

CAPÍTULO 16

Biologia Molecular Aplicada à Diagnose de Doenças de Plantas

Rivaldalve Coelho Gonçalves

1. Introdução

As doenças das plantas influenciam negativamente e de modo significativo as atividades agropecuárias e florestais em todo o mundo. Muitas epidemias tiveram como consequência grandes perdas econômicas, alterações sociais e ambientais. As doenças de origem biótica que incidem antes da colheita causam perda média de 12% na produção agrícola mundial (STRANGE; SCOTT, 2005). Mesmo em países desenvolvidos, a exemplo dos EUA, as doenças de plantas podem causar prejuízos da ordem de 1,5 bilhão de dólares ao ano (CAMPBELL et al., 1992).

Um dos fatos históricos mais relevantes sobre epidemias de doenças de plantas foi a devastação dos plantios de batata (*Solanum tuberosum* L.) por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary entre 1845 e 1850 na Europa, principalmente na Irlanda. Neste país, onde a maioria da população dependia da batata para se alimentar, as perdas na produção provocadas pela doença resultaram na morte de 2 milhões de pessoas e na emigração de 1 milhão de irlandeses para a América do Norte (BERGAMIN FILHO; KIMATI, 1995). A vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* Aims & Phillips-Mora, presente no Estado da Bahia a partir de 1989 (PEREIRA et al., 1989), causou, além do prejuízo econômico, significativa alteração da estrutura social das cidades da região sul daquele estado e resultou em perda de parte da Mata Atlântica remanescente. Na área florestal a doença "chestnut blight" causada pelo fungo *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr, em árvores de castanheira americana (*Castanea dentata* [Marshall] Borkhausen), vem desde 1904 reduzindo o número de indivíduos desta espécie em florestas nativas nos Estados Unidos (MERKEL, 1905). No Brasil, o mal-das-folhas-da-seringueira, causado por *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx, foi responsável pelos insucessos nos plantios de *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. no Estado do Pará com surtos severos a partir de 1965 (FERREIRA, 1989). Cita-se ainda a podridão-do-coleto de *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf cv. Marandu, uma doença que a partir da metade da década de 90 incide de modo fulminante nos estados do PA, RO, AC, TO e MA. Esta doença, cujo

agente patogênico primário é o cromista *Pythium peritum* (DUARTE et al., 2007), tem inviabilizado o cultivo desta importante forrageira na região.

A partir do início do século 19, diferentes estudos contribuíram para a criação e definição da Fitopatologia como ciência. A Fitopatologia dedica-se ao estudo de etiologia, diagnose, epidemiologia, interações entre plantas e patógenos e ao controle das doenças das plantas. Os estudos etiológicos do Dr. Henrich Anton De Bary, sobre a requeima da batata (DE BARY, 1876), e do Dr. Julius Kühn no final da primeira metade do século 19 constituem em marcos iniciais para a Fitopatologia. Em 1874, os estudos sobre o apodrecimento de árvores causado por fungos realizados pelo cientista Robert Hartig fundamenta a criação da especialidade Patologia Florestal (BOYCE, 1961). Paralelamente, ocorreu o desenvolvimento das especialidades da Fitopatologia como a Virologia, Bacteriologia, Micologia, Nematologia e Epidemiologia, bem como, das ciências Microbiologia, Genética, Biologia Molecular, Bioquímica, Taxonomia, Matemática e Ciências da Computação, todas contribuindo de alguma forma na construção do corpo de conhecimento necessário aos trabalhos desenvolvidos na área e ao melhor entendimento da organização dos sistemas biológicos envolvidos nas doenças das plantas. De todas as especialidades e ciências que se desenvolveram no período, a Biologia Molecular foi a responsável por um passo revolucionário no conhecimento dos sistemas biológicos terrestres. Desde então, a biologia molecular consiste na ciência que produz os conhecimentos sobre as moléculas encontradas em fósseis e nos sistemas vivos. Com a ajuda da ciência da Matemática e da Computação, estas informações moleculares têm sido úteis para explicar os fenômenos biológicos. Adicionalmente, esta ciência tem permitido uma classificação dos seres vivos que representam melhor os agrupamentos naturais entre microrganismos, bem como suas relações com as plantas.

No estudo de grupos naturais de microrganismos, espécie foi inicialmente definida como um conjunto de indivíduos que realizam cruzamentos entre si com gametas férteis contendo a metade do número de cromossomos resultando em prole fértil. A partir do conhecimento dos grupos procaríotos, vírus e viróides, esta definição é adaptada de modo que uma espécie passa a ser nestes casos um grupo de microrganismos com alto índice de similaridade genética e/ou fenotípica entre si e suficientemente diferente de outro grupo para as mesmas características.

Deste modo, a classificação de espécies e de grupos subespecíficos com base em dados moleculares constitui atualmente uma ferramenta de grande utilidade para a diagnose de doenças de plantas (LOPES et al., 2003) visando suportar as tomadas de decisões sobre qual é o agente causal e as medidas de manejo mais adequadas para o controle da doença. A diagnose visual realizada por profissional experiente constitui a abordagem mais amplamente utilizada e em maior frequência para os casos de doenças causadas por fungos, nematóides e até bactérias já conhecidas (VALLE; ZAMBOLIM, 1997; FERREIRA; MILANI, 2002; ALFENAS et al., 2004; KIMATI et al., 2005). No entanto, para outras doenças causadas principalmente por vírus, micoplasmas e bactérias, a abordagem molecular é muitas vezes imprescindível para um diagnóstico correto. Nesses casos, prescindir destas

ferramentas pode implicar no diagnóstico incorreto do agente causal e, conseqüentemente, na aplicação de medidas de controle inadequadas, as quais podem trazer não só prejuízos econômicos, mas também problemas sociais e ecológicos.

2. Biologia Molecular: o Estudo das Moléculas dos Seres Vivos

Na condição mais elementar, a vida existe em uma molécula formada por um arranjo de ligações químicas entre átomos, desde que as moléculas estejam inseridas num sistema energético ativo de um ser que possua um ciclo de vida com nascimento, reprodução e morte, podendo então dizer que há moléculas da vida. Por outro lado, cientistas se dedicam ao estudo de moléculas sinalizadoras e executoras da morte celular, sendo estas também objeto de estudo da biologia molecular (METZSTEIN; HORVITZ, 1999).

Dentre as moléculas da célula estão os ácidos nucleicos (ácido ribonucleico-RNA e ácido desoxirribonucleico-DNA), os quais são moléculas constituídas a partir de quatro bases nitrogenadas ligadas entre si por uma ligação fosfo-diéster e uma ligação ponte de hidrogênio entre as fitas. O DNA possui um carboidrato chamado desoxirribose enquanto que o RNA possui um carboidrato denominado ribose com uma hidroxila no carbono 2. Outra diferença estrutural entre estas duas moléculas é a base nitrogenada chamada uracila, presente no RNA e ausente no DNA, e a base nitrogenada timina presente no DNA e ausente no RNA. As demais, adenina, citosina e guanina, estão presentes tanto no DNA quanto no RNA (DARNELL et al., 1999). A seqüência de DNA de determinados genes e regiões intergênicas tem sido importante característica taxonômica, bem como a seqüência de RNA, uma vez que essas moléculas carregam informações genéticas comuns ao grupo e à espécie que pertencem e transferem esta informação às gerações seguintes com pouca alteração em alguns genes.

Há uma correspondência entre a proteína produzida e o gene que a codifica a partir do princípio de que para cada proteína há um único gene. As proteínas são formadas por seqüências de aminoácidos, possuem funções estruturais dentro e entre células e funções fisiológicas dentro e fora das células. Muitas proteínas são constituintes da membrana plasmática e de tubos interconectores de células, e outras são transportadoras de sinais e resposta ao ataque de pragas, doenças e agentes abióticos. As proteínas são encontradas em todos os seres vivos, exceto nos viróides, na membrana plasmática das células, nos ribossomos, no DNA, no citoplasma e nos capsídeos virais. Outro fato importante envolvendo as proteínas é a emergência de doenças em animais, a exemplo da vaca louca causada por proteínas infecciosas chamadas de "prions" (PRUSINER, 1998).

