesões e, assim, a sonda produzida apresentou total sensibilidade na detecção de centenas de estirpes desse fitopatógeno, apesar de sua produção não se restringir ao mesmo.

Os hormônios podem ter papel principal ou secundário na patogênese, sendo o desequilíbrio hormonal fator de virulência. Watanabe et al. (1998) investigaram a presença de um plasmídeo em *P. savastanoi* pv. *glycinea* (sin. *P. syringae* pv. *glycinea*), que contém o gene *efe*, codificando para síntese do etileno. Os resultados sugerem o envolvimento do plasmídeo com a patogenicidade e representam o primeiro registro de produção de etileno a partir de plasmídeos, em microrganismos. O isolamento do gene que codificam a enzima citocinina sintetase demonstrou que, pelo menos, três loci são necessários para *Rhodococcus fascians* causar fasciação em diversas hospedeiras: *ail* para a redução da virulência, *hyp* para o rápido crescimento do tumor e *fas* para a produção de citocinina; sendo que o gene *ipt* no último locus foi expresso especificamente durante a interação da bactéria com as

hospedeiras (Vidaver, 1995).

Proteínas principais da membrana (MSP) de espiroplasma e fitoplasmas podem ter papel importante no reconhecimento, invasão e patogenicidade na planta e no inseto e, espera-se que a caracterização de tais proteínas e seus genes contribuam para o entendimento desses processos (Fletcher, 1999). A purificação de fitoplasmas e o uso de técnicas moleculares possibilitaram a identificação de MSP de fitoplasmas associados com o *aster yellows* (AY), *clover phyllody* (CPH), *apple proliferation* (AP) e *sweet potato witches' broom* (SPWB) (Yu et al., 1998; Berg et al., 1999; Davies et al., 1999; Fletcher, 1999). A ocorrência de epítipos únicos para cada espécie de fitoplasma sugere que essas proteínas podem ser participantes-chave nas interações específicas com células do hospedeiro (Fletcher, 1999). Berg et al. (1999) investigaram uma proteína de membrana imunodominante do fitoplasma associado com AP. Essa proteína mostrou semelhanças com uma proteína de membrana antígenica do agente de SPWB (cujo gene foi também detectado no fitoplasma *peanut witches' broom*) (Yu et al., 1998), em relação ao tamanho e à organização de genes. A proteína obtida para AP foi usada na produção de anticorpos policlonais, através da expressão em bactérias, constituindo-se em alternativa promissora ao desenvolvimento de anticorpos

proteína ou de seu mRNA nas células ou nos tecidos onde são produzidos é uma importante fonte de informação que pode auxiliar na determinação da função de um gene ou proteína. Um dos princípios dessa metodologia é a localização dos mesmos por meio de sondas específicas. Técnicas de hibridização *in situ* têm sido amplamente utilizadas para localizar genes em cromossomas, células e tecidos de diversos organismos (Carneiro et al., 2000). Secções das glândulas esofageanas desempenham importante papel na interação entre nematóides fitoparasitas e seus hospedeiros. Quatro mRNAs foram identificados dos genes de celulase, os quais são expressos nas células das glândulas esofageanas subventrais de *H. glycines* e *Globodera rostochiensis*, no estágio J2. A construção de sonda de RNA de um gene da celulase, marcada com digoxigenina, permitiu a hibridização *in situ*, revelando-se altamente específica no citoplasma das células das glândulas esofageanas. Tal procedimento pode ser útil na caracterização e identificação de outros genes de secreção das glândulas esofageanas em nematóides fitoparasitas (Boer et al., 1998).

Vários tipos de enzimas extracelulares são produzidas pelos fitopatógenos, sendo importante determinar o papel das mesmas na patogênese. O fungo *Mycosphaerella* sp. penetra na planta através dos ferimentos, no entanto, quando este foi transformado com um gene de *Nectria haematococca* que codifica para cutinase, foi hábil em infectar frutos intactos de mamão (Dickman et al., 1989). β -1,4 endoglucanases (EGases) constituem uma classe de enzimas que atuam na hidrólise de importantes componentes da parede celular das plantas. Somente no final da década passada foram isoladas e clonadas as primeiras EGases de origem animal, tendo sido obtidas de *G. rostochiensis* e *H. glycines*. Sondas e anticorpos dirigidos contra as EGases foram utilizados para monitorar a expressão das mesmas durante o ciclo de vida de *G. tabacum*. Como a expressão é restrita aos estádios móveis dos nematóides e é retomada nos nematóides machos, tem sido sugerido que essas tenham função na hidrólise das paredes celulares da planta durante a penetração, a migração intracelular nos tecidos da raiz durante o parasitismo e a imigração dos machos. Dois genes de *G. tabacum* que codificam para EGases foram isolados e sequenciados, revelando 96 % de identidade de nucleotídeos com os de *G. rostochiensis* e 70 % com os de *H. glycines*. As diferenças na estrutura das preditas proteínas codificadas por tais genes de *G. tabacum* sugerem que essas enzimas podem ter especificidade diferente por substrato (Goellner et al., 2000).

As toxinas são produtos de patógenos microbianos, sendo particularmente importantes no estabelecimento do patógeno no interior do hospedeiro e na manifestação dos sintomas (Pascholetti et al., 1998). O estudo de toxinas específicas ao hospedeiro (HSTs) tem contribuído para o avanço na

para detecção e caracterização do fitoplasma (Berg et al., 1999). Seguindo a mesma linha, a partir de seqüências N-terminal de aminoácidos de uma proteína de membrana imunodominante (MMP) associada a um isolado de AY, determinou-se a seqüência do gene da proteína de membrana. O produto provável de tradução a partir do gene MMP de AY consistiu numa proteína de 233 aminoácidos, a qual apresenta a mesma estrutura geral que a proteína codificada pelo gene homólogo de CPh. Entretanto, observou-se que as proteínas de membrana dos fitoplasmas AY e CPh diferem quanto à seqüência de aminoácidos e à estrutura geral da proteína de membrana associada com os fitoplasmas AP e SPWB. A possibilidade que as proteínas de membrana de AY e CPh possam estar envolvidas com interações do patógeno com a planta hospedeira ou com o inseto vetor está sob investigação (Davies et al., 1999). As funções hipotéticas das proteínas imunodominantes incluem envolvimento no reconhecimento, aderência e invasão de planta ou de células do inseto hospedeiro e/ou desencadeamento de respostas de resistência do hospedeiro. Uma questão relevante concerne determinar se a interação com tais proteínas funciona em eventos semelhantes em fitoplasmas e espiroplasmas e nos principais tipos de hospedeiros (Fletcher, 1999).

Estudos de mutagênese utilizando o transposon Tn4001, inserido no primeiro gene do operon da frutose (*fruA*) resultaram na obtenção de um mutante de *Spiroplasma citri*, de reduzida patogenicidade, o qual é incapaz de utilizar frutose como fonte de carbono e de energia. Os trabalhos conduzidos em *Catharantus roseus*, demonstraram a retomada do uso de frutose pelos mutantes e que os genes envolvidos nessa restauração são também responsáveis pelo restabelecimento da patogenicidade. Afora o fenômeno da reversão, verificou-se que plantas infectadas com o mutante, quando complementadas com o operon inteiro da frutose desenvolveram sintomas severos, assim como da estirpe selvagem, indicando o envolvimento do operon da frutose com a patogenicidade de *S. citri*. Assim, a patogenicidade nesses mollicutes pode envolver um mecanismo em que a utilização de frutose pelo patógeno interfere na fisiologia normal da planta, tendo sido proposto que *S. citri* compete com as células companheiras por frutose, dificultando o carregamento de sacarose pelas células companheiras, até os tubos crivados do floema. Entretanto, as estirpes que não utilizam frutose são ainda patogênicas, apesar de induzirem sintomas brandos, indicando o provável envolvimento de outros mecanismos de patogenicidade (Gaurivaud et al., 2000).

