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

**Identificação molecular de um fitoplasma associado a árvores de oliveira
com sintoma de vassoura-de-bruxa**

Jacson Ferreira

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2017**

Jacson Ferreira
Bacharel em Agronomia

**Identificação molecular de um fitoplasma associado a árvores de oliveira com
sintoma de vassoura-de-bruxa**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **IVAN PAULO BEDENDO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Ferreira, Jacson

Identificação molecular de um fitoplasma associado a árvores de oliveira com sintoma de vassoura-de-bruxa/ Jacson Ferreira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017

45p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Mollicutes 2. Superbrotamento de ramos 3. Grupo 16SrVII-B fitoplasmas I.
Título

Dedico a Deus por ter trilhado o meu caminho,

pois sem ti nada sou e nada posso fazer.

A minha mãe Joana, ao meu pai José

e ao meu irmão Everton,

por sempre estarem ao meu lado.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.”

Claude Lévi-Strauss

OFEREÇO:

José Ferreira Soares
(*In memoriam*)

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar presente em minha vida guiando meu caminho.

Aos meus pais e ao meu irmão pelo apoio.

Ao prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo pela orientação, incentivo e colaboração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. E a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

A Thays Benites Camargo Pereira pela amizade e contribuição durante o mestrado.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia por contribuírem com a minha formação.

As amigas do laboratório de Procariotos Fitopatogênicos, Sarah Galvão, Ticyana Banzato e Claudia Almeida, pelo bom convívio, amizade e pela ajuda.

Aos amigos do laboratório de Virologia Vegetal, Gabriel, Tatiana, Talita, Daiana, Viviana, Arnaldo, David, Rafael e Heron pela amizade e momentos alegres que passamos.

Em especial ao meu amigo Gabriel pela amizade, parceria e por todos os momentos bons que passamos.

Aos meus amigos Danilo, Eduardo, Italo, Andréia e Geovane, pela amizade e boa convivência.

Ao Edvaldo pela amizade.

Aos amigos do Departamento de Fitopatologia e da Esalq.

Aos Funcionários do Departamento de Fitopatologia.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	9
2 DESENVOLVIMENTO	11
2.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1.1. Cultura da oliveira	11
2.1.2 Fitoplasmas.....	13
2.1.3 Sintomatologia.....	14
2.1.4 Relação com plantas hospedeiras	14
2.1.5 Detecção e identificação	15
2.1.6 Fitoplasma em oliveira	17
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	19
2.2.1 Obtenção das amostras	19
2.2.2 Extração de DNA	20
2.2.3 Detecção de fitoplasma em oliveira por duplo PCR.....	20
2.2.4 Excisão de gel.....	21
2.2.5 Purificação do produto de PCR.	22
2.2.6 Quantificação do fragmento de DNA purificado.....	22
2.2.7 Clonagem.....	23
2.2.8 Sequenciamento do fragmento genômico clonado	24
2.2.9 Identificação de fitoplasma por RFLP Virtual.....	24
2.2.10 Análise filogenética	25
2.2.11 Desenho de primers	26
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2.3.1 Detecção de fitoplasma em oliveira por duplo PCR.....	27
2.3.2 Identificação de fitoplasma por RFLP Virtual.....	30
2.3.3 Análise filogenética	34
2.3.4 Desenho de primers	35
3 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	39

RESUMO

Identificação molecular de um fitoplasma associado a árvores de oliveira com sintoma de vassoura-de-bruxa

Fitoplasmas são agentes causais de diversas doenças em numerosas espécies botânicas cultivadas, daninhas e silvestres. São procariotos que não apresentam parede celular, parasitas intracelulares obrigatórios, habitantes do floema e da hemolinfa, sendo transmitidos naturalmente por insetos vetores do tipo cigarrinhas. Plantas de oliveira apresentando sintomas tipicamente induzidos por fitoplasmas, caracterizados por desenvolvimento lento e superbrotamento de ramos com folhas de tamanho reduzido, foram observadas na cidade de Extrema (MG). A anomalia provoca danos significativos, pois retarda o início de produção e reduz o rendimento da cultura. Sintomas semelhantes foram relatados em olivais implantados em outros países, onde a doença foi associada aos fitoplasmas. O objetivo deste trabalho foi demonstrar a associação de fitoplasma com as plantas afetadas e identificar o fitoplasma presente nas árvores doentes. Para isto foram utilizadas as técnicas moleculares de PCR e RFLP, além de análise filogenética. Os resultados revelaram a presença de fitoplasmas em 73% das árvores sintomáticas analisadas, evidenciando que os sintomas observados no campo eram induzidos por fitoplasma. A doença foi denominada de vassoura-de-bruxa da oliveira. A identificação molecular permitiu classificar o fitoplasma como um representante do grupo 16SrVII-B. Este é o primeiro relato da ocorrência de fitoplasma em plantas de oliveira no Brasil. Em termos mais amplos, é o primeiro relato da associação de um fitoplasma do grupo 16SrVII com a doença vassoura-de-bruxa da oliveira, a qual, em outros países, está associada a fitoplasmas distintos do fitoplasma identificado no presente trabalho.

Palavras-chave: Mollicutes; Superbrotamento de ramos; Grupo 16Sr VII-B fitoplasmas

ABSTRACT

Molecular identification of a phytoplasma associated with olive trees with witches' broom symptom

Phytoplasmas are causal agents of diverse diseases occurring in numerous botanical species, among them cultivated, weeds and wild plants. They are wall-less prokaryotes, obligate intracellular parasites, inhabitants of phloem vessels and hemolymph, and naturally transmitted by insect vectors belonging to the group of the leafhoppers. Olive trees exhibiting symptoms typically induced by phytoplasmas, characterized by slow growth and shoot proliferation with small leaves, were observed in the municipality of Extrema (MG). The anomaly provokes significant damage due to the delay in the beginning of the production and yield reduction of the crop. Similar symptoms have been reported in olive orchards cultivated in other countries, where the disease was associated with phytoplasmas. The objective of the present investigation was to demonstrate the association of phytoplasma with affected plants and identify the phytoplasma present in diseased trees. PCR assays, RFLP analysis and phylogenetic analysis were used to molecular characterization of the phytoplasma. The results revealed the presence of phytoplasma in 73% of the symptomatic trees, evidencing that the symptoms observed in field were induced by phytoplasma. The disease was designated by olive witches' broom. The molecular identification allowed classify the phytoplasma as a representative of the 16SrVII-B group. This is the first report of the occurrence of phytoplasma in olive plants in Brazil. Moreover, this is also the first report of the association of a group 16SrVII phytoplasma with olive witches' broom disease, which has been described in other countries in association with phytoplasmas different from the phytoplasma identified in the present study.

Keywords: Mollicutes; Shoot proliferation; Group 16Sr VII-B phytoplasmas

|

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, no Brasil, a cultura da oliveira (*Olea europea* L.) vem despertando grande interesse social e econômico, tanto pela expansão do mercado da azeitona de mesa, como do azeite de oliva. Os maiores países produtores não estão atendendo à demanda mundial, o que estimula a produção em países situados fora dos tradicionais centros produtores do mundo. Assim, países sul-americanos como o Chile, a Argentina e, mais recentemente, o Brasil estão investindo na implantação de pomares de oliveira, buscando atender tanto ao consumo do mercado interno, como a geração de renda pela exportação do fruto e do azeite.

O Brasil ocupa posição de destaque entre os países que mais importam azeitona e azeite. Somente em relação ao azeite de oliva, foram importadas 63 mil toneladas no ano de 2011, representando um gasto de R\$ 573 milhões de reais, enquanto na safra 2012/2013 foram importadas aproximadamente 74,5 mil toneladas. Ressalta-se que a tendência é de aumento de consumo, sendo o mercado brasileiro bastante promissor. No Brasil, as maiores áreas de plantio estão localizadas nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Estas áreas têm se mostrado favoráveis ao cultivo da oliveira por apresentarem clima temperado caracterizado por baixas temperaturas durante o inverno, condição esta indispensável para a produção da planta. Nestes estados, programas de incentivo à implantação de pomares têm sido desenvolvidos por órgãos governamentais, no sentido de estimular o aumento da produção brasileira e abrir frentes alternativas às culturas tradicionais e predominantes na agricultura nacional.

Pesquisas desenvolvidas mostram resultados satisfatórios com o desenvolvimento da cultura no país. A expansão das áreas de cultivo além de diminuir os gastos com importação constitui uma fonte importante de emprego nas regiões produtoras, proporcionando emprego sazonal em diferentes épocas do ano complementando outras atividades agrícolas. No entanto, maiores investimentos em pesquisas são essenciais para viabilizar a exploração econômica e a inserção dessa cultura na produção agrícola brasileira.

As doenças ocorrentes em oliveiras estão entre os fatores que merecem mais estudos por parte das pesquisas realizadas com a cultura. Um exemplo desta necessidade passa a ser relatado. No ano de 2015, em uma propriedade do município de Extrema, localizado no sul do estado de Minas Gerais, foram observadas em um plantio comercial árvores que apresentavam desenvolvimento lento e alta intensidade de brotações de ramos com folhas de tamanho reduzido. Plantas podadas e adubadas apresentavam, inicialmente, recuperação temporária,

porém, em curto período, as brotações anormais voltavam a aparecer. Sintomas semelhantes aos descritos foram relatados em pomares instalados em países da Europa, como Itália e Espanha, e do Oriente Médio, principalmente no Irã. Nestes países a doença é conhecida como vassoura-de-bruxa, associada aos fitoplasmas, sendo disseminada, principalmente, por material de propagação vegetativa usado na produção de mudas de oliveira. Os danos são significativos, pois a doença atrasa o desenvolvimento das plantas, retarda o início da produção e reduz o rendimento da cultura. Consequentemente, as perdas econômicas se fazem sentir para os produtores.

Em vista da anomalia que afeta os olivais implantados na região de Extrema, e que também já foi observada em outras regiões cultivadas com oliveira, o presente trabalho de pesquisa teve por objetivo demonstrar a associação de fitoplasma com as plantas afetadas, bem como identificar molecularmente o fitoplasma presente em árvores portadoras da doença.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1.Revisão Bibliográfica

2.1.1. Cultura da oliveira

A oliveira (*Olea europaea* L.) pertence à família Oleaceae e é uma planta característica da região mediterrânea, explorada comercialmente para a produção de azeitonas de mesa e azeite (CAVALHEIRO et al., 2014). A cultura é conhecida desde a antiguidade e se tornou, ao longo do tempo, a base da agricultura em alguns países da referida região, tanto pelo aspecto econômico como social (OLIVEIRA et al., 2010). Na natureza, é uma planta rústica que cresce em solos pobres e em locais relativamente secos; no entanto, quando cultivada comercialmente, tem maior exigência por solos férteis e bem arejados e um regime hídrico anual variável de 600 a 800mm de água (BERTONCINI, 2012). Seus frutos contêm compostos nutricionais e terapêuticos benéficos à saúde humana, cujas propriedades se mantêm mesmo após o processamento para a produção de azeite (OLIVEIRA et al., 2010).