As proteínas podem ser utilizadas como moléculas informativas para a diagnose de doenças de plantas, a exemplo do perfil de isoenzimas como ferramenta para diferenciação de espécies ou raças de microrganismos (BONDE

et al., 1993). O princípio da técnica de eletroforese de isoenzimas está no fato de que ao revelar o gel submetido ao campo elétrico em condições controladas e visualizar as marcas, as diferentes distâncias de mobilidade de cada isoenzima dos diferentes organismos em estudo representam diferenças genéticas entre eles, portanto, diferenças nas seqüências de DNA correspondentes às mesmas (MURPHY et al., 1990). No entanto, devido às variações nesta característica decorrentes de fatores ambientais, o uso seguro desta técnica deve ser precedido de experiência e conhecimento do sistema com o tempo de utilização. Esta ferramenta ainda hoje é considerada viável em eficiência e custo na diagnose de doenças causadas por nematóides, principalmente quando se complementa esta informação com dados morfológicos e morfométricos.

Outra técnica que faz uso de proteínas para inferências taxonômicas é o perfil de proteínas totais, obtido por eletroforese unidirecional ou bidirecional com pulsos elétricos. Embora seja utilizada na taxonomia e caracterização de populações de microrganismos, esta técnica não tem sido utilizada como ferramenta de diagnose devido à dificuldade de operação, variações decorrentes de fatores ambientais e custo elevado.

Por outro lado, as proteínas carregam informações precisas e estáveis na seqüência de aminoácidos e esta abordagem é utilizada como critério de distinção de vírus. Após o seqüenciamento dos aminoácidos da proteína que se deseja estudar, faz-se a análise de similaridade das seqüências obtidas dos diferentes isolados e por meio de análise de agrupamento obtém-se o nome da espécie dos organismos em teste.

Outra importante abordagem sobre o uso de informações de proteínas é o perfil indireto de enzimas obtido a partir de testes bioquímicos com espécimes de bactérias e leveduras utilizando-se fontes isoladas de carbono e nitrogênio (JONES et al., 1993). Nestes testes realizados em microplacas ou tubos de ensaio, uma única fonte de carbono e/ou nitrogênio é oferecida ao organismo teste para avaliar a produção ou não da enzima relacionada ao substrato. Deste modo, um espécime capaz de utilizar a L-asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio certamente produz a enzima asparaginase a qual converte aquele substrato em aspartato. Uma série de substâncias, a exemplo de ácido acético, maltose, sacarose, glicogênio, etc., irá revelar um extenso perfil de enzimas do espécime estudado, fornecendo desta maneira informações com grande importância para a taxonomia.

Os ácidos graxos, que podem ser estudados para fins taxonômicos, são moléculas presentes em células dos seres vivos e possuem função estrutural na membrana plasmática e no envelope viral, além de servir como reserva de energia no citoplasma. Em bactérias, fungos filamentosos e leveduras, o perfil quali-quantitativo de ácidos graxos é importante como característica taxonômica para definir agrupamentos naturais na espécie.

3. Diagnose Molecular Baseada em DNA e RNA

A partir da descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick em 1953, uma verdadeira revolução no avanço do conhecimento científico

sobre a vida na terra tomou curso e, desde então, a humanidade tem se empenhado em conhecer a estrutura física e funcional do genoma de um número cada vez maior de espécies.

Com o conhecimento da estrutura física do genoma de microrganismos, pôde-se elaborar um sistema de classificação mais estável baseado na seqüência de genes marcadores em nível de espécie ou mesmo de táxons subespecíficos (TAYLOR et al., 1999). Esta abordagem apresenta a vantagem de contar com reduzidas taxas de mudanças em relação aos caracteres fenotípicos. Dados fenotípicos são muito sensíveis às alterações ambientais e eram as únicas ferramentas que embasavam a classificação de microrganismos até a consolidação das tecnologias para clonagem e seqüenciamento de genes ou regiões marcadoras dos patógenos alvos. Com o conhecimento da estrutura física do genoma de fitopatógenos é possível também detectá-los em plantas por meio de diversas técnicas a exemplo da reação em cadeia da polimerase (PCR) usando primers específicos que amplificam regiões genômicas marcadoras do grupo de isolados, notadamente patógenos de difícil isolamento e/ou cultivo in vitro como *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros (POOLER; HARTUNG, 1995).

4. Hibridização Molecular, Marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polimorfism) e AFLP (Amplified Fragment Length Polimorfism)

A correta identificação de um microrganismo para efeito de diagnose molecular de doença de plantas pode ser realizada por meio de diferentes técnicas baseadas na seqüência do DNA. Uma técnica muito utilizada para a detecção e diagnóstico de fungos, vírus e bactérias é denominada hibridização (por exemplo, o "dot-blot"). Nesta, uma coleção de isolados do fitopatógeno que se deseja detectar deve ser amostrada e seu material genético extraído para estudos de marcas reveladas em géis que possam separar este fitopatógenos de outras espécies. Após ter uma marca molecular específica do patógeno que causa a doença-alvo, a seqüência de DNA correspondente ao marcador é feita, radioativamente, com isótopos de fósforo - (P^{32}) - ou etiquetada com um substrato sensível a uma enzima que o converte em produto colorido visível a olho nu. Na marcação radioativa com P^{32} , a resolução da técnica é maior em relação à marcação colorimétrica ou quimioluminescente com digoxigenina ou biotina, no entanto, atualmente a quimioluminescência com marcadores modernos torna a resolução desta técnica semelhante àquela obtida pela marcação com radioisótopos. A sonda pode ser de DNA ou RNA. Em geral, as sondas são feitas de DNA a partir de clones contendo seqüência parcial do genoma do patógeno. No preparo de sondas para detecção de vírus de RNA e viróides, o RNA específico extraído da planta infectada é convertido em DNA complementar (cDNA) por meio de reação química com a enzima transcriptase reversa. O cDNA obtido é inserido em plasmídeos e

transferido para *Escherichia coli* (DUSI; MARINHO, 2001). Para a produção das sondas, uma PCR pode ser realizada contendo nucleotídeos marcados utilizando o inserto como molde.

Para a execução da técnica "dot-blot", o pesquisador deve analisar o material vegetal e hipotetizar sobre a espécie, subespécie ou raça presente do agente causal, para em seguida escolher a sonda de DNA ou RNA adequada (MEINKOTH; WAHJ, 1984).

O tecido contaminado ou infectado é triturado e o DNA presente é desnaturado, aplicado diretamente na membrana de náilon ou nitrocelulose na forma de pontos e fixado em aparatos específicos para este fim, como por exemplo Bio-Dot SF (Bio-Rad Laboratories). Em seguida, uma solução de DNA, em geral de esperma de salmão, é aplicada sobre a membrana para pré-hibridização com o objetivo de bloquear sítios livres da mesma e evitar que a sonda se ligue nestes sítios. Para hibridizar com a sonda específica do patógeno-alvo, a membrana pré-hibridizada é retirada da primeira solução e colocada para hibridizar na solução da sonda de detecção em um forno de hibridização com temperatura e tempo pré-determinado. Depois de decorrido o tempo de hibridização, a membrana é retirada, lavada para remover o excesso de sonda e revelada (Fig. 1).

