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

**Identificação de diversidade genética em fitoplasmas com base na
análise molecular dos gene 16S rRNA, SecY e Proteína Ribossomal**

Thays Benites Camargo Pereira

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2015**

Thays Benites Camargo Pereira
Engenheira Agrônoma

**Identificação de diversidade genética em fitoplasmas com base na análise
molecular dos gene 16S rRNA, SecY e Proteína Ribossomal**

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

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2015

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

Pereira, Thays Benites Camargo

Identificação de diversidade genética em fitoplasmas com base na análise molecular dos gene 16S rRNA, SecY e Proteína Ribossomal / Thays Benites Camargo Pereira. - - Piracicaba, 2015.

106 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Caracterização Multilocus 2. Mollicutes 3. Ferramentas moleculares 4. Procariotos sem parede celular I. Título

CDD 632.32
P436i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*A Deus pela Vida,
Aos meus pais Fernando e Doralice
e a meus irmãos Luis e Lays
por todo amor, apoio e incentivo* **DEDICO.**

“Se sua coragem negar-lhe, vá além de sua coragem”.

Emily Dickinson

Ao prof. Dr. Ivan P. Bedendo,
OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus por toda força, tornando tudo possível.

Aos meus pais e irmãos pelo exemplo, educação, companheirismo e todo incentivo nesta etapa de minha vida.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Fitopatologia pela inestimável oportunidade concedida de cursar meu mestrado e doutorado.

Ao Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo pela confiança e compreensão durante estes cinco anos. Assim como, pela valiosa colaboração para minha formação pessoal e profissional, sendo para mim um exemplo de pessoa a ser seguido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado. E a Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado sanduíche no exterior.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia que contribuíram para a minha formação, dedicando-se em fornecer seus conhecimentos.

Aos amigos do laboratório de Procariotos Fitopatogênicos Ariane Souza, Ana Mello, Daniela Flôres, Jacson Ferreira, Sarah Galvão e Ticyana Banzato pelos momentos agradáveis e pela ajuda.

Agradeço em Especial a minhas amigas Daniela Flôres, Cintia Carla Avalhães e Carol Kinjo pela amizade verdadeira e pelos ótimos momentos alegres que passamos e ainda passaremos juntas.

Aos amigos Viviana Camelo, Dalilla Rezende, Tauhany Rosa, Riviane Donha, Elcio Santos, Fernando Giovanetti, Bruno Zancheta, Evandro Ganen, Magner Rocha e Sebastião Solto, muito obrigada por de alguma forma tornarem minha vida mais completa.

Aos amigos que fiz no Departamento de Fitopatologia e na ESALQ.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

I am very grateful to Dr. Robert E. Davis, research leader on Molecular Plant Pathology Laboratory (USDA/ARS/Beltsville), for the opportunity to have had one year with your wonderful work team. Especially Ellen L. Dally, a person that taught me much more than scientific knowledge, giving me a lot of support all the time that I spent outside my country. I feel so blessed to have had the opportunity to meet Ellen and Robert, example of people that I will follow all my life. I appreciate Dr. Lee, Dr. Rose, Dr. John, Dr. Talo, Dr. Zhao, Dr. Wei, Daiana Bampi, Kristy, Jonathan, Sharon, Eleanor, Reham, and Sagheer for all lunches, chats and travel. I really had great times and I will remember forever.

Aos funcionários da Seção de Pós Graduação e da Biblioteca pelos serviços prestados.

A todos, que de uma forma direta ou indireta contribuíram para a minha formação e para realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
Referências	18
2 ÁRVORE-DA-FELICIDADE (POLYSCIAS FRUTICOSA), UM NOVO HOSPEDEIRO PARA UM FITOPLASMA DO SUBGRUPO 16SrVII-B NO BRASIL	21
Resumo	21
Abstract	21
2.1 Introdução	22
2.2 Material e Métodos	24
2.2.1 Material Vegetal	24
2.2.2 Extração do DNA total	24
2.2.3 Controles utilizados na reação de PCR.....	25
2.2.4 Reagentes utilizados e condições de PCR para amplificação de fragmentos genômicos do gene 16S rRNA	25
2.2.5 Purificação dos fragmentos de DNA amplificados nas reações de PCR.....	27
2.2.6 Quantificação do fragmento genômico amplificado na PCR	27
2.2.7 Sequenciamento do fragmento genômico amplificado na PCR	27
2.2.8 Análise de RFLP <i>in silico</i>	28
2.2.9 Análise filogenética	29
2.3 Resultados e Discussão	29
2.4 Conclusão	34
Referências	34
3 COUVE - FLOR (BRASSICA OLERACEA VAR. BOTRYTIS) COMO UM NOVO HOSPEDEIRO PARA O FITOPLASMA SUBGRUPO 16SrVII-B ASSOCIADO A DOENÇA CONHECIDA COMO ENFEZAMENTO DA COUVE-FLOR	39
Resumo	39
Abstract	40
3.1 Introdução	40
3.2 Material e Métodos	42
3.2.1 Material Vegetal	42
3.2.2 Extração do DNA total	42
3.2.3 Controles utilizados na reação de PCR.....	44
3.2.4 Reagentes utilizados e condições de PCR para amplificação de fragmentos genômicos do gene 16S rRNA	44
3.2.5 Purificação do fragmento de DNA amplificado na reação de PCR.....	45

3.2.6	Quantificação do fragmento genômico amplificado na PCR.....	46
3.2.7	Sequenciamento do fragmento genômico amplificado na PCR.....	46
3.2.8	Análise de RFLP <i>in silico</i>	46
3.2.9	Análise filogenética	47
3.3	Resultados e Discussão	48
3.4	Conclusões	54
	Referências.....	54
4	UM NOVO FITOPLASMA DO GRUPO 16SrXIII E UM FITOPLASMA DO GRUPO 16SrIII-J ENCONTRADO EM ALHO-PORÓ COM SINTOMAS DE SUBDESENVOLVIMENTO E RETORCIMENTO DE FOLHAS	60
	Resumo	60
	Abstract	60
4.1	Introdução.....	61
4.2	Material e Métodos	63
4.2.1	Material Vegetal	63
4.2.2	Extração do DNA total	63
4.2.3	Controles utilizados na reação de PCR	64
4.2.4	Reagentes e condições de PCR empregados para a amplificação de fragmentos genômicos do gene 16S rRNA.....	64
4.2.5	Reagentes utilizados e condições de PCR para a amplificação de fragmentos genômicos do gene da Proteína Ribossomal (rp)	65
4.2.6	Reagentes utilizados e condições de PCR para amplificação de fragmentos genômicos do gene <i>SecY</i>	66
4.2.7	Purificação dos fragmentos de DNA amplificados na reação de PCR.....	67
4.2.7.1	Purificação a partir da extração do gel de agarose.....	67
4.2.7.2	Purificação direta do produto de PCR.....	68
4.2.8	Quantificação do fragmento genômico amplificado na PCR.....	69
4.2.9	Clonagem do gene 16S rRNA	69
4.2.10	Sequenciamento dos fragmentos genômicos amplificados por PCR para os genes 16S rRNA, <i>SecY</i> e Proteína Ribossomal	70
4.2.11	Análise de RFLP <i>in silico</i>	71
4.2.12	Análise filogenética	72
4.3	Resultados e Discussão	74
4.3.1	Análise do gene 16S rRNA	74
4.3.2	Análise do gene <i>SecY</i> para o representante do subgrupo 16SrIII-J encontrado em Alho-poró.	83
4.3.3	Análise do gene <i>SecY</i> para o representante do grupo 16SrXIII encontrado em Alho-poró	87
4.3.4	Análise do gene da Proteína Ribossomal (rp)	87

4.4 Conclusões.....	92
Referências	92
APÊNDICES	99

RESUMO

Identificação de diversidade genética em fitoplasmas com base na análise molecular dos genes 16S rRNA, SecY e Proteína Ribossomal

Os fitoplasmas são organismos procariotos sem parede celular, que habitam as células do floema das plantas e são transmitidos, principalmente, por cigarrinhas sugadoras de floema. Este patógeno é responsável por causar doenças em diversas espécies vegetais, provocando a expressão de diversos sintomas, entre os quais podem ser destacados a redução do tamanho foliar, amarelecimento das folhas, superbrotamento de ramos e enfezamento da planta hospedeira. Entre os anos de 2013 e 2014, plantas de três espécies vegetais com sintomas característicos de infecção causada por fitoplasmas foram observadas no estado de São Paulo. O DNA total foi extraído a partir de plantas de couve-flor com sintomas de nanismo, malformação da inflorescência e necrose dos vasos do floema; de plantas da ornamental conhecida por árvore-da-felicidade com sintomas amarelecimento e redução do limbo foliar; e de plantas de Alho-poró com sintomas de enfezamento. Por meio do teste de PCR conduzido em sua maioria com os *primers* P1A/16S-SR foi possível detectar fitoplasmas nas três espécies vegetais testadas. Os fragmentos genômicos correspondentes ao 16S rRNA dos fitoplasmas foram sequenciados e identificados. Nas plantas de couve-flor e da árvore-da-felicidade foram identificados fitoplasmas afilados ao grupo 16SrVII-B, através da análise virtual de RFLP, cálculo dos coeficientes de similaridade (F) e análise filogenética. Para ambas as espécies, este é o primeiro relato da ocorrência de representantes deste grupo, nas condições brasileiras. Nas plantas de Alho-poró foram identificados fitoplasmas afiliados ao subgrupo 16SrIII-J e ao grupo 16SrXIII, com base na análise dos genes 16S rRNA, SecY e proteína ribossomal, conduzidas através de análise virtual de RFLP, valores de coeficientes de similaridade e análise filogenética. Para o fitoplasma membro do grupo 16SrXIII foram identificadas quatro estirpes, uma delas afiliada ao subgrupo 16SrXIII-E e as demais como prováveis representantes de novos subgrupos. O presente estudo se constitui em uma contribuição ao conhecimento de novos patossistemas envolvendo fitoplasmas, bem como à caracterização molecular de fitoplasmas baseadas em diferentes genes marcadores, atualmente usados para a classificação de representantes deste grupo emergente de agentes causais de doenças de plantas.

Palavras-chave: Caracterização Multilocus; Mollicutes; Ferramentas moleculares; Procariotos sem parede celular

ABSTRACT

Identification of genetic diversity in phytoplasma based on molecular analysis of the 16S rRNA, SecY and ribosomal protein genes

The phytoplasmas are prokaryotic organisms without cell walls, which inhabit the phloem cells of plants and are transmitted mainly by leafhoppers sucking the phloem. This pathogen is responsible for causing diseases in various plant species, leading to expression of many symptoms, among which can be highlighted the reduction of leaf size, leaf yellowing, shoots proliferation and stunting of the plant host. Between the years 2013 and 2014, three plant species with characteristic symptoms of infection caused by phytoplasma were observed in São Paulo. Total DNA was extracted from cauliflower plants with symptoms of stunting, malformation of the inflorescence and necrosis of the phloem; ornamental plants known for Ming Aralia with symptoms yellowing and little leaves; and leek plants with symptoms of stunting. Through the PCR test conducted mostly with the primers P1A/16S-SR was possible to detect phytoplasmas in the three species of plants. The genomic fragments corresponding of 16S rRNA gene of the phytoplasma were sequenced and identified. In plants of cauliflower and Ming Aralia were identified phytoplasmas belonging to 16SrVII-B group through virtual RFLP analysis, calculation of similarity coefficients (F) and phylogenetic analysis. For both species, this is the first report of the occurrence of representatives of this group, in Brazilian conditions. In leek plants were identified phytoplasmas affiliated with 16SrIII-J subgroup, and the 16SrXIII group, based on the analysis of the 16S rRNA, SecY and ribosomal protein genes, conducted through virtual analysis of RFLP, similarity coefficient values and phylogenetic analysis. For the phytoplasma member of group 16SrXIII were identified four strains, one affiliated with 16SrXIII-E subgroup and the others as probable representatives of new subgroups. This study constitutes a contribution to knowledge of new pathosystems involving phytoplasmas and the molecular characterization of phytoplasma based on different marker genes, currently used for the classification of representatives of this emerging group of plant pathogens.

Keywords: Cell wall-less prokaryotes; Molecular tools; Mollicutes, Multilocus characterization

1 INTRODUÇÃO

Os fitoplasmas são organismos procariotos unicelulares, sem parede celular, que apresentam uma única membrana ao redor do citoplasma. A ausência da parede celular resulta no pleomorfismo da célula, uma característica típica deste grupo de Mollicutes (BEDENDO, 2011). Segundo Lee e Davis (1992), através da microscopia eletrônica, os fitoplasmas podem ser visualizados nas células vegetais infectadas como corpúsculos normalmente arredondados ou de formas diversas, inclusive como filamentos ramificados. São parasitas obrigatórios de plantas e insetos, encontrados no floema das plantas e na hemolinfa dos insetos, principalmente das cigarrinhas da Ordem Hemiptera (BERTACCINI, 2007).

As doenças provocadas por este tipo de patógeno podem expressar diversos sintomas, os quais podem aparecer isoladamente ou de forma combinada, dependendo do patossistema patógeno-hospedeiro (BEDENDO, 2011). De acordo com este mesmo autor, os sintomas típicos exibidos por plantas doentes se caracterizam por clorose, necrose do floema, redução do tamanho foliar, amarelecimento das folhas, superbrotamento de ramos, enfezamento da planta, proliferação de gemas axilares, gigantismo do cálice, redução do tamanho das flores, filodia (transformação de órgãos florais em estruturas foliares), virescência (desenvolvimento de cloroplasto nas pétalas) e esterilidade. Os efeitos da doença podem variar dependendo da planta, da estirpe do patógeno e do ambiente (DAVIS, 1995).

Como exemplos clássicos de doenças de impacto econômico associadas aos fitoplasmas merecem destaque especial o amarelecimento letal do coqueiro, o amarelo do pessegueiro, o amarelo e a flavescência dourada da videira, o nanismo do arroz, o superbrotamento da batata, os enfezamentos do milho, o declínio e amarelos das rosáceas (DAVIS, 1955). No Brasil, na década de 1990 já eram relatadas uma série de doenças de natureza fitoplasmática ocorrentes em algumas espécies ornamentais, frutíferas, hortícolas e cereais (KITAJIMA, 1994).

O estudo dos fitoplasmas é dificultado principalmente devido ao difícil cultivo destes procariotos em meio de cultura. Até o presente, exaustivas tentativas para cultivar axenicamente estes microrganismos não tiveram sucesso. Desta forma, a detecção e classificação de fitoplasmas são feitas, sobretudo, com base nas diferentes regiões conservadas de alguns genes destes patógenos. Com a

introdução de métodos moleculares, a diversidade genética de fitoplasmas pode ser adequadamente explorada, servindo como base para a elaboração de um sistema de classificação taxonômica fundamentado em características filogenéticas (MARCONE, 2014). A biotecnologia permitiu esclarecer a filogenia e a relação genética entre fitoplasmas utilizando-se principalmente a amplificação do DNA pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e a análise das sequências nucleotídicas pela técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (DAVIS, 1995; HARRISON et al., 1996; BEDENDO et al., 1997). O emprego conjunto destas técnicas tem permitido classificar estes microrganismos em diferentes grupos e subgrupos (LEE et al., 1998; BERTACCINI; DUDUK, 2009; LEE et al., 2010a). Assim, padrões de restrição gerados pela digestão enzimática da região correspondente ao gene 16S rRNA são confrontados com padrões previamente relatados na literatura, permitindo a alocação dos fitoplasmas em distintos grupos e subgrupos (LEE et al., 1993, 1998). Na década de 1990, este sistema apontou a ocorrência de diversidade genética entre fitoplasmas, suficiente para agregar os fitoplasma, até então conhecidos, em 19 grupos e mais de 40 subgrupos (LEE et al., 1993, 1998).

Mais recentemente, outra modalidade de RFLP, denominada de RFLP virtual, tem sido adotada para a identificação e classificação de fitoplasmas (WEI et al., 2007; ZHAO et al., 2009). Neste caso, os fragmentos genômicos amplificados por PCR são sequenciados e uma digestão *in silico* é conduzida usando-se programas de computador. Os padrões de restrição gerados para o fitoplasma em estudo são comparados com aqueles relatados para outros fitoplasmas. Índices de similaridade entre os padrões de restrição apresentados pelo fitoplasma em estudo e aqueles encontrados na literatura são calculados a partir de equações matemáticas, permitindo a classificação em um dos grupos existentes ou em novos grupos, dependendo da diversidade genética encontrada neste tipo de análise. Com este esquema, 33 grupos e diversos subgrupos são reconhecidos até o momento (LEE et al., 1998, 2010a, 2010b; BERTACCINI; DUDUK, 2009; WEI et al., 2007, 2011; NEJAT, 2013; MARCONE, 2014).

O gene 16S ribossomal RNA (rRNA) é altamente conservado e usado oficialmente para classificação dos fitoplasmas em diferentes grupos e subgrupos dentro do gênero provisório '*Candidatus* phytoplasma'. Esta classificação foi proposta pelo International Research Program for Comparative Mycoplasmaology

(IRPCM), Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma taxonomy group, onde uma nova espécie é criada quando a sequência nucleotídica apresenta uma dissimilaridade de 2,5 % (IRPCM, 2004). O táxon provisório '*Candidatus*' foi introduzido em 1995 por Murray e Stackebrandt para descrições incompletas, procariotos não cultiváveis com dados moleculares específicos, principalmente quando sequências do 16S rDNA estão disponíveis (MARCONE, 2014).

Na última década, por meio de estudos epidemiológicos foi possível observar que diversas estirpes de fitoplasmas estão intimamente relacionadas, com base na análise de sequências do gene 16S rRNA, além de estarem envolvidas em doenças similares, associadas a vários cultivares de uma mesma espécie plantada em diferentes regiões geográficas. Entretanto, para facilitar o desenvolvimento de medidas de controle de doenças, é importante saber a correlação entre as diversas estirpes de fitoplasma e seus nichos ecológicos únicos, pois muitas vezes, estas estirpes não podem ser facilmente diferenciadas por análise de sequências de genes do 16S rRNA. Frente a esta dificuldade, passou-se a buscar marcadores moleculares adicionais para promover uma fina diferenciação de estirpes de fitoplasma intimamente relacionados. Dentre estes, podem ser citados os marcadores para o gene *Tuf*, gene da proteína ribossomal (rp), gene *SecY*, gene *SecA* e para a região espaçadora 16S-23S rRNA (ISR) (MARCONE, 2014; LEE et al., 2010a).

Lee et al., (2004) relataram que a natureza altamente conservada do gene 16S rRNA tem sido muito útil para a classificação dos microrganismos ao nível de gênero ou para táxons superiores, entretanto não é suficientemente adequada para a diferenciação ao nível de espécie. Neste trabalho, os autores enfatizaram a necessidade de se empregar parâmetros moleculares que fossem geneticamente variáveis, possibilitando à condução de uma fina diferenciação de estirpes dentro de um determinado grupo de fitoplasmas. Foi observado também que em contraste com os subgrupos definidos com base na sequência do gene 16S rRNA, a maioria dos subgrupos diferenciados utilizando-se as sequências dos genes da proteína ribossomal (rp) e *SecY* era consistente com os seus nichos ecológicos específicos, seja ele a planta hospedeira, o vetor ou a região geográfica.

O gene da Proteína Ribossomal (rp) é mais variável que o gene 16S rRNA e tem mais características filogenéticas informativas, podendo aumentar substancialmente o poder de resolução em delinear distintas estirpes de fitoplasmas.

Esta variação de sequência faz do gene *rp* a melhor ferramenta molecular para diferenciação de estirpes de fitoplasmas. Por exemplo, a similaridade média das sequências entre dois grupos (16Sr) de fitoplasma variou de 50,4 a 83,% baseada no gene *rp* e de 85,0 a 96,6% baseada no gene 16S rRNA. Já para o gene *SecY*, a similaridade média das sequências entre estes dois grupos variou entre 57,4 a 76%. Estes dados mostraram que tanto o gene *rp*, como o gene *SecY* podem representar um bom parâmetro para ser usado na classificação de estirpes de fitoplasmas (LEE et al., 2010a).

Com base na análise molecular do consagrado gene marcador 16S rRNA e dos novos genes marcadores *SecY* e Proteína Ribossomal, o presente estudo teve por objetivo a identificação da diversidade genética de fitoplasmas associados a distintas espécies vegetais, bem como disponibilizar à comunidade científica as sequências do gene *rp* e gene *SecY* correspondentes aos fitoplasma dos subgrupos 16SrIII-J e 16SrXIII, classificados de acordo com o gene 16S rRNA.

Referências

- 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 Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 957, 1997.
- BERTACINI, A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. **Frontiers in Bioscience**, Bologna, v. 12, p. 673-689, 2007.
- BERTACCINI, A.; DUDUK, B. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recente research. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 48, p. 355-378, 2009.
- DAVIS, R.E. Fitoplasmas: fitopatógenos procariotos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 3, p. 1-27, 1995.
- HARRISON, N.A.; RICHARDSON, P.A.; TSAI, J.H. Assay for detection of phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 263-269, 1996.
- IRPCM. '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.

KITAJIMA, E.W. Enfermidades de plantas associadas a organismos do tipo micoplasma. In: LUZ, W.C. da.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 153-174, 1994.

LEE, I.M.; DAVIS, R.E. Mycoplasmas which infect plants and insects. In: MANILOFF, J.; McELHANSEY, R.N.; FINCH, L.R.; BASEMAN, J.B. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 379-390.

LEE, I.M.; HAMMONS, R.W.; DAVIS, R.E.; GUNDERSEN, D.E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 8, p. 834-842, 1993.

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

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.

LEE, I.-M.; ZHAO, Y.; DAVIES, R.E. Prospects of multiple gene-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. **Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors**. Wallingford: CAB International, 2010a. chap. 4, p. 51-63.

LEE, I.-M.; BOTTNER-PARKER, K.D.; ZHAO, Y.; DAVIES, R.E.; HARRISON, N.A. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 60, p. 2887-2897, 2010b.

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

NEJAT, N.; VADAMALAI, G.; DAVIS, R.E.; HARRISON, N.A.; SIJAM, K.; DICKINSON, M.; ABDULLAH, S.N.A.; ZHAO, Y. '*Candidatus Phytoplasma malaysianum*', a novel taxon associated with virescence and phyllody of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 63, p. 540-548, 2013.

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.; CAI, H.; JIANG, Y.; LEE, I-M.; DAVIS, R.E.; DING, Y.; YUAN, E.; CHEN, H.; ZHAO, Y. A new phytoplasma associated with little leaf diseases in azalea: multilocus sequence characterization reveals a distinct lineage within the aster yellows phytoplasma group. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 158, p. 318-330, 2011.

ZHAO, Y.; WEI, W.; LEE, I-M.; SHAO, J.; SUO, X.; DAVIS, R.E. Construction of 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.