Devido à inabilidade de se cultivar fitoplasmas *in vitro*, a informação sobre aspectos genéticos desses organismos é ainda limitada. Grande parte da informação disponível tem se restringido às seqüências dos genes estruturais, principalmente o gene ribossomal. Nesse contexto, a análise funcional de produtos de genes de fitoplasmas pode ser realizada apenas em

hospedeiros heterólogos. Estudos iniciais visaram a expressão do gene da proteína de membrana de fitoplasma em *Escherichia coli*, mas o uso dessa bactéria como hospedeira pode não ser apropriada ao estudo do controle genético da expressão gênica, uma vez que os fitoplasmas podem infectar plantas e insetos (Palmano et al., 2001). Desta forma, *Bacillus subtilis*, bactéria mais estreitamente relacionada em termos filogenéticos com fitoplasmas, foi avaliada em estudos de expressão gênica. Os resultados demonstraram que a região promotora, localizada "upstream" no operon RNA ribossomal do fitoplasma *Western X-disease* (WX), permitiu a transcrição do gene cloranfenicol acetiltransferase, sugerindo que outros genes de fitoplasmas possam ser eficientemente expressos num "background" de *B. subtilis* (Palmano et al., 2001). Genes codificando as proteínas SecA e SecY, componentes essenciais do sistema Sec de translocação de proteína, foram clonados do fitoplasma OY. O gene *secA* consiste de 2.505 nucleotídeos e codifica uma proteína de 835 aminoácidos (96 kDa), mostrando alta similaridade com SecA de *B. subtilis*. Análise por "Western blot" confirmou que a proteína SecA é produzida em plantas infectadas por fitoplasma. O gene *secY* tem 1.239 nucleotídeos e codifica uma proteína de 413 aminoácidos, mostrando maior similaridade com SecY de *B. subtilis*. Estes resultados sugerem a presença de um sistema funcional Sec nos fitoplasmas. Como fitoplasmas são procariotos endocelulares sem parede celular, este sistema pode secretar proteínas bacterianas diretamente no citoplasma do hospedeiro. Acredita-se que este seja o primeiro registro da análise da seqüência e expressão de genes de fitoplasma codificando proteínas da membrana com uma função predita (Kakizawa et al., 2001).

O mapeamento físico representa uma alternativa para o entendimento do genoma dos organismos e, portanto, para a caracterização dos genes envolvidos na patogenicidade. O primeiro mapa físico de fitoplasma construído foi o do WX, com um cromossomo de aproximadamente 670 kb e no qual os dois operons rRNA (genes 16S rRNA) foram localizados (Firrao et al., 1996). Lauer & Seemüller (2000) geraram o mapa físico para o fitoplasma associado com AP, cujo cromossomo apresenta cerca de 645 kb e difere em tamanho daqueles presentes em fitoplasmas associados ao *pear decline* e *European stone fruit yellows* e pertencentes ao mesmo grupo taxonômico do AP. Graças ao mapeamento, vários genes foram localizados, dentre os quais os dois "operons" rRNA e o "operon" dos genes que codificam os fatores de alongamento G (*fus*) e Tu (*tuf*). Outros *loci* mapeados foram relacionados a um gene que codifica uma proteína imunodominante (IMP) e um possível gene nitroredutase. No mapa físico do fitoplasma associado ao *European stone fruit yellows*, foram observados um cromossomo de aproximadamente 635 kb, a presença dos *loci* dos dois

“operons” rRNA, o “operon” contendo o gene *tuf*, os genes que codificam uma proteína de membrana imunodominante e uma provável nitroredutase, tendo mostrado um arranjo genético semelhante àquele do AP, embora diferentes entre si (Marcone & Seemüller, 2001). O mapeamento físico e genômico do fitoplasma associado ao *sweet potato little leaf* (SPLL) possibilitou a caracterização desse organismo, para o qual determinou-se um cromossomo de aproximadamente 622 kb, a localização dos genes ligados *fus/tuf*, os dois operons rRNA, identificando-se, também, um gene *gidA*, que codifica uma proteína “glucose-inhibited division”. Também pôde-se inferir que existe significativa diversidade genômica no grupo dos fitoplasmas e, que rearranjos genéticos, como deleções ou inserções em áreas particulares do genoma de fitoplasmas podem estar correlacionados com diferenças biológicas, como sintomas expressos, espectro de hospedeiras e transmissibilidade (Padovan et al., 2000).

A determinação da sequência completa do genoma de fitoplasmas permite determinar o número e tipo de genes presentes no seu cromossomo, representando um grande avanço no entendimento desses organismos. Liefting & Kirkpatrick (1999) desenvolveram um projeto para clonagem e sequenciamento do genoma total do fitoplasma WX, para o qual existem resultados preliminares relacionados à clonagem de cosmídeos. A existência de DNA extra-cromossomal tem sido relatada para alguns fitoplasmas, embora as funções biológicas dos plasmídeos e de DNA extra-cromossomal presentes nesses mollicutes sejam ainda pouco conhecidas. Acredita-se que, a exemplo do que ocorre em certas bactérias, o DNA plasmidial de fitoplasmas pode codificar genes relacionados com patogenicidade, mas há necessidade de confirmação (Kuske & Kirkpatrick, 1990; Nakashima et al., 1991; Kuboyama et al., 1998). Kuboyama et al. (1998) caracterizaram o “background” genético responsável pelas diferenças quanto a patogenicidade, entre o fitoplasma associado com OY-W e um mutante patogênico (OY-M.), que incitava sintomas brandos. Os autores examinaram a possibilidade de que DNA extra-cromossomal de fitoplasma codificasse genes relacionados com patogenicidade. Assim, a análise de sequência de fragmento de DNA extra-cromossomal de OY-W revelou uma ORF que codifica a proteína de replicação (Rep) do plasmídeo. Hibridizações com sonda construída para a região do gene *Rep* permitiram avaliar a heterogeneidade entre os plasmídeos encontrados em OY-W e no mutante patogênico. Foi demonstrado haver diferenças no padrão de bandas e um número superior de cópias de plasmídeos em OY-W, sugerindo a possibilidade de uma relação entre genes codificados pelos plasmídeos e a patogenicidade do fitoplasma.

Investigou-se o DNA extra-cromossomal (EC-DNA) do fitoplasma associado a estirpes de ICPh, provenientes de uma localidade italiana, e dos fitoplasmas *vaccinium witches' broom* (VAC) e *walnut witches' broom*

(WWB), que são filogeneticamente relacionados ao ICPh. A observação de EC-DNA de fitoplasmas dessa área restrita, onde ocorrem fitoplasmas filogeneticamente distintos na mesma planta e no inseto vetor, indicou a existência de dois grupos diferentes de EC-DNA. Hibridização por Southern blot revelou que os EC-DNAs associados a VAC, WWB e várias estirpes de ICPh apresentavam alta homologia entre si. Entretanto, diferiram dos EC-DNAs de fitoplasmas do grupo AY presente no mesmo inseto e em plantas hospedeiras coletados no mesmo local que as estirpes de ICPh. As estirpes distintas de ICPh diferiram significativamente quanto ao número e tamanho dos EC-DNAs, com divergência mais marcante entre amostras de diferentes hospedeiras do que entre amostras da mesma planta hospedeira. Contudo, conforme demonstrado pela análise de sequência e pelos resultados de transmissão por insetos, a variação em tamanho não está relacionada com a interação com diferentes espécies de plantas hospedeiras. A hipótese mais plausível para a presença de padrões de bandas diversos consiste na ocorrência de eventos de recombinação envolvendo as regiões dos EC-DNAs ricas em sequências repetidas, com disseminação dessas moléculas recombinantes entre plantas e mediada por insetos (Rekab et al., 1999).