Outra técnica importante na diagnose de doenças de plantas é a RFLP que consiste na análise do polimorfismo no comprimento do fragmento DNA após digestão com enzima de restrição. Este polimorfismo origina-se das diferenças nas seqüências do DNA dos organismos em estudo e do fragmento gerado pelo corte da fita dupla com enzima de restrição. A técnica consiste em obter o DNA do microrganismo que se deseja identificar e digerir este DNA com enzimas de restrição. Em seguida, aplica-se o DNA digerido em um gel de agarose ou poliacrilamida e depois de decorrida a eletroforese, cora-se o gel com brometo de etídeo ou prata e as marcas são visualizadas e comparadas com o padrão que se tem para o microrganismo que se deseja detectar.

A técnica RFLP também pode ser empregada para estudos de diversidade genética e detecção de fitoplasmas e bactérias fitopatogênicas, notadamente de fitobactérias fastidiosas numa combinação de técnicas denominadas PCR-RFLP. No caso de fitobactérias, genes *hrp* ou mesmo de regiões intergênicas dos genes 16S ou 23S do DNA ribossomal (rDNA) podem ser utilizados para este propósito (POUSSIER et al., 1999).

A técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) consiste em extrair o DNA do microrganismo, fragmentá-lo com enzimas específicas e ligar adaptadores de dupla fita aos fragmentos, para posteriormente proceder a uma PCR com primers indicados e dNTP radioativo ou fluorescente (VOS et al., 1995). Em seguida, procede-se à eletroforese em um gel de poliacrilamida e a revelação das marcas (JANSSEN et al., 1996) ou a leitura pode ser feita em um equipamento apropriado com sensor para fluorescência. Em todos os casos, a análise dos dados consiste em tabular os resultados em uma planilha com respostas positivas e negativas para cada marca em um programa de computador. A análise de agrupamento irá mostrar a qual espécie pertence o isolado em teste, desde que a estes dados sejam incorporados os dados

dos isolados tipos. Em casos de doenças específicas, a presença de uma a poucas marcas exclusivas no gel é o suficiente para detectar o patógeno inclusive na subespécie (AVROVA et al., 2002).

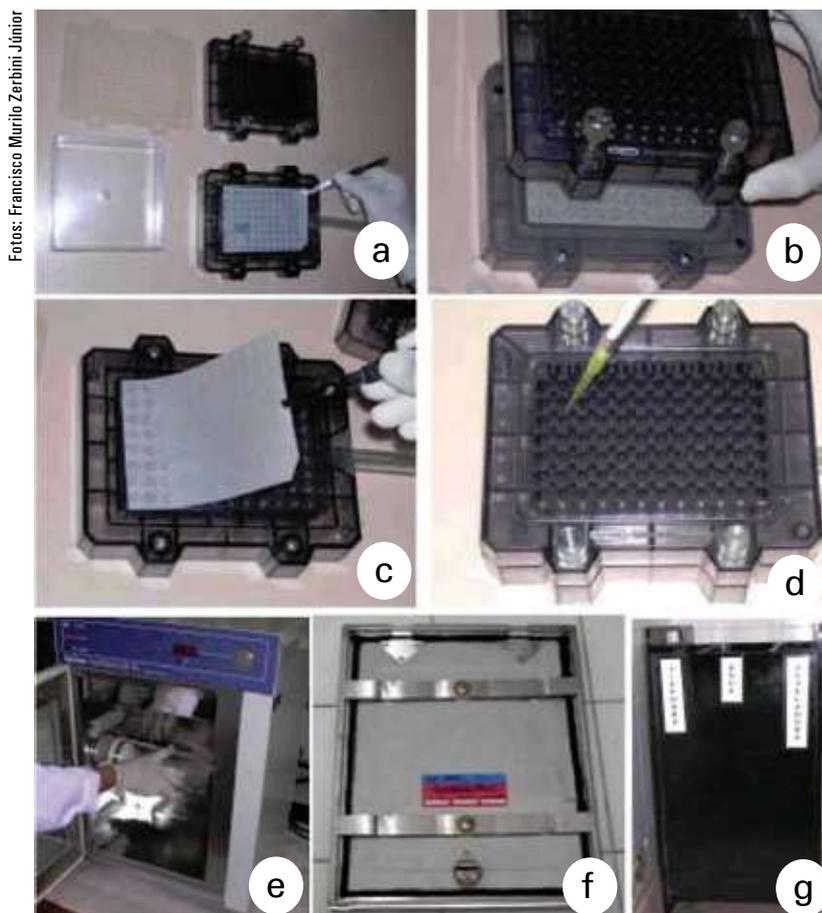


Fig. 1. Etapas da técnica "dot-blot" para detecção de patógenos e diagnose molecular de doenças de plantas com sondas: montagem das membranas e aplicação da amostra no aparato Bio-dot (a, b, c, d), forno de hibridização (e), cassete de revelação (f) e tanque de revelação da membrana (g).

5. PCR, Marcadores do Tipo ARDRA, RAPD e PCR Quantitativa

A técnica de PCR (Polimerase Reaction Chain) (MULLIS; FALONA, 1987) baseia-se no aumento do número de cópias de seqüências de DNA de interesse por meio de reação enzimática *in vitro*. Para processar a reação, combinam-se em um tubo ou placa de reação o DNA molde, dois ologonucleotídeos iniciadores ou "primers", os dNTPs (deoxynucleotídeos

fosfatos: dATP, dTTP, dCTP e dGTP), a enzima polimerase de DNA termoestável e a solução tampão da reação. Estes tubos são colocados dentro de um equipamento denominado termociclador programado para condicionar binômios de tempo e temperatura adequados a cada etapa da reação. Deste modo, a primeira etapa consiste na desnaturação do DNA obtida pela elevação da temperatura. Após a desnaturação do DNA, o equipamento abaixa a temperatura para que os oligonucleotídeos iniciadores se liguem às fitas simples e assim ocorra a etapa de anelamento. A temperatura de anelamento varia de 25°C a 65°C e serve como estratégia de amplificação específica devido ao aumento de estringência com a elevação da temperatura de anelamento. Na etapa de extensão da fita, o termociclador é programado para manter a temperatura em 72°C quando a enzima realiza a polimerização das duas novas fitas. Depois de decorrido o tempo programado para a polimerização, as fitas se separam em nova etapa de desnaturação pela elevação de temperatura e, subseqüentemente, os iniciadores novamente se ligam nas fitas moldes antigas e nas fitas moldes que foram produzidas na primeira reação. Após esta segunda polimerização estarão formadas as duas primeiras seqüências de DNA no tamanho definido pelo par de oligonucleotídeos iniciadores colocados no tubo de reação. Há a amplificação de fragmentos maiores que os definidos pelo par de primers, uma vez que o DNA molde original continua presente no tubo de reação, mas, a quantidade deste DNA amplificado no produto final não é significativa. A seqüência molde alvo de tamanho definido pelos primers é chamada de "amplicon" e a multiplicação destas seqüências se dá em progressão geométrica de ordem 2. O produto da reação é resultado da amplificação específica da região anelada pelos primers e bastam algumas cópias de DNA para que seja possível realizar a PCR. Deste modo, a técnica de PCR caracteriza-se por ser de alta sensibilidade, especificidade, rapidez (WEISING et al., 1995) e facilidade de execução. Alguns fatores como a temperatura de anelamento, a concentração de magnésio, a presença de inibidores químicos, a quantidade e atividade da enzima polimerase e a quantidade e especificidade dos primers influenciam na eficiência da reação, sendo, às vezes, necessário ajustes iniciais nestes fatores em cada estudo.

O uso de PCR, associado à digestão com enzimas de restrição, é viável pela eficácia em discriminar grupos de microrganismos, principalmente quando são realizados em seqüências conservadas entre espécies. Deste modo, a digestão enzimática pode ser combinada com a PCR para produzir um perfil de marcas do DNA amplificado. Para tanto, depois de realizada a PCR, as seqüências obtidas são digeridas com enzimas de restrição e o produto digerido é separado por eletroforese.