No Brasil a espécie foi introduzida no início do século XX em alguns estados das regiões Sul e Sudeste que ofereciam condições climáticas mais apropriadas ao seu desenvolvimento, entre eles os estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo (OLIVEIRA et al., 2010). Os atuais plantios são realizados em áreas montanhosas, com altitudes acima de mil metros que apresentam clima subtropical temperado, pois as plantas necessitam de temperaturas relativamente baixas (5-7°C) para que ocorra a floração (TERAMOTO et al., 2013). Nas condições brasileiras, as cultivares comerciais plantadas em regiões favoráveis apresentam bom desempenho, destacando-se Arbosana, Koroneiki e Arbequina para a produção de azeite e Ascolana para a produção de azeitonas (BERTONCINI, 2012). O país é o segundo maior importador mundial de frutos e azeite, sendo que a importação de azeitonas de mesa dobrou na última década (TERAMOTO et al., 2013). Entre os países produtores, a Argentina é um dos principais fornecedores para o Brasil, além de Portugal, Espanha (VILLA et al., 2010) e Chile (SILVA et al., 2012).

A olivicultura começou a ser estudada no país na década de 1940, mas foi a partir dos anos 2000 que os estudos com a cultura foram alavancados, com base nas análises de zoneamento agroclimático e econômico, desenvolvidos por órgãos ligados ao Ministério da Agricultura. Assim, foram definidas algumas regiões brasileiras que apresentavam características mais adequadas para o cultivo em larga escala. Apesar do crescente aumento

das áreas cultivadas com oliveira, a produção ainda é inexpressiva em relação à demanda para atender ao mercado interno brasileiro (MELLO & PINHEIRO, 2012).

Como o plantio comercial no país ainda é recente, as informações sobre o manejo da cultura são poucas, principalmente sobre os aspectos fitossanitários (RICALDE et al., 2012). Para o cultivo, as práticas recomendadas antes do plantio resumem-se em preparo profundo do solo, aplicação de calagem e monitoramento constante do pH, visando manter a neutralidade do solo. O preparo inicial do solo deve visar o aprofundamento do sistema radicular que é superficial, pois isso melhora o estabelecimento do pomar fazendo resistir a períodos secos. O plantio em sulcos com o colo da planta acima do nível do terreno é preferível em relação ao plantio em covas, como normalmente é feito para outras frutíferas, pois evita a concentração do sistema radicular e o acúmulo excessivo de água na região do colo (BERTONCINI, 2012).

As exigências nutricionais não são muito diferenciadas de outras plantas cultivadas em solos tropicais, exceto para o cálcio. Os solos devem apresentar textura média, boa drenagem e pH acima de 6,0. Os microelementos cobre, zinco e boro são necessários em adubações foliares, sendo que nas condições de neutralidade do solo estes nutrientes podem estar indisponíveis. O excesso de umidade pode prejudicar a fecundação das flores, pois a absorção de água pelo grão de pólen pode ocasionar o rompimento da antera antes da fecundação (BERTONCINI, 2012).

A expansão do cultivo de oliveira no país é justificada pelo aumento no consumo de seus frutos e derivados, em razão do aumento do poder aquisitivo das classes sociais e da ampla divulgação dos efeitos benéficos à saúde trazidos pelo uso rotineiro de seus produtos (MELLO & PINHEIRO, 2012). O grande potencial econômico do seu cultivo para as indústrias de processamento de alimentos, fitomedicamentos, cosméticos e extração de azeite incentivou empreendimentos no país, fazendo dessa cultura uma nova alternativa para a agricultura brasileira, tendo em vista que o abastecimento do mercado interno é totalmente dependente de importações (TOFOLI et al., 2013). Compostos considerados essenciais e imprescindíveis para o organismo humano como o ácido oleico, ácido graxo linoleico e ácido graxo linolênico, os quais são sintetizados somente por vegetais, são encontrados na maioria das variedades de azeitonas destinadas à extração do azeite (MELLO & PINHEIRO, 2012). Tocoferóis, vários minerais, compostos fenólicos e vitaminas do complexo B, também são importantes constituintes do azeite de oliva (BOBBIO & BOBBIO, 2003; BOSKOU, 1996; VOGNILDA, 1998), juntamente com as vitaminas A, E e K, ferro, cálcio, magnésio, potássio e aminoácidos (TOFOLI et al., 2013). Sendo um ingrediente básico da dieta mediterrânea o

azeite de oliva é indicado para consumo humano por seus efeitos benéficos ao coração, olhos, ossos, pele e sistema imunológico (TOFOLI et al., 2013), levando à redução na ocorrência de doenças crônicas como enfermidades cardiovasculares, hipertensão, reumatismo, osteoporose, cânceres e diabetes (COVAS, 2007).

2.1.2 Fitoplasmas

Fitoplasmas são patógenos que infectam muitas espécies vegetais, incluindo leguminosas, cereais, frutíferas, forrageiras, ornamentais e florestais. Não apresentam parede celular, são parasitas intracelulares obrigatórios, habitantes do floema e da hemolinfa, sendo transmitidos de plantas doentes para plantas sadias por meio de vetores, enxertia e pela planta parasita conhecida por cuscuta (BEDENDO, 2011). Estão associados coletivamente às doenças referidas como amarelos, as quais foram atribuídas aos vírus até que um grupo de cientistas japoneses identificou, em 1967, nos elementos do floema de plantas infectadas numerosas células pleomórficas que se apresentavam morfológica e ultraestruturalmente similares aos micoplasmas, procariotos conhecidos como agentes causais de doenças em animais e humanos (MARCONE, 2014). Inicialmente estes microrganismos foram chamados de ‘microrganismos semelhantes aos micoplasmas’ (termo em inglês MLO); mais tarde, em 1994, o termo trivial ‘fitoplasma’ foi cunhado e, posteriormente, o provisório status taxonômico “*Candidatus*” foi adotado como o nome do gênero para congregar os componentes deste grupo de patógenos (IRPCM, 2004). A observação por meio de microscopia eletrônica de transmissão mostrou seu tamanho variando de 80 a 900 nm, as células rodeadas por uma membrana trilaminar uniforme e, no seu interior, a presença de cadeias dispersas semelhantes ao DNA, além de grânulos ribossômicos (MARCONE, 2014). Células com formas esféricas e de halteres, apresentando gemulação, e ramificações filamentosas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura, sendo que estas diversificações morfológicas representam, provavelmente, vários estágios de desenvolvimento do microrganismo, os quais estão relacionados a fatores como número, idade das células e condições nutricionais (MARCONE & RAGOZZINO, 1996). Análises filogenéticas têm sugerido que fitoplasmas descendem de bactérias ancestrais gram-positivas e constituem um clado monofilético na classe Mollicutes (SAEED et al., 2016). Estudos moleculares revelaram um genoma pequeno e rico em relação às bases nitrogenadas timina e adenina (ZHAO et al., 2014).

Na natureza esses patógenos são transmitidos por insetos vetores pertencentes à ordem Hemiptera, famílias Cicadellidae, Cixidae, Cercopidae, Psyllidae e Fulgoridae, durante o período de alimentação. A ocorrência simultânea desses agentes de doenças e seus vetores em plantas cultivadas, silvestres e daninhas tem causado, muitas vezes, danos severos à produção de diversas espécies exploradas comercialmente, sobretudo em países de agricultura pouco desenvolvida. O ciclo de vida destes procariotos fitopatogênicos se desenvolve continuamente entre plantas e insetos, sendo ambos necessários para a sua sobrevivência e dispersão. Este tipo de situação exige destes patógenos a adaptação a uma ampla variedade de ambientes, incluindo o floema e o lúmen intestinal, a hemolinfa, a saliva e os nichos endocelulares em vários órgãos do inseto hospedeiro (MARCONE, 2014).

2.1.3 Sintomatologia

Plantas infectadas por fitoplasmas mostram sintomas específicos e não específicos. Esses sintomas variam com o fitoplasma, planta hospedeira, estágio da doença, idade da planta no momento da infecção e condições ambientais (MCCOY, 1979; MCCOY et al., 1989; LEE et al., 2000; SEEMULLER et al., 2002). Os sintomas específicos incluem anormalidades florais como descoloração, deformação, proliferação, esterilidade, virescência e filodia, superbrotamento de ramos (vassoura-de-bruxa), alongamento ou encurtamento de internódios, além de estípulas deformadas e descoloração do floema (MARCONE, 2010). Ainda segundo este autor, os sintomas menos específicos e não específicos são comuns, na maioria das vezes, em plantas lenhosas e se caracterizam por enrolamento, avermelhamento e amarelecimento foliar, redução no tamanho de folhas, necrose vascular, desfolha prematura, frutos pequenos, folhas esparsas, nanismo, declínio e morte da planta.

2.1.4 Relação com plantas hospedeiras

A maioria das plantas hospedeiras de fitoplasmas são angiospermas, sendo que poucos fitoplasmas foram detectados em gimnospermas (MARCONE, 2014). Ainda, a especificidade entre este tipo de patógeno e a espécie hospedeira é pouco compreendida e, na natureza, a gama de hospedeiros depende da relação tritrófica entre o patógeno, a planta e o inseto vetor. Fitoplasmas dos subgrupos 16SrI-A, 16SrI-B e 16SrI-C são capazes de infectar um grande número de plantas composta por mais de 80 espécies, enquanto que fitoplasmas do grupo 16SrX colonizam apenas um número bastante restrito de hospedeiros (SEEMULLER et al., 1998, 2002; LEE et al., 2000). A infecção dupla ou múltipla de uma única planta por

diferentes fitoplasmas foi relatada para vários patossistemas, especialmente para plantas perenes, as quais devido ao seu longo ciclo de vida fornece várias oportunidades de vetor ou vetores inocularem diversos fitoplasmas (MARCONE, 2014).

Investigações sobre o processo de colonização têm evidenciado que após o fitoplasma ser depositado no floema, o mesmo é distribuído sistemicamente pela planta passando pelos elementos crivados juntamente com o fluxo vascular (SEEMULLER et al., 2002). Algumas vezes, as células do parênquima e poucas células companheiras adjacentes ao floema também são colonizadas. Existem também relatos para vários hospedeiros lenhosos que a colonização das partes aéreas sofre influência das flutuações sazonais (LE_ON et al., 1996; LEPKA et al., 1999; TAN & WHITLOW, 2001; BERTAMINI et al., 2002a, 2002b; MAUST et al., 2003; GIORNO et al., 2013).

O principal efeito das infecções causadas por fitoplasmas é, aparentemente, o comprometimento da função do floema (MARCONE, 2014), podendo ocorrer aumento nos níveis de açúcares nos vasos, sendo este carboidrato alimento potencial para esses patógenos (CHRISTENSEN et al., 2005; GAI et al., 2014). A inibição no transporte de seiva resultando no acúmulo anormal de açúcares nas folhas mais velhas e redução dos mesmos nas folhas mais novas tem sido relatada em plantas infectadas (MAUST et al., 2003). Essa mudança na translocação do fotossintato, redução da fotossíntese, do teor de pigmentos, da condutância estomática, da transpiração e respiração das raízes e o desequilíbrio hormonal das plantas infectadas podem ser os fatores responsáveis pelos sintomas exibidos por plantas doentes (ENDESHAW et al., 2012; DING et al., 2013; VITALE et al., 2013; GAI et al., 2014). No entanto, os mecanismos exatos pelos quais o fitoplasma induz doença na planta e as diferentes reações da mesma às infecções são pouco conhecidas (MARCONE, 2014).