A bactéria *Xylella fastidiosa* teve recentemente o seu genoma completamente sequenciado. Aproximadamente 55% dos seus genes são ainda completamente desconhecidos. Baseado em possíveis hipóteses de patogenicidade, vários genes foram categorizados, destacando-se aqueles associados a interação da bactéria com ela mesma e com os hospedeiros, assim como genes relacionados à capacidade adaptativa às condições do xilema (Machado et al., 2001).

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* tem sido adotada como modelo para estudo das interações patógeno-hospedeiro e, embora alguns genes relacionados à patogenicidade tenham sido clonados e analisados, ainda é limitado o conhecimento de suas funções e dos mecanismos moleculares envolvidos. A partir de uma estirpe de *X. oryzae* pv. *oryzae* foi construída uma biblioteca “bacterial artificial chromosome” (BAC) e os resultados agrupados demonstraram que a biblioteca BAC apresenta grande potencial nos estudos do genoma, mapeamento refinado e clonagem dos genes relacionados à patogenicidade dessa bactéria (Ochiai et al., 2001).

Após um fitovírus ter acesso ao interior de uma célula, ele deve ser capaz de, pelo menos, replicar-se e mover para estabelecer uma infecção sistêmica. Técnicas moleculares têm dado grande contribuição no estudo do movimento dos vírus, permitindo utilizar diferentes estratégias para esse estudo, como: análise de mutação, plantas transgênicas expressando proteínas de movimento (PM), vírus marcados, construção de vírus quiméricos (Gilbertson et al., 1993). Mutantes da cultivar de fumo Virgínia têm um gene

de resistência a *Potyvirus* e variáveis níveis de resistência foram observados nessas plantas quando inoculadas com isolados de PVY, sendo altamente resistentes à maioria dos isolados testados e tolerantes a três estirpes necróticas de PVY. Embora a replicação de PVY tenha ocorrido em protoplastos, foi 30 % menor que no fumo suscetível, sugerindo que a diminuição da replicação também contribuiu para a resistência. Para identificar o(s) produto(s) gênicos virais envolvidos na resistência, foram comparadas as seqüências de aminoácidos dos mutantes com seus isolados originais, identificando-se a substituição de um único aminoácido no domínio da proteína associada ao genoma viral (VPg) que está correlacionada com a quebra da resistência. Juntos, esses resultados sugerem que, em adição ao seu papel na replicação, VPg desempenha um importante papel no movimento célula-a-célula do PVY (Masuta et al., 1999). A estirpe PAV de *Barley yellow dwarf virus* (BYDV-PAV) foi localizada através de hibridização *in situ* em células de aveia, que mostrou marcação de material filamentosso no núcleo, citoplasma e em vesículas induzidas pelo vírus, utilizando sondas de ácido nucléico senso e antisenso. RNA de fita negativa foi detectado nos estádios iniciais da infecção, primeiro no núcleo e, logo após, no citoplasma. No estádios tardios da infecção, a partir de cinco dias da inoculação, áreas contendo grande quantidade de material filamentosso foram marcadas com as duas sondas; em contraste, nesse mesmo período, as áreas que apresentaram grande número de partículas virais, detectaram, predominantemente, RNA de fita positiva. Como o RNA de fita negativa foi detectado antes das partículas virais, indica que a replicação iniciou antes da síntese da capa protéica no citoplasma (Nass et al., 1998).

Jagoueix-Eveillard et al. (2001) utilizaram, pela primeira vez, a técnica de "differential display" na identificação de genes cuja expressão é alterada após infecção de plantas por "mollicutes". A técnica permitiu o isolamento de cDNAs de *C. roseus* expressos diferencialmente, após infecção com *S. citri*, "*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia" e o fitoplasma "stolbur". Nesse estudo, cDNAs expressos de modo diferencial foram caracterizados por "Northern blot" e análise de seqüência, sendo que oito desses apresentavam alta homologia com genes de proteínas anteriormente seqüenciados, envolvidos com fotossíntese (*S. citri* e "stolbur"), transporte de carboidratos (*S. citri*), resposta a estresse (*S. citri*) ou vias de síntese de fitoesterol (*S. citri*). Além desses dados, demonstrou-se, pela primeira vez, a ativação de um gene que codifica uma proteína induzida por patógeno mediante infecção por *S. citri*. A maioria dos genes reguladores identificados provinham de plantas infectadas com *C. P. aurantifolia*, que induz proliferações abundantes do tipo superbrotamento, um processo de desenvolvimento ativo, comparado a amarelecimento foliar e declínio. Os genes foram isolados nos estádios de infecção tardia e relacionavam-se a diversas vias metabólicas. Mesmo não

havendo especificidade entre os genes e uma dada bactéria floemática e, apesar do número de patógenos representativos para cada tipo de sintoma ter sido pequeno, foi possível estabelecer a associação entre a regulação de alguns genes com o tipo de sintoma observado na planta. No que refere-se à expressão do gene "transketolase", envolvido no transporte de carboidratos, a mesma foi regulada após a infecção com a estirpe patogênica de *S. citri*, enquanto que esse tipo de regulação não foi observada para o mutante fitopatogênico.

INTERAÇÃO FITOPATÓGENO - VETOR

Para determinados patossistemas, é indispensável o sucesso da interação entre o fitopatógeno e o seu vetor, sendo este o meio mais comum da dispersão de vírus, fitoplasmas e espiroplasmas. Nos últimos anos, muitas informações referentes a essa interação foram obtidas, muitas delas devido ao desenvolvimento e a adoção de técnicas moleculares, como a construção de vírus quiméricos, análise de seqüência de nucleotídeos ou de aminoácidos, estudos mutacionais, hibridização *in situ* e análise por PCR.

Para investigar os determinantes genéticos da transmissibilidade dos fitopatógenos por vetores, novas oportunidades vem sendo exploradas em diferentes combinações patógeno-vetor, com a utilização de métodos moleculares. Os capsídeos de todos os geminivírus transmitidos por mosca-branca têm um ou mais epitopos em comum e tem sido sugerido que os mesmos podem ser determinantes da especificidade do vetor. O papel da capa protéica (CP) em determinar a especificidade do vetor foi investigada pela construção de vírus quimérico, no qual o gene que codifica para a CP do *African cassava mosaic virus* (ACMV), transmitido por mosca branca, foi substituído pelo mesmo gene do *Beet curly top virus* (BCTV), transmitido por cigarrinha (*Circulifer tenellus*). A cigarrinha transmitiu o BCTV e o vírus quimérico, mas não o ACMV. Tais resultados demonstram que a especificidade da transmissão do vírus pela cigarrinha reside na CP (Briddon et al., 1990).

A transmissão de potyvirus por afídios requer, além das partículas virais, a presença de uma proteína não estrutural, denominada de componente auxiliar (HC), sendo sugerido que o mesmo atue como uma ponte, permitindo que as partículas virais fiquem retidas no estilete. Estudos com mutações em regiões altamente conservadas do HC têm sido associadas com a perda da capacidade de união dos vírions. Dados obtidos por Blanc et al. (1998) sugerem que o domínio N-terminal do HC está envolvido na interação com os estiletes dos afídios, enquanto a região responsável pela união com os vírions

está localizada fora do domínio N-terminal, provavelmente na região central. A hipótese de que diferenças na retenção das partículas virais no estilete podem explicar diferenças na transmissão foi testada, tendo os afídios adquirido partículas virais marcadas com ^{125}I , na presença de HCs homólogos e heterólogos. Estudos com autoradiografia de vírions marcados com ^{125}I mostraram que a transmissão é altamente correlacionada com a retenção dos vírus no estilete dos afídios. Os resultados também revelam que constituinte(s) do/ou no canal alimentar de diversas espécies de afídios diferem na sua habilidade para interagir com específicos HCs, levando a diferenças qualitativas ou quantitativas na habilidade para reter e, subsequentemente, transmitir potyvírus específicos (Wang et al., 1998).