A técnica ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) consiste em proceder a uma análise do padrão de bandas resultantes da digestão de seqüências de rDNA com enzimas de restrição. Espécies do nematóide *Bursaphelenchus* Fuchs podem ser identificadas por esta técnica utilizando-se ITS-RFLP com primers específicos para amplificar as regiões ITS1 e ITS2 (BRAASCH et al., 1999). Em seguida

as seqüências são digeridas com as enzimas RsaI, HaeIII, MspI, HinfI e AlI e o produto visualizado em gel de agarose. Esta técnica também tem sido empregada com sucesso para distinção de fungos (OLIVEIRA; COSTA, 2002). Para fitoplasmas, a identificação pode ser feita a partir da aplicação do produto da digestão com enzimas de restrição nas seqüências de rDNA16S destes microrganismos (LEE et al., 2001), bem como para a identificação da bactéria *Ralstonia solanacearum* em eucalipto (Fig. 2).

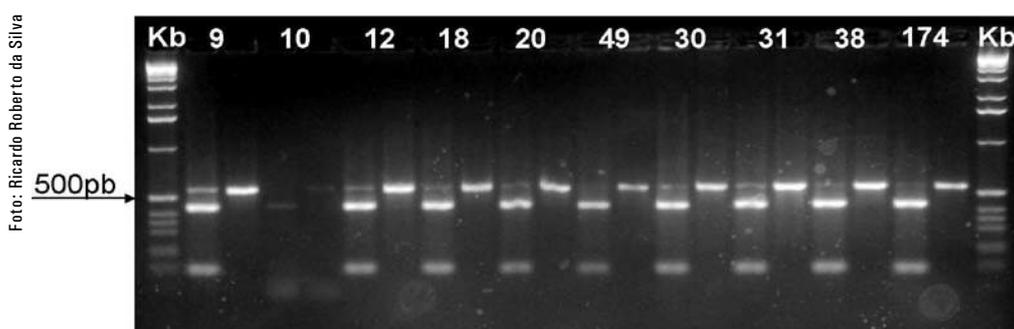


Fig. 2. Padrão de restrição do rDNA16S obtido com a enzima RsaI para diferentes isolados de *Ralstonia solanacearum* de eucalipto.

Kb = 1 Kb DNA Ladder à esquerda; produto de PCR não digerido à direita.

A técnica denominada RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) consiste em extrair o DNA do microrganismo de interesse e proceder a uma reação de PCR com pequenos primers de seqüência arbitrária e ricos em GC. Em seguida, o produto da PCR é aplicado no gel de agarose e submetido à eletroforese para separação dos fragmentos. Depois de decorrido um tempo pré-definido, o gel é visualizado e os dados são analisados como presença ou ausência das marcas genéticas. Esta técnica tornou-se amplamente utilizada a partir de 1990 (WILLIAMS et al., 1999) e pode ser usada para detecção de raças de fungos (KURAMAE; SOUZA, 2002) e estirpes de bactérias.

A PCR quantitativa ou PCR em tempo real consiste na multiplicação enzimática de seqüências de DNA e detecção do produto amplificado por fluorescência durante a amplificação. A técnica consiste em aplicar princípios básicos da PCR tradicional somado ao uso de sondas fluorescentes e detecção dos produtos em tempo real. A detecção do produto amplificado ou "amplicons" pode ser realizada por diferentes sistemas fluorescentes (MACKAY et al., 2002). O sistema TaqMan® consiste em adicionar um oligonucleotídeo denominado sonda TaqMan® que contém na extremidade 5', um composto de alta energia denominado "reporter" e na extremidade 3', uma molécula receptora de energia denominada "quencher" ao mix de PCR. Esta sonda é desenhada para anelar especificamente na fita molde entre os primers reverse e forward. Após cada ciclo da reação, subsequentemente à polimerização, a enzima Taq polimerase atua como uma exonuclease no sentido 5'-3', degrada a sonda e libera as duas moléculas.

A molécula “quencher” liberada e com energia emite fluorescência que é detectada pelo sensor do equipamento, sendo proporcional à quantidade de produto amplificado (Fig. 3).

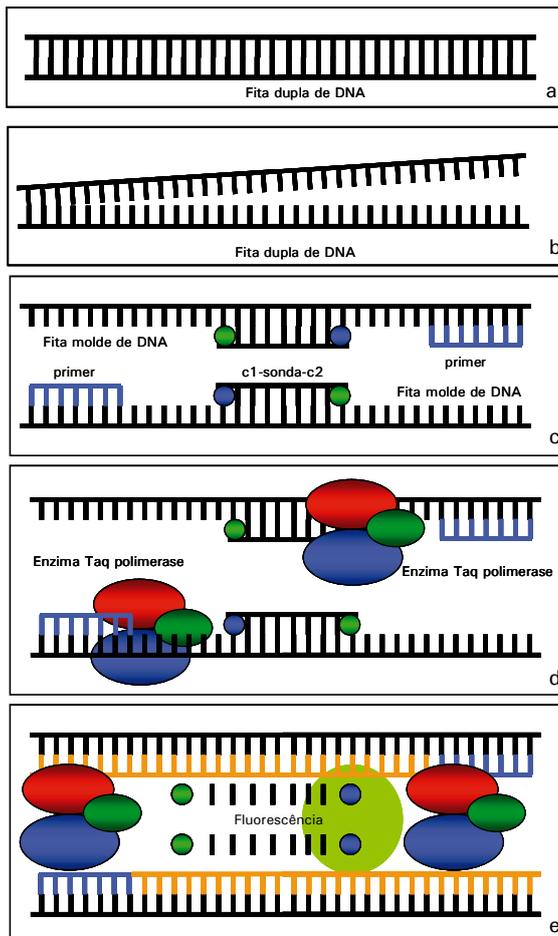


Fig. 3. Estágios da técnica PCR em tempo real com o sistema TaqMan® de sondas ligadas a uma molécula de cromóforo e uma molécula “quencher”: a) fita dupla de DNA molde intacta; b) desnaturação do DNA molde e separação das fitas; c) anelamento dos primers e da sonda TaqMan® marcada; d) polimerização das novas fitas e desligamento dos cromóforos e “quenchers”; e) desligamento da polimerase e emissão de fluorescência forte.

A proximidade entre os cromóforos na sonda original antes do anelamento evita as emissões de fluorescência após excitação a partir da fonte de luz do termociclador. A detecção da seqüência alvo é obtida quando o equipamento, por meio de um programa de computador, indica que foi atingido o primeiro valor detectável acima do limite de referência, o qual é definido como a fluorescência de base sem ocorrer reação de PCR (Fig. 4).

Outro sistema interessante para ser utilizado em PCR quantitativa é o de “molecular beacons” (TYAGI; KRAMER, 1996). Neste sistema, as oligosondas também possuem fluoróforos e quenchers nas extremidades, mas apresentam uma conformação secundária de DNA tipo haste e alça com os cromóforos próximos entre si e parte da fita anelada no início da reação enzimática. Na alça, há uma seqüência complementar à fita molde de DNA, de modo que, quando a reação se processa, a sonda hibridiza-se com a fita molde e adota uma

conformação linear mantendo distantes os cromóforos. Nesta situação, uma pequena quantidade de fluorescência é produzida e corrigida pelo programa de modo a não interferir na detecção. A possibilidade de utilização de fluoróforos de diferentes cores na mesma reação permite detectar diferentes seqüências alvo.