2.1.5 Detecção e identificação

A característica fastidiosa dos fitoplasmas dificulta o cultivo destes microrganismos em meio de cultura e consequentemente sua detecção e identificação. Com o advento e o progresso das técnicas moleculares, os fitoplasmas passaram a ser detectados, identificados e classificados principalmente com base na sequência do gene 16S rRNA (FIRRAO et al., 2004; BROWN et al., 2007; WEI et al., 2007; ZHAO et al., 2009). Para fins de diagnose, além da expressão de sintomas pela planta afetada é necessário demonstrar a associação constante dos fitoplasmas com as plantas suspeitas de infecção. Para fins de demonstração de

patogenicidade são utilizados procedimentos como transmissão do agente patogênico por enxertia, insetos vetores e cuscuteira.

Os fitoplasmas foram inicialmente diferenciados e identificados com base em propriedades biológicas, tais como a similaridade dos sintomas causados nas plantas infectadas, gama de plantas hospedeiras e diversidade de insetos vetores (LEE et al., 2000). No entanto, a determinação das propriedades biológicas era trabalhosa e demorada, além de não garantir resultados seguros e conclusivos. Posteriormente, antissoros policlonais e monoclonais foram produzidos para a detecção de fitoplasmas nos tecidos de plantas e insetos, principalmente para doenças economicamente importantes como a flavescedura dourada da videira e a proliferação de ramos da macieira (BERTACCINI & DUDUK, 2009). A partir da década de 1990, a identificação destes procariotos passou a ser amplamente realizada com a utilização das técnicas de PCR e de RFLP, tomando-se por base um fragmento de aproximadamente 1,25 kb, pertencente ao gene 16S rRNA (LEE et al., 1993; LEE et al., 1998). A aplicação conjunta destas técnicas tem permitido explorar a diversidade genética dos fitoplasmas e proceder à distinção molecular entre os mesmos, expressando sua classificação em um sistema de grupos e subgrupos, o qual tem sido consensualmente aceito em termos internacionais (GUNDERSEN & LEE, 1996; LEE et al., 2004; GU et al., 2005; WEI et al., 2007; ZHAO et al., 2009; SANTOS-CERVANTES et al., 2010). Atualmente, a análise de RFLP tem sido simulada em computador (RFLP virtual), com a digestão enzimática processada *in silico* usando-se 17 enzimas de restrição previamente definidas, usando-se fragmentos genômicos sequenciados, os quais são representativos de sequências nucleotídicas de 1,25 kb correspondentes ao gene 16S rRNA (WEI et al., 2008). Ainda, com base nos padrões coletivos de RFLP virtual são calculados os coeficientes de similaridade entre fitoplasmas previamente conhecidos e já relatados pela literatura e o fitoplasma que está sendo identificado no estudo.

Para a classificação de um fitoplasma em um novo grupo dois critérios têm sido exigidos. O primeiro estabelece que o fitoplasma em estudo deve ter um coeficiente de similaridade igual ou menor que 0,85 em relação aos fitoplasmas representantes dos diversos subgrupos componentes de todos os grupos 16Sr descritos (ZHAO et al., 2009). O segundo critério estabelece que um novo grupo deve receber pelo menos um status “*Ca. espécie fitoplasma*” (LEE et al., 1998). A classificação de fitoplasma em um novo subgrupo é feita quando o fitoplasma em estudo apresentar um coeficiente de similaridade igual ou menor que 0,97 em relação aos integrantes de cada um dos subgrupos anteriormente conhecidos dentro de um determinado grupo (WEI et al., 2008). A análise filogenética com base nas sequências

nucleotídicas componentes da região do gene 16S rRNA tem sido implementada como complemento para a identificação molecular conduzida por meio da análise de RFLP e índices de coeficientes de similaridade (WEI et al., 2007, 2008).

O desenvolvimento e validação da análise de RFLP virtual, juntamente com um programa que compara os perfis de RFLP automatizado que facilita o cálculo dos coeficientes de similaridade para diferenciar grupos e subgrupos, permitiram um importante avanço na classificação desses patógenos (WEI et al., 2007, 2008). Outra ferramenta disponível para rápida identificação e classificação de fitoplasmas é o sistema *iPhyClassifier* (ZAO et al., 2009). Ao comparar os perfis de RFLP e as sequências de genes 16S rRNA arquivados numa base de dados de fitoplasmas conhecidos, pode-se determinar o grupo e subgrupo ao qual pertence o fitoplasma que se deseja classificar (ZHAO et al., 2009). Vários grupos e dezenas de subgrupos foram descritos usando os recursos disponibilizados pelo sistema *iPhyClassifier* (ZHAO et al., 2009, 2014; FERNÁNDEZ et al., 2015).

Sem dúvida, o marcador molecular mais utilizado para a diferenciação e identificação de fitoplasmas é o gene 16S rRNA, o qual tem se mostrado adequado e extremamente útil para fins de classificação desses patógenos (MOTAMEDI et al., 2016). Além disto, este marcador tem proporcionado uma base relativamente sólida para elucidar os aspectos relacionados com filogenia e taxonomia (LEE et al., 1998). No entanto, para a diferenciação mais fina quanto à diversidade genética existente entre fitoplasmas e a elaboração de uma classificação mais completa, vários marcadores filogenéticos adicionais, tais como a proteína ribossomal (rp), os genes *secY* e *tuf* e a sequência da região intergênica espaçadora (SR) 16S-23S têm sido usados como ferramentas complementares (MARTINI et al., 2007; MARCONE, 2014). Assim, mais recentemente, genes com diferentes graus de conservação de sua sequência nucleotídica têm sido considerados para avaliar as relações genéticas e filogenéticas existentes entre fitoplasmas (SAEED et al., 2016).

2.1.6 Fitoplasma em oliveira

Embora a oliveira seja considerada uma espécie resistente às doenças, agentes patogênicos de natureza diversa podem afetar as árvores limitando o rendimento da cultura (LOCONSOLE et al., 2013). Dentre estes agentes estão os fitoplasmas associados à doença conhecida por vassoura-de-bruxa, a qual se constitui em fator de risco para o cultivo desta espécie, em função dos danos causados à produção (RASHIDI et al., 2010; MARTELLI, 2013).

Considerando o quadro sintomatológico da doença, vassoura-de-bruxa é o sintoma mais comumente mostrado pelas plantas infectadas. Este sintoma pode ser acompanhado de encurtamento dos entrenós dos ramos, fasciação, clorose foliar, morte de brotos, abortamento de flores e hipertrofia das inflorescências (MARTELLI, 2013).

O primeiro relato de fitoplasma infectando oliveira deu-se no ano de 1996 na Itália. Durante o outono e inverno do ano de 1994 árvores de oliveira das cultivares Frantoio e Aleccino apresentavam galhos com folhas amarelas, manchas cloróticas atingindo quase toda extensão da lâmina foliar e algumas folhas com áreas esverdeadas e amareladas. Folhas mal formadas exibindo margens irregulares também foram observadas. Durante a primavera e o início do verão ocorria a queda das folhas sintomáticas, sendo que as folhas mais jovens não apresentavam sintomas. Após análises de PCR, foi revelada a presença do patógeno nas amostras e os dados obtidos pela análise de RFLP apontaram que o fitoplasma presente nas plantas avaliadas se identificava com representantes do grupo 16SrV (POLLINI et al., 1996). Na Espanha, desde 1993, foram observadas, em pomares de oliveira, plantas mostrando sintomas de proliferação de ramos, encurtamento de entrenós e brotos anormais. No ano de 1997, empregando-se metodologia molecular, foi detectada a ocorrência de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16Sr XII nas plantas afetadas pela anomalia (FONT et al., 1998).

Na Itália, em 1999, foi relatada a presença de fitoplasma do grupo 16Sr I-B em plantas de oliveira com sintomas de proliferação de ramos e nanismo, sintomas esses que começavam a aparecer no início da primavera (MARZACHI et al., 1999). No Iran, em 2010, foi relatada a ocorrência de árvores suspeitas de infecção por fitoplasmas (RASHIDI et al., 2010). Neste caso, os sintomas se caracterizavam pela presença de folhas de tamanho reduzido, encurtamento dos entrenós e proliferação de brotos, com posterior declínio da planta. Segundo estes autores, em 2003, sintomas similares já haviam sido observados em oliveiras cultivadas no Azerbaijão e no próprio Iran e, no ano de 2006, plantas apresentando sintomas similares foram observadas novamente neste último país. Ainda, em 2005, foi notado que plantas de alfafa crescidas nas imediações das árvores sintomáticas de oliveira apresentavam sintomas de vassoura-de-bruxa e poucas folhas. Após a realização de testes moleculares, o fitoplasma presente nas plantas de oliveira e alfafa foram classificados como sendo afiliados ao grupo 16SrI.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Obtenção das amostras

Amostras de plantas sintomáticas e assintomáticas (Figura 1) foram coletadas em três áreas diferentes em uma propriedade comercial localizada na cidade de Extrema, estado de Minas Gerais. As amostras foram constituídas por folhas e ramos novos de plantas das variedades Arbequina, Ascolana, Aleccino, Grapolo e Koroneik, variedades estas que representam as mais frequentemente plantadas na região. Um total de 42 amostras foram coletadas, sendo 21 provenientes do campo I, o qual é formado por plantas com cinco anos de idade; 17 foram coletadas no campo II, constituído de plantas com três anos de idade; e 4 foram amostradas no campo III, cujo pomar abriga plantas com nove anos de idade.

Figura 1: A e B - plantas de oliveira apresentando sintomas de superbrotamento. C - ramo assintomático à esquerda e doente à direita. D - planta assintomática.

2.2.2 Extração de DNA

A extração do DNA total das amostras de oliveira foi feita com o uso do kit de extração de DNA de plantas DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. O material vegetal (aproximadamente 1g), constituído por folhas novas e pecíolos, que estava armazenado a 20°C negativos, foi macerado em nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados 400 µL do tampão AP1 e 4 µL de RNaseA por amostra. O material foi homogeneizado em vortex e incubado por 10 minutos a 65°C, sendo os tubos invertidos a cada 2-3 minutos durante o período de incubação. Um volume de 130 µL do tampão P3 foi adicionado à mistura e foi procedida à incubação por 5 minutos no gelo. Na sequência, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 14.000 rpm (20.000 x g). O sobrenadante foi depositado em uma coluna de filtragem, centrifugado por 2 minutos a 14.000 rpm (20.000 x g) e transferido para um novo tubo sem destruir o precipitado. Ao material foram acrescentados 1.5 de seu volume do tampão AW1. Uma alíquota de 650 µL da mistura foi transferida para uma nova coluna e centrifugada por 1 minuto a 8.000 rpm (11.000 x g), sendo descartado o líquido filtrado. Essa etapa foi repetida com o restante da amostra. Em seguida, a referida coluna foi colocada em um novo tubo de 2 mL, sendo a ela adicionados 500 µL do tampão AW2. Nova centrifugação foi processada por 1 minuto a 8.000 rpm (11.000 x g) e o filtrado foi descartado. Essa etapa foi repetida, porém por 2 minutos a 14.000 rpm (20.000 x g). A coluna foi removida e colocada em um novo tubo de 1.5 mL onde foram acrescentados 100 µL do tampão AE e conduzida nova centrifugação. Os tubos foram mantidos por 5 minutos à temperatura ambiente (15 - 25°C), sendo, posteriormente, seu conteúdo centrifugado por 1 minuto a 8.000 rpm (11.000 x g). Esta etapa foi repetida e o material de DNA proveniente da extração foi armazenado a 20°C negativos.