2 ÁRVORE-DA-FELICIDADE (*POLYSCIAS FRUTICOSA*), UM NOVO HOSPEDEIRO PARA UM FITOPLASMA DO SUBGRUPO 16SrVII-B NO BRASIL

Resumo

Árvore da Felicidade [*Polyscias fruticosa* (L.) Harms.] é uma espécie arbustiva, perene, ornamental, originária do sudeste da Ásia e das ilhas tropicais do Pacífico. Em 2013, uma doença, aqui denominada de folha pequena da árvore da felicidade (MaLL), foi observada em jardins localizados no estado de São Paulo. A presença de folhas amareladas e anormalmente pequenas forneceu a primeira evidência de infecção por fitoplasma. O DNA total para uso em reações de PCR foi extraído de folhas e brotos jovens, a partir de uma planta assintomática e de três plantas sintomáticas. Uma reação inicial de PCR usando-se os *primers* fU5/rU3 produziu um fragmento de 0,9 kbp e a análise da sequência nucleotídica deste fragmento (GenBank número de acesso KR363128) indicou a infecção da planta por um fitoplasma. Para identificar esse fitoplasma foram usados os iniciadores P1/16S-SR seguidos de P1A/16S-SR que amplificam o fragmento do gene 16S rRNA. Reações de PCR contendo o DNA da planta sintomática geraram fragmentos genômicos de 1,6 kbp. Nenhuma amplificação ocorreu quando foi usado como molde o DNA derivado de plantas assintomáticas. Os produtos de PCR de 1,6 kbp foram purificados e sequenciados para atingir uma cobertura de 4X a 5X por base, sendo a sequência depositada na base de dados GenBank (número de acesso KP828428). Usando a sequência KP828428, o melhor resultado de similaridade ocorreu com a sequência do fitoplasma associado ao superbrotamento do erigeron (GenBank número de acesso AY034608), um membro do grupo 16SrVII. Os padrões de RFLP *in silico*, obtidos com o uso da ferramenta 'on-line' *iPhyClassifier*, foram indistinguíveis dos padrões característicos para o subgrupo 16SrVII-B. O alinhamento de sequências, conduzido com o programa MegAlign (software Lasergene; DNASTAR), revelou que o fitoplasma estudado compartilhava 100% de identidade com a sequência do gene 16S rRNA do fitoplasma agente do superbrotamento do erigeron, estirpe de referência do subgrupo 16SrVII-B. No Brasil, fitoplasmas pertencentes ao subgrupo 16SrVII-B foram anteriormente relatados em plantas doentes de *Erigeron* sp. e *Cantharanthus roseus*, no estado de São Paulo. O presente estudo amplia o conhecimento da gama de hospedeiros naturais do subgrupo 16SrVII-B e revela *Polyscias fruticosa* como um novo hospedeiro dessa linhagem de fitoplasma.

Palavras-chave: Procariotos sem parede; Identificação molecular; Mollicutes; PCR/RFLP

Abstract

Ming aralia [*Polyscias fruticosa* (L.) Harms.] is a perennial dicot evergreen shrub used as an ornamental. Originally from south-eastern Asia and the Pacific tropical islands, the species is an exotic commercialized in Brazil. In 2013 a disease, here named ming aralia little leaf (MaLL), was observed in gardens located in the state of São Paulo, Brazil. The presence of yellowing and abnormally small leaves provided the first evidence pointing to infection by phytoplasma. Template DNA for

use in PCRs was extracted from leaves and young shoots sampled from a symptomatic plant and three symptomless plants. An initial PCR using primer pair fU5/rU3 yielded an amplicon of 0.9 kbp, the size expected for a phytoplasmal 16S rRNA gene fragment. Nucleotide sequence analysis of the amplicon (GenBank KR363128) indicated plant infection by a phytoplasma, termed strain MaLL-Br01. To identify the putative phytoplasma, semi-nested PCR assays were performed with primers P1/16S-SR followed by P1A/16S-SR, which amplify larger segments of the ribosomal (r) RNA operon. Repeated PCRs containing template from the symptomatic plant generated a 1.6 kbp genomic fragment. No amplification occurred when template DNA was derived from asymptomatic plants. The 1.6 kbp PCR product was purified and sequenced directly to achieve 4X to 5X coverage per base position, and the sequence was deposited in the GenBank database (Accession no. KP828428). Using KP828428 as a query, a BLASTn search yielded best hit with GenBank Accession no. AY034608 from *Erigeron witches'-broom* phytoplasma (EriWB), a member of the ash yellows phytoplasma group (16SrVII). In silico RFLP patterns of sequence KP828428, obtained by using iPhyClassifier online tool, were indistinguishable from those characteristic of subgroup 16SrVII-B. Alignment, using MegAlign program (Lasergene software; DNASTAR), revealed that phytoplasma strain MaLL-Br01 shared 100% nucleotide sequence identity of 16S rRNA with EriWB phytoplasma, reference strain of subgroup 16SrVIIB. In Brazil, phytoplasmas belonging to subgroup 16SrVII-B have been reported in diseased plants of *Erigeron* sp. and *Cantharanthus roseus* in the state of São Paulo. Our findings expand knowledge of the natural host range of subgroup in 16SrVII-B strains and reveal *P. fruticosa* as a new host of this phytoplasma subgroup lineage.

Keywords: Ash yellows group; Molecular identification; Mollicutes; PCR/RFLP

2.1 Introdução

A planta ornamental *Polyscias fruticosa* (L.) Harms., popularmente conhecida por árvore-da-felidade, pertence à família Araliaceae, sendo nativa da região sudeste da Ásia e das ilhas tropicais do Pacífico (HUAN et al., 1998). Em razão da sua boa adaptação, tem sido amplamente cultivada nos trópicos e nas regiões temperadas (PLUNKETT et al., 2001). O gênero *Polyscias* é o segundo maior desta família, com aproximadamente 130 espécies (PLUNKETT et al., 2001). Em países da Ásia, as folhas e raízes desta planta são utilizadas com finalidade medicinal por possuírem ação anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica (HUAN et al., 1998). No Brasil, este arbusto perene é uma espécie exótica comercializada como planta ornamental, encontrada em ambientes externos e internos.

Fitoplasmas são procariotos sem parede celular, habitantes de floema, que estão associados a centenas de doenças que ocorrem em uma ampla diversidade

de gêneros e espécies vegetais. A tentativa de cultivo de fitoplasmas em meio de cultura tem sido feita desde os anos 70 e, mesmo com a publicação recente de um meio seletivo axênico (CONTALDO et al., 2012), o cultivo *in vitro* deste microrganismo ainda é muito difícil e nem sempre viável (DAVIS et al., 2015). Esta inviabilidade no cultivo impede que características morfológicas e fisiológicas deste procarioto sejam descritas, implicando na impossibilidade de sua classificação dentro do esquema binomial latino, adotado para a maioria dos microrganismos. Assim, a classificação taxonômica dos fitoplasmas tem sido estabelecida com base nas sequências nucleotídicas altamente conservadas do gene 16S rRNA, sendo os mesmos classificados em grupos e subgrupos (LEE et al., 2004a, 2004b; IRPCM, 2004). Atualmente, através da utilização de análise de RFLP simulada por computador, e de acordo com as normas estabelecidas para classificação de fitoplasmas, são reconhecidos 32 grupos e mais de 100 subgrupos (MARCONE, 2014).

No Brasil, desde a década de 1970, tem sido reportada a ocorrência de distintos fitoplasmas em associação com doenças identificadas em grande número de espécies vegetais silvestres, daninhas e economicamente exploradas. Representantes dos grupos 16Srl e 16SrIII são prevalentes nas regiões brasileiras (RAPPUSSI et al., 2012), sendo relatados também aqueles afiliados aos grupos 16SrII, 16SrV, 16SrVI, 16SrVII, 16SrIX, 16SrXIII e 16SrXV. Os sintomas expressos pelas plantas doentes incluem clorose; redução no tamanho de folhas, flores e frutos; proliferação de ramos; nanismo; distorções foliares; necrose de vasos; avermelhamento de folhas, entre outros (AMARAL MELLO et al., 2011).

Em 2013, plantas de árvore-da-felicidade apresentando folhas amarelcidas e ramos curtos produzindo folhas miúdas foram observadas em logradouro público da cidade de Piracicaba. Em razão do tipo de sintomas, suspeitou-se dos mesmos serem induzidos por fitoplasmas. No entanto, buscas bibliográficas resultaram em insucesso, uma vez que não foram encontradas referências sobre o assunto. Assim, no presente estudo, buscou-se evidenciar a associação de possíveis fitoplasmas com as plantas sintomáticas.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material Vegetal

Amostras de ramos e folhas foram coletadas de uma planta aparentemente sadia e de três plantas apresentando os sintomas típicos de infecção por fitoplasmas (Figura 1).

Figura 1 - Ramo assintomático A, B e C à esquerda e ramos com sintomas de folhas amareladas e anormalmente pequenas A, B e C à direita

2.2.2 Extração do DNA total

A extração do DNA total foi feita de acordo com o método de extração rápida proposto por DOYLE; DOYLE (1987).

Foram usados aproximadamente 2,0 g de tecido vegetal fresco por amostra, utilizando folhas novas e pecíolo. O material foi macerado em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido e colocado em microtubo de 1,5 mL. Um volume de 800 μ L da solução de extração 2X CTAB a 65 °C foi adicionado ao macerado. Para o preparo dessa solução foram pesados 2 g de CTAB; 8,18 g de NaCl; 0,74 g de EDTA; 1,57 g de Tris-HCl e 1,0 g de PVP, dissolvidos em água deionizada até completar o volume de 100 mL, sendo o pH ajustado para 8,0. Antes do uso da solução de extração foram adicionados 2 μ L de mercaptoetanol para cada 1 mL de solução. Os tubos foram levados para banho-maria a 65 °C por 60 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos, em agitador mecânico, para homogeneização. Em cada tubo foram adicionados 600 μ L de CIA (clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1), e agitado por 1 minuto até a obtenção de uma emulsão de aparência leitosa. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm (20.000 x g). Os tubos foram retirados da centrífuga evitando perturbar a interface do conteúdo líquido. Posteriormente, a fase superior aquosa foi retirada com o auxílio de uma

pipeta e transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, à qual foram adicionados 540 µL de isopropanol gelado (-20 °C). A suspensão foi homogeneizada por inversão dos tubos e mantida por uma noite à temperatura de -20 °C, para a precipitação dos ácidos nucleicos. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80%. O processo de lavagem foi realizado duas vezes. Após a lavagem, os tubos foram deixados à temperatura ambiente para evaporação de resíduos de etanol. Em seguida, o precipitado foi dissolvido em 500 µL de cloreto de sódio (NaCl) 1M e a suspensão foi mantida à 4 °C por 60 minutos. Uma nova centrifugação à 14.000 rpm por 10 minutos foi realizada, o sobrenadante foi removido para novo microtubo e o precipitado foi descartado. Ao sobrenadante foram adicionados 350 µL de isopropanol e a mistura permaneceu à -20 °C por 2 horas. Após esse período de incubação foi realizada uma nova centrifugação à 14.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 80%, como descrito anteriormente. Após descartar o etanol os tubos foram mantidos abertos à temperatura ambiente para secagem do precipitado e, em seguida, este foi dissolvido em 100 µL de tampão 1X TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, com pH 8,0; tris = hidroximetilaminometano) e armazenado a -20 °C para o uso nas reações de PCR.

2.2.3 Controles utilizados na reação de PCR

Todos os reagentes utilizados na reação de PCR foram previamente testados com os controles positivos e negativos. Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de planta de vinca (*Catharanthus roseus* L.), comprovadamente infectada com fitoplasma e como controle negativo foi utilizado água deionizada autoclavada (miliQ). Após a confirmação de que os reagentes estavam funcionando, procedeu-se a reação de PCR com as amostras do presente estudo.

2.2.4 Reagentes utilizados e condições de PCR para amplificação de fragmentos genômicos do gene 16S rRNA

Cada reação de PCR foi processada utilizando um volume final de 50 µL contendo: 1 µL do DNA total puro; 37,75 µL de água deionizada autoclavada (miliQ); 1,0 µL de cada *primer* (na concentração de 20 pmol/ µL); 5 µL da solução tampão de PCR 10 X; 4 µL de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato - dNTPs (solução 2,5

mM de cada deoxinucleotídeo) e 0,25 µL GeneAmp® High fidelity PCR system (Applied Biosystem). Em todas as reações de PCR um tubo contendo água miliQ foi utilizado como controle negativo da reação.

A reação inicial de PCR para detecção de fitoplasma foi realizada com os *primers* fU5/rU3 (LORENZ et al., 1995), os quais amplificam um fragmento esperado de 0,9 kpb, a partir do gene 16S rRNA do fitoplasma. Outra reação de PCR independente foi realizada com o par de *primer* P1/16S-SR (DENG & HIRUKI, 1991; LEE et al., 2004a), sendo o produto dessa reação diluído em água miliQ na proporção de 1:30 para ser usado como molde em nova reação com os *primers* P1A/16S-SR (LEE et al., 2004a). Com o uso dos *primers* P1/16S-SR e P1A/16S-SR são esperados, respectivamente, fragmentos de 1.550pb e de 1.525 pb.

Para as reações de PCR com os *primers* fU5/rU3, o termociclador foi programado para 35 ciclos, sendo que cada ciclo compreendeu as seguintes etapas: 30 segundos a 95 °C para desnaturação do ácido nucléico, 75 segundos a 55 °C para anelamento dos *primers* e 90 segundos a 72 °C para extensão da fita. Adicionalmente, foi processada uma etapa inicial de desnaturação de 2 minutos à 94 °C e uma etapa final de extensão de 7 minutos à 72 °C.

Nas reações de PCR com os *primers* P1/16S-SR e P1A/16S-SR, o termociclador foi programado para 38 ciclos, sendo que cada ciclo compreendeu as seguintes etapas: 1 minuto a 94 °C para desnaturação do ácido nucléico, 2 minutos a 55 °C para anelamento dos *primers* e 3 minutos a 72 °C para extensão da fita. Uma etapa inicial de desnaturação de 2 minutos a 94 °C e uma etapa final de extensão de 7 minutos a 72 °C foram incluídas.

Os produtos obtidos na reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, preparado em tampão TA 1X contendo o corante Sybr safe® a 1%. Em todos os géis o marcador 1kb DNA ladder (Life Technologies) foi utilizado. O gel de agarose foi submetido à corrente elétrica por 60 minutos a 65 volts e a visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta.

As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descrita abaixo.

fU5 - 5'-CGGCAATGGAGGAAACT-3' (LORENZ et al., 1995).

rU3 - 5'-TTCAGCTACTCTTTGTAACA-3' (LORENZ et al., 1995).

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

P1A - 5' AAC GCT GGC GGC GCG CCT AAT AC 3' (LEE et al., 2004a).

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

2.2.5 Purificação dos fragmentos de DNA amplificados nas reações de PCR

Os fragmentos de DNA do fitoplasma, correspondente ao gene 16S rRNA, foram purificados com o uso do QIAquick PCR Purification (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

Para cada 1 volume do produto de PCR foram adicionados 5 volumes do tampão PB (Qiagen) em um microtubo de 2 mL. A amostra e o tampão foram misturados e aplicados na coluna QIAquick Spin acoplada a um tubo coletor e, em seguida, a amostra foi centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm (17.900 x g). O líquido que passou pela coluna foi descartado e a coluna mantida no mesmo tubo coletor. Um volume de 750 µL do tampão de lavagem PE (Qiagen) foi adicionado à coluna e centrifugado por 1 minuto a 13.000 rpm. Ao final da centrifugação, o líquido que passou pela coluna foi descartado e uma nova centrifugação foi realizada para garantir a ausência de resíduos de etanol na coluna. Em seguida, a coluna foi colocada em um novo tubo coletor, adicionados 50 µL do tampão de eluição EB no centro da coluna e mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. O tubo foi centrifugado por 1 minuto a 13.000 rpm e o DNA coletado para um novo tubo e armazenado a -20° C.

2.2.6 Quantificação do fragmento genômico amplificado na PCR

O fragmento genômico purificado foi quantificado em gel de agarose 1%, preparado em tampão TA 1X contendo o corante Sybr safe® a 1%. Foram utilizados 8 µL do marcador 1kb DNA ladder (Life Technologies) e 5 µL do marcador de peso molecular MASS DNA Ladder (New England BioLabs). O gel de agarose foi submetido à corrente elétrica por 60 minutos a 65 volts e a visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta.

2.2.7 Sequenciamento do fragmento genômico amplificado na PCR

O fragmento amplificado do 16S rDNA do fitoplasma na concentração de 20 ng/µL foi enviado para empresa de sequenciamento MacroGen (Rockvill, Estados Unidos). Os fragmentos amplificados com os *primers* P1A/16S-SR foram enviados para sequenciamento com 10 *primers* de cobertura, com a intenção de que cada base obtivesse cobertura mínima de 4X. Foram enviados os *primers* P1A, P5, F4, F5

no sentido *forward* e os *primers* 16S-SR, R5, R4 e R3 no sentido *reverse*. Os fragmentos amplificados no PCR com os *primers* fU5/rU3 foram sequenciados com os *primers* fU5 e F4 no sentido *forward* e rU3, R4 e R5 no sentido *reverse*, obtendo-se uma cobertura de 2x por base. Todos os *primers* enviados para serem usados no sequenciamento estavam na concentração 2 pmol/ μ L.

As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descrita abaixo:

P5 - 5' CGG CAA TGG AGG AAA CT 3' (SCHNEIDER et al., 1995).

F4 - 5' TGG TAG TCC ACG CCG TAA 3' (DAVIS & LEE, 1993).

F5 - 5'GGT TGT CGT CAG CTC GTG TCG 3'(I-M. LEE, comunicação pessoal).

R5 - 5'CGA CAC GAG CTG ACG ACA ACC 3' (I-M. LEE, comunicação pessoal).

R4 - 5' TTA CGG CGT GGA CTA CCA GGG 3' (GUNDERSEN et al., 1994).

R3 -5' GGC ACA TAG TTA GCC GGG GCT TAT 3' (I-M LEE, comunicação pessoal).

As sequências obtidas no sequenciamento foram alinhadas e editadas no programa computacional DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wisc.), utilizando as opções SeqMan, EditSeq e MegAlign.

2.2.8 Análise de RFLP *in silico*

A ferramenta *on-line* *iPhyClassifier* (ZHAO et al., 2009) foi usada para gerar a imagem virtual de RFLP em gel de agarose 3%. A imagem foi gerada após a digestão *in silico* da sequência do 16S rDNA do fitoplasma encontrado, com as 17 enzimas propostas por Wei et al. (2007). Estas enzimas foram *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI* (*Sau3AI*), *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*. Todos os fragmento do 16S rDNA utilizados estavam de acordo com os critérios estabelecido pelo IRPCM (2004).

O padrão de restrição gerado pela análise de RFLP *in silico* do fitoplasma encontrado neste estudo, foi comparado com padrões dos fitoplasmas representantes dos subgrupos do grupo 16SrVII (Tabela 1) para fins do cálculo dos coeficientes de similaridade (F). O coeficiente de similaridade foi calculado para cada par de fitoplasma de acordo com a fórmula descrita por Nei e Li (1979), $F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$, onde N_x e N_y representam o número total de bandas no perfil de cada fitoplasma resultantes da digestão com as 17 enzimas e N_{xy} é o número de bandas compartilhadas pelos dois fitoplasmas. As bandas de até 50 pb foram consideradas para os cálculos.

2.2.9 Análise filogenética

Uma árvore filogenética foi construída com as sequências nucleotídicas da região do 16S rDNA do fitoplasma encontrado neste estudo e com aquelas de representantes de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVI, 16SrVII, 16SrIX, 16SrXIII e 16SrXV, através do programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). Como raiz da árvore foi utilizada a sequência do microrganismo *Acholeplasma palmae* strain J233, número de acesso do GenBank NR_029152 (GUNDERSEN et al., 1994). Na construção da árvore filogenética foi utilizado o método de agrupamento Neighbour-joining e o teste Bootstrapping foi processado 1.000 vezes, para garantir a confiabilidade da posição dos ramos. Os fitoplasmas utilizados na construção da árvore estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Fitoplasmas representantes do subgrupo 16SrVII e dos demais grupos reportados no Brasil, depositadas no GenBank e usadas para construção da árvore filogenética

Hospedeiro	Estirpe	Classificação do gene 16S rRNA	Número de Acesso GenBank	Referência
<i>Fraxinus</i> sp.	AshY1	16SrVII-A	AF189215	Griffiths et al., 1999
<i>Erigeron</i> sp.	EriWB5	16SrVII-B	AY034608	Barros et al., 2002
<i>Polyscias fruticosa</i>	MaLL-Br01	16SrVII-B	KP828428	Deste estudo
<i>Crotalaria juncea</i>	CrSP-Br 01	16SrVII-C	KC756947	Flôres et al., 2013a
<i>Erigeron</i> sp.	ErWB-Br01	16SrVII-D	KJ831066	Flôres et al., 2015
<i>Zea mays</i>	MBS	16SrI-B	AF487779	Bedendo et al., 1997
<i>Citrus aurantifolia</i>	BR:MG:FNS10:2011	16SrII-C	KJ158173	Silva et al., 2014
<i>Manihot esculenta</i>	Md1	16SrIII-B	GU193976	Flôres et al., 2013b
<i>Sechium edule</i>	ChWBIII(Ch10)	16SrIII-J	AF147706	Montano et al., 2000
<i>Solanum melongena</i>	EB02-Br06	16SrIII-U	HM589213	Amaral Mello et al., 2011
<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	PassWB-Br4	16SrIII-V	GU292082	Davis et al., 2012
<i>Ziziphus jujuba</i>	JWB 16S	16SrV-B*	AY197661	Lee et al., 2004a
<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	PassWB-Br3	16SrVI-I	GU292081	Davis et al., 2012
<i>Catharanthus roseus</i>	PwK-CP3	16SrIX	JN792516	BARBOSA et al., 2012
<i>Carica papaya</i>	PACN-Br1	16SrXIII-E	JQ792171	Melo et al., 2013
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	HibWB26	16SrXV-A	AF14770	Montano et al., 2001a

*A sequência do 16S rDNA para o grupo 16SrV-B é correspondente a um isolado originário da China, pois o isolado brasileiro do grupo 16SrV-B identificado em crotalaria por Mello et al., (2004) foi identificado somente com base no RFLP convencional, não havendo sequência depositada no Genbank.