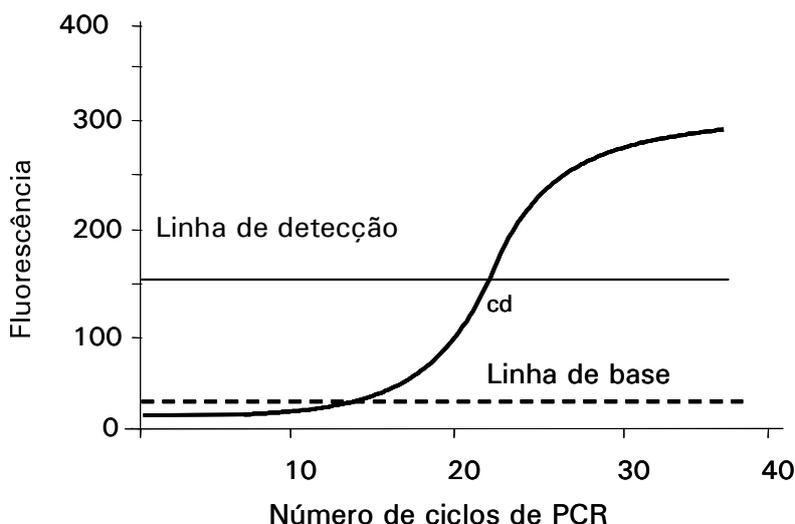


Fig. 4. Curva hipotética de amplificação de seqüência de DNA de um fitopatógeno via PCR em tempo real.

Onde: cd – ciclo de detecção do fitopatógeno.

O sistema SYBR® Green para PCR em tempo real também é fluorescente e tem como características o baixo custo relativo aos demais, maior factibilidade e inespecificidade quanto ao substrato de fita dupla. O uso deste sistema baseia-se na adição de um cromóforo denominado SYBR Green ao mix da reação de PCR no início da reação (VITZTHUM et al., 1999). A molécula de SYBR Green apresenta um pequeno nível de fluorescência basal sem estar ligada à fita dupla de DNA, o que não interfere na quantificação dos amplicons e na detecção da seqüência alvo, uma vez que esta quantidade basal é considerada pelo programa. Os picos de fluorescência aumentam de acordo com o aumento do número de fitas duplas no mix da reação, uma vez que o composto intercala-se e liga-se à fita dupla e desliga-se da mesma durante a desnaturação (Fig. 5).

Atualmente, uma série de equipamentos está disponível no mercado para a prática de PCR em tempo real como o Gene Amp 5700® da Applied Biosystems (Foster City, Califórnia), o iCycler iQ™ da empresa Bio-Rad (Hércules, Califórnia) e o Smart Cycler® TD da Idaho Technologies (Salt Lake City, Uta), além de outros. Até o momento apenas o Smart Cycler® TD tem a capacidade de realizar até 16 reações independentes. Para viabilizar a aplicação prática da PCR em tempo real na área de Fitopatologia, alguns protocolos foram desenvolvidos para detectar fungos em sementes (ZHANG et al., 1999), bactérias em sementes (BERG et al., 2006) e vírus em tecidos de plantas (ROBERTS et al., 2000).

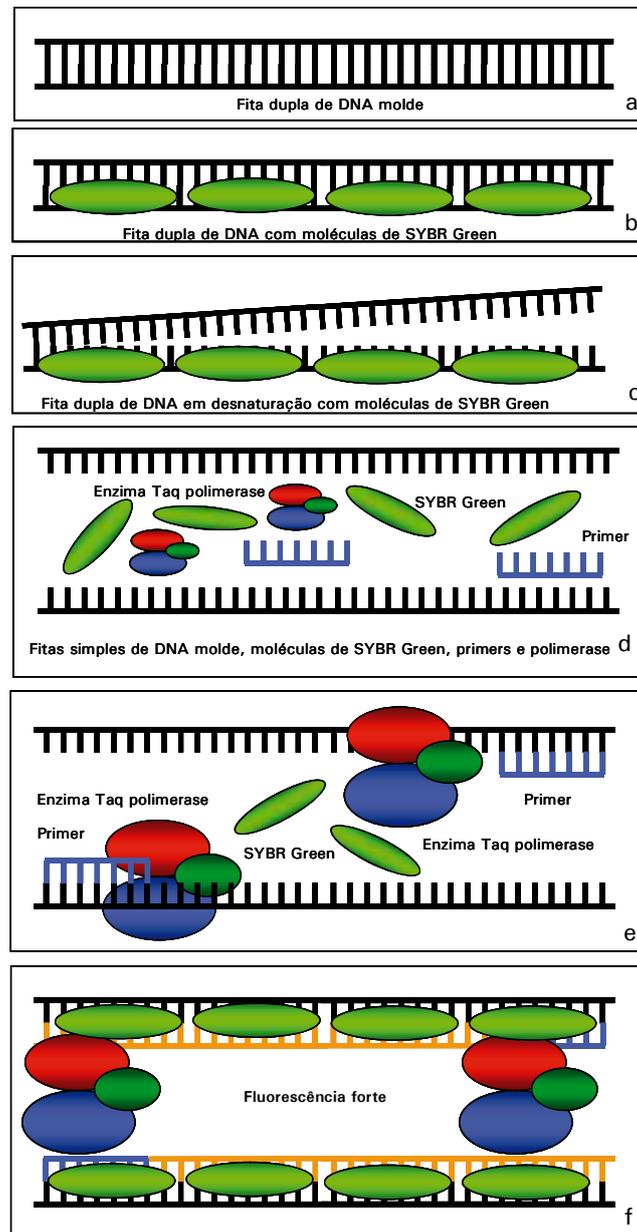


Fig. 5. Estágios da técnica PCR em tempo real com o sistema SYBR Green®: a) fita dupla de DNA molde intacta; b) integração e ligação do corante à fita dupla; c) desnaturação do DNA molde, separação das fitas e desligamento do corante; d) solução contendo DNA molde, primers, polimerase e corante; e) anelamento dos primers e acoplamento da polimerase; f) polimerização das novas fitas, desligamento da polimerase e ligamento do corante nas fitas duplas de DNA.

6. Reação em Cadeia da Polimerase e Análise Filogenética de Seqüências do DNA Genômico

A escolha da PCR associada à análise filogenética de seqüências como técnica padrão para diagnose de doenças de plantas depende de boa infra-estrutura no laboratório para extração de DNA, seqüenciamento e análise de dados. Após a análise do material vegetal, o pesquisador pode optar por isolar primeiramente o microrganismo em meio de cultura e multiplicá-lo para extração de DNA. Não sendo possível cultivar o patógeno em meio de cultura, a PCR poderá ser realizada com extrato vegetal ou DNA extraído dos tecidos infectados. Os fragmentos de DNA amplificados poderão ser clonados em vetores ou enviados diretamente para seqüenciamento. Quando se trata de doença sem sinais visíveis do patógeno, uma série de inferências é feita no material coletado em diferentes idades e sintomas, antes de se proceder à análise molecular. Quando não é possível a verificação de sinais do patógeno no tecido atacado com microscópio de luz e acredita-se que a doença é causada por um agente biótico, primers específicos para micoplasmas, vírus e viróides são avaliados. No caso de ocorrência de um fungo desconhecido cultivável em meio de cultura, ou conhecido mas não ao nível taxonômico desejado, pode-se realizar a identificação molecular por meio de seqüências correspondentes a rDNA 18S, 5.8S e ITS de rDNA ("Internal Transcribed Spacer" de DNA Ribosomal Nuclear) com o uso de primers universais. Outras regiões genômicas também são importantes para diferenciar espécies, a exemplo do gene correspondente ao rDNA 28S, TEFa (fator de tradução e alongação 1-alfa), RPB1 (subunidade I da RNA polimerase II). O mesmo procedimento com primers universais pode ser adotado para diagnose molecular de nematóides e bactérias, sendo neste último caso utilizados primers para amplificação do rDNA16s ou regiões específicas do genoma. Em todos estes casos, depois de obtida a seqüência do gene, uma análise filogenética para fins taxonômicos é realizada em programas de computador (Fig. 6) (GONÇALVES, 2003). Primers exclusivos para espécies até grupos infra-subespecíficos (KURAMAE; SOUZA, 2002; MAHUKU et al., 2006) também podem ser utilizados na diagnose molecular de doenças de plantas causadas por fungos e bactérias bem como para espécies de micoplasmas, vírus e viróides (LEE et al., 2001; ZERBINI et al., 2001; DUSI; MARINHO, 2001). Nesses casos, a presença de uma banda marcadora do grupo no gel significa resultado positivo para a diagnose, tendo como comparador um isolado tipo do grupo. Marcadores baseados em seqüências repetitivas, a exemplo das seqüências ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence), REP (Repetitive Extragenic Palindromic Sequence) e BOX, podem ser utilizados para caracterizar populações específicas e,

nestes casos, tornam-se ferramentas valiosas na diagnose molecular de isolados de interesse (WILLIAMS; FITT, 1999).