A análise da sequência de nucleotídeos ou de aminoácidos tem sido explorada para estudar a interação patógeno-vetor. Em trabalho conduzido por Kheyr-Pour et al. (2000) foi demonstrado que a troca num único aminoácido da proteína da CP transformou o *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) em não transmissível pela mosca branca; sendo que esta região do capsídeo também está envolvida na transmissão do TYLCV por *B. tabaci*. Granier et al. (1993) sequenciaram a região codificadora do HC de variantes de duas estirpes de *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) que apresentavam baixa transmissibilidade por afídio. Em uma das estirpes foi identificada mutação a nível de nucleotídeo levando a duas mudanças de aminoácidos e na outra estirpe houve alteração em apenas um aminoácido, sendo essa igual a identificada em *Potato virus C* (PVC), uma estirpe não transmissível de PVY. Foi confirmada que as quatro ORFs contidas no RNA-2 de *Pea early-browning virus* (PEBV), bem como peptídeos flexíveis no C-terminal da CP estão envolvidos na determinação da transmissão do vírus por nematóide (MacFarlane et al., 1996). Um isolado de PVY, pertencente ao patótipo 1-2, não transmissível por afídio, permitiu altas taxas de transmissão se os afídios adquiriram HC biologicamente ativo antes do vírion. Análise da sequência do gene HC de PVY 1-2 e comparação com PVY 0 (transmissível por afídios) revelaram 19 diferenças nucleotídicas, mas somente duas resultaram em trocas de aminoácidos, uma dos quais induziu uma troca de carga. Nenhuma das duas trocas de aminoácidos ocorreram dentro do domínio rico em cisteína, nem coincidiram com domínios conservados da proteína HC conhecidos por estar envolvidos na transmissão por afídios e que estão presentes em todos os potyvírus. Como nenhuma das mutações encontradas têm efeito negativo na habilidade de união dos vírions, uma possível explicação para a perda da função HC é que uma, ou ambas, mutações tornam o HC incapaz de interagir com os estiletes dos afídios (Llave et al., 1999).

A interação entre *Spiroplasma citri*, patógeno causador do "stubborn" dos citros, e seu inseto vetor, *Circulifer tenellus* tem sido investigada quanto aos mecanismos de transmissão pelo vetor. A análise

molecular da interação entre esse espiroplasma e células do inseto foi efetuada para linhas de uma estirpe isolada de *S. citri*. Observou-se que linhas derivadas desse isolado apresentavam diferentes graus de transmissibilidade pela cigarrinha vetora e métodos moleculares permitiram verificar diferenças no cromossomo da linha deficiente quanto a transmissibilidade (Fletcher et al., 1998). Há indícios de que a presença de proteínas de superfície está associada com a aderência de espiroplasma nas células cultivadas de *C. tenellus* (Fletcher, 1999). Os genes envolvidos nas interações entre *S. citri* e seus hospedeiros - planta e vetor - podem ser identificados por mutações e procedimentos de "screening", visando detectar os mutantes. O desenvolvimento e aperfeiçoamento de novos vetores de clonagem e de "transposons" efetivos na mutagênese de espiroplasmas fitopatogênicos constituem-se em promissoras linhas de pesquisa (Bové, 1997; Fletcher, 1999). A inserção randômica do transposon Tn4001 no genoma de *S. citri*, técnica aplicada para mutagênese, consagrou-se nos estudos sobre a biologia molecular e celular de *S. citri* e para a construção de vetores de genes objetivando transformação desse mollicute. O primeiro vetor usado consistiu na forma replicativa do vírus SpV1 de *S. citri* que, contudo demonstrou-se instável, com a rápida deleção do DNA inserido. Como estratégia alternativa, empregou-se a origem da replicação do DNA de *S. citri* (*oriC*) para construir um número de plasmídeos artificiais, contendo vários determinantes de resistência a antibióticos e, esses plasmídeos têm sido empregados como vetores de clonagem (Bové, 1997). Genes de espiroplasmas transcritos na planta devem estar relacionados com patogenicidade, enquanto aqueles induzidos apenas em insetos devem ser importantes para a transmissibilidade. A identificação de genes expressos em estirpes de "mollicuts", patogênicas ou transmissíveis, mas não em mutantes não-patogênicos ou não-transmissíveis, pode levar à obtenção de produtos ou funções relacionadas a essas duas principais atividades (Fletcher, 1999).

Hibridização *in situ*, utilizando sondas marcadas com biotina ou com digoxigenina demonstrou ser uma técnica rápida e adequada para confirmar o status da cigarrinha *Euscelidius variegatus* como vetor ou não do fitoplasma ICPh. Estudos demonstraram que, para ser infectivo, o fitoplasma deve ser capaz não só de passar à hemolinfa, mas também de penetrar em células específicas das glândulas salivares. Com a hibridização foi possível localizar ICPh especificamente nessas células, sendo uma técnica ainda mais vantajosa que o PCR, pois se um inseto não hospedeiro alimentou-se recentemente em uma planta infectada, é bastante provável que ele contenha fitoplasmas no intestino e, então, forneça resultado positivo em PCR. Adicionalmente, análises por PCR não podem distinguir células mortas do patógeno, períodos de latência e insetos não vetores. Assim, métodos que

localizam especificamente o patógeno *in situ* são requeridos para o desenvolvimento de estudos visando determinar a estratégia de replicação e o movimento do patógeno dentro do vetor. Desse modo, a utilização de sondas constituídas por oligonucleotídeos, desenhados para PCR, em hibridização *in situ* e detecção não-radioativa do fitoplasma associado ao ICPH e ao seu vetor *E. variegatus* demonstrou ser uma técnica promissora, que pode ser aplicada na investigação da biologia, ecologia e epidemiologia de outros fitoplasmas, bem como de muitos aspectos da interação inseto-patógeno (Webb et al., 1999).

Através de ensaios de PCR e de *nested* PCR, o fitoplasma *mulberry dwarf* foi detectado em ovos e em ninfas de *Hishimonoides sellatiformis* recentemente eclodidas desses ovos. Essa descoberta indica que o fitoplasma MD é passado à progênie desse inseto (Kawakita et al., 2000).

USO DA BIOLOGIA MOLECULAR NO FUTURO

É indubitável a grande contribuição que a biologia molecular tem dado à Fitopatologia, principalmente nas áreas de diagnose, epidemiologia e controle de doenças. O crescente número de artigos científicos que descrevem o uso de técnicas moleculares, publicados em revistas especializadas, revelam que as mesmas constituem-se em ferramentas de valor inquestionável para a Fitopatologia. No entanto, deve haver a compreensão de que tais técnicas, embora eficientes, rápidas e precisas, não respondem a todas as indagações da Fitopatologia e a interpretação dos resultados obtidos deve ser cuidadosa. Tal preocupação pode ser exemplificada por Leite Jr. et al. (1995), quando a transmissão de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* para plântulas foi positiva somente em cinco lotes de sementes de tomate testadas, embora em 11 lotes tenha sido detectada a bactéria por PCR. Assim, os autores questionam se os níveis do patógeno detectados por PCR podem estar abaixo daqueles necessários à transmissão por sementes ou se células mortas do patógeno podem estar contribuindo para a amplificação, mas não à transmissão. Do mesmo modo, pode-se analisar os resultados de amplificação por RT-PCR do TSWV a partir de tripes, mesmo daqueles que não foram hábeis em transmitir o vírus às plantas. Outro exemplo ocorre com a detecção de fitoplasma em *Dalbulus maidis*, inseto não vetor desse patógeno, confirmando que a detecção do DNA do patógeno numa determinada espécie de organismo não indica necessariamente a sua identificação como vetor. No entanto, com o contínuo descobrimento dos genes e suas funções em relação aos diferentes fitopatógenos e suas relações com os hospedeiros e vetores, a Fitopatologia Molecular terá um papel fundamental no desenvolvimento científico.