2.2.3 Detecção de fitoplasmas em oliveira por duplo PCR

Os ensaios foram conduzidos empregando-se duplo PCR. Na primeira reação foi utilizado o par de iniciadores (primers) P1/16S-SR (DENG & HIRUKI, 1991; LEE et al., 2004), seguido do par R16F2n/R2 (GUNDERSEN & LEE, 1996). Na primeira e segunda reações, espera-se a amplificação de fragmentos de DNA de cerca de 1.55 e 1.25 kb, respectivamente. Como padrão positivo para as reações foi utilizado o DNA extraído de plantas de arnica-do-campo (*Solidago microglossa*) e vinca (*Catharanthus roseus*), portadoras de fitoplasmas, enquanto os padrões negativos foram representados pelas misturas de reação contendo alíquotas de água sem a adição de DNA.

As sequências dos iniciadores utilizados são descritas a seguir:

P1 - 5' AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T 3' (DENG & HIRUKI, 1991).

16S-SR - 5' GGT CTG TCA AAA CTG AAG ATG 3' (LEE et al., 2004).

R16 F2n - 5' GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG 3' (GUNDERSEN; LEE, 1996).

R16 R2 - 5' TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G 3' (GUNDERSEN; LEE, 1996).

As reações de PCR foram conduzidas com a utilização do kit Pure Taq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare). O volume final de reação foi de 25 μ L, sendo que aos componentes do kit de reação foram acrescentados 1 μ L do extrato de DNA total, 1 μ L de cada primer (concentração: 20 pmol) e 22 μ L de água. O produto da primeira reação foi diluído em água na proporção 1/30 e serviu de modelo para a segunda reação. Na reação com o par P1/16S-SR, o termociclador foi programado para: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94° C por 1 minuto, 38 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, hibridização a 55° C por 2 minutos, extensão a 72° C por 3 minutos e um ciclo de extensão final a 72° C por 7 minutos. Na reação com o par R16F2n/R2, a programação foi feita para: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 50° C por 2 minutos, extensão a 72° C por 3 minutos e 1 ciclo de extensão final a 72° C por 7 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo o corante Sybr safe® 1% (Promega), usando-se tampão 1 X TAE e marcador molecular 1kb DNA ladder (life Technologies). A corrida eletroforética foi processada com uma corrente elétrica de 65 volts durante um período de 60 minutos, sendo os fragmentos genômicos visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

2.2.4 Excisão de gel

Para as amostras que geraram bandas inespecíficas, foi feita a excisão do gel cortando-se a região correspondente ao fragmento de interesse. À porção retirada do gel foram adicionados 10 μ L do reagente MBS (membrane binding solution), sendo a mistura homogeneizada em vortex e incubada a 65°C por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram purificadas com o uso do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Assim, a porção dissolvida do gel foi colocada em uma coluna acoplada a um tubo coletor de 2 mL e mantida à temperatura ambiente por 1 minuto. Na sequência, a coluna foi centrifugada a 14000 rpm (20.000 x g) por 1 minuto e a suspensão que passou pela coluna foi descartada. A coluna foi lavada com 700 μ L de MWS (membrane wash solution) e submetida à centrifugação por 1 minuto a 14000 rpm (20.000 x g).

Novamente, a suspensão que passou pela coluna foi descartada. Um volume de 500 µL de MWS foi adicionado à coluna, nova centrifugação foi conduzida a 14000 rpm (20.000 x g) por 5 minutos, sendo descartado o material que passou pela coluna. Em seguida, a coluna foi centrifugada com a tampa aberta por 1 minuto a 14000 rpm (20.000 x g) para permitir a evaporação de qualquer resíduo de etanol. O produto purificado foi eluído em 50 µL de NFW (nuclease free water), incubado a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado por 1 minuto a 14000 rpm (20.000 x g). O DNA eluído foi armazenado a 20°C negativos.

2.2.5 Purificação do produto de PCR.

A purificação dos fragmentos genômicos do fitoplasma correspondente ao gene 16S rRNA amplificados na reação de PCR foi feita com o kit PureLink® PCR purification Kit (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Para a purificação foi adicionado 400 µL do Binding Buffer B2 para 100 µL do produto de PCR em um tubo de 1.5 mL, misturando bem. Cada amostra foi pipetada na PureLink® Spin Column acoplada em um tubo coletor de 2 mL e centrifugada a 12000 rpm (17.000 x g) por um minuto, descartando em seguida o que passou pela coluna.

Posteriormente adicionou-se 650 µL do Wash Buffer W1 no centro da coluna, centrifugou a 12000 rpm (17.000 x g) por um minuto e descartou o que passou pela coluna centrifugando-a mais uma vez a 12000 rpm (17.000 x g) por 3 minutos. O DNA purificado foi eluído adicionando-se 50 µL do Elution Buffer no centro da coluna incubando-a em temperatura ambiente por 1 minuto, centrifugando em seguida por 2 minuto a 14000 rpm (17.000 x g). O DNA eluído e purificado foi armazenado a -20°C.

2.2.6 Quantificação do fragmento de DNA purificado

O fragmento genômico foi quantificado em gel de agarose 1%, preparado com tampão 1X TAE e corante Sybr safe® 1% (Promega). Um volume de 5 µL do marcador molecular 1Kb DNA ladder (life Technologies), 5 µL do marcador de peso molecular MASS DNA ladder (New England Biolabs) e 1 µL do DNA purificado foram utilizados. O gel de agarose foi submetido à corrente elétrica de 65 volts por 60 minutos e a visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta.

2.2.7 Clonagem

Os fragmentos de DNA purificados e quantificados apresentando $90 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ foram clonados em *Escherichia coli* estirpe DH5 α . Para a ligação foram adicionados em um tubo de 1,5 mL: 5 μL de tampão, 3 μL de DNA, 1 μL de PGEM (pGEM®-T Easy Vector System I) (Promega) e 1 μL da enzima T4 ligase. A mistura foi armazenada em geladeira por 12 horas e, em seguida, mantida a 20°C negativos. Para a reação de transformação, foram colocados 2 μL da ligação em 50 μL de células competentes (MAX Efficiency® DH5 α ™ Competent Cells) (Promega) em um tubo de 1,5 mL. Posteriormente, a suspensão foi resfriada em gelo por 30 minutos, passou por um choque térmico a 42°C por 50 segundos e, novamente resfriada em gelo por 2 minutos.

Um volume de 300 μL do meio SOC (S.O.C. Medium - Invitrogen) (HANAHAN, 1983) foi depositado nos tubos contendo as células transformadas e mantidos em agitador por 2 horas a 200 rpm (286 x g), à temperatura de 37°C. Posteriormente, 80 μL da suspensão foi plaqueada em meio LB sólido (BERTANI, 1951; LURIA & BURROUS, 1957). Ao meio LB foram acrescentados 40 μL do antibiótico ampicilina ($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 80 μL de XGAL (5 - bromo - 4 - cloro - 3 - indolil - β - D - galactopiranosida) na concentração de $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ e 18 μL de IPTG (Isopropil - β - D - tiogalactopiranosida) na concentração de $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ para um volume de 40 mL de meio, antes das células serem plaqueadas. Os componentes XGAL e IPTG foram utilizados para avaliar a atividade da β -galactosidase das bactérias transformadas, diferenciando estas bactérias daquelas não transformadas, por meio do aparecimento da coloração branca ou azul.

As placas contendo o meio de cultura foram mantidas por 12 horas a 37°C. As colônias transformadas foram transferidas para tubos contendo o meio LB líquido, com o auxílio de ponteiros esterilizados. Os tubos foram mantidos em agitador a 200 rpm (286 x g) por 12 horas, em temperatura de 37°C para multiplicação das células bacterianas. Três clones de cada amostra foram colocados para crescer no meio LB líquido.

Para a extração do DNA plasmidial foi utilizado o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) seguindo-se as instruções do fabricante. Um volume de 1,5 mL do meio LB líquido contendo as células que cresceram durante as 12 horas foi centrifugado por 3 minutos a 13000 rpm (17.900 x g). O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 250 μL de CRS (cell resuspension solution), e 10 μL de APS (Alkaline Protease Solution), sendo a mistura incubada por 5 minutos, à temperatura ambiente. Uma alíquota de 350 μL de NS (neutralization solution) foi acrescentada e a mistura foi

centrifugada por 10 minutos a 14000 rpm (20.000 x g), à temperatura ambiente. A suspensão foi depositada em uma coluna de filtração e centrifugada a 14000 rpm (20.000 x g) por 1 minuto, à temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e um volume de 750 µL de WS (wash solution) foi adicionado à coluna e centrifugada por 1 minuto a 14000 rpm (20.000 x g). O filtrado foi novamente descartado e após a adição de 250 µL de WS, a suspensão foi centrifugada por 2 minutos a 14000 rpm (20.000 x g). O DNA foi eluído em 100 µL de NFW (nuclease free water) e submetido à centrifugação por 1 minuto a 14000 rpm (20.000 x g) e armazenado a 20°C negativos.

Para detecção da presença do fragmento pertencente ao fitoplasma, foi feito um ensaio de PCR utilizando o par de primer R16F2n/ R2 e um ensaio de PCR com o par T7/SP6. Além disto, foi conduzida a digestão com a enzima de restrição EcoRI, a qual cliva o fragmento em dois sítios. Após a confirmação da presença do fragmento genômico, o plasmídeo foi quantificado em gel de agarose 1%, preparado com tampão 1X TAE e corante Sybr safe® 1% (Promega). Foram utilizados 5 µl do marcador molecular 1kb DNA ladder (life Technologies), 5 µl do marcador de peso molecular MASS DNA ladder (New England Biolabs) e 1 µl do plasmídeo. O gel de agarose foi submetido à corrente elétrica por 60 minutos a 65 volts, sendo a visualização dos fragmentos amplificados realizada em transiluminador de luz ultravioleta.

2.2.8 Sequenciamento do fragmento genômico clonado

O fragmento genômico do 16S rDNA na concentração de 90ng.µl⁻¹ foi enviado para o sequenciamento na empresa Macrogen (Maryland, Estados Unidos). As sequências foram montadas em contigs, usando o site Electropherogram quality analysis da Embrapa, sendo editadas e alinhadas utilizando o programa BIOEDIT.

2.2. 9 Identificação de fitoplasma por RFLP virtual

A imagem virtual de RFLP usando gel de agarose 3% foi gerada pelo programa Pdraw32. A digestão *in silico* da sequência do 16S rDNA com 1.25kb correspondente ao fitoplasma estudado foi realizada usando-se um conjunto de 17 endonucleases previamente estabelecidas para a obtenção dos padrões coletivos de RFLP virtual (WEI et al., 2007). A seguir as enzimas de restrição utilizadas para a digestão *in silico*: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *Hinfl*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI* e *TaqI*.