2.3 Resultados e Discussão

A reação inicial de PCR, conduzida com os *primers* fU5/rU3, rendeu fragmentos de 0,9 kb, os quais são esperados para o gene 16S rRNA de fitoplasmas, para o DNA total extraído de plantas de árvore-da-felicidade suspeitas de infecção. Para a confirmação desse resultado considerado como preliminar,

novas reações de PCR foram conduzidas, agora com os *primers* P1/16SR-SR e P1A/16SR-SR. Neste caso, a presença de fitoplasma foi revelada pela amplificação de fragmentos de DNA de aproximadamente 1,6 kb, típicos para amplificações geradas por este par de *primers*. Contrariamente, nenhuma amplificação ocorreu para o DNA de planta assintomática, usado como padrão negativo ou quando a água foi usada nas reações de PCR. No entanto, fragmentos de 1,6 kb foram obtidos para o controle positivo, representado pelo DNA de planta de vinca sabidamente infectada por fitoplasma.

A ocorrência de fitoplasmas em plantas ornamentais tem sido frequentemente relatada pela literatura. No Brasil, por exemplo, diversas espécies ornamentais já foram evidenciadas como hospedeiras de fitoplasmas, entre elas vinca (*Catharanthus roseus*), Crista de galo (*Celosia spicata*), Begônia (*Begonia* spp.), Margaridinha (*Chrysanthemum paludosum*), Rainha Margarida (*Callistephus chinensis*), Sempre-viva (*Helichrysum bracteatum*), Bico de Papagaio (*Euphorbia pulcherrima*), Lisianto (*Eustoma grandiflorum*), Palma de Santa Rita (*Gladiolus communis*), Hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) e Primavera (*Bougainvillea spectabilis*). A caracterização molecular de fitoplasmas associados aos representantes destas espécies tem permitido a identificação de representantes de diversos grupos e subgrupos, tais como 16SrI-B, 16SrII, 16SrIII-B, 16SrIII-J, 16SrIX e 16SrXV-A (BARBOSA et al., 2012; MONTANO, 2001a, 2001b; KREYCI et al., 2010; BEDENDO et al., 1999; ECKSTEIN, 2008; RIBEIRO et al., 2006; KITAJIMA et al., 1974; RIVAS, 2000; MONTANO et al., 2011; SILVA, 2008).

O fitoplasma detectado no teste de PCR com os *primers* P1A/16S-SR foi diretamente sequenciado, atingindo assim uma cobertura de pelo menos 4x por base. O produto resultante do PCR com os *primers* fU5/rU3 foi também sequenciado obtendo-se, pelo menos, 2x a cobertura por base. As fitas consenso foram montadas e revelaram que a sequência do 16S rRNA do fitoplasma encontrado nas amostras de árvore-da-felicidade apresentou maior similaridade com os fitoplasmas representantes do grupo 16SrVII. Para os fragmentos genômicos amplificados pelos *primers* P1A/16S-SR, a sequência nucleotídica do fitoplasma da árvore-da-felicidade mostrou 100% de identidade com a sequência do fitoplasma do superbrotamento do erigeron (GenBank AY034608), pertencente ao sugrupo 16SrVII-B (FLÔRES et al., 2015). A sequência originária do PCR com os *primers* fU5/rU3 apresentou os mesmo resultados já referidos para a sequência amplificada pelo par P1A/16S-SR,

mostrando 100% de identidade com o fitoplasma afiliado ao subgrupo 16SrVII-B (Figura 2).

O fitoplasma detectado com os *primers* P1A/16S-SR foi identificado como fitoplasma da folha miúda da árvore-da-felicidade (Ming aralia little leaf phytoplasma - MaLL) e a sequência correspondente foi denominada como MaLL-BR01, sendo depositada na base de dados do GenBank sob o número de acesso KP828428. A sequência deste mesmo fitoplasma amplificada com os *primers* fU5/rU3, os quais geraram fragmentos genômicos aproximadamente 860 pares de bases, também foi depositada na base de dados do GenBank, sob o número de acesso KR363128.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Candidatus Phytoplasma fraxini strain CfS-Br10 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal	1587	1587	100%	0.0	100%	KR270802.1
☐	Candidatus Phytoplasma fraxini isolate MaLL-Br01 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal	1587	1587	100%	0.0	100%	KP828428.1
☐	Artemisia witches'-broom phytoplasma isolate III contains 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile and 23S rib	1587	1587	100%	0.0	100%	DQ989180.1
☐	Artemisia witches'-broom phytoplasma isolate II contains 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile and 23S rib	1587	1587	100%	0.0	100%	DQ989179.1
☐	Erigeron witches'-broom phytoplasma strain RPWB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: 16	1587	1587	100%	0.0	100%	AF411592.1
☐	Erigeron witches'-broom phytoplasma 16S ribosomal RNA gene, partial sequence: tRNA-Ile gene, c	1587	1587	100%	0.0	100%	AY034608.1
☐	Artemisia witches'-broom phytoplasma isolate I contains 16S ribosomal RNA, tRNA-Ile and 23S rib	1581	1581	100%	0.0	99%	DQ989178.1
☐	'Erigeron sp.' witches'-broom phytoplasma clone ErWB-Br01 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	1555	1555	100%	0.0	99%	KJ831066.1
☐	Candidatus Phytoplasma fraxini isolate L1-09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1543	1543	100%	0.0	99%	KP324846.1

Figura 2 - Valores de cobertura e identidade de sequência obtidos com o uso da ferramenta on-line Blastn (NCBI), quando testado a sequência do fitoplasma MaLL-Br01, originária do teste de PCR com os *primers* fU5/rU3 (NCBI, 2015)

A identificação do fitoplasma presente nas plantas de árvore-da-felicidade foi confirmada pela análise virtual de RFLP e pela ferramenta molecular *iPhyClassifier* (ZHAO et al., 2009), utilizando dezessete enzimas de restrição. O padrão de restrição de RFLP *in silico* obtido para o fitoplasma foi idêntico àquele apresentado pelo fitoplasma representante do subgrupo 16SrVII-B (Figura 3).

Figura 3 - Padrões de restrição de RFLP gerados pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região do 16S rDNA do fitoplasma encontrado na planta de árvore da felicidade MaLL-Br01 (A) e do fitoplasma representando do grupo 16SrVII-B Erigeron Witches'-Broom phytoplasma EriWB5 (B). Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*. M= marcador ϕ X174-DNA *HaeIII* digest

Utilizando os padrões de restrição gerados pela digestão *in silico*, os valores dos coeficientes de similaridade (F) foram calculados entre o fitoplasma da árvore-da-felicidade e os representantes de diferentes subgrupos que compõem o grupo 16SrVII. O valor de (F) igual a 1 foi obtido entre o fitoplasma encontrado na árvore-da-felicidade e o fitoplasma do erigeron, um fitoplasma de referência para o subgrupo 16SrVII-B, apontando a completa identidade entre estes fitoplasmas (Tabela 2) e confirmando mais uma vez a identificação do fitoplasma em estudo.

Tabela 2 - Valores de coeficiente de similaridade calculados para o fitoplasma detectado na árvore da felicidade e outros fitoplasmas pertencentes a diversos subgrupos do grupo 16SrVII

Fitoplasma	Classificação do gene 16S rRNA	AshY1	ArtWBI	CrSP-Br 01	ErWB-Br01	MaLL-Br01
<i>Candidatus Phytoplasma fraxini</i>						
AshY1	16SrVII-A	1				
Artemisia witches'-broom phytoplasma ArtWBI	16SrVII-B	0,9	1			
Crotalaria Shoot Proliferation phytoplasma CrSP-Br 01	16SrVII-C	0,84	0,89	1		
Erigeron bonariensis Witches' Broom phytoplasma ErWB-Br01	16SrVII-D	0,85	0,94	0,83	1	
Ming aralia little leaf phytoplasma MaLL-Br01	16SrVII-B	0,9	1	0,89	0,94	1

Os fitoplasmas do grupo 16SrVII foram originalmente relatados nos Estados Unidos e Canadá, infectando *Fraxinus* spp. e *Syringa* sp. (GRIFFITHS et al., 1999). No Brasil, o primeiro relato de um representante deste grupo foi feito no estado de São Paulo em plantas de *Erigeron* sp. e *Catharanthus roseus* (BARROS et al., 2002). Estes fitoplasmas foram classificados como pertencentes ao subgrupo 16SrVII-B. Posteriormente, dois novos subgrupos foram descritos no estado de São Paulo, sendo um deles o subgrupo 16SrVII-C representado por um fitoplasma

presente em plantas de *Crotalaria juncea* (FLÔRES et al., 2013a) e o outro, o subgrupo 16SrVII-D cujo representante é um fitoplasma associado a plantas de *Erigeron* sp (FLÔRES et al., 2015). Dentre os quatro subgrupos descritos para 'Candidatus *Phytoplasma fraxini*', apenas o fitoplasma de referência para o subgrupo 16SrVII-A não foi relatado no Brasil.

As sequências nucleotídicas da região 16S rDNA do fitoplasma identificado no presente estudo e de distintos fitoplasmas encontrados no Brasil foram utilizadas para a construção de uma árvore filogenética (Figura 4). O fitoplasma da árvore-da-felicidade emergiu de um clado juntamente com os demais representantes do grupo 16SrVII e do fitoplasma referência do grupo 16SrVI. Em um trabalho anterior, Lee e colaboradores (2004a) ao estudarem diferentes estirpes de fitoplasmas pertencentes à espécie 'Candidatus *Phytoplasma ulmi*' também observaram que os fitoplasmas do grupo 16SrVII emergiram do mesmo clado daqueles de grupo 16SrVI, indicando que estes grupos são evolutivamente próximos. A análise filogenética mostrou que o fitoplasma da árvore-da-felicidade está estritamente relacionado com o fitoplasma representante do subgrupo 16SrVII-B, uma vez que ambos emergiram do mesmo ramo. Estes resultados estão em perfeita concordância com aqueles obtidos nos valores dos coeficientes de similaridade e nas análises de RFLP, confirmando a identidade do fitoplasma em estudo como sendo afiliado ao subgrupo 16SrVII-B.

Figura 4 - Árvore filogenética construída usando o método *Neighbor-Joining* com as sequências da região 16S rDNA do fitoplasma identificado na árvore da felicidade MaLL-Br01, de fitoplasmas representantes do grupo 16SrVII, de um representante de cada fitoplasma relatado no Brasil e do procarioto *Acholeplasma palmae*, com ancestral comum dos fitoplasmas

2.4 Conclusão

A presente investigação contribuiu para ampliar os conhecimentos da gama de hospedeiros naturais do fitoplasma afiliado ao subgrupo 16SrVII-B e revelou a planta *Polyscias fruticosa* como um novo hospedeiro dessa linhagem de fitoplasma.

Referências

AMARAL MELLO, A.P.O.A.; ECKSTEIN, B.; FLORES, D.; KERYCI, 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.

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 Brazil. **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, n. 10, p. 1142 - 1148, 2002.

BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Molecular evidence for the presence of maize bushy stunt phytoplasma in corn in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 957, 1997.

BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E. ; DALLY, E.L. Detecção e caracterização de fitoplasmas em plantas de vinca (*Catharantus roseus*) e de pimenta (*Capsicum frutescens*) através das técnicas de duplo PCR e de RFLP. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 25, n.3, p.197-201, 1999.

CONTALDO, N.; BERTACCINI, A.; PALTRINIERI, S.; WINDSOR, H.M.; WINDSON, D. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasma. **Phytopathology Mediterranea**, Firenze, v. 51, p. 607-617, 2012.

DAVIS, R.E.; LEE, I-M. Cluster-Specific Polymerase Chain Reaction Amplification of 16S rDNA Sequences for Detection and Identification of Mycoplasma-like Organisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 1008-1011, 1993.

DAVIS, R.E.; ZHAO, Y.; DALLY, E.L.; JOMANTIENE, R.; LEE, I-M.; WEI, W.; KITAJIMA, E.W. 'Candidatus *Phytoplasma sudamericanum*', a novel taxon, and strain PassWB-Br4, a new subgroup 16SrIII-V phytoplasma, from diseased passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 62, p. 984–989, 2012.

DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; ZHAO, Y.; LEE, I.-M.; WEI, W.; WOLF, T.K.; BEANLAND, L.; LEDOUX, D.G.; JOHNSON, D.A.; FIOLA, J.A.; WALTER-PETERSON, H.; DAMI, I.; CHIEN, M. Unraveling the Etiology of North American Grapevine Yellows (NAGY): Novel NAGY Phytoplasma Sequences Related to '*Candidatus Phytoplasma pruni*'. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, n.8, p. 1087-1097, 2015.

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.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry**, New York, v. 19, p. 11-15, 1987.

ECKSTEIN, B. **Identificação molecular de um fitoplasma associado à malformação das folhas das ornamentais *Celosia argentea* L. e *Celosia spicata* L.** 2008. 50p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FLÔRES, D.; MELLO, A.P.O.A.; MASSOLA JUNIOR, N.S.; BEDENDO, I.P. First Report of a Group 16SrVII-C Phytoplasma Associated with Shoot Proliferation of Sunn Hemp (*Crotalaria juncea*) in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 12, p.1652, 2013a.

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, 2013b.

FLÔRES, D.; MELLO, A.P.O.A.; 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 Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 65, p. 2761-2765, 2015.

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.

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.

HUAN, V.D.; YAMAMURA, S.; OHTANI, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; NHAM, N.T.; CHAU, H.N. Oleanane saponins from *Polyscias fruticosa*. **Phytochemistry**, New York, v. 47, n. 3, p. 451-457, 1998.

IRPCM. '*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.

KITAJIMA, E.W.; CUPERTINO, F.P.; COSTA, C.L.; MATTOS, J.K.A.; TAKATSU, A. Ocorrência de anomalias de planta do tipo amarelo associadas a micoplasma no D. Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, n. 56, p. 246-250, 1974.

KREYCI, P.F.; BRITO, R.A.S.; LANZA, R.; BEDENDO, I.P. Ocorrência de fitoplasma pertencente ao grupo 16SrXV em vinca encontrada no Estado de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 36, p. 1-2, 2010.

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 Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 337–347, 2004a.

LEE, I.-M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; DAVIS, R.E.; BOTTNER, K.D.; MARCONE, C.; SEEMULLER, E. '*Candidatus Phytoplasma asteris*', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1037-1048, 2004b.

LORENZ, K.-H.; SCHNEIDER, B.; AHRENS, U.; SEEMULLER, E. Detection of the Apple Proliferation and Pear Decline Phytoplasma by PCR Amplification of Ribosomal and Nonribosomal DNA. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 7, p. 771-776, 1995.

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

MELLO, A.P.O.A.; RIBEIRO, L.F.C.; MASSOLA JÚNIOR, N.S.M.; BEDENDO, I.P. Um fitoplasma do grupo 16SrV associado ao superbrotamento da crotalária. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 30, n. 4, p. 432-435, 2004.

MELO, L.; SILVA, E.; FLÔRES, D.; VENTURA, J.; COSTA, H.; BEDENDO, I. 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.

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 Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 4, p. 429-436, 2000.

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, 2001a.

MONTANO, H.G.; DALLY, E.L.; DAVIS, R.E.; PIMENTEL, J.P.; BRIOSO, P.S.T. First report of natural infection by *Candidatus Phytoplasma brasiliense* in *Catharanthus roseus*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 1209-1209, 2001b.

MONTANO, H.G.; CUNHA JUNIOR, J.O.; PIMENTEL, J.P. Phytoplasmas in Brazil: an update. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 64, p. S251-S252, 2011. Supplement.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. **BLAST Assembled Genomes**. Disponível em: < <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> >. Acesso em: 10 maio 2015.

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.

PLUNKETT, G.M.; LOWRY II, P.P. ; BURKE, M.K. The Phylogenetic Status of Polyscias (Araliaceae) Based on Nuclear Its Sequence Data. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 88, n. 2, p. 213-230, 2001.

RAPPUSSI, M.C.C.; ECKSTEIN, B.; FLÔRES, D.; HAAS, I.C.R.; AMORIM, L.; BEDENDO, I.P. Cauliflower stunt associated with a phytoplasma of subgroup 16SrIII-J and the spatial pattern of disease. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, n. 4, p. 829-840, 2012.

RIBEIRO, L.F.C.; AMARAL MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; GIORIA, R. Phytoplasma associated with shoot proliferation in begonia. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 63, p. 475-477, 2006.

RIVAS, E.B.; GALLETTI, S.R.; DUARTE, L.M.L.; SEABRA, P.V.; ALEXANDRE, M. A.V. Virus and phytoplasma diseases of lisianthus. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 26 n. 2, p. 257-262, 2000.

SCHNEIDER, B.; SEEMULLER, E.; SAMRT, C.D.; KIRKPATRICK, B.C. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: RAZIN, S.; TULLY, J.G. **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. Academic Press, 1995. p. 369-380.

SILVA, E.G. **Identificação de fitoplasmas associados à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar e ao superbrotamento da primavera (*Bougainvillea spectabilis*) no estado de São Paulo**. 2008. 98p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SILVA, F.N.; QUEIROZ, R.B.; SOUZA, A.N.; ALSADI, A.M.; SIQUEIRA, D.L.; ELLIOT, S.L.; CARVALHO, C.M. First Report of a 16SrIIIC Phytoplasma Associated with Asymptomatic Acid Lime (*Citrus aurantifolia*) in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 11, p. 1577, 2014.

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.

WEI, W.; DAVIS, R.E.; LEE, I.M.; ZHAO, Y. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma group. **International Journal**

of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, v. 57, p. 1855-1867, 2007.

ZHAO, Y.; WEI, W.; LEE, I-M.; SHAO, J.; SUO, X.; DAVIS, R.E. Construction of na 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.

3 COUVE - FLOR (*BRASSICA OLERACEA* VAR. *BOTRYTIS*) COMO UM NOVO HOSPEDEIRO PARA O FITOPLASMA SUBGRUPO 16SrVII-B ASSOCIADO A DOENÇA CONHECIDA COMO ENFEZAMENTO DA COUVE-FLOR

Resumo

O enfezamento da Couve-flor vem ocorrendo com altos níveis de incidência, provocando reduções significativas da produtividade nas lavouras brasileiras. Os fitoplasmas pertencentes aos subgrupos 16SrIII-J e 16SrXV-A foram previamente relatados em associação com a doença. Em 2014, plantas com sintomas típicos da doença caracterizada por nanismo, folhas avermelhadas, malformação da inflorescência e necrose dos vasos do floema foram amostradas no estado de São Paulo. O DNA total foi extraído a partir de seis plantas sintomática e duas assintomáticas e usado como molde para um PCR inicial utilizando os *primers* fU5/rU3. O resultado foi coerente com uma infecção por fitoplasma, considerando que o fragmento produzido na amplificação foi de 0,9 kpb (GenBank. KT444690), sendo este o tamanho esperado para um fragmento do gene de 16S rRNA do fitoplasma utilizando os *primers* citado acima. Visando identificar o putativo fitoplasma, os *primers* P1/16S-SR seguido do par P1A/16S-SR foram utilizados em ensaios de semi-nested PCR. Os produtos amplificados foram purificados e sequenciados com dez iniciadores para alcançar a cobertura 4X a 5X por base. Fragmentos de DNA de 1,6 kb foram gerados a partir da planta sintomática, confirmando a associação de fitoplasma com a planta sintomática. Após o sequenciamento desse fragmento, a similaridade da sequência encontrada na ferramenta on-line de alinhamento BLASTn, mostrou uma melhor similaridade com o representante do grupo dos ash yellows phytoplasma (16SrVII), identificado como *Artemisia witches'-broom* phytoplasma (número de acesso DQ98917) afiliado com subgrupo 16SrVII-B. A análise baseada em padrões de restrição virtual usando a ferramenta on-line *iPhyClassifier*, revelou uma identidade completa entre os perfis eletroforéticos produzidos pelo fitoplasma encontrado na couve-flor e do representante do subgrupo 16SrVII-B. A sequência do 16S rDNA do fitoplasma obtida a partir de couve-flor, demonstrou 100% de semelhança em relação às sequências de *Artemisia witches'-broom* phytoplasma quando alinhadas no programa MegAlign (DNASTAR). O fitoplasma presente na couve-flor sintomática caracterizado molecularmente neste estudo foi designada CFS-BR10 e a sequência do 16Sr DNA depositada na base de dados GenBank (número de Acesso KR270802). Assim, os nossos resultados revelaram um fitoplasma distinto em associação com o enfezamento da couve-flor, diferente dos dois descritos anteriormente para este patossistema. Além disso, evidenciou-se que sintomas semelhantes podem ser induzidos em um mesmo hospedeiro por fitoplasmas distintos, como já encontrados em outros tipos de associação entre a planta e fitoplasmas. No Brasil, os representantes do subgrupo 16SrVII-B foram primeiramente identificados, em plantas erigeron e vinca. Com base nos nossos resultados, em adição a estas espécies selvagens, a couve-flor representa uma espécie cultivada que servem como um novo hospedeiro de fitoplasma pertencente ao subgrupo 16SrVII-B.

Palavras-chave: '*Candidatus phytoplasma fraxini*'; Enfezamento da couve-flor; Ferramentas moleculares

Abstract

Cauliflower stunt has occurred with high levels of incidence and provoked significant yield reduction in Brazilian crops. A phytoplasma belonging to the subgroups 16SrIII-J and 16SrXV-A were previously reported in association with the disease. In 2014, plants with typical symptoms of the disease, characterized by stunting, reddening leaves, malformation of inflorescence and vessel necrosis were newly sampled in areas of the state of São Paulo. Total DNA was extracted from six symptomatic and two asymptomatic plants and used as template an initial PCR using primer pair fU5/rU3. The result was coherent with a phytoplasma infection, insofar as the amplicon yielded was 0.9 kbp (GenBank no. KT444690), a regular size for a fragment of phytoplasmal 16S rRNA gene. Aiming identify the putative phytoplasma, primers P1/16S-SR followed by P1A/16S-SR was used in semi-nested PCR assays. Amplified products were purified and sequenced with ten primers to achieve 4X to 5X coverage per base position. DNA fragments of 1.6 kbp were generated from template of affected plants, confirming the association of phytoplasmas with symptomatic plants. After sequencing of these fragments, a BLASTn search yield best hit with a representative of the ash yellows group, identified as *Artemisia witches'-broom* phytoplasma (GenBank accession DQ98917) affiliated with 16SrVII-B subgroup. Analysis based on virtual restriction patterns employing iPhyClassifier on line tool revealed complete identity between the electrophoretic profiles produced by the phytoplasma found in cauliflower and the representative of the 16SrVII-B subgroup. The DNA sequences from cauliflower phytoplasma demonstrated 100% similarity in relation to the sequences of *Artemisia* phytoplasma when aligned with MegAlign program (Lasergene software; DNASTAR). The phytoplasma present in diseased cauliflower and molecularly characterized in this study was designated CfS-Br10 and the respective 16S rDNA sequence was deposited in the GenBank database (Accession number KR270802). Thus, our findings revealed a distinct phytoplasma in association with cauliflower stunt, in addition to two different phytoplasmas previously described for this pathosystem. Moreover, it was evidenced that similar symptoms may be induced in a same host by distinct phytoplasmas, as well as found in other kinds of association between plant and phytoplasmas. In Brazil, representatives of the 16SrVII-B subgroup were firstly identified in some years ago in erigeron and periwinkle plants. Based on our results, in addition to these wild species, cauliflower represents a cultivated species that serve as new host of a phytoplasma belonging to the 16SrVII-B subgroup.