O Brasil, apesar das severas limitações financeiras impostas à pesquisa, tem assumido a postura de acompanhar e absorver os novos avanços que estão sendo gerados a todo momento pela biologia molecular e pela biotecnologia. Atualmente, a adoção de técnicas moleculares é uma realidade em grande parte dos laboratórios brasileiros de Fitopatologia, sendo utilizadas em diferentes linhas de pesquisa. Os resultados obtidos até então e o desenvolvimento de protocolos que visam simplificar a metodologia de extração de ácido nucléico com redução nos custos e no tempo, a síntese de centenas de oligonucleotídeos gerando custos comparáveis ao desenvolvimento de alguns poucos antissoros monoclonais, o desenvolvimento de kits são, entre outras, informações que estimulam o uso de métodos moleculares, fazendo com que os mesmos continuem, cada vez mais, a ter espaço na Fitopatologia.

A clonagem molecular de genes que possibilitam a planta resistir a diversas classes de patógenos tem revelado que as proteínas codificadas pelos mesmos têm várias características em comum. Enquanto os produtos dos genes *R* têm elementos estruturais em comum, como repetições ricas em Leucina, os produtos dos genes *avr* são diferentes, não apresentando quaisquer elementos estruturais em comum. Essas descobertas sugerem que as plantas podem ter desenvolvido mecanismos comuns de transdução de sinais para a expressão de resistência a uma ampla faixa de patógenos não relacionados. A caracterização dos sinais moleculares envolvidos no reconhecimento do patógeno e os eventos moleculares que especificam a expressão de resistência podem levar a novas estratégias para o controle de doenças de plantas. Futuros desafios da pesquisa incluem a determinação dos mecanismos pelos quais os produtos dos genes *R* reconhecem os elicitores dos patógenos e as respostas defensivas da planta para bloquear o patógeno (Staskawicz et al., 1995).

Técnicas que possibilitam o desenvolvimento de plantas transgênicas, embora gerando discussões quanto à ética e à biossegurança, são uma realidade e não se pode ignorar o destacado papel que têm em relação ao controle de doenças e, possivelmente, de vetores.

Em futuro breve, na Fitopatologia, com o acúmulo de informações moleculares relativas aos fitopatógenos, hospedeiros, vetores e a interação entre os mesmos através das análises de seus genomas, transcriptomas e proteomas aliado ao desenvolvimento da robótica, por exemplo, o uso de "DNA microarray" (Carneiro et al., 2000), poder-se-á rapidamente identificar nos fitopatógenos, hospedeiros e vetores, a função e a expressão de genes de interesse e possíveis mutações gênicas que servirão para orientar o desenvolvimento de plantas transgênicas seguras para a alimentação humana e expressando resistência a fitopatógenos e/ou vetores. Além disto, poder-se-á

ter a criação de chips de DNA, semelhantes aos utilizados no estudo de doenças humanas (Moreira Filho & Almeida, 2000), que permitirão, prematuramente, identificar plantas suscetíveis a fitopatógenos virulentos e potenciais vetores, assim como estudar a ação de defensivos agrícolas sobre o genoma de plantas, de fitopatógenos e de vetores, de modo a selecionar os defensivos mais eficazes e seguros para uso na agricultura.

Para um país como o Brasil, que tem na agricultura uma de suas principais atividades, inclusive desempenhando importante papel social, a opção pela adoção ou não de novas tecnologias que otimizam a atividade agrícola, assume importância estratégica. No momento, é importante que a discussão sobre a necessidade ou não de novas tecnologias não fique restrita meramente a questões políticas ou econômicas, devendo-se considerar também os aspectos sociais e ambientais envolvidos (Cançado, 2000).

LITERATURA CITADA

- ABAD, J.A. & MOYER, J.W. 1992. Detection and distribution of *sweet potato feathery mottle virus* in sweet potato by in vitro-transcribed RNA probes (riboprobes), membrane immunobinding assay, and direct blotting. *Phytopathology* 82:300-5.
- AKAMATSU, H.; ITOH, Y.; KODAMA, M.; OTANI, H. & KOHMOTO, K. 1997. AAL-toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. *Phytopathology* 87:967-72.
- ALZATE-MARIN, A.L.; ARRUDA, M.C.C.; BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. 1999. Uso de marcadores RAPD como auxílio na seleção para resistência à antracnose do feijoeiro comum. *Fitopatol. Bras.* 24:455-8.
- ANDERSON, J.M.; PRESTON, J.F.; DICKSON, D.W.; HEWLETT, T.E.; WILLIAMS, N.H. & MARUNIAK, J.E. 1999. Phylogenetic analysis of *Pasteuria penetrans* by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Nematol.* 31:319-25.
- AUDY, P.; BRAAT, C.E.; SAIDRON, G.; HUANG, H.C. & LAROCHE, A. 1996. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology* 86:361-6.
- BAI, G.; KOLB, F.L.; SHANER, G. & DOMIER, L.L. 1999. Amplified fragment length polymorphism markers linked to a major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. *Phytopathology* 89:343-8.
- BERG, M.; DAVIES, D.L.; CLARK, M.F.; VETTEN, H.J.; MAIER, G.; MARCONE, C. & SEEMÜLLER, E. 1999. Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product. *Microbiology* 145:1937-43.
- BLANC, S.; AMMAR, E.D.; LAMPASONA, S.G.; DOLJA, V.V.; LLAVE, C.; BAKER, J. & PIRONE, T.P. 1998. Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J. Gen. Virol.* 79:3119-22.
- BOER, J.M.; YAN, Y.; SMANT, G.; DAVIS, E.L. & BAUM, T.J. 1998. In situ hybridization to messenger RNA in *Heterodera glycines*. *J. Nematol.* 30:309-12.
- BOVÉ, J.M. 1997. Spiroplasmas: infectious agents of plants, arthropods and vertebrates. *Wien Klin Wochenschr* 109/14-15:604-12.
- BRASILEIRO, A.C.M. & CANÇADO, G.M.A. 2000. Plantas transgênicas. *Inf. Agropec.* 21:28-35.
- BRIDDON, R.W.; PINNER, M.S.; STANLEY, J. & MARKHAM, P.G. 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177:85-94.
- BRIOSO, P.S.T.; POZZER, L.; MONTANO, H.G. & PIMENTEL, J.P. 2001. Uso atual e futuro da biologia molecular na fitopatologia. Parte I: Aplicações em fitopatógenos e vetores. In: Luz, W.C. da; Fernandes, J.M.C.; Prestes, A.M. & Picinini, E.C. (Eds.). *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo, Rapp, vol.9, p.79-118.
- BRIOSO, P.S.T.; SILVA, R.S.; POZZER, L.; ÁVILA, A.C. & RESENDE, R.O. 1996. *Sweet potato feathery mottle virus* - detecção molecular no Estado do Rio de Janeiro. *Fitopatol. Bras.* 21:422 (abstr.).
- CANÇADO, G.M.A. 2000. Plantas transgênicas e biossegurança. *Inf. Agropec.* 21:89-96.
- CARNEIRO, N.P.; CARNEIRO, A.A.; GUIMARÃES, C.T. & PAIVA, E. 2000. Decifrando o genoma. *Inf. Agropec.* 21:20-7.
- 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.
- CHATENET, M.; DELAGE, C.; RIPOLLES, M.; IREY, M. & ROTT, P. 2001. Detection of *sugarcane yellow leaf virus* in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. *Plant Dis.* 85:1177-80.
- CHEN, Y.D. & CHEN, T.A. 1998. Expression of engineered antibodies in plants: a possible tool for spiroplasma and phytoplasma disease control. *Phytopathology* 88:1367-71.
- CHIOCCHETTI, A.; GHIGNONE, S.; MINUTO, A.; GULLINO, M.L.;