Os padrões de restrição gerados pela digestão *in silico* para o fitoplasma encontrado em oliveira foram comparados com aqueles relatados para os fitoplasmas pertencentes aos diversos subgrupos constituintes do grupo 16SrVII (VII-A, VII-B, VII-C e VII-D), para determinação dos valores dos coeficientes de similaridade (F). Os coeficientes de similaridade foram calculados para cada par de fitoplasmas, utilizando a fórmula $F = 2N_{XY}/(N_X + N_Y)$ (NEI & LI, 1979), onde N_{XY} é o número de bandas compartilhadas pelos dois fitoplasmas que estão sendo comparados, enquanto N_X e N_Y são os números totais de bandas no perfil eletroforético gerado por cada um dos fitoplasmas que estão sendo contrastados.

2.2.10 Análise filogenética

Uma árvore filogenética foi construída utilizando a sequência nucleotídica da região 16S rDNA do fitoplasma em estudo e aquelas pertencentes a diversos fitoplasmas representantes dos grupos 16SrI, 16SrIII, 16SrVII, 16SrIX, 16SrXIII, 16SrXV, por meio do programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). A sequência do microrganismo *Acholeplasma palmae* strain J233 (GenBank NR 029152), foi usada como raiz da árvore (GUNDERSEN et al., 1994). O método de agrupamento Neighbour-joining e o teste Bootstrapping processado 1.000 vezes foram empregados na elaboração da árvore filogenética, para garantir a confiabilidade da posição dos ramos.

Tabela 1: Fitoplasmas relatados no Brasil e subgrupos do grupo VII depositados no GenBank usados para construção da árvore filogenética.

Hospedeiro	Estirpe	Classificação do gene 16S rRNA	Número de acesso GenBank	Referência
<i>Fraxinus sp.</i>	AshY1	16SrVII-A	AF189215	GRIFFITHS et al., 1999
<i>Erigeron sp.</i>	EriWB5	16SrVII-B	AY034608	BARROS et al., 2002
<i>Medicago sativa</i>	ArAWB	16SrVII-C	AY147038	CONCI et al., 2005
<i>Erigeron sp.</i>	ErWB-Br01	16SrVII-D	KJ831066	FLÔRES et al., 2015
<i>Olea europaea</i>	OWB-Br01	16SrVII-B	-	Deste estudo
<i>Catharanthus roseus</i>	Pwk-CP3	16SrIX	JN792516	BARBOSA et al., 2012
<i>Manihot esculenta</i>	Md1	16SrIII-B	GU193976	FLÔRES et al., 2013
<i>Secium edule</i>	ChWBIII	16SrIII-J	AF147706	MONTANO et al., 2000
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	HibWB26	16SrXV-A	AF147708	MONTANO et al., 2001
<i>Zea mays</i>	MBS	16SrI-B	AF487779	BEDENDO et al., 1997
<i>Carica papaya</i>	PACN-Br1	16SrXIII-E	JQ792171	MELO et al., 2013

2.2.11 Desenho de primers

Com o objetivo de obter primers específicos para a detecção do fitoplasma encontrado em árvores de oliveira estudadas neste trabalho, dois pares de primers foram desenhados (Tabela 2) com base em dez sequências pertencentes ao referido fitoplasma. Para o desenho dos primers, o princípio estabelecido foi a seleção de regiões das sequências em que as bases fossem iguais ou as mais similares possíveis, considerando as dez sequências analisadas. Para aquelas sequências em que algumas bases diferiam, a base escolhida foi aquela que estava presente na maioria das sequências.

Os iniciadores foram delineados para possuírem mais que 15pb e menos que 30pb. Este cuidado se justifica pelo fato de primers menores que 15pb diminuem a especificidade da reação, enquanto aqueles menores que 30pb reduzem a formação de dímeros (RAYMAEKERS et al., 2009). As características dos primers envolvendo formação de dímeros, porcentagem de G+C e temperatura de anelamento foram observadas através do programa BEACON DESIGNER (PREMIER Biosoft International). Após a síntese os primers foram testados para as amostras de oliveira nas quais o fitoplasma aqui estudado havia sido detectado por meio dos primers universais. A reação de PCR foi conduzida com a utilização do kit Pure Taq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare). O volume final de reação foi de 25 µL, sendo que aos componentes do kit de reação foram acrescentados o produto da primeira reação realizada com o par de primer P1/16S-SR, diluído em água na proporção 1/30, 1 µL de cada primer (concentração: 20 pmol) (Tabela 2) e 22 µL de água. O padrão negativo foi representado pela mistura de reação contendo alíquotas de água sem a adição de DNA.

Na reação com o par OLF(I)/OLR(I) que amplifica um fragmento de aproximadamente 1 kb, a programação foi feita para: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 54° C por 2 minutos, extensão a 72° C por 3 minutos e 1 ciclo de extensão final a 72° C por 7 minutos. Na reação com o par OLF(II)/OLR(II) que amplifica um fragmento de aproximadamente 0.9 kb, a programação foi feita para: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 52° C por 2 minutos, extensão a 72° C por 3 minutos e 1 ciclo de extensão final a 72° C por 7 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo o corante Sybr safe® 1% (Promega), usando-se tampão 1 X TAE e marcador molecular 1kb DNA ladder (life Technologies). A corrida eletroforética foi processada com uma corrente elétrica de 65 volts durante um período

de 60 minutos, sendo os fragmentos genômicos visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

Tabela 2: Primers desenhados com base em sequências de fitoplasmas pertencentes ao grupo VII-B presentes nas plantas de oliveira avaliadas nesse estudo.

Primer I	Primer II
Forward (F)/ Reverse (R)	Forward (F)/ Reverse (R)
OLF(I) = AATGGCCTACCAAGACGATGAT	OLF(II) = CACATTAGTTAGTTGGTAGGGTA
OLR (I) = AGCTACTCTTTGTAACAGCCA	OLR(II) = GAAGTCGAGTTACAGACTT

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Detecção de fitoplasma em oliveira por duplo PCR

Em 38 árvores sintomáticas amostradas nos campos I e II, a presença de fitoplasmas foi detectada em 28 plantas, representando 73% das amostras analisadas (Tabela 3). A presença do patógeno foi demonstrada pela amplificação de fragmentos genômicos de aproximadamente 1.25 kb, correspondente ao gene 16S rRNA. Produtos de 1.25 kb são esperados quando o duplo PCR é conduzido com os primers P1/16S-SR e R16F2n/R2 na primeira e segunda reação, respectivamente. Esses fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1%, após corrida eletroforética (Figura 2). As quatro árvores amostradas no campo III, as quais não exibiam sintomas indicativos da doença, se revelaram negativas para a presença de fitoplasmas. Os controles positivos, representados pelo DNA extraído de plantas sabidamente portadoras de fitoplasmas, geraram produtos de PCR de 1.25 kb, enquanto nenhuma amplificação ocorreu para os controles negativos. Os resultados obtidos com os padrões revelaram a confiabilidade dos testes de PCR empregados para a análise das amostras. Com base nos sintomas de proliferação de pequenos ramos exibidos pelas plantas doentes e na constante associação entre fitoplasmas e as plantas sintomáticas aqui estudadas, a doença foi denominada de vassoura-de-bruxa, sendo o fitoplasma denominado ‘fitoplasma da vassoura-de-bruxa da oliveira’, designado pela sigla OWBP (Olive witches’broom phytoplasma).

Considerando as árvores pertencentes às diferentes variedades analisadas, a presença (P) e ausência (A) do fitoplasma apresentou a seguinte proporção: Ascolana (6P/1A), Aleccino (4P/1A), Grapolo (7P/4A) e Koroneik (5P/1A). Em plantas da variedade Arberquina não houve detecção de fitoplasmas (0P/ 4A).

A constante presença do fitoplasma nos tecidos das plantas de oliveira portadoras de sintomas é uma forte evidência de que a anomalia está associada a este procarioto. Uma vez que a diagnose de doenças de origem fitoplasmática é baseada em sintomas típicos incitados por este grupo de procariotos e na intensa presença de sintomas nos tecidos das plantas sintomáticas (LEE et al., 2000; BERTACCINI & DUDUK, 2009), a elevada proporção de árvores portadoras do fitoplasma observadas no presente trabalho é uma forte evidência de que os sintomas típicos de vassoura-de-bruxa são induzidos pelo fitoplasma. A detecção de fitoplasmas por meio de PCR tem sido feita rotineiramente pelo fato da técnica ser sensível e confiável (GUNDERSEN & LEE, 1996). Apesar destas características, não é rara a obtenção de resultados negativos para hospedeiros que mostram sintomas especificamente associados aos fitoplasmas. Este tipo de evento pode ser atribuído a diversos fatores, entre os quais ao estágio vegetativo da planta, à época de amostragem, à presença de substâncias inibidoras presentes nos hospedeiros, à baixa concentração do patógeno nos tecidos vegetais e, mesmo, à distribuição desuniforme no dossel (SILVA et al., 2015). No presente caso, a não detecção do fitoplasma na totalidade das amostras sintomáticas parece estar mais relacionada com a distribuição irregular do mesmo ou sua baixa concentração nos tecidos vegetais amostrados, assim como relatado para videira (GALETTO & MARZACHI, 2010). A constatação de fitoplasma em 73 % das plantas sintomáticas pode ser considerada como alto nível de detecção, considerando as dificuldades que normalmente são encontradas para se demonstrar a presença deste tipo de patógeno em plantas de espécies lenhosas. Assim, este elevado índice de detecção se apresenta como suficientemente confiável e seguro para suportar a associação de plantas doentes com a presença de fitoplasma, confirmando a suspeita inicial da diagnose feita com base na sintomatologia exibida pelas árvores observadas no campo.

Figura 2- Amplificação do 16S rDNA do fitoplasma presente em plantas sintomáticas de oliveira por meio de duplo PCR com os primers P1/16S-SR e R16F2n/R2. Coluna: M- marcador molecular 1kb Lader; Colunas: 01-037 amostras positivas de oliveira; Coluna: P- Controle positivo; Coluna: N- Controle negativo.