Keywords: '*Candidatus phytoplasma fraxini*'; Cauliflower stunt; Molecular tools

3.1 Introdução

A couve-flor (*Brassica oleracea* var. botrytis) é um hortaliça pertencente a família das brássicas, sendo no ano de 2014 comercializado no estado de São Paulo mais de 1,9 milhões de engradados contendo 30 cabeças, cultivada em uma área de aproximadamente 2.500 hectares (IEA/CATI – SAAESP, 2015). No Brasil a couve-flor foi primeiramente introduzida no estado do Rio de Janeiro, proveniente da

Europa no século XIX. Essa hortaliça é de grande interesse devido seu alto valor nutricional, bem como pelo seu valor socioeconômico, cultivada principalmente em pequenas áreas durante o ano todo, considerada de grande importância na agricultura familiar (MAY et al., 2007). Segundo Rapussi et al., (2012) o estado de São Paulo é líder na produção de couve-flor, sendo Ibiúna, Porto Feliz, Itatiba, Jarinú e Sorocaba as principais regiões produtora.

No mundo a ocorrência de fitoplasmas associados a doenças em Brássicas é antiga, são encontrados relatos dessa associação desde 1939 nos Estado Unidos, em campos de produção de repolho. Naquela época a doença foi atribuída a vírus, no entanto os sintomas eram típicos para a doença causada por fitoplasmas, sendo estes descritos por clorose, redução do tamanho das folhas, enfezamento generalizado, deformação de cabeça, escurecimento dos vasos e proliferação dos brotos (CANALE et al., 2012). Na cultura da couve-flor, o primeiro relato da associação de fitoplasmas com plantas sintomáticas foi feito na década de 80 por Bertaccini et al. (1983) pelo uso de microscopia eletrônica de transmissão.

Canale e colaboradores (2012) publicaram uma revisão que aborda o patossistema Brássicas - Fitoplasmas, onde relataram que desde a década de noventa anomalias tem sido observadas nos campos de Brássicas do estado de São Paulo, ocorrendo com alta incidência e provocando sérios danos a cultura. Por se tratar de um cultivo em sua maioria familiar, muitas áreas foram abandonadas ou o campo cultivo substituído por outra hortaliças.

O primeiro relato da associação de fitoplasmas a Brássicas no Brasil foi feito em repolho (AMARAL MELO, 2007), sendo posteriormente estendido a brócolis (ECKSTEIN et al., 2008) e couve-flor (RAPUSSI-DA-SILVA, 2010). Após a confirmação da associação desse patógeno ocasionando doenças em brássicas e com base no quadro sintomatológico, a doença ficou conhecida com "Enfezamento", ou seja, redução no desenvolvimento das plantas.

De acordo com Canale et al. (2012), após o aparecimento da doença nos campos produtores de brássicas, sua importância aumentou de maneira significativa com o passar dos anos. Alguns campos comerciais apresentaram incidências de até 90%, inviabilizando o cultivo dessas hortaliças, levando muitas vezes essas áreas ao abandono ou a troca de cultura. Os níveis de incidência da doença são variáveis e dependem muito da época do ano, da variedade utilizada e da época de utilização de inseticidas para controle dos vetores (RAPUSSI et al., 2012).

Devido a importância da doença no cultivo da couve-flor, o presente trabalho teve como objetivo detectar, bem como identificar o fitoplasma presente em plantas sintomáticas de couve-flor coletados no estado de São Paulo.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material Vegetal

As plantas de couve-flor (*Brassica oleracea* var. Botrytis) da variedade Veneza foram coletadas na cidade de Araçoiaba da Serra no Estado de São Paulo no ano de 2014. Foram coletadas seis plantas apresentando os sintomas de nanismo, folhas avermelhadas, malformação da inflorescência e necrose dos vasos do floema (Figura 5) e duas plantas assintomáticas.

Figura 5 - Plantas com sintomas de folhas malformação da inflorescência (A e B) e necrose dos vasos do floema (C) à esquerda

3.2.2 Extração do DNA total

A extração do DNA total das plantas de couve-flor foi feita de acordo com o método de extração rápida proposto por DOYLE; DOYLE (1987).

Foram retirados aproximadamente 2,0 g de material fresco de cada amostra. O material foi macerado em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. Após obter um material homogêneo, o macerado foi colocado em microtubo de 1,5 mL, e adicionados 800 µL da solução tampão de extração 2X CTAB a 65 °C. Para o preparo da solução de extração foram pesados 2 g de CTAB; 8,18 g de NaCl; 0,74 g

de EDTA; 1,57 g de Tris-HCl e 1,0 g de PVP, dissolvidos em água deionizada até completar o volume de 100 mL e o pH ajustado para 8,0. Antes do uso da solução de extração foram adicionados 2 µL de mercaptoetanol para cada 1 mL de solução. Os tudo foram incubados em banho-maria a 65 °C por 60 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos em agitador mecânico, para homogeneização. Em cada tubo foram adicionados 600 µL de CIA (clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1), e agitados por 1 minuto até a obtenção de uma emulsão de aparência leitosa. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a velocidade de 14.000 rpm (20.000 x g) e retirados da centrífuga evitando perturbar a interface do conteúdo líquido. A fase superior aquosa foi retirada com auxílio de uma pipeta e transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, à qual foram adicionados 540 µL de isopropanol gelado (-20 °C). A suspensão foi homogeneizada por inversão dos tubos e mantidos por uma noite (overnight) a temperatura de -20 °C para a precipitação dos ácidos nucleicos. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a velocidade de 14.000 rpm, o sobrenadante descartado e o precipitado resultante (pellet), lavado com 1 mL de etanol 80%. Na lavagem do pellet, o etanol foi removido do tubo após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente. O processo de lavagem foi realizado duas vezes. Após a lavagem os tubos foram mantidos abertos a temperatura ambiente para evaporação de resíduos do etanol. Em seguida, o precipitado foi dissolvido em 500 µL de cloreto de sódio a 1 M (NaCl). Essa suspensão foi mantida a 4 °C por 60 minutos. Uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos foi realizada, o sobrenadante removido para um novo microtubo e o precipitado descartado. Ao sobrenadante foram adicionados 350 µL de isopropanol e mantidos à -20 °C por 2 horas. Após o período de incubação uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos foi realizada, o sobrenadante descartado e o pellet resultante lavado duas vezes com etanol 80%, como descrito anteriormente. Após descartar o etanol, os tubos foram mantidos abertos e a temperatura ambiente para secagem do precipitado, e em seguida, este foi ressuspensionado em 100 µL do tampão 1X TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, com pH 8,0; tris = hidroximetilaminometano) e armazenados a -20 °C para o uso do DNA na reação de PCR.

3.2.3 Controles utilizados na reação de PCR

Todos os reagentes utilizados na reação de PCR foram previamente testados com controles positivos e negativos. Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de planta de vinca (*Catharanthus roseus* L.), comprovadamente infectada com fitoplasma e como controle negativo foi utilizado água MilliQ. Após a confirmação de que os reagentes estavam funcionando, procedeu-se a reação de PCR com as amostras do presente estudo.

3.2.4 Reagentes utilizados e condições de PCR para amplificação de fragmentos genômicos do gene 16S rRNA

Cada reação de PCR foi processada utilizando um volume final de 50 µL contendo: 1 µL do DNA total puro; 37,75 µL de água deionizada autoclavada (miliQ); 1,0 µL de cada *primer* (na concentração de 20 pmol/ µL); 5 µL de solução tampão de PCR 10 X; 4 µL de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução 2,5mM de cada deoxinucleotídeo) e 0,25 µL GeneAmp® High fidelity PCR system (Applied Biosystem). Em todas as reações de PCR um tubo contendo água miliQ era utilizado como controle negativo da reação.

A reação inicial de PCR para detecção de fitoplasma foi realizada com os *primers* fU5/rU3 (LORENZ et al., 1995), esse par amplifica um fragmento esperado de 0,9 kb do gene 16S rRNA do fitoplasma. Outra reação de PCR independente foi realizada com o par de *primer* P1/16S-SR (DENG & HIRUKI, 1991; LEE et al., 2004), sendo o produto dessa diluído em água miliQ na proporção de 1:30 para ser usado no semi-nested, com os *primers* P1A/16S-SR (LEE et al., 2004). Com o uso dos *primers* P1/16S-SR e P1A/16S-SR são esperados, respectivamente, fragmentos de 1550 e 1525 pb.

Para as reações de PCR com os *primers* fU5/rU3, o termociclador foi programado para 35 ciclos, sendo que cada ciclo compreende as seguintes etapas: 30 segundos a 95 °C para desnaturação do ácido nucléico, 75 segundos a 55 °C para anelamento dos *primers* e 90 segundos a 72 °C para extensão da fita. Uma etapa inicial de desnaturação de 2 minutos a 94 °C e uma etapa final de extensão de 7 minutos a 72 °C foram incluídas.

Nas reações de PCR com os *primers* P1/16S-SR e P1A/16S-SR, o termociclador foi programado para 38 ciclos, sendo que cada ciclo compreende as seguintes etapas: 1 minuto a 94 °C para desnaturação do ácido nucléico, 2 minutos

a 55 °C para anelamento dos *primers* e 3 minutos a 72 °C para extensão da fita. Adicionalmente, foi processada uma etapa adicional de desnaturação de 2 minutos a 94 °C e uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72 °C.

Os produtos obtidos na reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, preparado em tampão TA 1X contendo o corante Sybr safe® a 1%. Em todos os géis o marcador 1kb DNA ladder (Life Technologies) foi utilizado. O gel de agarose foi submetido à corrente elétrica por 60 minutos a 65 volts e a visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta.

As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas abaixo.

fU5 - 5'-CGGCAATGGAGGAAACT-3' (LORENZ et al., 1995).

rU3 - 5'-TTCAGCTACTCTTTGTAACA-3' (LORENZ et al., 1995).

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

P1A - 5' AAC GCT GGC GGC GCG CCT AAT AC 3' (LEE et al., 2004).

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

3.2.5 Purificação do fragmento de DNA amplificado na reação de PCR

Os fragmentos genômicos do fitoplasma, correspondente ao gene 16S rRNA, amplificados na PCR foram purificados com o uso do QIAquick PCR Purification (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante.

Para cada 1 volume do produto de PCR foram adicionados 5 volumes do tampão PB (Qiagen) em um microtubo de 2 mL. A amostra e o tampão foram misturados e aplicados na coluna QIAquick Spin acoplada a um tubo coletor, e então centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm (17.900 x g). O líquido que passou pela coluna foi descartado e a coluna colocada no mesmo tubo coletor. O volume de 750 µL do tampão de lavagem PE (Qiagen) foi adicionado à coluna e centrifugado por 1 minuto a 13.000 rpm. Ao final da centrifugação, o líquido que passou pela coluna foi descartado e uma nova centrifugação foi realizada para garantir a ausência de resíduos de etanol na coluna. Em seguida, a coluna foi colocada em um novo tubo coletor, adicionados 50 µL do tampão de eluição EB no centro da coluna e mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. A coluna foi centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm, o DNA coletado para um novo tubo e armazenado a -20 °C.

3.2.6 Quantificação do fragmento genômico amplificado na PCR

O fragmento genômico purificado foi quantificado em gel de agarose 1%, preparado em tampão TA 1X contendo o corante Sybr safe® a 1%. Foram utilizados 8 µL o marcador 1kb DNA ladder (Life Technologies) e 5 µL do marcador de peso molecular MASS DNA Ladder (New England BioLabs). O gel de agarose foi submetido eletroforese por 60 minutos a 65 volts e a visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.7 Sequenciamento do fragmento genômico amplificado na PCR

O fragmento amplificado do 16S rDNA do fitoplasma na concentração de 20 ng/µL foi enviado para empresa de sequenciamento MacroGen (Rockvill, Estados Unidos). Os fragmentos amplificado no semi-nested PCR com os *primers* P1A/16S-SR foram enviados para sequenciamento com 10 *primers* de cobertura, com a intenção de que cada base obtivesse cobertura mínima de 4X. Foram enviados os *primers* P1A, P5, F4, F5 no sentido *forward* e os *primers* 16S-SR, R5, R4 e R3 no sentido *reverse*. Os fragmentos amplificado no PCR com os *primers* fU5/rU3 foram sequenciados com os *primers* de cobertura fU5 e F4 no sentido *forward* e rU3, R4 e R5 no sentido *reverse*, esses obtiveram uma cobertura de 2x por base. Todos os *primers* enviados ao sequenciamento estavam na concentração 2 pmol/ µL.

As sequências dos primers utilizados encontram-se descrita abaixo:

P5 - 5' CGG CAA TGG AGG AAA CT 3' (SCHNEIDER et al., 1995).

F4 - 5' TGG TAG TCC ACG CCG TAA 3' (DAVIS & LEE, 1993).

F5 - 5'GGT TGT CGT CAG CTC GTG TCG 3'(I-M. LEE, comunicação pessoal).

R5 - 5'CGA CAC GAG CTG ACG ACA ACC 3' (I-M. LEE, comunicação pessoal).

R4 - 5' TTA CGG CGT GGA CTA CCA GGG 3' (GUNDERSEN et al., 1994).

R3 -5' GGC ACA TAG TTA GCC GGG GCT TAT 3' (I-M LEE, comunicação pessoal).

As sequências obtidas no sequenciamento foram alinhadas e editadas no programa computacional DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wisc.), usando as opções SeqMan, EditSeq e MegAlign.

3.2.8 Análise de RFLP *in silico*

A ferramenta *on-line* *iPhyClassifier* (ZHAO et al., 2009) foi usada para gerar a imagem virtual de RFPL em gel de agarose 3%. A imagem foi gerada após a digestão *in silico* da sequências do 16S rDNA do fitoplasma encontrado, com as 17

enzimas propostas por Wei et al., (2007). Estas enzimas foram *AluI*, *BamHI*, *Bfal*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI* (*Sau3AI*), *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*. Todos os fragmento do 16S rDNA utilizados estavam de acordo com os critérios estabelecido pelo IRPCM (2004).

O padrão de restrição gerado pela análise de RFLP *in silico* do fitoplasma encontrado neste estudo, foi comparado com padrões dos fitoplasmas representantes dos diversos subgrupos do grupo 16SrVII (Tabela 3), para fins do cálculo dos coeficientes de similaridade (F). O coeficiente foi calculado para cada par de fitoplasma de acordo com a fórmula descrita por Nei e Li (1979), $F = \frac{2N_{xy}}{(N_x + N_y)}$, onde N_x e N_y representam o número total de bandas no perfil de cada fitoplasma resultantes da digestão com as 17 enzimas e N_{xy} é o número de bandas compartilhadas pelos dois fitoplasmas. As bandas de até 50 pb foram consideradas para os cálculos.

3.2.9 Análise filogenética

Uma árvore filogenética foi construída usando-se as sequências nucleotídicas componentes da região do 16S rDNA do fitoplasma encontrado neste estudo, de fitoplasma reportados em couve-flor e de representantes de fitoplasmas relatados no Brasil, pertencentes aos grupos 16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVI, 16SrVII, 16SrIX, 16SrXIII e 16SrXV, através do programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). Como raiz da árvore foi utilizada a sequência do microrganismo *Acholeplasma palmae* strain J233, número de acesso do GenBank NR_029152 (GUNDERSEN, et al., 1994). Na construção da árvore filogenética foi utilizado o método de agrupamento Neighbour-joining e o teste Bootstrapping foi processado 1.000 vezes, para garantir a confiabilidade da posição dos ramos. Os fitoplasmas utilizados na construção da árvore estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Fitoplasmas representantes do subgrupo 16SrVII e dos demais grupos reportados no Brasil, depositadas no GenBank e usadas para construção da árvore filogenética

Hospedeiro	Estirpe	Classificação do gene 16S rRNA	Número de Acesso GenBank	Referência
<i>Fraxinus</i> sp.	AshY1	16SrVII-A	AF189215	Griffiths et al., 1999
<i>Erigeron</i> sp.	EriWB5	16SrVII-B	AY034608	Barros et al., 2002
<i>Artemisia annua</i>	ArtWB	16SrVII-B*	DQ989178	Meneguzzi et al., 2008
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Botrytis</i>	CfS-BR10	16SrVII-B	KR270802	Deste estudo
<i>Crotalaria juncea</i>	CrSP-Br 01	16SrVII-C	KC756947	Flôres et al., 2013a
<i>Erigeron</i> sp.	ErWB-Br01	16SrVII-D	KJ831066	Flôres et al., 2015
<i>Zea mays</i>	MBS	16SrI-B	AF487779	Bedendo et al., 1997
<i>Citrus aurantifolia</i>	BR:MG:FNS10:2011	16SrII-C	KJ158173	Silva et al., 2014
<i>Manihot esculenta</i>	Md1	16SrIII-B	GU193976	Flôres et al., 2013b
<i>Sechium edule</i>	ChWBIII(Ch10)	16SrIII-J	AF147706	Montano et al., 2000
<i>Solanum melongena</i>	EB02-Br06	16SrIII-U	HM589213	Amaral Mello et al., 2011
<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	PassWB-Br4	16SrIII-V	GU292082	Davis et al., 2012
<i>Ziziphus jujuba</i>	JWB 16S	16SrV-B*	AY197661	Lee et al., 2004
<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	PassWB-Br3	16SrVI-I	GU292081	Davis et al., 2012
<i>Catharanthus roseus</i>	PwK-CP3	16SrIX	JN792516	Barbosa et al., 2012
<i>Carica papaya</i>	PACN-Br1	16SrXIII-E	JQ792171	Melo et al., 2013
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	HibWB26	16SrXV-A	AF14770	Montano et al., 2001
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Botrytis</i>	CauPh-YNym1	16SrII-A	KC953000	GenBank
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Botrytis</i>	CfS-Br01	16SrIII-J	HM237045	Rappussi et al., 2012
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Botrytis</i>	CfS-Br03	16SrXIII	JN818844	GenBank
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Botrytis</i>	CfS-Br07	16SrXV-A	JN818845	Canale e Bedendo, 2013

*A sequência do 16S rDNA para o grupo 16SrV-B é correspondente a um isolado originário da China, pois o isolado brasileiro do grupo 16SrV-B identificado em crotalária por Mello et al., (2004) foi identificado somente com base no RFLP convencional, não havendo sequência depositada no Genbank. O Isolado 16SrVII-B é originário da Argentina e foi usado por demonstrar 100% de identidade com o fitoplasma CfS-BR10 no teste Blast

3.3 Resultados e Discussão

Com objetivo de detectar fitoplasmas em plantas de couve-flor com sintomas de nanismo, folhas avermelhadas, malformação da inflorescência e necrose dos vasos do floema, uma reação inicial de PCR com os *primers* fU5/rU3 foi realizada. Com o uso deste *primers* o fragmento de 0,9 kb, correspondente a região 16S rDNA do fitoplasma é esperado para reações positivas. Neste primeiro PCR foram testadas as amostras sintomáticas; amostras assintomáticas, que representam o controle negativo da plantas; água MiliQ, que corresponde ao controle negativo da reação de PCR; e DNA proveniente de plantas de vinca comprovadamente infectadas com fitoplasma, que representa o controle positivo da reação de PCR.

Um fragmento de 0,9 kb que corresponde ao tamanho esperado quando há amplificação de fitoplasma foi observado para uma amostra de couve-flor, esse mesmo tamanho de fragmento foi observado no PCR onde foi testada a planta de

vinca. Nenhuma amplificação ocorreu quando testado plantas assintomáticas ou água MiliQ.

Devido a suspeita da presença de fitoplasma, pela sintomatologia e pelo resultado obtido no PCR inicial, um novo PCR foi realizado com os *primers* P1/16S-SR seguido do P1A/16S-SR para confirmar o resultado da primeira detecção. Esse semi-nested PCR rende a amplificação de um fragmento de 1,6 kb da região do 16S rDNA. As mesmas amostras testadas no PCR com os *primers* fU5/rU3 foram testadas nesse PCR. No semi-nested PCR a presença do fitoplasma foi evidenciada pela amplificação de um fragmento de 1,6 kb, visualizados no gel de agarose. A amostra amplificada neste PCR foi a mesma amplificada no PCR inicial, fortalecendo a hipótese da presença do fitoplasma na planta sintomática de couve-flor. Uma amplificação no tamanho esperado de 1,6 kb também foi observada para o controle positivo da reação. No entanto, nenhuma amplificação ocorreu quando testada a planta assintomática ou o controle negativo da reação.

A não detecção de fitoplasma em plantas que apresentam sintomas muito característico para infecção do patógeno não é rara, podendo esta, ser atribuída ao baixo título do patógeno nos tecidos amostrados e sua variação de acordo com a estação do ano e a distribuição irregular do patógeno na planta hospedeira. Estes fatores devem ser considerados quando há falha da detecção por PCR (GALETTO e MARZACHI, 2010).

Os fragmentos genômicos amplificados nos dois PCRs foram purificados e enviados para o sequenciamento. Com o uso dos *primers* P1A/16S-SR foram enviados dez *primers* para alcançar uma cobertura de pelo menos 4X por base. Já para os *primers* fU5/rU3 foram enviados cinco *primers* e assim obter uma cobertura de pelo menos 2x por bases. As ferramentas SeqMan e EditSeq do programa DNASTAR foram usadas para montar a fita consenso em ambas as sequências.

As sequências foram aplicadas na ferramenta *on-line* de alinhamento BLASTn, que tem por objetivo encontrar a similaridade da sequência obtida com os demais fitoplasmas depositados na base de dados do GenBank (National Center for Biotechnology Information - NCBI). O fitoplasma detectado em couve-flor compartilhou 100% de identidade com fitoplasmas representantes do grupo dos ash yellows phytoplasma, especificamente com os representantes do subgrupo 16SrVII-B, como o isolado argentino *Artemisia witches'-broom* phytoplasma (ArtWBI) (número de acesso DQ989178) e o isolado brasileiro *Erigeron Erigeron witches'-*

broom phytoplasma (número de acesso AY034608). O resultado foi observado quando testada as sequências originárias dos dois PCRs, com os *primers* P1A/16S-SR e fU5/rU3.

Com o objetivo de identificar o fitoplasma presente na planta de couve-flor, uma análise virtual de RFLP foi realizada na ferramenta *on-line* *iPhyClassifier* (ZHAO et al., 2009), empregando as dezessete enzimas de restrição propostas por Wei et al., (2007). Padrões de restrição foram feitos para cada representante do subgrupo 16SrVII (Tabela 3) e comparados entre si. O representante do subgrupo 16SrVII-B, o fitoplasmas *Erigeron Erigeron witches'-broom phytoplasma* (EriWB) foi escolhido por ser uma estirpe brasileira. O padrão de RFLP *in silico* obtido do fitoplasma da couve-flor se mostrou idêntico ao padrão de restrição apresentado pelo fitoplasma representante do subgrupo 16SrVII-B (Figura 6). Isto demonstra uma total identidade entre esses fitoplasmas. Na ferramenta MegAlign (software Lasergene; DNASTAR), o alinhamento das sequências com todos os representantes do grupo 16SrVII revelou que o fitoplasma presente na planta de couve-flor, compartilhada 100% de identidade de sequência do gene 16S rRNA com os fitoplasmas EriWB e ArtWBI, a estirpe brasileira EriWB é referência do subgrupo 16SrVII-B no Brasil.