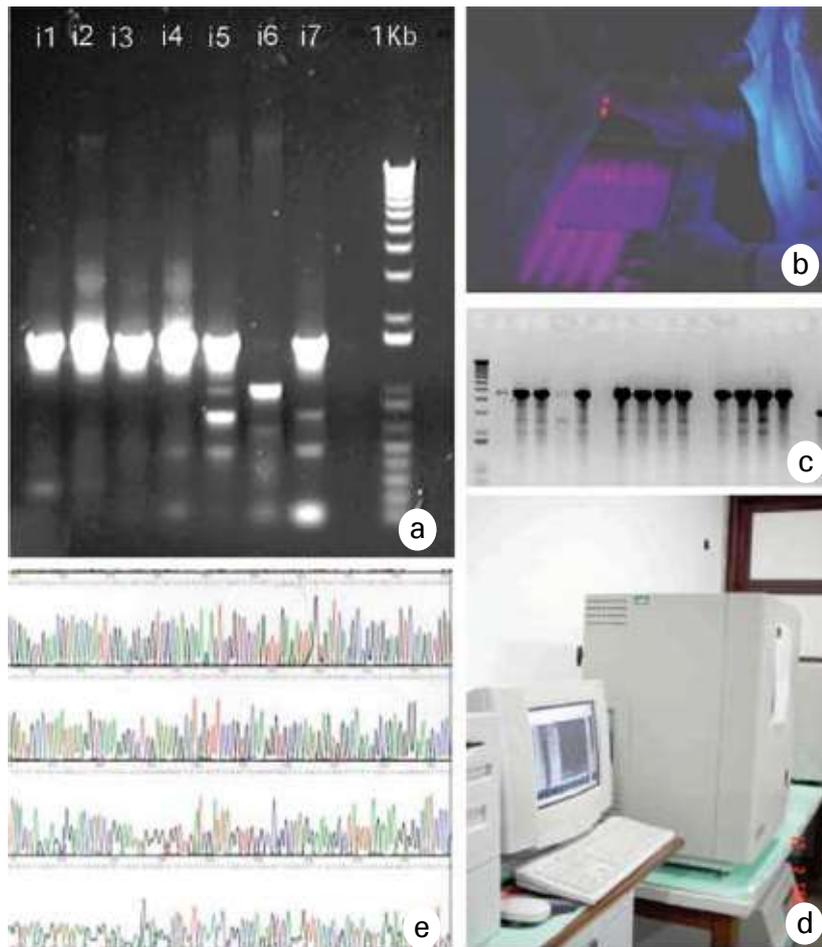


Fig. 6. Etapas da identificação molecular de fitobactérias por análise filogenética de seqüências de rDNA16S a partir de DNA de diferentes isolados de bactérias patogênicas ao eucalipto (i1a i7); e à direita marcador 1Kb: a) gel de agarose com fragmentos amplificados via PCR; b) gel visualizado em luz ultravioleta; c) gel com marcas fortes dos plasmídeos contendo os genes; d) seqüenciador automático ABI Prism 377; e) eletroferograma parcial de seqüência de DNA.

7. Perfil de Ácidos Graxos (Fame)

Os lipídeos ou ácidos graxos são extensas moléculas com esqueleto de carbono que têm a função de estruturar a membrana plasmática e

servir de reserva de energia. Em fungos e bactérias, o perfil qualitativo de ácidos graxos por meio de cromatografia gasosa pode ser utilizado na diagnose molecular de doenças de plantas (LANOISELET et al., 2005). Atualmente, um sistema automatizado denominado MD (Microbial Identification System) é capaz de identificar com grande precisão fungos filamentosos, leveduras e bactérias por meio da análise qualitativa e quantitativa dos ácidos graxos presentes na parede celular destes microrganismos. Este sistema constitui de um cromatógrafo gasoso acoplado a um computador, o qual armazena a base de dados dos perfis de ácidos graxos de uma grande coleção de espécimes, além do programa que analisa os dados obtidos na leitura do cromatógrafo. A metodologia de identificação consiste em cultivar o microrganismo alvo, extrair os ácidos graxos, aplicar a amostra e aguardar os resultados que saem em forma de gráficos e tabelas com a indicação da espécie e índice de similaridade. Para os casos em que não há na base de dados informações suficientes para reconhecer o organismo que se deseja identificar, o sistema indica os *taxa* mais prováveis e seus respectivos valores de similaridade, além do perfil encontrado na amostra. A identificação de bactérias com este sistema pode constituir rotina na diagnose molecular de doenças de plantas, além de ser mais uma ferramenta de trabalho para a pesquisa que envolve a taxonomia de fitopatógenos. A desvantagem é que esse sistema é caro e existe em poucos laboratórios no Brasil. Contudo, apresenta vantagens para trabalhos taxonômicos pois já possui uma extensa biblioteca e um programa de análise de dados, mesmo havendo limitações devido à baixa repetibilidade de resultados para usuários iniciantes e para isolados desconhecidos de sua base de dados. Este sistema tem sido usado com sucesso para a identificação de *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas* spp. (YANG et al., 1993, JANSEN et al., 1996).

8. Perfil Isoenzimático por Eletroforese, Perfil Indireto de Enzimas e Análise Sorológica

Toda proteína é codificada por um gene correspondente. Ao considerar as pequenas variações no genoma de espécies de um mesmo gênero, a ausência de uma determinada proteína em uma espécie dada por uma pequena alteração no alelo do gene responsável por sua codificação pode ser considerada uma característica taxonômica fenotípica, a exemplo dos padrões de ranhuras na parte posterior de fêmeas de fitonematóides. Ao reunir informações da presença ou ausência de proteínas denominadas isoenzimas em número suficiente para separar as várias espécies dentro de um gênero e espécimes de

uma espécie, ou ainda, raças dentro da espécie, o pesquisador poderá auxiliar-se deste recurso para a diagnose de uma determinada doença. O perfil de isoenzimas é uma técnica que após sua implementação e padronização apresenta utilização simples, eficaz e de baixo custo, sendo seu emprego direcionado aos patógenos cuja informação de perfis de isoenzimas está bem caracterizada.

No caso de análise do perfil indireto de enzimas, inicialmente os espécimes em cultura pura são cultivados em meios que contêm fontes distintas de carbono, nitrogênio, lipídeos, aminoácidos e outras substâncias. Estes testes são realizados em tubos de ensaio fornecendo separadamente cada substância que se deseja avaliar quanto à utilização ou não pelo microrganismo alvo. Frequentemente, estes testes são empregados na diagnose de doenças causadas por bactérias. Atualmente, sistemas automatizados têm sido muito utilizados para facilitar parte deste trabalho, não dispensando, no entanto, a inclusão de provas bioquímicas em alguns dos testes necessários em cada gênero. No caso de não dispor de sistema automatizado, o pesquisador deve realizar uma análise numérica de uma grande quantidade de dados utilizando-se para tanto um programa de computador apropriado. O sistema de análise de perfil de uso de fontes de carbono BIOLOG® (JONES et al., 1993) tem este objetivo e consiste em avaliar a existência e produção de enzimas capazes de converter substratos diversos de fontes de carbono presentes numa microplaca contendo um corante indicador. Com os resultados de positivo ou negativo para cada fonte de carbono, o sistema permite por meio de análise de agrupamento perfazer uma taxonomia numérica (Fig. 7) e indicar a espécie presente. Devido ao aumento da complexidade do trabalho taxonômico a partir de provas bioquímicas necessárias, outro sistema possível de uso automatizado ou manual denominado API® System (BioMérieux, França) (Analytical Profile Index) tem sido utilizado em taxonomia de fitobactérias, a exemplo de *Serratia* spp. (RASCOE, et al., 2003) e *Erwinia* spp. (SHUERGER; BATZER, 1993).