Tabela 3- Amostras de plantas de oliveira sintomáticas e assintomáticas analisadas pela técnica de duplo PCR usando-se o par de primers P1/ 16S-SR seguido do par de primers R16F2n/ R2 visando a detecção de fitoplasma

Amostra	Área	Variedade	Resultado
O1	Campo I	Não identificada	+
O2	Campo I	Não identificada	+
O3	Campo II	Não identificada	+
O4	Campo II	Não identificada	-
O5	Campo I	Não identificada	+
O6	Campo II	Não identificada	+
O7	Campo II	Não identificada	+
O8	Campo I	Não identificada	-
O9	Campo II	Não identificada	-
O10	Campo I	Grapolo	+
O11	Campo I	Grapolo	-
O12	Campo I	Grapolo	-
O13	Campo I	Koroneik	+
O14	Campo I	Ascolana	+
O15	Campo I	Grapolo	+
O16	Campo I	Koroneik	+
O17	Campo I	Koroneik	+
O18	Campo I	Ascolana	+
O19	Campo I	Grapolo	+
O20	Campo I	Ascolana	+
O21	Campo I	Grapolo	+
O22	Campo I	Grapolo	+
O23	Campo I	Grapolo	+
O24	Campo I	Grapolo	-
O25	Campo I	Grapolo	+
O26	Campo I	Koroneik	+
O27	Campo II	Aleccino	+
O28	Campo II	Aleccino	-
O29	Campo II	Ascolana	-
O30	Campo II	Grapolo	-
O31	Campo II	Aleccino	+
O32	Campo II	Koroneik	-
O33	Campo II	Koroneik	+
O34	Campo II	Ascolana	+
O35	Campo II	Aleccino	+
O36	Campo II	Aleccino	+
O37	Campo II	Ascolana	+
O38	Campo II	Ascolana	+
O39	Campo III	Arberquina	-
O40	Campo III	Arberquina	-
O41	Campo III	Arberquina	-
O42	Campo III	Arberquina	-

2.3.2 Identificação de fitoplasma por RFLP Virtual

Cada fitoplasma encontrado em cada árvore amostrada foi considerado como um isolado ou ‘strain’. Para cada isolado, três clones foram sequenciados, tendo sido selecionados dez isolados para fins de sequenciamento: O1, O5, O6, O26, O27, O31, O33, O34, O35 e O37. Após as análises das sequências nucleotídicas, uma sequência consenso foi selecionada para representar cada um dos isolados. Os resultados mostraram que as fitas consenso representativas dos isolados O1, O5, O6, O26, O31 e O37 foram idênticas quanto à sequência de seus nucleotídeos. Também foram idênticas entre si as sequências dos isolados O27, O34 e O35. Finalmente, a sequência identificada por O33 não se enquadrava em nenhum dos grupos referidos.

Uma sequência entre as seis que revelaram total identidade entre si foi selecionada para representar o fitoplasma encontrado em árvores de oliveira. Esta sequência nucleotídica foi denominada OWB-Br01 (Olive Witches’ Broom-Brazil 01). O alinhamento realizado entre a sequência OWB-Br01 e diversas outras sequências disponíveis no Genbank apontou que o isolado representativo do fitoplasma identificado em oliveira apresentava 99% de identidade com sequências do 16S rRNA de fitoplasmas afiliados ao grupo 16Sr VII. As análises virtuais de RFLP usando 17 enzimas de restrição e a ferramenta interativa ‘online’ *Iphyclassifier* confirmaram que o fitoplasma aqui estudado pertencia ao grupo 16SrVII, sendo classificado como um membro do subgrupo 16SrVII-B. O fitoplasma presente nas amostras sintomáticas de oliveira apresentou padrões coletivos de restrição *in silico* idênticos àqueles gerados pelo fitoplasma descrito como referência para o subgrupo 16Sr VII-B (Erigeron Witches’ Broom phytoplasma EriWB5 – GenBank AY034608) (Figura 3). Os valores dos coeficientes de similaridade (F) calculados com base nos padrões coletivos de restrição variaram de 0,89 a 1,0 entre o isolado OWB-Br01 e os demais representantes dos diversos subgrupos componentes do grupo 16SrVII (Tabela 4). Especificamente, um valor de coeficiente de similaridade igual 1,0 foi encontrado quando o fitoplasma da oliveira foi contrastado com o fitoplasma referência do subgrupo 16SrVII-B. Estes resultados permitiram concluir que o fitoplasma encontrado na região sul do estado de Minas Gerais está associado à doença vassoura-de-bruxa da oliveira pertence ao subgrupo 16SrVII-B.

Tabela 4: Coeficientes de similaridade (F) calculado pela análise do padrão de RFLP virtual de fitoplasmas dos subgrupos do grupo VII e o fitoplasma do presente estudo (OWB-Br01).

Fitoplasma	Classificação do gene 16S rRNA	AshY1	EriWB5	ArAWB	ErWB-Br01	OWB – Br01
<i>Candidatus Phytoplasma Fraxini</i> (AshY1)	16SrVII - A	1				
Erigeron witches' broom (EriWB5)	16SrVII - B	0.92	1			
Argentinian alfalfa witches' broom (ArAWB)	16SrVII - C	0.86	0.89	1		
Erigeron bonariensis witches' broom (ErWB-Br01)	16SrVII - D	0.87	0.94	0.83	1	
Olive witches' broom phytoplasma (OWB - Br01)	16SrVII - B	0.93	1.00	0.89	0.95	1

As sequências dos isolados O27, O34 e O35 compartilharam 99% de similaridade e mostraram um valor de coeficiente de similaridade de 0,99, quando contrastadas com a sequência do fitoplasma padrão do subgrupo 16SrVII-B. Neste caso, o padrão de restrição gerado pela enzima *MseI* foi distinto daquele apresentado pelo fitoplasma representante do grupo VII-B (Figura 4). A sequência nucleotídica do isolado O33 evidenciou 99% de similaridade com a sequência do representante do subgrupo 16SrVII-B e um valor de coeficiente de similaridade de 0,98. A endonuclease *RsaI* gerou um padrão de restrição enzimático diferenciado para este isolado, em relação ao padrão gerado pelo fitoplasma de referência para o subgrupo 16SrVII-B (Figura 5).

Os isolados se mostraram similares entre si e, seguramente, pertencentes ao mesmo subgrupo do grupo 16SrVII, de acordo com o sistema estabelecido para classificação de fitoplasmas em grupos e subgrupos baseado no 16S rRNA (WEI et al., 2008). Segundo este sistema, para que um fitoplasma seja classificado em um determinado subgrupo é necessário que o valor do coeficiente de similaridade (F) calculado entre ele e todos os demais componentes deste subgrupo seja maior que 0,97. Assim, pelo fato dos isolados identificados nas amostras de oliveira mostrarem valores de (F) acima de 97% em relação ao representante do subgrupo 16SrVII-B, todos podem ser incluídos neste subgrupo de classificação.

Figura 3- Padrões de restrição de RFLP virtual produzidos pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região 16Sr rDNA do fitoplasma presente em árvores de oliveira (Gel A) [OWBP] e do fitoplasma descrito como referência para o subgrupo VII-B (Gel B) [EriWB5].

Figura 4- Padrões de restrição de RFLP virtual gerado pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região 16Sr rDNA do isolado representativo dos isolados O27, O34 e O35 detectados em árvores de oliveira (Gel A) e do fitoplasma representante do grupo VII-B (Gel B) [EriWB5].

Figura 5- Padrões de restrição de RFLP virtual gerado pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região 16Sr rDNA do isolado O33 (Gel A) e do fitoplasma representante do grupo VII-B (Gel B) [EriWB5].

A análise de RFLP virtual permitiu, pela primeira vez, associar um fitoplasma do grupo 16SrVII a este tipo de sintomatologia ocorrente em oliveira. Em outros países, representantes de distintos grupos 16Sr tem sido descritos em associação com doenças de natureza fitoplasmática observadas em árvores doentes. Apesar de diferentes fitoplasmas terem sido relatados em árvores de oliveira, os sintomas de desenvolvimento lento, folhas de tamanho reduzido e presença de intensa brotação de ramos observados nas plantas de oliveira analisadas neste trabalho se apresentaram semelhantes àqueles descritos em plantas de pomares instalados em outras áreas geográficas do mundo. Assim, na Itália, a proliferação de ramos e a ocorrência de subdesenvolvimento em árvores de oliveira foram associados à presença de um fitoplasma molecularmente identificado como membro do grupo 16Sr I-B (MARZACHI et al.; 1999). Na Espanha, superbrotamento de ramos, encurtamento de internódios e aparecimento de ramos anormais foram observados em plantas portadoras de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16Sr XII (FONT et al., 1998). Mais recentemente, no Iran, sintomas característicos de infecção fitoplasmática, tais como folhas miúdas, ramos curtos e ocorrência de ramos extranumerários foram observados em árvores infectadas por fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrI (RASHIDI et al., 2010). Estes mesmos autores relataram a ocorrência de sintomas semelhantes em oliveiras cultivadas em campos comerciais do Azerbaijão, nas quais também foram identificados fitoplasmas representantes do grupo 16SrI. Também na Itália, fitoplasmas afiliados ao grupo 16Sr V foram identificados em plantas que exibiam galhos com folhas mal formadas e áreas dos bordos foliares de conformação irregular (POLLINI et al., 1996). A ocorrência de distintos fitoplasmas associados a sintomas semelhantes produzidos pela mesma planta não se constitui em fato raro, pois alguns patossistemas tem mostrado que o mesmo hospedeiro pode ser infectado naturalmente por fitoplasmas pertencentes a diferentes grupos, os quais podem induzir sintomas similares (MELLO et al., 2011). Além disso, o fato de diferentes fitoplasmas infectarem um determinado hospedeiro pertencente a uma mesma espécie botânica e induzirem sintomas similares sugere baixa especificidade do agente de doença em relação à espécie do hospedeiro, como encontrada no patossistema estudado no presente trabalho.

A distribuição geográfica de fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrVII aparentemente está limitada ao continente americano (FLÔRES et al., 2015). Segundo estes autores, representantes do subgrupo 16SrVII-A tem sido descritos em espécies lenhosas, enquanto membros dos subgrupos 16SrVII-B, 16SrVII-C e 16SrVII-D estão associados com anomalias ocorrentes em espécies herbáceas. Na América do Norte, fitoplasmas do subgrupo 16SrVII-A foram identificados em árvores de freixo (*Fraxinus angustifolia*), uma espécie da mesma

família a que pertence a oliveira, que mostravam sintomas de vassoura-de-bruxa (SINCLAIR & GRIFFITHS, 1996). No Brasil, representantes do subgrupo 16SrVII-B foram inicialmente encontrados em plantas de erigeron (*Erigeron* sp.) e vinca (*Catharanthus roseus*) naturalmente infectadas (BARROS et al., 2002). É interessante mencionar que nestes hospedeiros a presença do fitoplasma também induziu sintomas do tipo vassoura-de-bruxa.

Além dos hospedeiros anteriormente referidos, diversas espécies botânicas cultivadas, daninhas e silvestres têm sido mencionadas como hospedeiras de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrVII. No Chile, um fitoplasma do subgrupo 16SrVII-A foi identificado em videiras com sintomas de amarelos (GAJARDO et al., 2009) e em plantas de peônia (*Paeonia lactiflora*), portadoras de folhas mal formadas, e de plantas de murta (*Ugni molinae*) exibindo vassoura-de-bruxa (ARISMENDI et al., 2011). No Canadá, um membro deste mesmo subgrupo foi caracterizado em árvores de pessegueiro com sintomas de vassoura-de-bruxa (ZUNNOON-KHAN et al., 2010). Na Argentina, um representante do subgrupo 16SrVII-B foi associado a plantas de erigeron com vassoura-de-bruxa (MENEGUZZI et al., 2008). Neste mesmo país, um fitoplasma classificado no subgrupo 16SrVII-C foi encontrado em alfafa com superbrotamento de ramos (CONCI et al., 2005) e em plantas de morango que mostravam sintomas de filodia (FERNANDEZ et al., 2013). Recentemente no Brasil, um fitoplasma também afiliado a este subgrupo foi identificado em plantas de crotalaria com brotamento excessivo de ramos (FLÔRES et al., 2013).