- GARIBALDI, A. & MIGHELI, Q. 1999. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* isolated from soil, basil seed, and plants by RAPD analysis. Plant Dis. 83:576-81.
- COLETTA FILHO, H.D.; CARLOS, E.F. & MACHADO, M.A. 1998. Distribution of *Xylella fastidiosa* within sweet orange trees. In: XIV CONFERENCE OF IOC. p.155 (abstr.).
- CORDEIRO, M.C.R. & SÁ, M.F.G. 1999. Biotecnologia e resistência a patógenos. Biotecnol. Ciência & Desenv. 10:34-9.
- CRUZ, C.M.V.; ARDALES, E.Y.; SKINNER, D.Z.; TALAG, J.; NELSON, R.J.; LOUWS, F.J.; LEUNG, H.; MEW, T.W. & LEACH, J.E. 1996. Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analyses. Phytopathology 86:1352-9.
- DAVIES, D.L.; CLARK, M.F. & BARBARA, D. 1999. Cloning and sequencing of the genes determining a major membrane protein associated with the chlorotic isolate of aster yellows and clover phyllody. First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes. URL: <http://www.uniud.it/phytoplasma/conf.html>.
- DICKMAN, M.B.; PODILA, G.K. & KOLATTUKUDY, P.E. 1989. Insertion of cutinase gene into a wound pathogen enables it to infect intact hosts. Nature 342:1209-14.
- DREIER, J.; BERMPOHL, A. & EICHENLAUB, R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology 85:462-8.
- FABRITIUS, A.; SHATTOCK, R.C. & JUDELSON, H.S. 1997. Genetic analysis of metalaxil insensitivity in *Phytophthora infestans* using linked DNA markers. Phytopathology 87:1034-40.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: Embrapa-Cenargen. 220p.
- FIGUEIREDO, D.V.; SILVA NETO, S.P. & BRIOSO, P.S.T. 2001. Amplificação, por RT-PCR, de fragmento específico de estirpe do *Cucumber mosaic virus* (CMV) não transmitida mecanicamente de bananeira. Fitopatol. Bras. 26:521 (abstr.).
- FIRRAO, G.; SMART, C.D. & KIRKPATRICK, B.C. 1996. Physical map of the *western X disease* phytoplasma chromosome. J. Bacteriol. 178:3985-8.
- FLETCHER, J. 1999. Interactions of phytopathogenic mollicutes with insect and plant hosts. First internet conference on phytopathogenic mollicutes. URL: <http://www.uniud.it/phytoplasma/conf.html>.
- FLETCHER, J.; WAYADANDE, A.; MELCHER, U. & YE, F. 1998. The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: a closer look. Phytopathology 88:1351-8.
- FLORES, A.; CHET, I. & HERRERA, A.E. 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzanium* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. Curr. Genet. 31:30-7.
- FORCELINI, C.A.; GOELLNER, C.I. & MAY-DE MIO, L. 2001. Resistência de fungos a fungicidas. In: Luz, W.C. da; Fernandes, J.M.C.; Prestes, A.M. & Picinini, E.C. (Eds.). Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo, Rapp, v.9, p.339-81.
- FREEMAN, S.; HOROWITZ, S. & SHARON, A. 2001. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. Phytopathology 91:986-92.
- FRIEDRICH, L.; LAWTON, K.; DIETRICH, R.; WILLITS, M.; CADE, R. & RYALS, J. 2001. NIM1 overexpression in *Arabidopsis* potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides. MPMI 14:1114-24.
- GARDENER, B.B.S.; MAVRODI, D.V.; THOMASHOW, L.S. & WELLER, D.M. 2001. A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria. Phytopathology 91:44-54.
- GARNIER, M. 1997. Non-cultivable phytopathogenic mycoplasmas: characterization, detection and perspectives for control. Wien Klin Wochenschr. 109/14-15:613-7.
- GAURIVAUD, P.; DANET, J.L.; LAIGRET, F.; GARNIER, M. & BOVÉ, J.M. 2000. Fructose utilization and phytopathogenicity of *Spiroplasma citri*. MPMI 13:1145-55.
- GILBERTSON, R.L.; HOU, Y.M.; GRIECO, P.D. & NOUEIRY, A. 1993. Análise molecular do movimento de vírus nas plantas. In: Luz, W.C. da; Fernandes, J.M.C.; Prestes, A.M. & Picinini, E.C. (Eds.). Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo, Rapp, v.1, p.197-237.
- GOELLNER, M.; SMANT, G.; DE BOER, J.M.; BAUM, T.J. & DAVIS, E.L. 2000. Isolation of Beta-1,4-endoglucanase genes from *G. tabacum* and their expression during parasitism. J. Nematol. 32:154-65.
- GRANIER, F.; TARDIF, M.D.; DELBART, F.C.; LECOQ, H. & ROBAGLIA, C. 1993. Mutations in *zucchini yellow mosaic virus* helper component protein associated with loss of aphid transmissibility. J. Gen. Virol. 74: 2737-42.
- GREEN, H. & JENSEN, D.F. 1995. A tool for monitoring *Trichoderma harzianum*: II. The use of a GUS transformant for ecological studies in the rhizosphere. Phytopathology 85:1435-40.
- 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 Inter. and Biol. Control. Marcel Dekker, p.393-413.
- HARTUNG, J.S.; PRUVOST, O.P.; VILLEMOT, I.E. & ALVAREZ, A. 1996. Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by immunocapture and a nested-polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 86:95-101.
- HE, C.X.; LI, W.B.; AYRES, A.J.; HARTUNG, J.S.; MIRANDA, V.S. & TEIXEIRA, D.C. 2000. Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. *Plant Dis.* 84:622-6.
- JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; TARENDEAU, F.; GUOLTER, K.; DANET, J.L.; LAIGRET, F.; BOVÉ, J.M. & GARNIER, M. 2001. *Catharanthus roseus* genes regulated differentially by mollicute infections. *MPMI* 14:225-33.
- KAKIZAWA, S.; OSHIMA, K.; KUBOYAMA, T.; NISIGAWA, H.; JUNG, H.; SAWAYANAGI, T.; TSUCHIZAKI, T.; MIYATA, S.; UGAKI, M. & NAMBA, S. 2001. Cloning and expression analysis of phytoplasma protein translocation genes. *MPMI* 14:1043-50.
- 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.
- KAWAKITA, H.; SAIKI, T.; WEI, W.; MITSUHASHI, W.; WATANABE, K. & SATO, M. 2000. Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs e eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology* 90:909-14.
- KHEYR-POUR, A.; BANANEJ, K.; DAFALLA, G.A.; CACIAGLI, P.; NORIS, E.; AHOONMANESH, A.; LECOQ, H. & GRONENBORN, B. 2000. *Watermelon chlorotic stunt virus* from the Sudan and Iran: sequence comparisons and identification of a whitefly-transmission determinant. *Phytopathology* 90:629-35.
- KUBOYAMA, T.; HUANG, C.-C.; LU, X.; SAWAYANAGI, T.; KANAZAWA, T.; KAGAMI, T.; MATSUDA, T.; TSUCHIZAKI, T. & NAMBA, S. 1998. A plasmid isolated from phytopathogenic onion yellows phytoplasma and its heterogeneity in the pathogenic phytoplasma mutant. *MPMI* 11:1031-7.
- KUSKE, C.R. & KIRKPATRICK, B.C. 1990. Identification and characterization of plasmids from the *Western aster yellows* mycoplasma-like organism. *J. Bacteriol.* 172:1628-33.
- 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, p.507-38.
- LANZA, M.A.; GUIMARÃES, C.T. & SCHUSTER, I. 2000. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. *Inf. Agropec.* 21:97-108.
- LAUER, U. & SEEMÜLLER, E. 2000. Physical map of the chromosome of the *apple proliferation* phytoplasma. *J. Bacteriol.* 182:1415-8.
- LE GALL, F., BOVÉ, J.M. & GARNIER, M. 1998. Engineering of a single-chain variable-fragment (scFv) antibody specific for the stolbur phytoplasma (Mollicute) and its expression in *Escherichia coli* and tobacco plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4566-72.
- LEE, H.K.; TEWARI, J.P.; TURKINGTON, T.K. & TRAIL, E. 2001a. A PCR-based assay to detect *Rhynchosporium secalis* in barley seed. *Plant Dis.* 85:220-5.
- LEE, I.M.; LUKAESKO, L.A. & MAROON, C.J.M. 2001b. Comparison of dig-labeled PCR, nested PCR, and ELISA for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in field-grown potatoes. *Plant Dis.* 85:261-6.
- LEITE JR., R.P.; JONES, J.B.; SOMODI, G.C.; MINSAVAGE, G.V. & STALL, R.E. 1995. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. *Plant Dis.* 79:917-22.
- LEITE, B.; RONCATO, L.B.; PASCHOLATI, S.F. & LAMBAIS, M.R. 1997. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações plantas-fungos patogênicos. *Rev. Anu Patol. Pl.* 5:235-80.
- LIEFTING, L. & KIRKPATRICK, B. 1999. The *Western X-disease* phytoplasma genome project - preliminary results of cloning the genome. First internet conference on phytopathogenic mollicutes. URL: <http://www.uniud.it/phytoplasma/conf.html>.
- LILJEROTH, E.; JANSSON, H.B. & SCHÄFER, W. 1993. Transformation of *Bipolaris sorokiniana* with the GUS gene and use for studying fungal colonization of barley roots. *Phytopathology* 83:1484-9.
- LIMÓN, M.C.; PINTOR-TORO, J.A. & BENÍTEZ, T. 1999. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology* 89:254-61.
- LLAVE, Y.C.; MARTÍNEZ, B.; DÍAZ-RUIZ, J.R. & LÓPEZ-ABELLA, D. 1999. Helper component mutations in nonconserved residues associated with aphid transmission efficiency of a pepper isolate of potato virus. *Phytopathology* 89:1176-81.
- LOEBENSTEIN, G.; AKAD, F.; FILATOV, V.; SADVAKASOVA, G.; MANADILOVA, A.; BAKELMAN, H.; TEVEROVSKY, E.; LACHMANN, O. & DAVID, A. 1997. Improved detection of *potato leafroll luteovirus* in leaves and tubers with a digoxigenin-labeled cRNA