Figura 6 - Padrões de restrição de RFLP gerados pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região do 16S rDNA do fitoplasma encontrado na planta de couve-flor CfS-BR10 (A) e do fitoplasma representando do grupo 16SrVII-B *Erigeron Witches'-Broom phytoplasma* EriWB5 (B). Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*. M= marcador ϕ X174-DNA *HaeIII* digest

O fitoplasma detectado na planta de couve-flor foi identificado por Enfezamento da couve-flor, em inglês Cauliflower Stunt e então denominado CfS-BR10. Este fitoplasma com sequência total de 1546 bases foi depositado na base de dados GenBank número de acesso KR270802. O PCR inicial com o uso dos *primers*

fU5/rU3 rendeu uma sequência 859 bases, que também foi depositada na base de dados do GenBank, número de acesso KT444690.

Por meio da comparação entre os padrões de restrição gerados pela digestão *in silico*, os valores dos coeficientes de similaridade (F) foram calculados entre o fitoplasma CfS-BR10 e os representantes de diferentes subgrupos que compõem o grupo 16SrVII. O menor valor de (F) igual a 0,89 foi observado para o representante do subgrupo 16SrVII-C (*Crotalaria shoot proliferation phytoplasma*), já com o representante do subgrupo 16SrVII-B (*Erigeron Erigeron witches'-broom phytoplasma*), foi obtido o valor de (F) igual a 1, que indica 100% de similaridade entre os fitoplasmas (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de coeficiente de similaridade calculados para o fitoplasma detectado na árvore da felicidade e outros fitoplasmas pertencentes a diversos subgrupos do grupo 16SrVII

Fitoplasma	Classificação do gene 16S rRNA	AshY1	EriWB5	CrSP-Br 01	ErWB-Br01	CfS-Br10
<i>Candidatus Phytoplasma fraxini</i> - AshY1	16SrVII-A	1				
<i>Erigeron witches'-broom phytoplasma</i> - EriWB5	16SrVII-B	0,9	1			
<i>Crotalaria Shoot Proliferation phytoplasma</i> - CrSP-Br 01	16SrVII-C	0,84	0,89	1		
<i>Erigeron bonariensis Witches' Broom phytoplasma</i> - ErWB-Br01	16SrVII-D	0,85	0,94	0,83		
Cauliflower stunting phytoplasma - CfS-Br10	16SrVII-B	0,9	1	0,89	0,94	1

Com base na análise virtual de RFLP e nos valores dos coeficientes de similaridade, o fitoplasma identificado na planta de couve-flor, CfS-BR10, é um representante do grupo 16SrVII-B.

Na cultura da couve-flor, os fitoplasmas foram detectados pela primeira vez na Itália nos anos 80, com o uso da microscopia eletrônica de transmissão, entretanto, não foram classificados em virtude da ausência das técnicas moleculares (BERTACCINI et al., 1983). No Brasil, Rapussi (2010) descreveu para a couve-flor os fitoplasma afiliados aos grupos 16SrIII, 16SrXIII e 16SrXV nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul. Este autor ainda relata uma grande predominância do fitoplasma pertencente ao subgrupo 16SrIII-J. Os fitoplasmas do grupo 16SrXV foram encontrados somente no estado do Rio Grande do Sul (CANALE et al., 2013).

De acordo com Rapussi et al., (2012) o enfezamento da couve-flor ocorre com altos níveis de incidência desde o ano 2000 no cinturão verde da cidade de São Paulo, provocando reduções significativas da produtividade, que vem se

intensificando ao longo dos anos. Os danos a cultura devem-se principalmente a redução da qualidade do produto final, resultando em perdas e até em abandono de áreas.

O estudo epidemiológico realizado por Rapussi e colaboradores (2012) para o enfezamento da couve-flor, mostrou que a doença nos campos de cultivo se encontra de forma agregada e o patógeno é introduzido a partir de áreas externas, mostrando a localização da doença principalmente nos bordos de cultivo. Neste trabalho, também foi observado que aumento da incidência da doença é responsável pelo aparecimento de focos secundários na região central da área, e que os insetos vetores responsáveis pela transmissão, provavelmente estariam abrigados nas plantas daninhas que crescem no interior da cultura. Canale e colaboradores (2012) relatam ainda, que a análise epidemiológica do enfezamento da couve-flor comprovou que tanto o controle dos insetos vetores, como o controle das plantas daninhas nos bordos e nas entrelinhas, são importantes para a redução da incidência da doença.

A amostra de couve-flor onde o fitoplasma CfS-Br10 foi detectado apresentava sintomas de nanismo, folhas avermelhadas, malformação da inflorescência e necrose dos vasos, esses sintomas foram relatados por RAPUSSI et al., (2012) para couve-flor, assim como para repolho (AMARAL MELLO, 2007) e brócolis (ECKSTEIN et al., 2008). A ocorrência da associação de distintos fitoplasma para a mesma doença não é rara, sendo observado no estudo de Canale e Bedendo (2013) como também no presente trabalho. Canale et al., (2012) explicam que no cultivo do brócolis, do repolho e da couve-flor é evidente a diversidade de fitoplasmas envolvidos na doença do enfezamento, evidenciando que a predominância de um determinado grupo pode estar ligado com o inseto vetor a que o fitoplasma tem maior afinidade, ou até mesmo com a eficiência do vetor em transmitir este fitoplasma. No cultivo de brássicas no Brasil há um predomínio de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII, como relatado por Amaral Mello (2007), Rapussi (2010) e Eckstein (2010), entretanto, para as brássicas estão descritos os fitoplasmas afiliados aos grupos 16SrI, 16SrIII, 16SrXIII e 16SrXV.

No cultivo de brássicas na Europa é predominante a ocorrência de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrI, por exemplo, brócolis, repolho, couve e nabo na Itália (MARCONE e RAGOZZINO, 1995); brócolis na Sérvia (DUDUK et al., 2007); e colza (*Brassica napus* var. *arvensis*) na República Tcheca (BERTACCINI et

al., 1998). Fitoplasmas associados ao grupo 16SrI, em repolho, também foram descritos nos Estados Unidos (LEE et al., 2003). No entanto, diferentemente dos fitoplasmas descritos na Europa e nos Estados Unidos, um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrVI foi identificado no Irã em plantas de repolho causando sérios danos a cultura, sendo observados mais de 50% de infecção no campo (SALEHI et al., 2007).

Os fitoplasmas representantes do subgrupo 16SrVII-B foram primeiramente identificados no Brasil associados a plantas de erigeron e vinca (Barros et al., 2002). Já os subgrupos 16SrVII-C e 16SrVII-D foram recentemente descritos no estado de São Paulo, infectando respectivamente, plantas de *Crotalaria juncea* (FLÔRES et al., 2013a) e *Erigeron* sp (FLÔRES et al., 2015b). Para os quatro subgrupos descritos de 'Cadidatus *Phytoplasma fraxini*' (16SrVII), apenas o subgrupo 16SrVII-A não é relatado no Brasil. No entanto, América do Sul os fitoplasmas afiliados ao subgrupo 16SrVII-A já foram descritos no Chile em associação com plantas de videira, murta e peônia (GAJARDO et al., 2009; ARISMENDI et al., 2011).

O grupo de fitoplasmas dos "Ashy yellows" também é muito comum na Argentina, sendo descritos os subgrupos 16SrVII-B e 1SrVII-C em plantas herbáceas, que predominantemente apresentam sintomas de superbrotamento, filodia e redução do tamanho foliar (Conci et al., 2014).

Para verificar a relação filogenética do fitoplasma CfS-Br01 com os demais fitoplasmas representantes dos diferentes subgrupos do grupo 16SrVII, e com os distintos fitoplasmas descritos no Brasil, uma árvore filogenética foi construída com as sequências nucleotídicas da região 16S rDNA obtidas junto ao GenBank (Tabela 3). O fitoplasma CfS-Br10 emergiu de um clado juntamente com o representante do subgrupo 16SrVII-B (*Erigeron witches'-broom* phytoplasma), mostrando a estreita relação filogenética entre eles. E por sua vez, concordando aqueles resultados obtidos na análise virtual de RFLP e nos valores dos coeficientes de similaridade, confirmando a identidade do fitoplasma em estudo com sendo afiliado ao subgrupo 16SrVII-B (Figura 7).

Figura 7 - Árvore filogenética construída usando o método *Neighbor-Joining* com as sequências da região 16S rDNA do fitoplasma identificado na couve-flor CfS-BR10, de fitoplasmas representantes do grupo 16SrVII, de um representante de cada fitoplasma relatado no Brasil e do procarioto *Acholeplasma palmae*, com ancestral comum dos fitoplasmas

Os demais fitoplasmas representantes dos diferentes subgrupos do 16SrVII, emergiram em um mesmo clado que o fitoplasma representante do 16SrVI. A íntima relação filogenética entre os fitoplasma representantes dos grupos 16SrV, 16SrVI e 16SrVII observada na figura 4, também foi encontrada por Lee et al., (2004a), destacando que estão grupos são evolutivamente próximos

3.4 Conclusões

Com base nos nossos resultados, a couve-flor representa uma espécie cultivada que servem como hospedeiro de fitoplasma pertencente ao subgrupo 16SrVII-B, diferente dos dois fitoplasmas anteriormente descritos para este patossistema. Neste trabalho também ficou evidenciado que sintomas semelhantes podem ser induzidos em um mesmo hospedeiro por distintos fitoplasmas, como já encontrado para outros tipos de associação entre planta e fitoplasmas.

Referências

AMARAL MELLO, A.P.O. **Identificação de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença.** 2007. 64p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

AMARAL MELLO, A.P.O.A ; ECKSTEIN, B. ; FLORES, D. ; KERYCI, 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.

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 (Supplement), p.S95-S96, 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 Brazil. **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, n. 10, p. 1142 - 1148, 2002.

BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Molecular evidence for the presence of maize bushy stunt phytoplasma in corn In Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 957, 1997.

BERTACCINI, A.; PISI, A.; MARANI, F. Virescenza e fillodia del cavolfiore e del broccolo. **Informatore Fitopatologico**, Bologna, v. 33, p. 57 - 60, 1983.

BERTACCINI, A.; VORACKOVA, Z.; VIBIO, M.; FRANOVA, J.; NAVRATIL, M.; SPAK, J.; NEBESAROVA, J. Comparison of phytoplasmas infecting winter oilseed rape in the Czech Republic with Italian Brassica phytoplasmas and their relationship to the aster yellows group. **Plant Pathology**, Oxford, v. 47, p. 317–324, 1998.

CANALE, M.C.; MELLO, A.P.O.A.; MARTINS, T.D.; BEDENDO, I.P. Patossistema Fitoplasma-Brássicas: Identificação do Agente em Repolho, Couve-Flor e Brócolis, Potenciais Vetores e Epidemiologia. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 151-176, 2012.

CANALE, M.C.; BEDENDO, I.P. '*Candidatus Phytoplasma brasiliense*' (16SrXVA Subgroup) Associated with Cauliflower Displaying Stunt Symptoms in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 3, p. 419, 2013.

CONCI, L.; PONS, A.S.; GUZMÁN, F.; FERNÁNDEZ, F.; GALDEANO, E.; GROSSO, T.P.; TORRES, L.; MENEGUZZI, N. Advances in knowledge about phytoplasma diseases in Argentina. In: BERTACCINI, A. **European Cooperation in Science and Tecnology**. Phytoplasmas and phytoplasma disease management: how to reduce their economic impact. Bologna: IPWG - International Phytoplasma Working Group, 2014. chap. 2, p. 82-89.

DAVIS, R.E. ; LEE, I-M. Cluster-Specific Polymerase Chain Reaction Amplification of 16S rDNA Sequences for Detection and Identification of Mycoplasma-like Organisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 1008-1011, 1993.

DAVIS, R.E.; ZHAO, Y.; DALLY, E.L.; JOMANTIENE, R.; LEE, I-M.; WEI, W.; KITAJIMA, E.W. '*Candidatus Phytoplasma sudamericanum*', a novel taxon, and strain PassWB-Br4, a new subgroup 16SrIII-V phytoplasma, from diseased passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 62, p. 984–989, 2012.

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.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry**, New York, v. 19, p. 11-15, 1987.

DUDUK, B.; BULAJIC, A.; DUDUK, N.; CALARI, A.; PALTRINIERI, S.; KRSTIC, B.; BERTACCINI, A. Identification of phytoplasmas belonging to aster yellows ribosomal group in vegetables in Serbia. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, 341-342, 2007.

ECKSTEIN, B.; SILVA, E.G.; BEDENDO, I.P.; BRUNELLI, K. Primeiro relato da ocorrência de fitoplasmas em cultura de brócolis no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, p. 93, 2008. Supplement.

ECKSTEIN, B. **Enfezamento o brócolis: identificação molecular de fitoplasmas, potenciais insetos vetores e hospedeiros alternativos, e análise epidemiológica da doença**. 2010. 104p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

FLÔRES, D.; MELLO, A.P.O.A.; MASSOLA JUNIOR, N.S.; BEDENDO, I.P. First Report of a Group 16SrVII-C Phytoplasma Associated with Shoot Proliferation of Sunn Hemp (*Crotalaria juncea*) in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 12, p. 1652, 2013a.

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, 2013b.

FLÔRES, D.; MELLO, A.P.O.A.; 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 Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 65, p. 2761-2765, 2015.

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.

GALETTTO, L.; MARZACHI, C. Real-Time PCR diagnosis and quantification of phytoplasma. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. **Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors**. Wallingford: CAB International, 2010. chap. 1, p. 1-18.

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.

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.

IEA/CATI – AAESP. **Instituto de Economia Agrícola**. Estatística de produção da Agropecuária Paulista. Disponível em: <http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/subjetiva.aspx?cod_sis=1&idioma=1>. Acesso em: 25 Set. 2015.

IRPCM. '*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.

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 Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 337-347, 2004.

LORENZ, K.-H.; SCHNEIDER, B.; AHRENS, U.; SEEMULLER, E. Detection of the Apple Proliferation and Pear Decline Phytoplasma by PCR Amplification of Ribosomal and Nonribosomal DNA. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 7, p. 771-776, 1995.

MARCONE C.; RAGOZZINO A. Detection of phytoplasmas in Brassica spp. in southern Italy and their characterization by RFLP analysis. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 102, n. 5, p. 449-460, 2005.

MAY, A.; TIVELLI, S.W.; VARGAS, P.F.; SAMRA, A.G.; SACCONI, L.V.; PINHEIRO, M.Q. **A cultura da couve-flor**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2007. 36p.

MELLO, A.P.O.A.; RIBEIRO, L.F.C.; MASSOLA JÚNIOR, N.S.M.; BEDENDO, I.P. Um fitoplasma do grupo 16SrV associado ao superbrotamento da crotalária. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 30, n. 4, p. 432-435, 2004.

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

MENEGUZZI, N.G.; TORRS, L.E.; GALDEANO, E.; GUZAMAN, F.A.; NOME, S.F.; CONCI, R.L. Molecular characterization of a phytoplasma of the ash yellows group (16Sr VII-B) occurring in *Artemisia annua* and *Conyza bonariensis* weeds.

Agriscientia, v. 25, n. 1, p. 7-16, 2008

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 Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, n. 4, p. 429-436, 2000.

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.

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.

RAPPUSSI-Da-SILVA, M.C.C. **Enfezamento da couve-flor: identificação molecular de fitoplasmas, evidencia de potencial vetor e análise epidemiológica da doença**. 2010. 107p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RAPPUSSI, M.C.C.; ECKSTEIN, B.; FLÔRES, D.; HAAS, I.C.R.; AMORIM, L.; BEDENDO, I.P. Cauliflower stunt associated with a phytoplasma of subgroup 16SrIII-J and the spatial pattern of disease. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, n. 4, p. 829-840, 2012.

SALEHI, M.; IZADPANAH, K.; SIAMPOUR, M. Characterization of a Phytoplasma Associated with Cabbage Yellows in Iran. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 5, p. 625-630, 2007.

SCHNEIDER, B.; SEEMULLER, E.; SAMRT, C.D.; KIRKPATRICK, B.C. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. Academic Press, 1995, p. 369-380.

SILVA, F.N.; QUEIROZ, R.B.; SOUZA, A.N.; ALSADI, A.M.; SIQUEIRA, D.L.; ELLIOT, S.L.; CARVALHO, C.M. First Report of a 16SrIIC Phytoplasma Associated with Asymptomatic Acid Lime (*Citrus aurantifolia*) in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 11, p. 1577, 2014.

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.

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

ZHAO, Y.; WEI, W.; LEE, I-M.; SHAO, J.; SUO, X.; 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.

4 UM NOVO FITOPLASMA DO GRUPO 16SrXIII E UM FITOPLASMA DO GRUPO 16SrIII-J ENCONTRADO EM ALHO-PORÓ COM SINTOMAS DE SUBDESENVOLVIMENTO E RETORCIMENTO DE FOLHAS

Resumo

O alho-poró (*Allium porrum* L.) é uma hortaliça originária da Europa que vem sendo cultivada praticamente no mundo todo. No ano de 2014, plantas de alho-poró apresentando os sintomas de subdesenvolvimento e retorcimento de folhas foram observadas na região de São José do Rio Pardo - SP. Em virtude da sintomatologia, houve a suspeita de infecção por fitoplasma. O DNA total usado na reação de PCR foi extraído a partir plantas sintomáticas e assintomáticas. A amplificação de fragmentos genômicos de aproximadamente 1,6 kb, indicaram a associação de fitoplasmas com as plantas afetadas. Nenhuma amplificação ocorreu a partir de extratos de plantas assintomáticas. A identificação molecular, com base no gene 16S rRNA, revelou a presença de um fitoplasma afiliado ao subgrupo 16SrIII-J e outro pertencente ao grupo 16SrXIII. Para este último fitoplasma foram caracterizadas quatro estirpes, uma delas é afiliada ao subgrupo 16SrXIII-E e as demais não apresentaram identidade com nenhum dos representantes dos subgrupos até agora conhecidos. Estes fitoplasmas também foram analisados com base nos genes *SecY* e Proteína Ribossomal (*rp*). Os fragmentos genômicos amplificados para estes dois genes foram purificados e sequenciados com diferentes *primers*, para que cada base tivesse uma cobertura mínima de 3X. Os resultados mostraram que o gene *SecY* apresentou maior variabilidade genética do que o gene 16S rRNA. Contudo, este gene não permitiu a distinção de estirpes dentre os fitoplasmas afiliados ao subgrupo 16SrIII-J. A análise do gene *rp* mostrou que umas das estirpes do fitoplasma associado ao enfezamento do Alho-poró, foi similar aos demais fitoplasmas afiliados ao subgrupo 16SrIII-J descritos até o momento. Os resultados da análise para o referido gene, também mostraram que a outra estirpe, pode ser indicada como representante de um novo subgrupo dentro do grupo 16SrXIII. Ainda, este estudo apontou que o alho-poró representa uma espécie cultivada que serve como um novo hospedeiro para fitoplasmas pertencentes ao subgrupo 16SrIII-J e ao grupo 16SrXIII, ampliando o conhecimento da gama de hospedeiros para estes fitoplasmas.

Palavras-chave: Genes *SecY*; Gene da Proteína Ribossomal; Identificação molecular; Mollicutes fitopatogênicos

Abstract

The leek (*Allium porrum* L.) is a vegetable native to Europe that has been cultivated almost worldwide. In 2014, leek plants showing symptoms of stunting and abnormal leaves were observed in the region of São José do Rio Pardo - SP. These symptoms provide the first evidence pointing to infection by phytoplasma. The total DNA used in PCR reaction was extracted from symptomatic and asymptomatic plants. Amplification of genomic fragments showing approximately 1.6 kb, indicated the presence of phytoplasma associated with the affected plants. No amplification occurred from asymptomatic plant DNA. The molecular identification based on 16S rRNA gene, revealed the presence of a phytoplasma belonging 16SrIII-J subgroup, and another belonging to the 16SrXIII group. For the latter phytoplasma, four strains

were identified, one affiliated with 16SrXIII-E subgroup, and the other showed no identity with any of the subgroups representatives known. These phytoplasmas were also analyzed based on the protein ribosomal (rp) and SecY genes. The genomic fragments amplified for these two genes were purified and sequenced with different primers to achieve coverage at least 3X per base position. The results showed that the gene SecY presented greater genetic variability than the 16S rRNA gene. However, this gene did not allow distinction from the phytoplasma strains affiliated with 16SrIII-J subgroup. The analysis of rp gene showed that the phytoplasma associated with leeks stunting can be indicated as representative of a new subgroup within the group 16SrXIII. The results also showed that based on rp gene, the phytoplasma found in diseased plant of leek was similar to the phytoplasmas 16SrIII-J subgroup strains, described so far. This study also found that the leek is a cultivated species that serves as a new host for phytoplasmas belonging to 16SrIII-J subgroup and 16SrXIII group, expanding the knowledge of the host range for these phytoplasma.

Keywords: Molecular identification; Phytopathogenic Mollicutes; Ribosomal protein genes and Secy gene

4.1 Introdução

O alho-poró (*Alium porrum* L.) é uma hortaliça bianual de inverno pertencente à família Alliaceae. É uma planta aromática, originária da Europa e cultivada praticamente no mundo todo. Apesar de ser uma hortaliça de inverno, com temperatura ótima de cultivo em torno de 20 °C, híbridos desta espécie ganharam popularidade entre os produtores, devido aos rendimentos mais elevados, maior uniformidade em comparação com cultivares de polinização aberta e possibilidade de ser cultivada em regiões tropicais e subtropicais (CABI, 2015; BERNAERT et al., 2012). No Brasil, essa cultura se adapta muito bem às condições dos estados da região Sul, devido ao clima mais ameno. O alho-poró é muito usado por possuir um sabor mais refinado, sutil e doce do que a cebola padrão (CABI, 2015).

Os fitoplasmas, organismos unicelulares sem parede celular, são parasitas obrigatórios encontrados no floema das plantas e na hemolinfa dos insetos, principalmente cigarrinhas da Ordem Hemiptera (BEDENDO, 2011; BERTACCINI, 2007). Devido à inviabilidade e às dificuldades encontradas para seu cultivo *in vitro* (DAVIS et al., 2015; MARCONE, 2014), o sistema de detecção e classificação de fitoplasmas é baseado no uso de ferramentas moleculares, principalmente pela amplificação do DNA via técnica de PCR, que em conjunto com a análise de RFLP permitem a identificação destes patógenos (LEE et al., 1998; WEI et al., 2007;

MARCONI, 2014). O emprego de técnicas moleculares também tem permitido determinar a diversidade genética e o relacionamento filogenético entre os distintos grupos de fitoplasmas (JOMANTIENE et al., 2002).