Já a análise sorológica para a detecção de patógenos conhecidos é uma técnica muito útil na diagnose de doença de plantas devido ao baixo custo e facilidade de execução. A técnica consiste na extração de proteínas do agente causal da doença, a partir da planta com sintomas de doença causada por vírus, fungos ou bactérias ou mesmo a partir de cultura pura de bactérias ou fungos, e análise deste material mediante a técnica conhecida como Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay) (CLARK; ADAMS, 1977). Em seguida, anticorpos específicos conjugados com a enzima catalizadora do teste devem ser adicionados à amostra alvo, conjuntamente com um substrato para reação colorimétrica, por exemplo, p-nitrofenilfosfato. O resultado é lido com um sensor colorimétrico denominado espectrofotômetro em comprimentos de onda específicos para cada enzima.

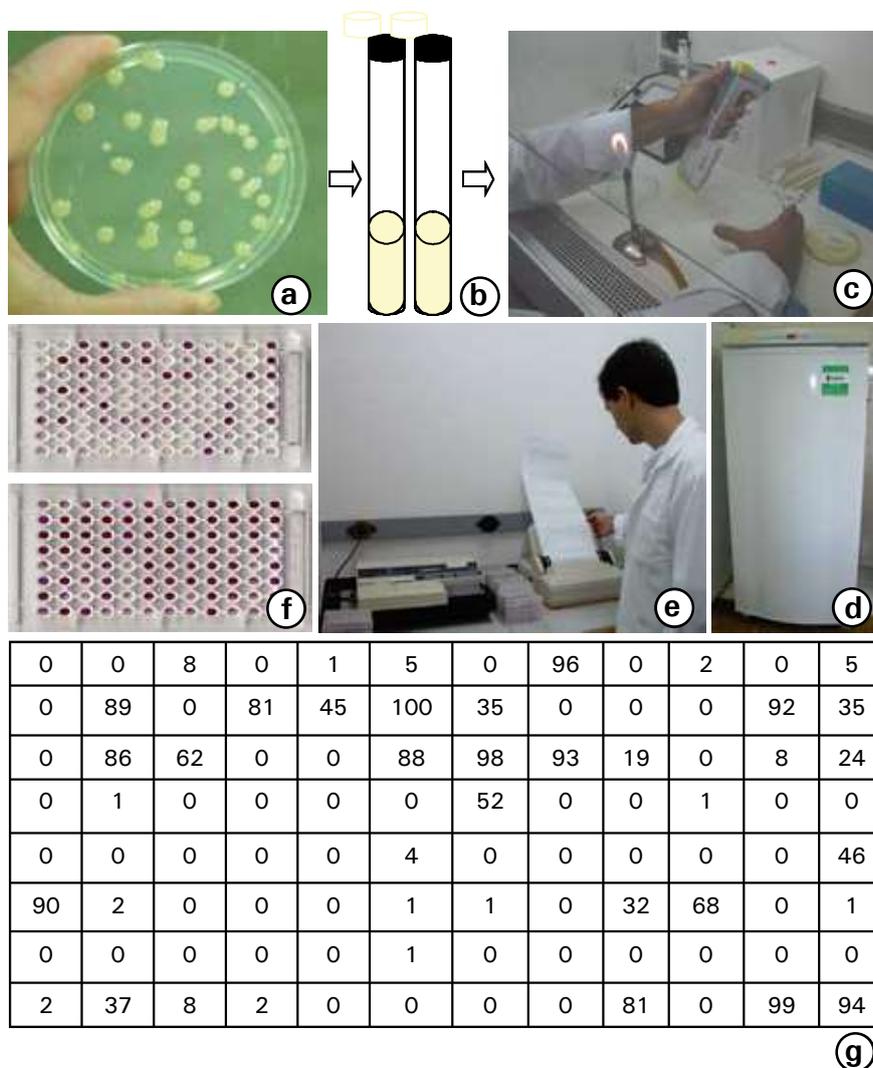


Fig. 7. Análise do perfil de utilização de fontes de carbono por bactérias fitopatogênicas: a) colônias de bactéria em meio Biolog; b) suspensão de bactérias em tubos; c) microplacas em fase de semeio da suspensão de bactérias; d) câmara BOD para cultivo de bactéria; e) equipamento leitor de placas de Elisa; f) microplacas com resultados positivos (poços roxos) e negativos (poços claros); g) tabela com resultados da porcentagem de isolados da espécie com resultado positivo para a fonte de carbono.

9. Conclusões

Para a tomada de decisão quanto às ações a serem realizadas visando ao controle ou manejo integrado de doenças numa planta ou numa população de plantas, sejam cultivadas ou daninhas, é fundamental ter a diagnose

correta da doença com a identificação precisa do agente causal. Tecnologias modernas que associam uma abordagem múltipla como as técnicas de avaliação do perfil genotípico e fenotípico de agentes bióticos causadores de doenças em plantas são ferramentas fundamentais para uma diagnose eficaz. A partir do desenvolvimento da biologia molecular, concomitantemente com a ciência da Computação, da Microbiologia e da Fitopatologia, tornou-se possível avaliar um maior número de características dos fitopatógenos, tanto do genoma ou mesmo de plasmídeos no caso de bactérias, utilizando-se hibridização com sondas, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), marcadores AFLP, RAPD, ARDRA, PCR (Polymerase Chain Reaction) e PCR quantitativa (POOLER et al., 1995). Adicionalmente, as técnicas que empregam sistemas automatizados ou não para avaliar o perfil de ácidos graxos da parede celular (FAME), o perfil de utilização de fontes de carbono (p. ex. BIOLOG) e o perfil de proteínas reúnem em suas bibliotecas respostas dos isolados tipos e de uma ampla gama de espécimes de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Para os nematóides, o perfil de isoenzimas e a morfologia são as técnicas predominantes para a diagnose, com uma crescente tendência ao uso de marcadores moleculares, fundamentadas em seqüências de DNA. Este aumento do conhecimento das características genotípicas e fenotípicas de fitopatógenos associadas às especificidades dos mesmos quanto aos hospedeiros e ao clima permitiu classificá-los em *taxa* que representam com grande fidelidade as divisões naturais, resultando num sistema nomenclatural estável. Atualmente, no Brasil a diagnose de rotina em laboratórios de fitopatologia e patologia florestal emprega técnicas tradicionais de isolamento direto, cultivo quando necessário e análise microscópica e morfometria em microscópios de luz comum. Tais abordagens apresentam resolução em nível de espécie e têm tido êxito em orientar medidas de controle de doenças, pois estas medidas apresentam amplo espectro de ação. Mesmo que este diagnóstico resulte na identificação correta do patógeno até ao nível de gênero, poderá haver êxito no controle da doença causada por este, na propriedade. No entanto, para efeito de adoção de sistemas de manejo integrado dentro do conceito de desenvolvimento sustentável e para a perpetuação de um necessário e rigoroso sistema de segurança biológica no Brasil, a taxonomia molecular deve se consolidar como ferramenta útil para suportar decisões precisas e seguras.

10. Referências

- ALFENAS, A. C. ; ZAUZA, E. A. ; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 442 p.
- AVROVA, A. O.; HYMAN, L. J.; TOTH, R. L.; TOTH, I. K. Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1499–508, 2002.

BERG, T.; TESORIERO, L.; HAILSTONES, D. L. A multiplex real-time PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 6:, p. 624-630, 2006.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. Importância da fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO A.; KIMATI, H. ; A M O R I M , L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p.13-33.