- probe. Plant Dis. 81:489-91.
- LOZANO, J.C. 1986. Cassava bacterial blight: a manageable disease. Plant Dis. 70:1089-93.
- MACFARLANE, S.A.; WALLIS, C.V. & BROWN, D.J.F. 1996. Multiple virus genes involved in the nematode transmission of *pea early browning virus*. Virology 219:417-22.
- MACHADO, M.A.; COLETTA FILHO, H.D.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A. & KURAMAE, E.E. 2001. O projeto genoma da *Xylella fastidiosa*. Rev. Anu. Patol. Pl. 9:63-77.
- MACKENZIE, D.J.; MCLEAN, M.A.; MUKERJI, S. & GREEN M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Dis. 81:222-6.
- MAHMOOD, T. & RUSH, C.M. 1999. Evidence of cross-protection between *beet soilborne mosaic virus* and *beet necrotic yellow vein virus* in sugar beet. Plant Dis. 83:521-6.
- MARCONE, C. & SEEMÜLLER, E. 2001. A chromosome map of the European stone fruit yellows phytoplasma. Microbiology 147:1213-21.
- MARINHO, V.L.A.; KUMMERT, J.; RUFFLARD, G.; COLINET, D. & LEPOIVRE, P. 1998. Detection of *apple stem grooving virus* in dormant apple trees with crude extracts as templates for one-step RT-PCR. Plant Dis. 82:785-90.
- MASUTA, C.; NISHIMURA, M.; MORISHITA, H. & HATAYA, T. 1999. A single amino acid change in viral genome-associated protein of potato virus correlates with resistance breaking in 'Virgin A mutant' tobacco. Phytopathology 89:118-23.
- MAVRODI, O.V.; GARDENER, B.B.S.; MAVRODI, D.V.; BONSALE, R.F.; WELLER, D.M. & THOMASHOW, L.S. 2001. Genetic diversity of phlD de 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopathology 91:35-43.
- MES, J.J.; WIT, R.; TESTERINK, C.S.; GROOT, F.; HARING, M.A. & CORNELISSEN, B.J.C. 1999. Loss of avirulence and reduced pathogenicity of a gamma-irradiated mutant of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Phytopathology 89:1131-7.
- MIGHELI, Q.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; DEALESSI, L.; CAMPONOGARA, A. & RAMÓN-VIDAL, D. 1998. Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the β -1,4-endoglucanase gene *egl1* show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. Phytopathology 88:673-7.
- MILLS, D.; RUSSELL, B.W. & HANUS, J.W. 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology 87:853-61.
- MONTANO, H.G.; PIMENTEL, J.P. & BRIOSO, P.S.T. 2001. Detecção de fitoplasma afiliado ao grupo 16 S rRNA III em chuchu-semente proveniente de plantas com superbrotamento do chuchuzeiro no Brasil. Fitopatol. Bras. 26:508 (abstr.).
- MOREIRA-FILHO, C.A. & ALMEIDA, S.V. 2000. Genoma clínico. Biotechn. Cienc. Desenv. 16:162-7.
- NAKASHIMA, K.; KATO, S.; IWANAMI, S. & MURATA, N. 1991. Cloning and detection of chromosomal and extrachromosomal DNA from mycoplasma-like organisms that cause yellow dwarf disease of rice. App. Environ. Microbiol. 57: 3570-5.
- NASS, P.H.; DOMIER, L.L.; BIRUTE, P.J. & D'ARCY, C.J. 1998. In situ localization of *barley yellow dwarf virus*-PAV 17-kDa protein and acid nucleic in oats. Phytopathology 88:1031-9.
- OCHIAI, H.; INOUE, Y.; HASEBE, A. & KAKU, H. 2001. Construction and characterization of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* bacterial artificial chromosome library. FEMS Microbiol. Letters 200:59-65.
- OSHIMA, K.; SHIOMI, T.; KUBOYAMA, T.; SAWAYANAGI, T.; NISHIGAWA, H.; KAKIZAWA, S.; MIYATA, S.; UGAKI, M. & NAMBA, S. 2001. Isolation and characterization of derivative lines of the onion yellows phytoplasma that do not cause stunting or phloem hyperplasia. Phytopathology 91:1024-9.
- PADOVAN, A.C.; FIRRAO, G.; SCHNEIDER, B. & GIBB, K.S. 2000. Chromosome mapping of the sweet potato little leaf phytoplasma reveals genome heterogeneity within the phytoplasmas. Microbiology 146:893-902.
- PALMANO, S.; KIRKPATRICK, B.C. & FIRRAO, G. 2001. Expression of chloramphenicol acetyltransferase in *Bacillus subtilis* under the control of a phytoplasma promoter. FEMS Microbiol. Letters 199:177-9.
- PASCHOLATI, S.F.; STANGARLIN, J.R.; LEITE, B. & ESTRADA, K.R.F.S. 1998. Mecanismos da patogenicidade em fungos. Rev. Anu. Patol. Pl. 6:1-47.
- PICO, B.; DÍEZ, M.J. & NUEZ, F. 1999. Improved diagnostic techniques for *tomato yellow leaf curl virus* in tomato breeding programs. Plant Dis. 83:1006-12.
- PODLECKIS, E.V.; HAMMOND, R.W.; HURTT, S.S. & HADIDI, A. 1993. Chemiluminescent detection of potato and pome fruit viroids by digoxigenin-labeled dot blot and tissue blot hybridization. J. Virol. Methods 43:147-58.
- PROSEN, D.; HATZIOUKAS, E.; SCHAAD, N.W. & PANOPOULOS,