O sistema de classificação estabelecido pelo grupo de taxonomia de fitoplasmas do IRPCM (2004), estabeleceu que a classificação deve ser feita com base na sequência do gene 16S rRNA, permitindo classificar os fitoplasmas em distintos grupos e subgrupos. Com o avanço da biotecnologia e das ferramentas moleculares, diversos estudos têm mostrado que estirpes muito relacionadas não são, muitas vezes, diferenciadas somente pela análise do gene 16S rRNA, o qual é um gene altamente conservado. Estes estudos têm evidenciado que estirpes molecularmente próximas apresentam diferenças ecológicas ou biológicas, dificultando a designação de uma nova espécie (MARTINI et al., 2007; LEE et al., 2010a; MARCONI 2014).

Com o objetivo de superar as limitações encontradas no 16S rRNA, múltiplos genes com variados graus de conservação estão sendo utilizados para propiciar uma fina diferenciação entre os fitoplasmas, introduzindo assim um parâmetro filogenético adicional. Os genes *SecY*, *tuf*, Proteína Ribossomal (rp), 23S rRNA e região intergênica 16S-23S têm sido frequentemente usados como ferramentas complementares, garantindo uma diferenciação mais acurada entre as espécies. Os genes *SecY* e *rp* são os mais variáveis entre os genes citados acima e têm se mostrado como ótimos marcadores para a diferenciação de estirpes de fitoplasmas (MARTINI et al., 2007; LEE et al., 2010a; LEE et al., 2010b).

A sequência do gene 16S rRNA tem um papel fundamental nos estudos de evolução e ecologia microbiana. Este gene se tornou padrão para o estabelecimento de relações filogenéticas, avaliação da biodiversidade genética e detecção e quantificação de estirpes específicas. Estudos de ecologia e evolução de microrganismos que utilizam as sequências do 16S rRNA são complicados para os procariotos, pois muitas bactérias podem abrigar múltiplos óperons rRNA heterogêneos (ACINAS et al., 2004).

A presença de dois óperons 16S rRNA é conhecida para a maioria das estirpes de fitoplasmas, o que leva estes microrganismos a serem classificados em *rrnA* e *rrnB*. Schneider e Seemuller (1994) analisaram 28 estirpes de fitoplasmas e todas apresentavam duas cópias do óperon 16S rRNA, sendo que entre as estirpes analisadas 12 pertenciam ao grupo 16Srl. Em sua maioria os óperons são idênticos

ou muito próximos, entretanto, a heterogeneidade existe para algumas estirpes (SCHNEIDER; SEEMULLER, 1994; LEE et al., 1998; WEI et al., 2007; MARCONE, 2014). Para uma classificação mais precisa quando existe essa heterogeneidade é recomendável que as sequências sejam obtidas por clonagem, pois assim é possível separar os dois óperons (WEI et al., 2007). No Brasil, essa heterogeneidade do 16S rRNA já foi relatada para os fitoplasmas causadores das doenças do enfezamento do tomateiro e da berinjela, ambos afiliados ao grupo 16SrIII (AMARAL MELLO et al., 2004, 2006).

No presente trabalho buscou-se caracterizar molecularmente dois fitoplasmas associados ao subdesenvolvimento e retorcimento de folhas de plantas de alho-poró, empregando como marcadores moleculares os genes 16S rRNA, Proteína Ribossomal (rp) e *SecY*.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material Vegetal

Amostras de alho-poró, num total de 14, foram coletadas em plantios comerciais instalados na região de São José do Rio Pardo/SP. As plantas apresentavam sintomas de subdesenvolvimento e retorcimento de folhas levando à suspeita de infecção por fitoplasma.

4.2.2 Extração do DNA total

A extração do DNA total foi processada a partir das folhas com o uso do *kit* comercial de extração DNeasy Plant Mini Kit – Qiagen, cuja metodologia foi parcialmente modificada por GREEN et al., (1999).

Aproximadamente 1,0 g de material vegetal fresco foi triturado em almofariz de porcelana, na presença de nitrogênio líquido. O macerado foi colocado em microtubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 800 µL da solução tampão de extração 2X CTAB à 65 °C e 4 µL de RNase. Para o preparo da solução de extração foram pesados 2 g de CTAB; 8,18 g de NaCl; 0,74 g de EDTA; 1,57 g de Tris-HCl e 1,0 g de PVP, sendo os componentes dissolvidos em água deionizada até completar o volume de 100 mL e o pH ajustado para 8,0. Antes do uso da solução de extração foram adicionados 2 µL de mercaptoetanol para cada 1 mL de solução. O material foi incubado à 65 °C por 10 minutos e agitado de 2 a 3 vezes durante este período. Em

seguida, foram adicionados 130 µL do tampão AP3 (Qiagen) e a mistura foi incubada no gelo por 5 minutos. Após centrifugação a 14.000 rpm (20.000 x g) por 5 minutos, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi aplicado na coluna QIAshredder Mini spin, montada sobre um tubo coletor. A coluna foi centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos. O filtrado foi transferido para um novo microtubo, onde foi adicionado 1,5 volumes do tampão AW1 (Qiagen), correspondente à aproximadamente 675 µL. Um volume de 650 µL dessa mistura foi aplicado na coluna DNeasy Mini spin e centrifugado por 1 minuto a 8.000 rpm (6.000 x g). Essa etapa foi repetida até que não houvesse mais líquido no microtubo. O filtrado foi descartado e a coluna contendo o DNA foi transferida para um novo microtubo. Na coluna foram adicionados 500 µL do tampão AW2 (Qiagen), seguido de centrifugação por 1 minuto a 8.000 rpm. Esse procedimento foi realizado duas vezes e, após a segunda lavagem, foi processada a centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos. Após a centrifugação, os microtubos foram deixados à temperatura ambiente por 10 minutos para evaporação de possíveis resíduos de etanol presentes no tampão AW2 (Qiagen). A coluna foi transferida para um novo microtubo, adicionados 100 µL do tampão AE (Qiagen) pré-aquecido a 65 °C e deixados à temperatura ambiente por 20 minutos para eluição do DNA. Uma última centrifugação por 2 minutos a 8.000 rpm foi realizada e o DNA total obtido foi armazenado a -20 °C para ser usado nas reações de PCR.

4.2.3 Controles utilizados na reação de PCR

Todos os reagentes utilizados na reação de PCR foram previamente testados com controles positivos e negativos. Como controle positivo foi utilizado o DNA extraído de planta de vinca (*Catharanthus roseus* L.), comprovadamente infectada com fitoplasma e como controle negativo foi utilizado água milliQ. Após a confirmação de que os reagentes estavam adequados, procedeu-se à reação de PCR com as amostras do presente estudo. Posteriormente, em todas as reações de PCR, água foi utilizada como controle negativo da reação.

4.2.4 Reagentes e condições de PCR empregados para a amplificação de fragmentos genômicos do gene 16S rRNA

Cada reação foi processada utilizando um volume final de 50 µL, contendo 1 µL do DNA total; 37,75 µL de água deionizada autoclavada (miliQ); 1,0 µL de cada

iniciador (na concentração de 20 pmol/ μ L); 5 μ L de solução tampão 10 X PCR; 4 μ L de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução 2,5mM de cada deoxinucleotídeo) e 0,25 μ L GeneAmp[®] High fidelity PCR system (Applied Biosystem).

A primeira reação de PCR foi conduzida com o par de *primers* P1/16S-SR (DENG & HIRUKI, 1991; LEE et al., 2004), sendo o produto desta reação diluído em água miliQ na proporção 1:30 e utilizado como modelo na segunda reação, onde foram usados os *primers* P1A/16S-SR (LEE et al., 2004). Com o uso dos *primers* P1/16S-SR e P1A/16S-SR são esperadas amplificações de fragmentos genômicos de 1.550 pb e 1.525pb, respectivamente.

Para ambos os pares de *primers*, o termociclador foi programado para 38 ciclos, sendo que cada ciclo compreendeu as seguintes etapas: 1 minuto à 94 °C para desnaturação do ácido nucléico; 2 minutos à 55 °C para anelamento dos *primers*; e 3 minutos à 72 °C para extensão da fita. Adicionalmente, foi processada uma etapa inicial de desnaturação de 2 minutos à 94 °C e uma etapa final de extensão de 7 minutos à 72 °C. Os produtos gerados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% preparado em tampão TA 1X, contendo o corante Sybr safe[®] a 1%. Em todos os géis o marcador 1kb DNA ladder (Life Technologies) foi utilizado, sendo os mesmos submetidos à corrente elétrica de 65 volts por 60 minutos. A visualização dos fragmentos de DNA amplificados foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta.

As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas a seguir.

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

P1A - 5' AAC GCT GGC GGC GCG CCT AAT AC 3' (LEE et al., 2004).

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

4.2.5 Reagentes utilizados e condições de PCR para a amplificação de fragmentos genômicos do gene da Proteína Ribossomal (rp)

Cada reação de PCR foi processada utilizando um volume final de 50 μ L, contendo os mesmos componentes, nas mesmas proporções descritas no item 4.2.4.

Na primeira reação foi utilizado o par de *primers* rpF1/rpR1 (LIM e SEAR, 1992), sendo o produto gerado diluído em água miliQ, na proporção de 1:30, e usado na segunda reação com os *primers* rp(III)FN/rp(I)-R1A (DAVIS et al., 2013;

MARTINI et al., 2007) e rpF1C/rp(I)-R1A (MARTINI et al., 2007). Com o uso dos *primers* de primeira e segunda reação são esperados, respectivamente, fragmentos de aproximadamente 1.250 pb e 1.200 pb, correspondentes aos genes *rpIV* (*rpl22*) e *rpsC* (*rpS3*).

Para duas reações de PCR o termociclador foi programado para 38 ciclos, sendo que cada ciclo compreendeu as seguintes etapas: 1 minuto à 94 °C para desnaturação do ácido nucléico, 2 minutos à 50 °C para anelamento dos *primers* e 3 minutos à 72 °C para extensão da fita. Uma etapa inicial de desnaturação de 2 minutos à 94 °C e uma etapa final de extensão de 7 minutos à 72 °C foram incluídas.

Os produtos obtidos na reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose, de forma idêntica àquela descrita anteriormente para o gene 16S rRNA.

As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas a seguir.

rpF1- 5' GGA CAT AAG TTA GGT GAA TTT 3' (LIM e SEARS, 1992).

rpR1 - 5' ACG ATA TTT AGT TCT TTT TGG 3' (LIM e SEAR, 1992).

rpF1C - 5'ATG GTD GGD CAY AAR TTA GG 3' (MARTINI et al., 2007).

rp(III)-FN - 5' GGT GAA TTT TCT CCA ACT CG 3' (DAVIS et al., 2013).

rp(I)-R1A - 5' GTT CTT TTT GGC ATT AAC AT 3' (MARTINI et al., 2007).

4.2.6 Reagentes utilizados e condições de PCR para amplificação de fragmentos genômicos do gene *SecY*

A primeira reação de PCR foi processada com o par de *primers* L15F1A (III)/MapR1(III) (LEE et al., 2010a). Um volume final de reação de 50 µL foi preparado, contendo os seguintes componentes: 1 µL do DNA total; 37,50 µL de água miliQ; 1,0 µL de cada *primer* (concentração de 20 pmol/ µL); 5 µL de solução tampão 10 X PCR; 4 µL de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução 2,5mM de cada deoxinucleotídeo) e 0,5 µL de TaKara *LA Taq*TM Polymerase (TAKARA Bio Inc).

A segunda reação foi conduzida com um volume final de 50 µL, sendo composta por 37,75 µL de água; 1 µL de DNA total; 1,0 µL dos *primers* SecY-F1(III)/SecY-R1(III) (LEE et al., 2010a); 0,25 µL da polimerase GeneAmp[®] High fidelity PCR system (Applied Biosystem); 5 µL de solução tampão 10 X PCR; e 4 µL de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução 2,5mM de cada deoxinucleotídeo). Assim como para os outros genes estudados, o produto da primeira PCR foi diluído na proporção de 1:30 em água miliQ. Com o uso desses

primers na primeira e segunda reação de PCR são esperados, respectivamente, fragmentos de DNA de, aproximadamente, 2.200 pb e 1.700 pb.

Na primeira reação de PCR, o termociclador foi programado para 35 ciclos, sendo que cada ciclo compreendeu as seguintes etapas: 30 segundos à 94 °C para desnaturação do ácido nucléico, 1 minuto à 50 °C para anelamento dos *primers* e 5 minutos à 68 °C para extensão da fita. Etapas complementares foram incluídas, sendo uma de desnaturação inicial de 1 minuto à 94 °C e uma etapa de extensão final de 10 minutos à 72 °C. Na segunda reação, utilizando a enzima GeneAmp® High fidelity PCR system, o termociclador foi programado para 38 ciclos, assim como descrito no item 4.2.1.5 para o gene da Proteína Ribossomal.

Os produtos amplificados na segunda reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose como descrito anteriormente para o gene 16S rRNA.

As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas a seguir:

L15-F1A (III) - 5' CTT CTG GTA AAG GAC ATA AAG G 3' (LEE et al., 2010a).

Map-R1 (III) - 5' GGT TCT TCG TGC AAT TGC AAA CC 3' (LEE et al., 2010a).

SecY-F1 (III) - 5' CTA GAC CAG GTT TTG AAG G 3' (LEE et al., 2010a).

SecY-R1 (III) - 5' GAC CTG CTT TTC TCA TTA TAG C 3' (LEE et al., 2010a).

4.2.7 Purificação dos fragmentos de DNA amplificados na reação de PCR

4.2.7.1 Purificação a partir da extração do gel de agarose

Os fragmentos amplificados dos genes *SecY* e Proteína Ribossomal dos fitoplasmas foram extraídos e purificados como uso do kit comercial QIAquick Gel Extration Kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

De cada amostra positiva para fitoplasma foram utilizados 100 µL de produto da segunda reação, aos quais foram adicionados 25 µL do tampão de corrida Tracking Dye. Essa mistura foi aplicada em gel Low-Melt agarose 1% preparado em tampão TA 1X, contendo o corante Sybr safe® a 1% e o marcador 1kb DNA ladder (Life Technologies). O gel de agarose foi submetido à corrente elétrica por 60 minutos a 65 volts. Os fragmentos visualizados em transiluminador de luz ultravioleta que correspondiam ao tamanho esperado para o fitoplasma foram removidos juntamente com um bloco de gel, com o auxílio de um escalpelo, e pesados em balança de alta precisão. O bloco de gel foi colocado em um microtubo de 2 mL e

para cada 1 volume de gel Low-Melt agarose foram adicionados 3 volumes do tampão QG (Qiagen). O material foi, então, incubado por 10 minutos à 55 °C. Para dissolver o gel, a mistura foi agitada por 2-3 vezes durante o período de incubação. Após a dissolução completa do gel, foi adicionado isopropanol na proporção de 1:1, sendo a suspensão misturada pela inversão constante do microtubo. A suspensão foi colocada na coluna QIAquick spin montada sobre um tubo coletor e centrifugada por 1 minuto à 13.000 rpm (17.900 x g), sendo este procedimento repetido até que não houvesse mais líquido no microtubo. Após a centrifugação, o filtrado foi descartado, a coluna colocada novamente no mesmo tubo coletor, adicionados 500 µL do tampão QG (Qiagen) e conduzida uma nova centrifugação por 1 minuto à 13.000 rpm. O líquido que passou pela coluna foi descartado, sendo adicionados à coluna 750 µL do tampão de lavagem PE (Qiagen). Após deixar a coluna à temperatura ambiente por 5 minutos, a coluna foi centrifugada por 1 minuto à 13.000 rpm. O filtrado foi descartado e uma centrifugação adicional foi realizada para garantir que não restassem resíduos de etanol presentes no tampão de lavagem PE no interior da coluna. Esta foi colocada em um novo tubo coletor e no centro da coluna foram adicionados 50 µL do tampão de eluição EB (Qiagen). Após 10 minutos à temperatura ambiente, a coluna foi centrifugada por 2 minutos à 13.000 rpm, o DNA eluído foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20° C.

4.2.7.2 Purificação direta do produto de PCR

O fragmento correspondente à região 16S rDNA amplificado na segunda reação de PCR foi purificado com o uso do QIAquick PCR Purification (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante.

Para cada 1 volume do produto de PCR foram adicionados 5 volumes do tampão PB (Qiagen) em um microtubo de 2 mL. A amostra e o tampão foram misturados e aplicados na coluna QIAquick Spin acoplada a um tubo coletor, e, então, centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm (17.900 x g). O líquido que passou pela coluna foi descartado e a coluna colocada no mesmo tubo coletor. O volume de 750 µL do tampão de lavagem PE (Qiagen) foi adicionado à coluna, seguido de centrifugação por 1 minuto à 13.000 rpm. O líquido que passou pela coluna foi descartado e uma nova centrifugação foi realizada para garantir que não restassem resíduos de etanol na coluna. Após a centrifugação adicional, a coluna foi colocada em um novo tubo coletor, adicionados 50 µL do tampão de eluição EB no centro da

coluna, a qual foi deixada à temperatura ambiente por 10 minutos. A coluna foi centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm e o DNA transferido para um novo tubo e armazenado a -20° C.

4.2.8 Quantificação do fragmento genômico amplificado na PCR

Os fragmentos de DNA purificados correspondentes aos genes 16S rRNA, SecY e Proteína Ribossomal dos fitoplasmas encontrados no alho-poró foram quantificados em gel de agarose 1% preparado em tampão TA 1X, contendo o corante Sybr safe® a 1%. Foram utilizados 8 µL do marcador 1kb DNA ladder (Life Technologies), 5 µL do marcador de peso molecular MASS DNA Ladder (New England BioLabs) e 1 µL de DNA misturado com 5 µL do corante de corrida. O gel de agarose foi submetido à corrente elétrica por 60 minutos a 65 volts e a visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta.

4.2.9 Clonagem do gene 16S rRNA

Para realizar a clonagem, o fragmento do 16S rDNA de 1550 pb purificado foi inserido no vetor pGEM®- T Easy Vector System II (Promega) e clonado em *Escherichia coli* da estirpe JM109 High Efficiency Competent Cells. Para a inserção do DNA ao plasmídeo (ligação) foram utilizados 2,5 µL do DNA purificado, 1 µL do vetor (25 ng. µL⁻¹), 5 µL de tampão ligase 2X, 1 µL de T4DNA ligase (3 U. µL⁻¹) e 0,5 µL de água deionizada autoclavada (miliQ), compondo uma mistura de 10 µL que foi colocada em um microtubo e armazenada 12 horas à 4°C.

Na transformação, inserção do vetor contendo o fragmento de DNA nas células competentes da *E. coli*, 2 µL do produto da ligação foram colocados em um tubo contendo 50 µL de células competentes e incubados no gelo por 30 minutos. Em seguida, a mistura foi submetida a um choque térmico, por incubação à 42 °C por 50 segundos e, imediatamente, colocada no gelo durante 2 minutos. Após o choque térmico, foram adicionados às células transformadas 250 µL de meio de cultura SOC (1% de triptona; 0,5% extrato de levedura; 8,5 mM NaCl; 2,5 mM de KCl; 0,001 mM MgCl; 0,02 mM de glicose e água até completar o volume de 1000 mL). A mistura foi mantida sob agitação por 2 horas à 37 °C, à 200 rpm. Após este período, 80, 50, 25 e 10 µL da suspensão de células transformadas foram semeadas em meio LB (1% de triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% de NaCl; 1,6% de ágar),

contendo ampicilina, X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosida) e IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosida), nas concentrações finais de 100 mg.mL⁻¹, 4% e 20%, respectivamente. As colônias foram incubadas à 37 °C por 12 horas. As colônias transformadas (colônias brancas) foram transferidas para tubos Falcon (Polypropylene Round-Bottom Tubes) de 14 mL, contendo o meio líquido Terrific Broth - TB (1,2 % de triptona; 2,4 % extrato de levedura; 0.4% Glicerol; 17 mM fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄); 72 mM fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) e pH ajustado para 7.0) e ampicilina 100 mg.mL⁻¹ e, em seguida, incubados à 37 °C por 12 horas, à 200 rpm.

A partir das bactérias clonadas foi realizada a extração do plasmídeo contendo o fragmento do 16S rDNA dos fitoplasmas. A extração foi realizada com o *kit* comercial Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit (BIO-RAD), de acordo com as recomendações do fabricante. Para confirmação da presença dos fitoplasmas no plasmídeo, foi realizada uma reação de PCR com o par de *primer* T7/SP6 e os produtos foram enviados para sequenciamento.

4.2.10 Sequenciamento dos fragmentos genômicos amplificados por PCR para os genes 16S rRNA, SecY e Proteína Ribossomal

Os fragmentos de DNA dos genes analisados, na concentração de 20 ng/ μ L, foram enviados para a empresa de sequenciamento *Macrogen* (Rockvill, Estados Unidos). Para o gene 16S rRNA foram enviados 10 *primers* com a intenção de que cada base tivesse cobertura de mínimo 4 X. No sentido *forward* foram utilizados os *primers* P1A, P5, F4, F5 e T7. No sentido *reverse* foram utilizados os *primers* 16S-SR, R5, R4, R3 e SP6. Para o gene SecY foram utilizados os *primers* SecY-F1(III), L15F-696-b e SecYG-SF1 no sentido *forward* e SecY-R1(III), MapR-696-b, SecYG-SR1, SecYG-SR2 no sentido *reverse*. No sequenciamento do gene da Proteína Ribossomal foram utilizados os *primers* rpF1C, rp(III)-FN, rpXIISF1 e rpXIISF2 no sentido *forward* e no sentido *reverse* os *primers* rp(I)-R1A e rpR1. Todos os *primers* utilizados estavam na concentração 2 pmol/ μ L.

As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas a seguir:

P5 - 5' CGG CAA TGG AGG AAA CT 3' (SCHNEIDER et al., 1995).

F4 - 5' TGG TAG TCC ACG CCG TAA 3' (DAVIS & LEE, 1993).

F5 - 5'GGT TGT CGT CAG CTC GTG TCG 3'(I-M Lee, comun. pessoal).

T7 - 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3' (Promega Corporation, 2014).

R5 - 5'CGA CAC GAG CTG ACG ACA ACC 3' (I-M Lee, comun. pessoal).

R4 - 5' TTA CGG CGT GGA CTA CCA GGG 3' (GUNDERSEN et al., 1994).

R3 - 5' GGC ACA TAG TTA GCC GGG GCT TAT 3' (I-M Lee, comun. pessoal).

SP6 - 5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG 3' (Promega Corporation, 2014).