2.3.3 Análise filogenética

A relação filogenética existente entre o fitoplasma identificado em árvores de oliveira, fitoplasmas pertencentes aos diferentes subgrupos que compõem o grupo 16SrVII e representantes dos grupos 16Sr relatados em associação com doenças de natureza fitoplasmática que ocorrem no Brasil está apresentada na árvore filogenética gerada a partir das respectivas sequências nucleotídicas (Figura 6). As ramificações observadas nesta árvore filogenética apontaram que o isolado representativo do fitoplasma da vassoura-de-bruxa da oliveira está alocado dentre os ramos que congregam os diferentes fitoplasmas de referência para cada um dos subgrupos pertencentes ao grupo 16SrVII. Esta relação filogenética está em concordância com os valores dos coeficientes de similaridade e com as análises de RFLP virtuais conduzidas com o conjunto de endonucleases previamente estabelecidas para identificação e classificação de fitoplasmas (WEI et al., 2008). Especificamente, a análise

filogenética revelou que o fitoplasma associado à vassoura-de-bruxa da oliveira compartilha o mesmo clado do fitoplasma de referência para o subgrupo VII-B.

Figura 6- Árvore filogenética construída com as sequências nucleotídicas do fitoplasma identificado nas árvores de oliveira (OWB-Br01), de representantes dos fitoplasmas dos subgrupos pertencentes ao grupo 16Sr VII, dos representantes dos fitoplasmas mais frequentemente descritos no Brasil e do procarioto *Achleoplasma palmae*. Os números nos ramos representam valores de confiança baseados no “Bootstrapping”.

2.3.4 Desenho de primers

Os primers desenhados com a finalidade específica de detectar o fitoplasma da vassoura-de-bruxa da oliveira foram testados para dez sequências selecionadas entre aquelas usadas nos ensaios deste estudo. Para o par de primers OLF (I)/OLR(I), um fragmento de DNA de aproximadamente 1kb foi amplificado a partir de todas as dez amostras analisadas (Figura 7). Os controles negativos representados pelas reações de PCR conduzidas com a presença de água e componentes da mistura não evidenciaram amplificação de fragmentos de DNA. Para o par OLF(II)/OLR(II), das dez amostras avaliadas, sete revelaram a ocorrência de ampliações de fragmentos de aproximadamente 0,9 kb, visualizados no gel de agarose 1% (dados não mostrados). Os controles negativos das reações, os quais foram idênticos àqueles anteriormente referidos, não geraram amplificação visualizadas no gel. Em razão dos resultados obtidos nos ensaios de PCR, estes primers podem ser considerados como

potencialmente promissores, porém as avaliações até agora conduzidas ainda são bastante preliminares. Novos ensaios serão realizados em trabalhos futuros.

Figura 7- Amplificação de fragmentos de DNA em amostras de oliveira sintomáticas por duplo PCR utilizando o par de primer P1/16S na primeira reação e o par OLF(I)/ OLR(I) na segunda reação. Colunas: o1 - o37 representam amostras de oliveira; Coluna: N representa controle negativo; Coluna: M representa marcador molecular 1kb Lader.

3. CONCLUSÃO

Com base nos resultados revelados na presente investigação pode-se concluir que:

- um fitoplasma do grupo 16SrVII-B está associado às árvores de oliveira portadoras de sintomas de vassoura-de-bruxa;
- o fitoplasma identificado em oliveira é distinto de todos os demais fitoplasmas até agora descritos nesta cultura, em diversos países onde a doença tem sido relatada.

REFERÊNCIAS

- ARISMENDI, N.; GONZÁLEZ, F.; ZAMORANO, A.; ANDRADE, N.; PINO, A.M.; FIORE, N. Molecular identification of '*Candidatus* Phytoplasma fraxini' in murta and peony in Chile. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 64, p. 95-96, 2011.
- BARBOSA, J.C.; ECKSTEIN, B.; BERGAMIN FILHO, A.; BEDENDO, I.P.; KITAJIMA, E.W. Molecular characterization of a phytoplasma of group 16SrIX related to "*Ca. Phytoplasma phoenicium*" in periwinkle in Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 130-135, 2012.
- BARROS, T.S.L.; DAVIS, R.E.; RESENDE, R.O.; DALLY, E.L. Erigeron witches'-broom phytoplasma in Brazil represents new subgroup VII-B in 16S rRNA gene group VII, the ash yellows phytoplasma group. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 1142-1148, 2002.
- BEDENDO, I.P. Fitoplasmas e espiroplasmas. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. chap. 11, p. 255-270.
- BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Molecular evidence for the presence of maize bushy stunt phytoplasma in corn In Brasil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 957, 1997.
- BERTACCINI, A.; DUDUK, B. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recente research. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 48, p. 355-378, 2009.
- BERTAMINI, M.; GRANDO, M.S.; MUTHUCHELIAN, K. Effect of phytoplasma infection on photosystem II efficiency and thylakoid membrane protein changes in field grown apple (*Malus pumila*) leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, n. 6, p. 349-356, 2002 a.
- BERTAMINI, M.; NEDUNCHEZHIAN, N.; TOMASI, F. Phytoplasma [Stolbur subgroup (Bois Noir-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, n. 6, p. 357-366, 2002 b.
- BERTANI, G. Studies on lysogenesis. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 62, p. 293-300, 1951.
- BERTONCINI, E.I. Cultivo de oliveiras no estado de São Paulo. **Pesquisa & Tecnologia**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 1-10, jul / dez. 2012.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 238p.
- BOSKOU, D. **Olive oil: chemistry and technology**. 1. ed. Champaign: American Oil Chemists' Society Press, 1996. 161p.
- BROWN, D.R.; WHITCOMB, R.F.; BRADBURY, J.M. Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 2703-2719, 2007.

CAVALHEIRO, C.V.; ROSSO, V.D.; PAULUS, E.; CICHOSKI, A.J.; WAGNER, R.; MENEZES, C.R.; BARIN, J.S. Composição química de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) da região de Caçapava do Sul, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.10, p.1874-1879, out. 2014.

CHRISTENSEN, N.M.; AXELSEN, K.B.; NICOLAISEN, M. Phytoplasmas and their interactions with hosts. **Trends in Plant Sciences**, London, v. 10, n. 11, p. 526-535, 2005.

CONCI, L.; MENEGUZZI, N.; GALDEANO, E.; TORRES, L.; NOME, C.; NOME, S. Detection and molecular characterisation of an alfalfa phytoplasma in Argentina that represents a new subgroup in the 16S rDNA Ash Yellows group ('*Candidatus* Phytoplasma fraxini'). **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 113, p. 255-265, 2005.

COVAS, M.I. Olive oil and the cardiovascular system. **Pharmacological Research**, London, v. 55, n. 3, p. 175-186, 2007.

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

DING, Y.; WU, W.; WEI, W.; DAVIS, R.E.; LEE, I. –M.; HAMMOND, R.W.; SHENG, J. P.; SHEN, L.; JIANG, Y.; ZHÃO, Y. Potato purple top phytoplasma - induced disruption of gibberellin homeostasis in tomato plants. **Annals of Applied Biology**, Hoboken, v. 162, p. 131-139, 2013.

ENDESHAW, S.T.; MUROLO, S.; ROMANAZZI, G.; NERI, D. Effects of bois noir on carbon assimilation, transpiration, stomatal conductance of leaves and yield of grapevine (*Vitis vinífera*) cv. Chardonnay. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 145, p. 286-295, 2012.

FERNÁNDEZ , F.D.; CONCI, V.C.; KIRSCHBAUM, D.S.; CONCI, L.R. Molecular characterization of a phytoplasma of the ash yellows group occurring in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants in Argentina. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 135, p. 1-4, 2013.

FERNÁNDEZ, F.D.; MENEGUZZI, N.G.; GUZMAN, F.A.; KIRSCHBAUM, D.S.; CONCI, V.C.; NOME, C.F.; CONCI, L.R. Detection and identification of a novel 16SrXIII subgroup phytoplasma associated with strawberry red leaf disease in Argentina. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 65, p. 2741-2747, 2015.

FIRRAO, G.; ANDERSEN, M.; BERTACCINI, A. '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p. 1243-1255, 2004.

FLÔRES, D.; AMARAL MELLO, A.O.; PEREIRA, T.B.C.; REZENDE, J.A.M.; BEDENDO, I.P. A novel subgroup 16SrVII-D phytoplasma identified in association with erigeron witches' broom. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 65, p. 2761-2765, 2015.

FLÔRES, D.; HAAS, I.C.; CANALE, M.C.; BEDENDO, I.P. Molecular identification of a 16SrIII-B phytoplasma associated with cassava witches' broom disease. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.137, p. 237-242, 2013.

FONT, I.; ABAD, P.; DALLY, E. L.; DAVIS, R.E.; JORDÁ, C. Nueva enfermedad en el olivar español. **Phytoma España**, Valencia, n. 102, p. 211-212, 1998.

GAI, Y.P.; HAN, X.J.; LI, Y.N. Metabolomic analysis reveals the potential metabolites and pathogenesis involved in mulberry yellow dwarf disease. **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v. 37, n. 6, p. 1474-1490, 2014.

GAJARDO, A.; FIORE, N.; PRODAN, S.; PALTRINIERI, S.; BOTTI, S.; PINO, A. M.; ZAMORANO, A.; MONTEALEGRE, J.; BERTACCINI, A. Phytoplasmas associated with grapevine yellows disease in Chile. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, p. 789-796, 2009.

GALETTO, L.; MARZACHI, C. Real- Time PCR diagnosis and quantification of phytoplasma. In: WEINTRAUB, P. G.; JONES, P. **Phytoplasmas Genomes, Plant Hosts and Vectors**. 1. ed. Oxford, *Centre for Agriculture and Biosciences International*, 2010. chap. 1, p. 1-18.

GIORNO, F.; GUERRIERO, G.; BIAGETTI, M. Gene expression and biochemical changes of carbohydrate metabolism in in vitro micro-propagated apple plantlets infected by ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 70, p. 311-317, 2013.

GRIFITHS, H.M.; SINCLAIR, W.A.; SMART, C.D.; DAVIS, R.E. The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches’-broom: “*Candidatus Phytoplasma fraxini*”. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 49, p. 1605-1614, 1999.

GU, P.W.; AN, F.Q.; WU, Y.F.; YANG, D.; LUO, C.P.; XIANG, J.Y.; YANG, Y. Comparison and analysis of 16S rDNA fragment of phytoplasma of wheat blue dwarf. **Acta Phytopathologica Sinica**, Pequim, v. 35, n. 5, p. 403-409, 2005.

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

GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.M.; REHNER, S.A.; DAVIS, R.E.; KINGSBURY, D.T. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, p. 5244-5254, 1994.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

IRPCM Phytoplasma/ Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group. “*Candidatus Phytoplasma*”, a taxon for the wall - less, non - helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1243-1255, 2004.