BONDE, M. R.; MICALES, J. A.; PETERSON, G. L. The use of isozyme analysis for identification of plant-pathogenic fungi. **Plant Disease**, v. 77, p. 961-968, 1993.

BOYCE, J. S. **Forest pathology**. 3th ed. New York: McGraw-Hill, 1961. 550 p.

BRAASCH, H.; METGE, K.; BURGERMEISTER, W. *Bursaphelenchus*-Arten (Nematoda, Parasitaphelenchidae) in Nadegehöten in Deutschland und ihre ITS-RFLP-Muster. **Nachrichtenblatt für den Deutschen Pflanzenschutzdienst**. v. 51, 312-320. 1999.

CAMPBELL, C. L.; LUCAS, L. T.; LUCAS, G. B. **Introduction to plant diseases: identification and management**. New York : Springer, 1992. p. 364.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v. 34, p. 475-83, 1977.

DARNELL, J.; MATSUDAIRA, P.; ZIPURSKY, L.; LODISH, H.; BERK, A.; BALTIMORE, D. **Molecular Cell Biology**. 4th ed. New York: W. H. Freeman Bk & Cdr, 1999. 1184 p.

DE BARY, A. Researches into the nature of potato fungus, *Phytophthora infestans*. **Journal of the Royal Agricultural Society of England.**, v. 12, p. 239-269, 1876. Series 2.

DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; SANHUEZA, R. M. V.; VERZIGNASSI, J. R.; KONDO, N. Etiologia da podridão do coleto de *Brachiaria brizantha* em pastagens da Amazônia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 261-265, 2007.

DUSI, A. N.; MARINHO, V. L. A. Métodos de diagnose de viróides. In: . ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. (Ed.). **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Londrina: Embrapa Soja; Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2001. p.125-140.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1989 . 570 p.

FERREIRA, F. A.; MILANI, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil**. Magi Iguaçú: International Paper, 2002. 98 p.

GONÇALVES, R. C. **Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil**. 2003. 79 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.; ZABEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, v. 142, p. 1881-1893, 1996.

JONES, J. B.; CHASE, A. R.; HARRIS, G. K. Evaluation of the biolog GN microplate system for Identification of some plant-pathogenic bacteria, **Plant Disease**, v. 77, p. 553-558, 1993.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2. 663 p.

KURAMAE, E. E.; SOUZA, N. L. Variabilidade genética entre formae speciales de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e seqüências de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 1481-1485, 2002.

LANOISELET, V. M.; COTHER, E. J.; COTHER, N. J.; ASH, G. J.; HARPER J. D. I. Comparison of two total cellular fatty acid analysis protocol to differentiate *Rhizoctonia oryzae* and *R. oryzae-sativae*. **Mycologia**, v. 97, n. 1, 2005, p. 77-83, 2005.

LEE, I. M.; DAVIS, R. E.; FLETCH, E. R. J. Spiroplasmas and phytoplasmas. In: SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. (Ed.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3th ed. St. Paul Minnesota: The American Phytopathological Society, 2001. p. 283-320.

LOPES, S. A.; MARCUSSI, S.; TORRES, S. C. Z.; SOUZA, V.; FAGAN, C.; FRANÇA, S. C.; FERNANDES, N. G.; LOPES, J. R. S. Weeds as alternative hosts of the citrus, coffee, and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. **Plant Disease**, v. 87, p. 544-549, 2003.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, p.1292-1305, 2002.

MAHUKU, G. S.; JARA, C.; HENRIQUEZ, M. A.; CASTELLANOS, G.; CUASQUER, J. Genotypic characterization of the common bean bacterial Blight pathogens, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by rep-PCR and PCR-RFLP of the Ribosomal Genes. **Journal of Phytopathology**, v. 154, n. 1, p. 35, 2006.

MEINKOTH, J.; WAH, U. G. Hybridization of nucleic acids immobilised on solid supports. **Annalytical Biochemistry**, v. 1, n. 38, p. 267-284, 1984.

MERKEL, H. W. **A deadly fungus on the American chestnut**. 10th ed. New York : Zoological Society, 1905. p. 97-103.

METZSTEIN, M. M.; HORVITZ, H. R. The *C. elegans* cell death specification gene *ces-1* Encodes a Snail Family Zinc Finger Protein. **Molecular Cell**, v. 4, p. 309-319 , 1999.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: WU, R. (Ed.), **Methods in enzymology**. San Diego: Academic, 1987. v. 155. p. 335-350.

MURPHY, R. W.; SITES, J. W.; BUTH, D. G., HAUFLE, C. H. Proteins I: isozyme electrophoresis. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C. (Ed.). **Molecular Systemics**. Massachusetts: Sinauer Associates Publishers, Sunderland, 1990. p. 45-126.

OLIVEIRA, V. C. de; COSTA, J. L. da S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 631-634, 2002.

PEREIRA, J. L. M.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. C. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotropica**, v. 1, p. 79-81, 1989.

POOLER, M. R.; HARTUNG, J. S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, v. 31, p. 377-381, 1995.

POUSSIER, S.; VANDEWALLE, P.; LUISETTI, J. Genetic diversity of African and world wide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2184-2194, 1999.

PRUSINER, S. B. **Prions**. Proceedings of the National Academy of Science. v. 95, n. 23, p. 13363-13383, 1998.

RASCOE, J.; BERG, M.; MELCHER, U.; MITCHELL, F. L.; BRUTON, B. D.; PAIR, S. D.; FLETCHER, J. Identification, phylogenetic analysis, and biological characterization of *Serratia marcescens* strains causing cucurbit yellow vine disease. **Phytopathology**, v. 93, p. 1233-1239, 2003.

ROBERTS, C. A.; DIETZGEN, R. G.; HEELAN, L. A.; MACLEAN, D.J. Real-time RT-PCR fluorescent detection of tomato spotted wilt virus. **Journal Virology Methods**, v. 88, p. 1-8, 2000.

SHUERGER, A. C.; BATZER, J. C. Identification and host range of an Erwinia pathogen causing stem rots on hydroponically grown plants. **Plant Disease**, v. 77, p. 472-477, 1993.

STRANGE, R. N.; SCOTT, P. R. Plant disease: A threat to global food security. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 83-116, 2005.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; FISHER, M. C. The evolution of asexual fungi: Reproduction, Speciation and Classification. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 197-246, 1999.

TYAGI, S.; KRAMER, F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 303-308, 1996.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa, MG: Suprema Gráfica e Editora, 1997. 2 v.

VITZTHUM, F.; GEIGER, G.; BISSWANGER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard UV transilluminator gel imaging system. **Analytical Biochemistry**, v. 276, p. 59-64, 1999.

VOS, P.; HOGERS R.; BLEEKER M.; REIJANS M.; VAN DE LEE T.; HORNES M.; FRITERS A.; POT, J.; PALEMAN J.; KUIPER M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, 1995, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; MEYER, W. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. CRC Press, 1995. p. 320.

WILLIAMS, R. H.; FITT, B. D. L. Differentiating A and B groups of *Leptosphaeria maculans*, causal agent of stem canker (black leg) of oilseed rape. **Plant Pathology**, v. 48, p. 161-175, 1999.

YANG, P.; VAUTERIN, L.; VAN CANNEYT, M.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, p. 47-71, 1993.

ZHANG, A. W.; HARTMAN, G. L. B.; CURIO-PENNY, B.; PEDERSEN, W. L.; BECKER, K. B. Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from soybean seeds. **Phytopathology**, v. 89. n. 9. p. 796-804, 1999.

ZERBINI, F. M.; AMBROZE VICIUS, L. P.; NAGATA, A. K. I. Diagnose molecular de fitoviroses. In: ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. (Ed.). **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Londrina: Embrapa Soja; Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, p. 95-124, 2001.