L15F-696-b - 5' DMA AGA ATG GMR WRA ACA AGG 3' (I-M Lee, comun. pessoal).

SecYG-SF1-5'CAGAAAATGGTTTTTCCCAATGGGT3' (Dally, E. L comun. pessoal).

MapR-696-b-5'AGCCACACCTACAACAATTAA3' (Dally, E. L comun. pessoal).

SecYG-SR1-5'GTTTAGTAGCGTAAGTGATTGG3' (Dally, E. L comun. pessoal).

SecYG-SR2-5'AAACTGGACAATAATAGAGGCAG3' (Dally, E. L comun. pessoal).

rpXIIISF1-5'TTCATACAGCCAAACCAGGTG3' (Dally, E. L comun. pessoal).

rpXIIISF2-5'CGTATGAATTTCCGACGTGTTC3' (Dally, E. L comun. pessoal).

As sequências obtidas no sequenciamento foram alinhadas e editadas no programa computacional DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wisc.), usando as opções SeqMan, EditSeq e MegAlign.

4.2.11 Análise de RFLP *in silico*

O programa pDraw32 V.1.1.121 (AcaClone Software) foi usado para análise dos mapas de sítios putativos de restrição das sequências dos fitoplasmas aqui estudados, sendo simulada uma digestão virtual com as 17 enzimas propostas por Wei et al. (2007) para os genes do 16S rRNA, de acordo com os critérios estabelecidos pelo IRPCM (2004). As enzimas utilizadas foram *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI* (*Sau3AI*), *MseI*, *RsaI*, *SspI* e *TaqI*. Após a digestão *in silico*, foi gerada uma imagem simulada de eletroforese em gel de agarose 3% (WEI et al., 2007). Para o gene *SecY* (LEE et al., 2010a) e o gene da Proteína Ribossomal (LEE et al., 1998) foram utilizadas as 17 enzimas citadas e uma enzima adicional denominada *MluCI* (*Tsp509I*).

Os padrões gerados pela análise de RFLP *in silico* usando o gene 16S rRNA dos fitoplasmas encontrados neste estudo foram comparados com aqueles dos fitoplasmas representantes dos diversos subgrupos do grupo 16SrIII e 16SrXIII (Tabela 5), para fins do cálculo dos coeficientes de similaridade (F). Para cada par de fitoplasma, foi calculado o coeficiente de similaridade de acordo com a fórmula descrita por Nei e Li (1979). A equação é enunciada por $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, onde N_x e N_y representam o número total de bandas no perfil de cada fitoplasma resultantes da digestão com as 17 enzimas e N_{xy} é o número de bandas compartilhadas pelos

dois fitoplasmas em análise. As bandas de até 50 pb foram consideradas para os cálculos. Os valores de homologia das sequências entre os genes estudados foram de calculadas pelo emprego do programa ClustalW2 (Li et al., 2015).

Tabela 5 - Sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA de fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII e grupo 16SrXIII depositadas no GenBank e usadas para o cálculo dos valores de coeficientes de similaridade (F)

Nome da Doença	Classificação do gene 16S rRNA	nº GenBank 16S rRNA	nº GenBank SecY	nº GenBank rp	Referência
Maize bushy stunt phytoplasma	16SrI-B	AY265208	AY803175	AY264858	Lee et al., 2010a; Martini et al., 2007
Crotalaria phyllody phytoplasma	16SrII-C	EF193355	GU004349	EF186818	Lee et al., 2010a; Martini et al., 2007
Peach X-disease Canada phytoplasma	16SrIII-A	L33733	GU004327	EF186813	Lee et al., 2010a; Martini et al., 2007
Clover yellow edge phytoplasma	16SrIII-B	AF173558	GU004332	JQ360962	Davis et al., 2013.
Pecan bunchy top phytoplasma	16SrIII-C	GU004371	GU004361	EF186807	Davis et al., 2013.
Goldenrod yellows phytoplasma	16SrIII-D	GU004372	GU004364	EF186810	Davis et al., 2013.
Spirea stunt phytoplasma	16SrIII-E	AF190228	GU004326	EF186806	Davis et al., 2013.
Milkweed yellows phytoplasma	16SrIII-F	AF510724	GU004340	EF186808	Davis et al., 2013.
Walnut witches'-broom phytoplasma	16SrIII-G	AF190227	GU004325	JQ360961	Lee et al., 2010a; Davis et al., 2013.
Poinsettia branch inducing phytoplasma	16SrIII-H	AF190223	GU004328	EF186811	Davis et al., 2013.
Momordica charantia' witches'-broom phytoplasma	16SrIII-J	-	KT313401	-	Munhoz, 2012.
Chayote witches broom phytoplasma	16SrIII-J	AF147706	KP763468	-	Montano et al., 2000.
Leek stunting phytoplasma - LeSt-Br03	16SrIII-J	KT444696	KT588314	KT588312	Deste estudo
Bellis perennis' phytoplasma	16SrIII-J	KC412024	-	KC412019	Galdeano et al., 2013
Cucurbita maxima var. zapallito phytoplasma	16SrIII-J	KC412028	-	KC412017	Galdeano et al., 2013
Allium sativum phytoplasma clone GDIII207	16SrIII-J	KC412032	-	KC417336	Galdeano et al., 2013
Solanum lycopersicum phytoplasma TomRed	16SrIII-J	KC412031	-	KC412023	Galdeano et al., 2013
Allium sativum phytoplasma clone GDIII	16SrIII-J	AY081816	-	KC412014	Galdeano et al., 2013
Potato purple top-MT phytoplasma	16SrIII-M	FJ226074	GU004333	JQ044380	Davis et al., 2013.
Potato purple top-AK phytoplasma	16SrIII-N	GU004365D	GU004359	JQ044381	Davis et al., 2013.
Jujube witches'-broom China phytoplasma	16SrV-B	AY197661	AY197695	AY197681	Lee et al., 2010a; Martini et al., 2007
Clover phyllody Canada phytoplasma	16SrVI-A	AY500130	GU004315	EF183486	Lee et al., 2010a; Martini et al., 2007
Ash yellows phytoplasma	16SrVII-A	AF092209	GU004329	EF183492	Lee et al., 2010a; Martini et al., 2007
Pigeon pea witches'-broom phytoplasma	16SrIX-A	EF186826	JN791243	EF183495	Lee et al., 2010a; Martini et al., 2007
Mexican periwinkle virescence phytoplasma- MPV	16SrXIII-A	AF248960	GU004336	EF193365	Lee et al., 2010a; Martini et al., 2007
Strawberry stunting phytoplasma - Straw1	16SrXIII-B	U96614	-	U96615	Lee et al., 2010a; Martini et al., 2007
Chinaberry yellows phytoplasma - ChTY-CbY1	16SrXIII-C	AF495882	-	-	Fernandez et al., 2015.
Mexican potato purple top phytoplasma - PPT	16SrXIII-D	FJ914647	-	-	Fernandez et al., 2015.
Papaya apical curl necrosis phytoplasma - PACN	16SrXIII-E	JQ792171	-	-	Fernandez et al., 2015.
Strawberry red leaf phytoplasma - StrawRL	16SrXIII-F	KJ921641	-	-	Fernandez et al., 2015.
Leek stunting phytoplasma LeSt-Br01	16SrXIII	KT444691	-	KT588313	Deste estudo
Leek stunting phytoplasma LeSt-Br02	16SrXIII	KT444692	-	-	Deste estudo
Leek stunting phytoplasma LeSt-Br06	16SrXIII	KT444693	-	-	Deste estudo
Leek stunting phytoplasma LeSt-Br07	16SrXIII	KT444694	-	-	Deste estudo

4.2.12 Análise filogenética

Uma árvore filogenética foi construída usando as sequências nucleotídicas dos genes 16S rRNA, SecY e Proteína Ribossomal dos fitoplasmas presentes nas plantas de alho-poró e de representantes de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVI, 16SrVII, 16SrIX, 16SrXIII e 16SrXV, através do

programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). Como raiz da árvore foi utilizada a sequência do microrganismo *Acholeplasma palmae* strain GenBank NR029152 para o gene 16S rRNA (GUNDERSEN, et al., 1994), *A. palmae* strain GenBank NC022538 para o gene *SecY* (LEE et al., 2010a) e *A. palmae* strain GenBank EF197116 para o gene da Proteína Ribossomal (MARTINI et al., 2007). Na construção da árvore filogenética foi utilizado o método de agrupamento Neighbour-joining e o teste Bootstrapping foi processado 1.000 vezes para garantir a confiabilidade da posição dos ramos. As sequências nucleotídicas utilizadas na construção da árvore estão listadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Sequências nucleotídicas do gene 16S rRNA, do gene *SecY* e do gene da Proteína Ribossomal de fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII e 16SrXIII e dos demais grupos reportados no Brasil, depositadas no GenBank e usadas para construção da árvore filogenética

Nome da Doença	Classificação do gene 16S rRNA	nº GenBank 16S rRNA	nº GenBank SecY	nº GenBank rp	Referência
Maize bushy stunt phytoplasma	16SrI-B	AY265208	AY803175	AY264858	Lee et al., 2010; Martini et al., 2007
Crotalaria phyllody phytoplasma	16SrII-C	EF193355	GU004349	EF186818	Lee et al., 2010; Martini et al., 2007
Peach X-disease Canada phytoplasma	16SrIII-A	L33733	GU004327	EF186813	Lee et al., 2010; Martini et al., 2007
Clover yellow edge phytoplasma	16SrIII-B	AF173558	GU004332	JQ360962	Davis et al., 2013.
Pecan bunchy top phytoplasma	16SrIII-C	GU004371	GU004361	EF186807	Davis et al., 2013.
Goldenrod yellows phytoplasma	16SrIII-D	GU004372	GU004364	EF186810	Davis et al., 2013.
Spirea stunt phytoplasma	16SrIII-E	AF190228	GU004326	EF186806	Davis et al., 2013.
Milkweed yellows phytoplasma	16SrIII-F	AF510724	GU004340	EF186808	Davis et al., 2013.
Walnut witches'-broom phytoplasma	16SrIII-G	AF190227	GU004325	JQ360961	Lee et al., 2010; Davis et al., 2013.
Poinsettia branch inducing phytoplasma	16SrIII-H	AF190223	GU004328	EF186811	Davis et al., 2013.
Momordica charantia' witches'-broom phytoplasma	16SrIII-J	-	KT313401	-	Munhoz, 2012.
Chayote witches broom phytoplasma	16SrIII-J	AF147706	KP763468	-	Montano et al., 2000.
Leek stunting phytoplasma - LeSt-Br03	16SrIII-J	KT444696	KT588314	KT588312	Deste estudo
Bellis perennis' phytoplasma	16SrIII-J	KC412024	-	KC412019	Galdeano et al., 2013
Cucurbita maxima var. zapallito phytoplasma	16SrIII-J	KC412028	-	KC412017	Galdeano et al., 2013
Allium sativum phytoplasma clone GDIII207	16SrIII-J	KC412032	-	KC417336	Galdeano et al., 2013
Solanum lycopersicum phytoplasma TomRed	16SrIII-J	KC412031	-	KC412023	Galdeano et al., 2013
Allium sativum phytoplasma clone GDIII	16SrIII-J	AY081816	-	KC412014	Galdeano et al., 2013
Potato purple top-MT phytoplasma	16SrIII-M	FJ226074	GU004333	JQ044380	Davis et al., 2013.
Potato purple top-AK phytoplasma	16SrIII-N	GU004365D	GU004359	JQ044381	Davis et al., 2013.
Jujube witches'-broom China phytoplasma	16SrV-B	AY197661	AY197695	AY197681	Lee et al., 2010; Martini et al., 2007
Clover phyllody Canada phytoplasma	16SrVI-A	AY500130	GU004315	EF183486	Lee et al., 2010; Martini et al., 2007
Ash yellows phytoplasma	16SrVII-A	AF092209	GU004329	EF183492	Lee et al., 2010; Martini et al., 2007
Pigeon pea witches'-broom phytoplasma	16SrIX-A	EF186826	JN791243	EF183495	Lee et al., 2010; Martini et al., 2007
Mexican periwinkle virescence phytoplasma- MPV	16SrXIII-A	AF248960	GU004336	EF193365	Lee et al., 2010; Martini et al., 2007
Strawberry stunting phytoplasma - Straw1	16SrXIII-B	U96614	-	U96615	Lee et al., 2010; Martini et al., 2007
Chinaberry yellows phytoplasma - ChTY-CbY1	16SrXIII-C	AF495882	-	-	Fernandez et al., 2015.
Mexican potato purple top phytoplasma - PPT	16SrXIII-D	FJ914647	-	-	Fernandez et al., 2015.
Papaya apical curl necrosis phytoplasma - PACN	16SrXIII-E	JQ792171	-	-	Fernandez et al., 2015.
Strawberry red leaf phytoplasma - StrawRL	16SrXIII-F	KJ921641	-	-	Fernandez et al., 2015.
Leek stunting phytoplasma LeSt-Br01	16SrXIII	KT444691	-	KT588313	Deste estudo
Leek stunting phytoplasma LeSt-Br02	16SrXIII	KT444692	-	-	Deste estudo
Leek stunting phytoplasma LeSt-Br06	16SrXIII	KT444693	-	-	Deste estudo
Leek stunting phytoplasma LeSt-Br07	16SrXIII	KT444694	-	-	Deste estudo

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Análise do gene 16S rRNA

As reações de PCR conduzidas com os *primers* P1A/16S-SR para o DNA total extraído de plantas sintomáticas de alho-poró geraram fragmentos de aproximadamente 1,6 kb, típicos para amplificações produzidas por este par de *primers*. Nenhuma amplificação ocorreu para o DNA de planta assintomática, utilizada como padrão negativo, ou quando foi usada água nas reações de PCR. No entanto, quando utilizado DNA de planta de vinca, sabidamente infectada por fitoplasma, fragmentos de aproximadamente 1,6 kb foram amplificados.

O primeiro relato da associação entre fitoplasmas e alho-poró foi feito por Ploaie et al. (1974) citado por Bertaccini et al. (1999), na Romênia. Naquela ocasião, os fitoplasmas foram detectados por microscopia eletrônica em plantas que apresentavam sintomas de proliferação. Um primeiro estudo para classificação de fitoplasma presentes em plantas de alho-poró foi feito por Bertaccini et al. (1999), onde foram identificados representantes dos grupos 16Srl-B, na República Tcheca e 16SrXII-A, na Itália. Na América do Sul, nenhum relato foi feito para alho-poró, entretanto, na Argentina, os fitoplasmas são muito importantes na cultura do alho, causando a doença conhecida como "tristeza do alho" (GAJARDO et al., 2009).

Os fitoplasmas detectados por PCR com os *primers* P1A/16S-SR foram diretamente sequenciados, atingindo uma cobertura mínima de pelo menos 4x por base. As fitas consenso do gene 16S rRNA foram montadas e aplicadas na ferramenta *on-line* BLAST que revelou representantes de dois distintos grupos de fitoplasmas. Um dos fitoplasmas apresentou 99% de identidade de sequência com um representante do subgrupo 16SrIII-J (Chayote witches' broom phytoplasma ChWBIII - AF14770), enquanto o outro compartilhou 99% da sequência nucleotídica com um representante do subgrupo 16SrXIII-A (Mexican periwinkle virescence phytoplasma - AF248960).

As plantas sintomáticas de alho-poró amostradas neste trabalho apresentavam principalmente sintomas de subdesenvolvimento e, por esta razão, os fitoplasmas detectados foram denominados fitoplasmas do enfezamento do alho-poró (Leek Stunting phytoplasmas - LeSt).

O fitoplasma do alho-poró que mostrou alta identidade de sequência com o fitoplasma de referência do grupo 16SrIII-J foi também caracterizado por meio da

análise virtual de RFLP, realizada com as enzimas descritas por Wei et al., (2007). Os padrões de restrição de RFLP *in silico* obtidos para este fitoplasma foram idênticos àqueles apresentados pelo fitoplasma padrão do subgrupo 16SrIII-J, conhecido por 'Chayote witches' broom phytoplasma (ChWBIII) (Figura 8).

Figura 8 - Padrões de restrição de RFLP gerados pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região do gene 16S rRNA do fitoplasma encontrado em planta de alho-poró (LeSt) (A) e do fitoplasma de referência do subgrupo 16SrIII-J (ChWBIII) (B). Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*. M= marcador ϕ X174-DNA *HaeIII* digest

Utilizando os padrões de restrição gerados pela análise virtual de RFLP, os coeficientes de similaridade (F) foram calculados entre o fitoplasma do alho-poró e todos os diferentes fitoplasmas representantes dos subgrupos que compõem o grupo 16SrIII (dados não mostrados). O valor de (F) obtido entre o fitoplasma do presente estudo, representado pela estirpe LeSt-Br03, e o fitoplasma de referência do subgrupo 16SrIII-J foi igual a 1, o que indica completa identidade entre esses fitoplasmas. Este resultado confirma mais uma vez a identificação deste fitoplasma como afiliado ao referido subgrupo. A sequência nucleotídica correspondente a esta estirpe foi denominada LeSt-Br03 e depositada na base de dados GenBank sob o número de acesso KT444696.

O grupo 16SrIII é o grupo que congrega o maior número de fitoplasmas descritos no mundo e associados a numerosas doenças que ocorrem em uma ampla gama de plantas cultivadas, daninhas e silvestres. Este grupo atualmente apresenta 25 subgrupos identificados, sendo o representante do subgrupo 16SrIII-Y, o último deles descrito (GALDEANO et al., 2013; LEE et al., 2014). O grupo 16SrIII está amplamente distribuído na América do Sul, havendo relatos de representantes feitos no Brasil, na Argentina, Colômbia e Bolívia. A maioria das estirpes identificadas foram classificadas como membros dos subgrupos 16SrIII-B e 16SrIII-J, estando em associação com doenças relatadas em uma grande diversidade de espécies vegetais (GUZMÁN et al., 2014).

No Brasil, fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII tem sido frequentemente caracterizados, revelando uma predominância deste grupo no país (CANALE et al., 2012; RAPUSSI et al., 2012). Os subgrupos 16SrIII-B e 16SrIII-J são os mais comumente relatados pela literatura. Afiliados ao grupo 16SrIII-J já foram encontrados em plantas de tomate, berinjela, repolho, couve-flor, chuchu, entre outras (AMARAL MELLO, 2007; AMARAL MELLO et al., 2006, 2011; FLÔRES et al., 2013; MONTANO et al., 2000; RAPPUSSI et al., 2012). Galdeano e colaboradores (2013) reportaram que o subgrupo 16SrIII-J tem sido detectado somente na América do Sul. Rapussi e colaboradores (2012) sugeriram baixa especificidade deste subgrupo em relação às espécies hospedeiras e que a descoberta de possíveis insetos vetores para estes patossistemas seriam úteis para delinear novas estratégias de manejo para o controle das diversas doenças às quais estes agentes estão associados.

As sequências nucleotídicas da região 16S rDNA do fitoplasma identificado no presente estudo e de distintos fitoplasmas encontrados no Brasil foram utilizadas para a construção da árvore filogenética (Figura 9). O fitoplasma do alho-poró (estirpe LeSt-Br03) emergiu de um clado juntamente com os demais representantes do grupo 16SrIII, confirmando que a estirpe em estudo está filogeneticamente relacionada com os fitoplasmas deste grupo. Na referida árvore filogenética foi possível observar que todas as estirpes do subgrupo 16SrIII-J formaram um *cluster* separado dos demais subgrupos do 16SrIII. Dentro deste *cluster*, as estirpes do fitoplasma do alho-poró e o representante do subgrupo 16SrIII-J emergiram juntas em um ramo separado das demais estirpes deste subgrupo, as quais são de origem argentina. Este resultado mostrou que o fitoplasma do alho-poró está estritamente relacionado com o fitoplasma representante do subgrupo 16SrIII-J, em concordância com os resultados obtidos na análise de RFLP e nos valores dos coeficientes de similaridade, mais uma vez confirmando a identidade do fitoplasma em estudo como afiliado ao subgrupo 16SrIII-J.

Figura 9 - Árvore filogenética construída com as sequências nucleotídicas do gene 16S rRNA, incluindo o fitoplasma identificado em Alho-poró (estirpe LeSt-Br03), 17 fitoplasmas representantes de subgrupos do grupo 16SrIII e 7 fitoplasmas representantes de diferentes grupos encontrados no Brasil. O procarioto *Achleplasma palmae* foi utilizado como raiz da árvore

A fita de DNA consenso do fitoplasma que obteve alta identidade com o grupo 16SrXIII apresentou na sequência nucleotídica do gene 16S rRNA a letra R na posição 395, e a letra Y nas posições 795, 967 e 1115. Ao observar os cromatogramas destas sequências, foram notados dois picos dentro da região “F2n/R2” nas quatro posições das bases (Figura 10). Entretanto, era esperado apenas um pico para cada posição de base. Na sequência completa de 1541 nucleotídeos, os duplos picos corresponderam às bases A ou G, na posição 395 e C ou T nas posições 795, 967 e 1115. Para eliminar a hipótese de possíveis erros de sequenciamento, o PCR foi repetido por mais duas vezes a partir do DNA total, utilizando uma polimerase de alta fidelidade. O sequenciamento foi realizado com 10 *primers* para que cada base tivesse cobertura de pelo menos 4x. O mesmo resultado foi observado em todos os sequenciamentos, comprovando que os picos duplos não eram erros resultantes da DNA polimerase ou do sequenciamento.

Figura 10 - Regiões da sequência nucleotídica do gene 16S rRNA que apresentaram picos duplos

Davis e colaboradores (2013) também observaram a presença deste duplo pico em análises de sequências originárias de fitoplasmas presentes em plantas de pêssogo. Estes autores levantaram a hipótese que quando existem dois picos no cromatograma é possível que este resultado indique a presença de heterogeneidade nas sequências do óperon rRNA. Para testar essa hipótese, os pesquisadores sugeriram digerir o produto do 16S rRNA com enzimas de restrição que apresentem pontos de corte específicos para os pontos encontrados na sequência. Esta sugestão foi testada no presente estudo, porém nenhuma enzima de restrição apresentou o ponto de corte específico para as posições de pico duplo presentes nas sequências do fitoplasma detectado no alho-poró. Por este motivo, as sequências do 16S rRNA foram clonadas em *E. coli* e novamente sequenciadas.

Um total de 11 clones foi sequenciado, os quais revelaram a presença de quatro sequências heterogêneas do gene 16Sr RNA. Ao analisar novamente o cromatograma, nenhuma sequência apresentou heterogeneidade, sendo observados apenas picos simples. O nucleotídeo referente a cada posição de pico duplo obtido após o sequenciamento dos clones está descrito na Tabela 7. Este resultado revelou a possibilidade da existência de quatro linhagens estreitamente relacionadas presentes na amostra analisada.