- N.J. 1993. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. *Phytopathology* 83:965-70.
- PRYOR, B.M. & GILBERTSON, R.L. 2001. A PCR-based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrot seed. *Plant Dis.* 85:18-23.
- REDONDO, E.; SAKATE, R.K.; YANG, S.J.; LOT, H.; LE GALL, O. & CANDRESSE, T. 2001. *Lettuce mosaic virus* pathogenicity determinants in susceptible and tolerant lettuce cultivars map to different regions of the viral genome. *MPMI* 14:804-10.
- REKAB, D.; CARRARO, L.; SCHNEIDER, B.; SEEMÜLLER, E.; CHEN, J., CHANG, C.J.; LOCCI, R. & FIRRAO, G. 1999. Geminivirus-related extrachromosomal DNAs of the X-clade phytoplasmas share high sequence similarities. *Microbiology* 145:1453-9.
- RESENDE, R.O. 1994. Perspectivas de plantas transgênicas no controle de fitovírus. In: Luz, W.C. da; Fernandes, J.M.C.; Prestes, A.M. & Picinini, E.C. (Eds.). *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo, Rapp, v.2, p.123-52.
- SALDARELLI, P.; BARBAROSSA, L.; GRIECO, F. & GALLITELLI, D. 1996. Digoxigenin-labeled riboprobes applied to phytosanitary certification of tomato in Italy. *Plant Dis.* 80:1343-6.
- SARTORATO, A.; NIETSCH, S.; BARROS, E.G. MOREIRA, M.A. 2000. RAPD and SCAR markers linked to resistência gene to angular leaf spot in common beans. *Fitopatol. Bras.* 25:637-42.
- SCHAAD, N.W.; CHEONG, S.S.; TAMAKI, S.; HATZILOUKAS, E. & PANOPOULOS, N.J. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* 85:243-8.
- SCHAAD, N.W.; BERTHIER-SCHAAD, Y.; SECHLER, A. & KNORR, D. 1999. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. *Plant Dis.* 83:1095-100.
- SCHNABEL, G. & JONES, A.L. 2001. The 14 alpha-demethylase (CYP51A1) gene is over expressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology* 91:102-10.
- SCHOEN, C.D.; KNORR, D. & LEONE, G. 1996. Detection of *potato leafroll virus* in dormant tubers by immunocapture and a fluorogenic 5' nuclease RT-PCR assay. *Phytopathology* 86:993-9.
- SILVA, A.T.; PENNA, J.C.V.; GOULART, L.R.; SANTOS, M.A. & ARANTES, N.E. 2000a. Genetic variability among and within races of *Heterodera glycines* Ichinohe assessed by RAPD markers. *Gen. & Mol. Biol.* 23:323-9.
- SILVA, J.F.V.; ABDELNOOR, R.V.; COSTA, C.L. & BAÍA, G.S. 2000b. Análise de RAPD em isolados de *Fusarium* spp. parasitas de ovos de *Heterodera glycines* ou de plantas de soja. *Fitopatol. Bras.* 25:491-6.
- SINGH, M. & SINGH, R.P. 1996. Factors affecting detection of PVY in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 60:47-57.
- SINGH, R.P.; BOUCHER, A.; LAKSHMAN, D.K. & TAVANTZIS, S.M. 1994. Multimeric non-radioactive cRNA probes improve detection of *potato spindle tuber viroid* (PSTVd). *J. Virol. Methods* 49:221-34.
- STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J.; ELLIS, J.G. & JONES, J.D.J. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268:661-7.
- 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 leafhopper. *Phytopathology* 83:655-9.
- VAN DER VLUGT, C.I.M.; DERKS, A.F.L.M. DIJKSTRA, J. & GOLDBACH, R. 1988. Towards a rapid and reliable detection method for *iris severe mosaic virus* in iris bulb. *Act. Hortic.* 234:191-8.
- VERDIER, V.; MOSQUERA, G. & ASSIGBÉTSÉ, K. 1998. Detection of the cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, by polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 82:79-83.
- VIDAVER, A.K. 1995. Coryneform and related bacteria. In: Singh, R.P. & Kohmoto, K. (Ed.). *Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases*. New York, Elsevier Science, v.1, p.247-51.
- VIDAVSKY, F. & CZOSNEK, H. 1998. Tomato breeding lines resistant and tolerant to tomato leaf curl virus issued from *Lycopersicon hirsutum*. *Phytopathology* 88:910-4.
- VUNSH, R.; ROSNER, A. & STEIN, A. 1991. Detection of *bean yellow mosaic virus* in gladioli corms by the polymerase chain reaction. *Ann. Appl. Biol.* 119:289-94.
- WANG, R.Y.; POWELL, G.; HARDIE, J. & PIRONE, T.P. 1998. Role of the helper component in vector-specific transmission of potyviruses. *J. Gen. Virol.* 79:1519-24.
- WATANABE, K.; NAGAHAMA, K. & SATO, M. 1998. A conjugative plasmid carrying the *efe* gene for ethylene-forming enzyme isolated from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Phytopathology* 88: 1205-9.
- WATERWORTH, H.E. & MOCK, R. 1999. An assessment of *nested* PCR to detect phytoplasmas in imported dormant buds and internodal tissues of quarantined tree fruit germ plasm. *Plant Dis.* 83:1047-50.

- 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.
- WILLITS, D.A. & SHERWOOD, J.E. 1999. Polymerase chain reaction detection of *Ustilago hordei* in leaves of susceptible and resistant barley varieties. *Phytopathology* 89:212-7.
- WINTON, L.M.; STONE, J.K.; WATRUD, L.S. & HANSEN, E.M. 2002. Simultaneous one-tube quantification of host and pathogen DNA with real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 92:112-6.
- WOENG, T.F.C.A.; OATES, J.E.T.; LUGTENBERG, B.J.J. & BLOEMBERG, G.V. 2001. Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains. *MPMI* 14:1006-15.
- WYLIE, S.; WILSON, C.R.; JONES, R.A.C. & JONES, M.G.K. 1993. A polymerase chain reaction assay for *cucumber mosaic virus* in lupin seeds. *Aust. J. Agric. Res.* 44:41-51.
- XU, J.; NARABU, T.; MIZUKUBO, T. & HIBI, T. 2001. A molecular marker correlated with selected virulence against the tomato resistance gene *Mi* in *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria*. *Phytopathology* 91:377-82.
- YI, H.Y.; RUFTY, R.C.; WERNSMAN, E.A. & CONKLING, M.C. 1998. Mapping the root-knot nematode resistance gene (*Rk*) in tobacco with RAPD markers. *Plant Dis.* 82:1319-22.
- YU, Y.-L.; YEH, K.-W. & LIN, C.-P. 1998. An antigenic protein gene of a phytoplasma associated with sweet potato witches' broom. *Microbiology* 144: 1257-62.
- ZHAN, J.; MUNDT, C.C. & McDONALD, B.A. 2001. Using restriction fragment length polymorphisms to assess temporal variation and estimate the number of ascospores that initiate epidemics in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 91:1011-7.
- ZHANG, A.W.; HARTMAN, G.L.; RICCIONI, L.; CHEN, W.D.; MA, R.Z. & PEDERSEN, W.L. 1997. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues. *Plant Dis.* 81:1143-9.
- 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.