LE_ON, R.; SANTAMARÍA, J.M.; ALPIZAR, L. Physiological and biochemical changes in shoots of coconut palms affected by lethal yellowing. **New Phytologist**, Malden, 227-234, 1996.

LEE, I. –M.; DAVIS, R. E.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 221 - 255, 2000.

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

LEE, I.-M.; HAMMOND, R.W.; DAVIS, R.E.; GUNDERSEN, D.E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. **Journal Phytopathology**, Saint Paul v. 83, p. 834 - 842, 1993.

LEE, I.M.; MARTINI, M.; MARCONE, C.; ZHU, S.F. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 'Candidatus phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 337-347, 2004.

LEPKA, P.; STITT, M.; MOLL, E. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 1, p. 59-68, july. 1999.

LOCONSOLE, G.; SAPONARI, M.; BOTTALICO, G.; FAGGIOLI, F.; ALBANESE, G.; SAVINO, V. Production of Nuclear Stock olive plants for certification programs. **La Rivista di Scienza Dell'Alimentazione**, Roma, n. 1, p. 75-84, gennaio/ marzo. 2013.

LURIA, S.E.; BURROUS, J.W. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 74, p. 461-476, 1957.

MARCONE, C. Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 165, p. 199-221, 2014.

MARCONE, C. Movement of Phytoplasmas and the Development of Disease in the Plant. In: WEINTRAUB, P. G.; JONES, P. **Phytoplasmas Genomes, Plant Hosts and Vectors**. 1. ed. Oxford, Centre for Agriculture and Biosciences International, 2010. chap. 7, p. 114-131.

MARCONE, C.; RAGOZZINO, A. Comparative ultrastructural studies on genetically different phytoplasmas using scanning electron microscopy. **Petria**, Roma, v. 6, n. 2, p. 125-136, 1996.

MARTELLI, G.P.A. Brief Outline of Infectious Diseases of Olive. **Palestine Technical University Research Journal**, Palestina, v. 1, n. 1, p. 01-09, 2013.

MARTINI, M.; LEE, I.-M.; BOTTNER, K.; ZHAO, Y.; BOTTI, S.; BERTACCINI, A.; HARRISON, N.; CARRARO, L.; MARCONE, C.; KHAN, A. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 2037-2051, 2007.

MARZACHÌ, C.; ALMA, A.; D'AQUILIO, M.; MINUTO, G.; BOCCARDO, G. Detection and identification of phytoplasmas infecting cultivated and wild plants in Liguria (Italian Riviera). **Journal of Plant Pathology**, Itália, v. 81, n. 2, p. 127-136, July, 1999.

MAUST, B.E.; ESPADAS, F.; TALAVERA, C. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 93, n. 8, p. 976-981, 2003.

MCCOY, R.E. Mycoplasmas and yellows diseases. In: WHITCOMB, R. F. AND TULLY, J. G.(ED). **The Mycoplasmas**. New York: Academic Press, 1979. v. 3, p. 229-264.

MCCOY, R.E.; CAUDWELL, A.; CHANG, C.J.; CHEN, T.A.; CHYKOWSKI, L.N.; COUSIN, M.T.; DALE, J.L.; DE LEEUW, G.T.N.; GOLINO, D.A.; HACKETT, K.J.; KIRKPATRICK, B.C.; MARWITZ, R.; PETZOLD, H.; SINHA, R.C.; SUGIURA, M.; WHITCOMB, R.F.; YANG, I.L.; ZHU, B.M.; SEEMULLER, E. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: WHITCOMB, R.F.; TULLY, J.G. (ED). **The Mycoplasmas**. New York: Academic Press, 1989. v. 5, p. 545-640.

MELLO, A.P.O.A.; ECKSTEIN, B.; FLORES, D.; KREYCI, P.F.; BEDENDO, I.P. Identification by computer-simulated RFLP of phytoplasmas associated with eggplant giant calyx representative of two subgroups, a lineage of 16SrIII-J and the new subgroup 16SrIII-U. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 61, p. 1454-1461, 2011.

MELLO, L.D.; PINHEIRO, M.F. Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 23, n. 4, p. 537-548, out/dez, 2012.

MELO, L.; SILVA, E.; FLÔRES, D.; VENTURA, J.; COSTA, H.; BEDENDO, I. P. A phytoplasma representative of a new subgroup, 16SrXIII-E, associated with Papaya apical curl necrosis. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrech, v. 137, p. 445-450, 2013.

MENEGUZZI, N.G.; TORRES, L.E.; GALDEANO, E.; F.A. GUZMÁN.; S.F. NOME.; L.R. CONCI. Molecular characterization of a phytoplasma of the ash yellows group (16Sr VII-B) occurring in *Artemisia annua* and *Conyza bonariensis* weeds. **Agriscientia**, Córdoba, v. XXV, n. 1, p. 7-15, 2008.

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

MONTANO, H.G.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; PIMENTEL, J.P.; BRIOSO, P.S.T. Identification and phylogenetic analysis of a new Phytoplasma from diseased chayote in Brasil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 4, p. 429-436, 2000.

MOTAMEDI, E.; SALEHI, M.; SABBAGH, S.K.; SALARI, M. Differentiation and Classification of Phytoplasmas Associated with Almond and GF-677 Witches'-Broom Diseases using rRNA and rp Genes. **Journal Phytopathology**, Saint Paul, v. 164, p. 185-192, 2016.

NEI, M.; LI, W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

OLIVEIRA, M.C.; NETO, J.V.; PIO, R.; OLIVEIRA, A.F.; RAMOS, J.D. Enraizamento de estacas de oliveira submetidas a aplicação de fertilizantes orgânicos e AIB. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 337-344, mar/ abr. 2010.

POLLINI POGGI, C.; BISSAN, R.; GIUNCHED, L.; VINDIMIAN, E. First Report of Phytoplasma Infection in Olive Trees (*Olea Europea* L.). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, p. 109-111, 1996.

RASHIDI, M.; GHOSTA, Y.; BAHAR, M. Molecular identification of a phytoplasma associated with Russian olive witches' broom in Iran. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, n. 127, p. 157-159, 2010.

RAYMAEKERS, M.; SMETS, R.; MAES, B.; CARTUYVELS, R. Checklist for Optimization and Validation of Real-Time PCR Assays. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, Hoboken, v. 23, p. 145-51, 2009.

RICALDE, M.P.; GARCIA, F.R.M.; NAVA, D.E.; LOECK, A.E.; DONATTI-RICALDE, M.G.; COUTINHO, E.F. *Oxycenus maxwelli* (Keifer) (Acari: Eriophyidae) danificando a cultura da oliveira, *Olea europaea* L., no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 767-769, mai. 2012.

SAEED, S.T.; SRIVASTAVA, A.K.; SAROJ, A.; KHAN, A.; SAMAD, A. Phylogenetic analysis of "rose witches'-broom" phytoplasma from cultivated *Rosa damascena* in India representing a new subgroup V-B1 in 16S rRNA gene group V. **Plant Gene**, Amsterdam, v. 5, p. 71-77, 2016.

SANTOS-CERVANTES, M.E.; CHÁVEZ-MEDINA, J.A.; ACOSTA-PARDINI, J.; FLORES-ZAMORA, G.L.; MÉNDEZ-LOZANO, J. Genetic diversity and geographical distribution of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p. 388-395, 2010.

SEEMULLER, E.; GARNIER, M.; SCHNEIDER, B. Mycoplasmas of plants and insects. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R. (ED). **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2002. chap. 5, p. 91-117.

SEEMULLER, E.; MARCONE, C.; LAUER, U.; RAGOZZINO, A.; GOSCHL, M. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. **Journal of Plant Pathology**, Italia, v. 80, p. 3-26, 1998.

SILVA, E.G; FLÔRES, D.; BEDENDO, I.P. Bougainvillea shot proliferation, a new disease induced by distinct phytoplasmas. **Journal of Phytopathology**, v.163, p. 872-876, 2015.

SILVA, L.F.O.; OLIVEIRA, A.F.; PIO, R.; ZAMBON, C.R. Caracterização agronômica e carpométrica de cultivares de oliveira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 3, p. 350-356, jul / set. 2012.

SINCLAIR, W.A.; GRIFFITHS, H.M.; DAVIS, R.E. Ash yellows and Lilac Witches" – Broom: Phytoplasma disease of concern in forest and horticulture. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, n. 5, p. 468-475, May, 1996.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TAN, P.Y.; WHITLOW, T. Physiological responses of *Catharanthus roseus* (periwinkle) to ash yellows phytoplasmal infection. **New Phytologist**, New York, v. 150, n. 3, p. 757-769, 2001.

TERAMOTO, J.R.S.; BERTONCINI, E.I.; PRELA-PANTANO, A. Mercado dos produtos da oliveira e os desafios brasileiros. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 24-32, mar/ abr. 2013.

TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J.; FERRARI, J.T.; NOGUEIRA, E.M.C. Doenças fúngicas da oliveira: sintomas, etiologia e manejo. **Biológico**, São Paulo, v.75, n. 1, p.53-61, jan/jun, 2013.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; FREITAS, G.F. Otimização de um protocolo para micropropagação da oliveira Ascolano 315. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n. 4, p. 530-534, jul/ ago. 2010.

VITALE, M.; CHITARRA, W.; GALETTO, L.; BOSCO, D.; MARZACHÌ, C.; GULLINO, M. L.; SPANNA, F.; LOVISOLO, C. Flavescence dorée phytoplasma deregulates stomatal control of photosynthesis in *Vitis vinífera*. **Annals of Applied Biology**, Hoboken, v. 162, p. 335-346, 2013.

VOGNILDA, E.; ELVEVOLL, E.O.; BROX, J.; OLSEN, R.L.; BARSTAD, H.; AURSAND, M.; ØSTERUD, B. Effects of dietary marine oils and olive oils on fatty acid composition, platelet membrane fluidity, platelet responses and serum lipids in healthy humans. **Lipids Germany**, Weinheim, v. 33, n. 4, p. 427-436, 1998.

WEI, W.; DAVIS, R.E.; LEE, I.M.; ZHAO, Y. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 1855-1867, 2007.

WEI, W.; LEE, I.M.; DAVIS, R.E.; SUO, X.; ZHAO, Y. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 2368-2377, 2008.

ZHAO, Y.; DAVIS, R.E.; WEI, W.; SHAO, J.; JOMANTIENE, R. Phytoplasma genomes: evolution through mutually complementary mechanisms, gene loss and horizontal acquisition. In: GROSS, D.C.; LICHENS-PARK, A.; KOLE, C. (ED). **Genomics of Plant-Associated Bacteria**. New York: Springer Heidelberg, 2014. chap. 10, p. 235-271.

ZHAO, Y.; WEI, W.; LEE, I.M.; SHAO, J.; SUO, X.B.; DAVIS, R.E. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 2582-2593, 2009.

ZUNNOON-KHAN, S.; AROCHA-ROSETE, Y.; SCOTT, J.; CROSBY, W.; BERTACCINI, A.; MICHELUTTI, R. First report of 'Candidatus Phytoplasma fraxini' group 16SrVII phytoplasma associated with a peach disease in Canada. **New Disease Reports**, Inglaterra, v.21, p. 20, 2010.