Tabela 7 - Nucleotídeos referentes a cada posição de pico duplo dos clones obtidos a partir do gene 16S rRNA do fitoplasmas presente no Alho-poró relacionado ao grupo 16SrXIII

Clones	Posição 395	Posição 795	Posição 967	Posição 1115
LeSt-Br01 - C1	A	T	T	T
LeSt-Br02 - C2	A	C	C	C
LeSt-Br06 - C6	A	C	T	T
LeSt-Br07 - C7	G	T	T	T

A heterogeneidade de sequências da região 16S do óperon rRNA foi anteriormente reportada no Brasil, por Amaral Mello e colabores (2003, 2006), para fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII associados aos enfezamentos do tomateiro e da berinjela. O fitoplasma causador do enfezamento do tomateiro apresentou a troca de bases em seis posições na sequência nucleotídica (AMARAL MELLO et al., 2006). No presente estudo a troca de bases foi observada em apenas quatro posições.

Com o objetivo de confirmar a identidade do fitoplasma detectado na planta de alho-poró, foi realizada a análise virtual de RFLP. Os padrões de restrição foram obtidos para todos os representantes do grupo 16SrXIII (Figura 11) e para os quatro clones ou estirpes do fitoplasma LeSt (Figura 12).

Figura 11 - Padrões de restrição de RFLP gerados pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região 16S rDNA dos fitoplasmas representantes do grupo 16SrXIII. Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*. M= marcador ϕ X174-DNA *HaeIII* digest

O padrão de restrição obtido para a estirpe LeSt-Br02 (Figura 12) foi idêntico ao padrão apresentado pelo Papaya apical curl necrosis phytoplasma, representante do subgrupo 16SrXIII-E (Figura 12). Entretanto, os padrões apresentados pelas estirpes LeSt-Br01, LeSt-Br06 e LeSt-Br07 não apresentaram semelhança com nenhum dos fitoplasmas já descritos para o grupo 16SrXIII.

Figura 12 - Padrões de restrição de RFLP gerados pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região 16S rDNA do fitoplasma detectado no alho-poró. Estirpes LeSt-Br01, LeSt-Br02, LeSt-Br06, LeSt-Br07. Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*. M= marcador ϕ X174-DNA *HaeIII* digest

A estirpe LeSt-Br07 apresentou os padrões de restrição mais discrepantes, com diferença nos sítios de restrição das enzimas *RsaI* e *TaqI* (Figura 12). As demais estirpes apresentaram diferença apenas para uma enzima (Tabela 8). Esta discrepância observada entre os padrões de restrição pode ser explicada pela heterogeneidade das sequências do 16S rDNA, como proposto por Amaral Mello e colaboradores (2011), concordando com os resultados obtidos no sequenciamento.

Tabela 8 - Enzimas que apresentaram diferenças nos padrões de restrição produzidos pela análise virtual de RFLP do gene 16S rRNA para as quatro estirpes do fitoplasma do grupo 16SrXIII encontradas em plantas de Alho-poró

FITOPLASMA	ENZIMAS			
	<i>Alu I</i>	<i>Hha I</i>	<i>Rsa I</i>	<i>Taq I</i>
LeSt-Br01	1	1	1	1
LeSt-Br02	2	1	1	1
LeSt-Br06	1	2	1	1
LeSt-Br07	1	1	2	2

Ainda, Amaral Mello e colaboradores (2006) explicam que em alguns casos a alteração da sequência nucleotídica gera alteração no padrão de restrição. Estes autores obtiveram um sítio extra de restrição para a enzima *RsaI* em apenas um dos

clones, o que não foi observado nos demais clones analisados. A heterogeneidade na sequência nucleotídica da região 16S do óperon rRNA também foi observada por Jomantiene et al. (2002) em fitoplasmas do grupo 16SrIII, estes associados com a virescência da boca-de-leão e a folha pequena do cardo. Os autores também relataram a ocorrência de diferenças nos sítios de restrição presentes nas sequências nucleotídicas dos fitoplasmas associados a ambas as doenças, permitindo, assim, diferenciar os óperons (*rrn*) em *rrnA* e *rrnB*. O fitoplasma identificado em boca-de-leão foi diferenciado pelas enzimas *Hinfl* e *HhaI*, enquanto o fitoplasma do cardo pelas enzimas *HhaI* e *KpnI*. Os autores constataram similaridade de sequência de 99,3% entre os operons *rrnA* e *rrnB* para o fitoplasma do cardo, e 99,6% de similaridade de sequência entre os óperons do fitoplasma detectado em boca-de-leão.

Para as estirpes encontradas no alho-poró, a similaridade de sequências variou de 99,68% entre a sequência da estirpe LeSt-Br01 e as sequências das estirpes LeSt-Br02, LeSt-Br06 e LeSt-Br07 a 99,36% entre a sequência da estirpe LeSt-Br07 e as sequências das estirpes LeSt-Br06 e LeSt-Br02. Liefting e colaboradores (1996) relataram que, na maioria das vezes, a diferença entre os óperons do gene 16S rRNA varia menos 0,5% na posição dos nucleotídeos.

Os coeficientes de similaridade (F) foram calculados a partir dos padrões de restrição gerados pela análise de RFLP, entre as estirpes do fitoplasma do alho-poró e todos os representantes dos diferentes subgrupos que compõem o grupo 16SrXIII. O valor de (F) obtido entre a estirpe LeSt-Br02 e o fitoplasma de referência para o subgrupo 16SrXIII-E foi igual a 1, evidenciando a existência de identidade total entre os mesmos (Tabela 9). Este resultado está em perfeita concordância com a identificação deste fitoplasma feita pela análise virtual de RFLP. A sequência da estirpe LeSt-Br02 foi depositada na base de dados do GenBank sob o número de acesso KT444692. A estirpe LeSt-Br01 apresentou o maior valor de coeficiente de similaridade (F=0,97) quando contrastada com o representante do subgrupo 16SrXIII-E e com as estirpes LeSt-Br02 e LeSt-Br06. Já a estirpe LeSt-Br07 apresentou maior valor de coeficiente de similaridade (F=0,93) em relação à estirpe LeSt-Br01, indicando ser a estirpe geneticamente mais distante das demais.

Tabela 9 - Valores de coeficientes de similaridade (F) calculados para as estirpes do fitoplasma detectado em Alho-poró e os fitoplasmas pertencentes aos demais subgrupos do grupo 16SrXIII

Fitoplasma	Classificação do gene 16S rRNA	MPV	StraW1	ChTY-CbY1	PPT-SINPV	PACN	StrawRL	LeSt-Br01	LeSt-Br02	LeSt-Br06	LeSt-Br07
MPV	16SrXIII-A	1.00									
StraW1	16SrXIII-B	0,93	1.00								
ChTY-CbY1	16SrXIII-C	0,84	0,85	1.00							
PPT-SINPV	16SrXIII-D	0,93	0,96	0,83	1.00						
PACN	16SrXIII-E	0,92	0,91	0,82	0,90	1.00					
StrawRL	16SrXIII-F	0,91	0,86	0,73	0,8	0,85	1.00				
LeSt-Br01	16SrXIII	0,89	0,94	0,85	0,9	0,97	0,86	1.00			
LeSt-Br02	16SrXIII	0,92	0,91	0,82	0,91	1.00	0,81	0,97	1.00		
LeSt-Br06	16SrXIII	0,86	0,91	0,82	0,87	0,94	0,77	0,97	0,94	1.00	
LeSt-Br07	16SrXIII	0,92	0,9	0,88	0,87	0,9	0,81	0,93	0,9	0,9	1.00

De acordo com Wei et al. (2008), um novo subgrupo é reconhecido se um determinado fitoplasma apresentar um valor de coeficiente de similaridade igual ou inferior a 0,97, quando comparado com todas as estirpes representativas descritas para o grupo de classificação a que pertencem.

Com base na análise da sequência nucleotídica, nos padrões de restrição gerados pela digestão *in silico* e no cálculo dos coeficientes de similaridade (Tabela 9), pode-se inferir, segundo wei et al., 2008) que das estirpes do fitoplasma encontrado em plantas de alho-poró, uma delas é afiliada ao subgrupo 16SrXIII-E e três delas seriam representantes de novos subgrupos.

As sequências nucleotídicas da região 16S rDNA dos fitoplasmas identificados no presente estudo e de distintos fitoplasmas encontrados no Brasil foram utilizadas para a construção da árvore filogenética (Figura 13). As estirpes do fitoplasma do alho-poró emergiram de um clado juntamente com os demais representantes do grupo 16SrXIII, revelando que estas estirpes estão filogeneticamente relacionadas aos fitoplasmas deste grupo. A estirpe LeSt-Br02 emergiu juntamente com o fitoplasma afiliado ao subgrupo 16SrXIII-E, em um clado separado das demais estirpes, confirmando a identidade deste fitoplasmas e concordando com os resultados obtidos na análise virtual de RFLP e na determinação dos coeficientes de similaridade. As demais estirpes emergiram em um *cluster* separado também em concordância com a análise virtual de RFLP e com os valores de coeficientes de similaridade.

Figura 13 - Árvore filogenética construída com as sequências do gene 16S rRNA das estirpes do fitoplasma identificado em Alho-poró (LeSt-Br01, LeSt-Br02, LeSt-Br06 e LeSt-Br07), representantes do grupo 16SrXIII, representantes de grupos relatados no Brasil e do procarioto *Achleplasma palmae*, usado como raiz da árvore

4.3.2 Análise do gene *SecY* para o representante do subgrupo 16SrIII-J encontrado em Alho-poró.

As reações de PCR conduzidas com os *primers* SecY-F1(III)/SecY-R1(III) amplificaram fragmentos genômicos de aproximadamente 1.7 kb, a partir do DNA total extraído de plantas sintomáticas de alho-poró. Este é o tamanho esperado para a região genômica amplificada pelos *primers*, a qual compreende a sequência completa do gene *SecY* e as sequências parciais dos genes adjacentes *rpl15* e *map* (methionine aminopeptidase) (Figura 14). A partir desta mesma amostra de alho-poró, foi identificado previamente o fitoplasma afiliado ao subgrupo 16SrIII-J.

Figura 14 - Arranjo esquemático do gene *SecY* e dos genes adjacentes *rpl15* e *map* e as posições dos *primers* para a amplificação (LEE et al., 2010a)

Nenhuma amplificação ocorreu para o DNA de planta assintomática ou para água utilizados como padrões negativos para as reações de PCR. No entanto, fragmentos de aproximadamente 1.7 kb foram obtidos para o controle positivo.

O fitoplasma detectado neste PCR foi diretamente sequenciado com cinco *primers* para que cada base tivesse cobertura mínima de pelo menos 3x. A fita consenso do gene *SecY* foi montada e aplicada na ferramenta *on-line* BLAST, que revelou 100% de identidade com *Momordica charantia* witches'-broom phytoplasma (KT313401), também afiliado ao grupo 16SrIII-J. Uma identidade de sequência de 99% foi obtida para Chayote witches' broom phytoplasma (KP763468), também representante do grupo 16SrIII-J.

A análise virtual de RFLP da estirpe LeSt-Br03 foi realizada assim como descrito para o gene 16S rRNA, com alteração somente pela inclusão da enzima *MluCI* (*Tsp509I*). Os padrões de restrição para o gene *SecY* foram obtidos para todos os representantes do subgrupo 16SrIII-J (Figura 15), sendo que estes se mostraram idênticos, como observado para o gene 16S rRNA.

Figura 15 - Padrões de restrição de RFLP gerados pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região do gene *SecY* da estirpe LeSt-Br03 do fitoplasma detectado em Alho-poró (A), do gene *SecY* do Chayote witches broom phytoplasma (B) e do gene *SecY* do *Momordica charantia* witches'-broom phytoplasma (C), estes dois últimos sendo representantes do subgrupo 16SrIII-J. Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *MluCI* (*Tsp509I*), *RsaI*, *SspI*, *TaqI*. M= marcador ϕ X174-DNA *HaeIII* digest

O resumo dos padrões de restrição produzidos pela análise virtual de RFLP do gene *SecY* para todos os representantes do grupo 16SrIII pode ser observado na Tabela 10. O RFLP virtual foi conduzido com as 18 enzimas propostas por Lee et al.(2010), no entanto para fins de resumo dos resultados foram usadas apenas 12 enzimas chaves para diferenciação de representantes de subgrupos.

Tabela 10 - Resumo dos padrões de restrição produzidos pela análise virtual de RFLP do gene *SecY* para os fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII e a estirpe LeSt-Br03 do fitoplasma detectado em Alho-poró

FITOPLASMA	ENZIMAS											
	<i>AfuI</i>	<i>BfaI</i>	<i>DraI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HpaII</i>	<i>MseI</i>	<i>MluCI</i>	<i>RsaI</i>	<i>SspI</i>	<i>TaqI</i>
CX (16SrIII-A)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CYE (16SrIII-B)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
PTB (16SrIII-C)	3	2	3	2	2	3	3	3	1	3	2	2
GR1 (16SrIII-D)	3	2	3	3	2	4	2	4	1	3	3	2
SP1 (16SrIII-E)	4	3	1	1	1	1	1	5	1	4	1	1
MW1 (16SrIII-F)	5	2	3	2	2	4	2	4	1	3	2	2
WWB (16SrIII-G)	1	2	1	1	1	1	1	6	1	1	1	1
JR1Ph (16SrIII-H)	6	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ChWB (16SrIII-J)	7	4	4	3	3	5	2	7	3	2	2	3
LeSt-Br03 (16SrIII-J)	7	4	4	3	3	5	2	7	3	2	2	3
MT117 (16SrIII-M)	3	2	3	3	2	4	2	4	1	3	2	2
AKpot6 (16SrIII-N)	3	2	3	3	2	4	2	4	2	3	2	2

Para evidenciar a maior variabilidade genética do gene *SecY*, foram comparadas as sequências dos genes 16S rRNA e *SecY* para os representantes do grupo 16SrIII, cujas sequências do gene *SecY* se encontravam disponibilizadas no GenBank (Tabela 11). Os resultados confirmaram maior variabilidade entre as sequências do gene *SecY* para a maioria dos fitoplasmas analisados, indicando que este gene é mais informativo para a classificação de estirpes estritamente relacionadas (LEE et al., 2010a). Entretanto, não foi notada diferença na porcentagem de homologia entre os gene 16S rRNA e *SecY*, quando a sequência da estirpe LeSt-Br03 foi comparada com a sequência do Chayote witches' broom phytoplasma, referência para o subgrupo 16SrIII-J. Esta constatação pode explicar os resultados obtidos pela análise virtual de RFLP, onde os padrões de restrição foram idênticos para ambos os genes.

Tabela 11 - Comparativo da homologia das sequências (%) do gene 16S rRNA e do gene *SecY* dos fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII e da estirpe LeSt-Br03 do fitoplasma detectado em planta de Alho-poró

Classificação do gene 16S rRNA	Gene 16S rRNA / Gene <i>SecY</i>											
	CX	CYE	PTB	GR1	SP1	MW1	WWB	JR1Ph	ChWB	LeSt-Br03	MT117	AKpot6
CX (16SrIII-A)	100/100											
CYE (16SrIII-B)	96.95/96.67	100/100										
PTB (16SrIII-C)	96.47/94.22	99.36/95.28	100/100									
GR1 (16SrIII-D)	96.71/95.25	99.60/96.38	99.60/97.80	100/100								
SP1 (16SrIII-E)	97.11/98.34	99.52/95.96	99.04/93.67	99.28/94.62	100/100							
MW1 (16SrIII-F)	96.71/95.33	99.60/96.38	99.76/97.64	99.84/99.69	99.28/94.70	100/100						
WWB (16SrIII-G)	97.27/98.65	99.68/96.52	99.20/93.82	99.44/94.93	99.84/97.94	99.44/95.01	100/100					
JR1Ph (16SrIII-H)	96.95/99.45	99.36/96.75	98.88/94.22	99.12/95.33	99.52/98.26	99.12/95.41	99.68/98.73	100/100				
ChWB (16SrIII-J)	96.63/92.61	99.52/92.00	99.20/90.42	99.44/91.53	99.20/92.14	99.44/91.29	99.36/92.22	99.04/92.53	100/100			
LeSt-Br03 (16SrIII-J)	96.55/92.53	99.44/91.92	99.12/90.34	99.36/91.45	99.12/92.06	99.36/91.21	99.28/92.14	98.96/92.45	99.92/99.92	100/100		
MT117 (16SrIII-M)	95.66/94.93	98.47/96.15	98.63/97.56	98.71/99.61	98.23/94.30	98.88/99.29	98.39/94.62	98.23/95.01	98.31/91.13	98.23/91.05	100/100	
AKpot6 (16SrIII-N)	96.26/95.01	99.11/96.15	99.27/97.48	99.35/99.69	98.86/94.38	99.51/99.37	99.03/94.70	98.70/95.09	98.94/91.29	98.86/91.21	98.54/99.29	100/100

As relações filogenéticas entre fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII e a estirpe LeSt-Br03 do fitoplasma identificado em Alho-poró (Figura 16) mostrou a

íntima relação entre os fitoplasmas do subgrupo 16SrIII-J, dando suporte aos resultados observados na análise de RFLP e nos valores de similaridade de sequências nucleotídicas. A árvore filogenética construída para o gene *SecY* foi congruente com a árvore filogenética construída para o gene 16S rRNA. Todos os representantes do grupo 16SrIII emergiram de um mesmo clado. Os representantes do subgrupo 16SrIII-J formaram um clado isolado dos demais afiliados do grupo 16SrIII, sendo que o alto valor do bootstrapping no ramo torna este agrupamento altamente confiável.

Figura 13 - Árvore filogenética construída com as sequências do gene *SecY* da estirpe do fitoplasma identificado em Alho-poró (LeSt-Br03), de fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII, de fitoplasmas representantes de grupos relatados no Brasil e do procarioto *Acholeplasma palmae*, como raiz da árvore

De acordo com Lee et al. (2010), a análise filogenética baseada nas sequências do gene *SecY* permite uma fina diferenciação entre as estirpes de fitoplasmas. A filogenia baseada neste gene pode ajudar a resolver problemas de diferenciação dos subgrupos dentro de cada grupo, quando estes problemas não são capazes de serem resolvidos pela filogenia baseada no gene 16S rRNA. Ainda segundo estes autores, o gene *SecY* está presente em todos os fitoplasmas conhecidos com apenas uma cópia no genoma.

Embora vários fitoplasmas do subgrupo 16SrIII-J tenham sido reportados no Brasil, sequências do gene *SecY* somente têm sido registradas no GenBank para os

fitoplasmas utilizados no presente estudo, ou seja Chayote witches' broom phytoplasma, *Momordica charantia* witches'-broom phytoplasma e a estirpe LeSt-Br03 do fitoplasma identificado em Alho-poró. Desta forma, prejudicado o estabelecimento de relações genéticas, baseadas no gene *SecY*, entre estes fitoplasmas e os demais afiliados ao subgrupo 16SrIII-J encontrados no Brasil.

4.3.3 Análise do gene *SecY* para o representante do grupo 16SrXIII encontrado em Alho-poró

O gene *SecY* não foi analisado para o representante do grupo 16SrXIII, pois os fragmentos genômicos não foram amplificados mesmo usando diversos pares de *primers* descrito na literatura ou mesmo desenhados especificamente para esta finalidade.

4.3.4 Análise do gene da Proteína Ribossomal (*rp*)

A amplificação do gene *rp* para a estirpe LeSt-Br03, correspondente ao fitoplasma do subgrupo 16SrIII-J, e para a estirpe LeSt-Br01, correspondente ao grupo 16SrXIII, encontrados no Alho-poró foi evidenciada pela presença de um fragmento de aproximadamente 1.2 Kb, cujo tamanho é esperado quando a reação de PCR é conduzida com os *primers* *rpF1C/rp(I)R1A* ou *rpFN(III) /rp(I)R1A*. Com o emprego destes *primers* são amplificadas as sequências completas dos genes *rpIV* (*rpL22*) e *rpsC* (*rpS3*) e parcial do gene *rpsS* (*rpS19*). O fragmento total amplificado para o fitoplasma afiliado ao grupo 16SrIII-J foi de 1.211 pares de bases, sendo este fragmento ajustado para 1.126 pares de bases, com o objetivo de restarem apenas as sequências correspondentes aos genes *rpIV* e *rpsC*. O fitoplasma afiliado ao grupo 16SrXIII apresentou um fragmento de 1.300 pares de bases, que também foi ajustado para 1.240 pares de bases, correspondentes às sequências dos genes *rpIV* e *rpsC*,

Nenhuma amplificação ocorreu para o DNA de planta assintomática ou quando água foi usada como controle negativo na reação de PCR. No entanto, fragmentos de aproximadamente 1,2Kb foram gerados nas reações de PCR para o controle positivo.

Os fragmentos genômicos amplificados foram purificados e diretamente sequenciados com seis *primers*, para que cada base tivesse uma cobertura mínima de pelo menos 3x. As fitas consenso do gene *rp* foram montadas e aplicadas na

ferramenta *on-line* BLAST. A estirpe LeSt-Br01 revelou 97% de identidade com Mexican periwinkle virescence phytoplasma (EF193365), pertencente ao subgrupo 16SrXIII-A. Já a estirpe LeSt-Br03 compartilhou 99% de identidade de sequência com outros sete representantes do grupo 16SrIII-J descritos na Argentina, sendo o *Allium sativum* phytoplasma clone GDIII (KC412014) escolhido como representante dos demais.

As análises virtuais de RFLP dos fitoplasma LeSt-Br03 e LeSt-Br01 foram realizadas assim como descrito para o gene 16S rRNA, apenas com a adição da enzima *MluCI* (*Tsp509I*). A estirpe LeSt-Br01 do fitoplasma afiliado ao grupo 16SrXIII apresentou os padrões de restrição diferentes dos padrões descritos para os fitoplasmas dos subgrupos 16SrXIII-A e 16SrXIII-B. As diferenças podem ser observadas principalmente para as enzimas *HaeIII*, *SspI* e *TaqI*, que apresentaram um sítio de restrição a menos, e para a enzima *HinfI* com um sítio extra de restrição (Figura 17).

Figura 17 - Padrões de restrição de RFLP gerados pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região completa dos genes *rpIV* e *rpsC*, da estirpe LeSt-Br01 do fitoplasma detectado em Alho-poró (A), do Mexican periwinkle virescence phytoplasma-16SrXIII-A (B) e do Strawberry stunting phytoplasma-16SrXIII-B. Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *MluCI* (*Tsp509I*), *RsaI*, *SspI*, *TaqI*. M= marcador ϕ X174-DNA *HaeIII* digest

Os padrões de restrição da estirpe LeSt-Br03 do fitoplasma afiliado ao subgrupo 16SrIII-J, quando comparado com os demais representantes deste subgrupo, apresentou maior similaridade com os padrões de restrição apresentados

pelo *Allium sativum* phytoplasma clone GDIII, sendo observado apenas a ausência de um sítio de restrição para a enzima *AluI*. Os padrões apresentados pelos demais fitoplasmas pertencentes ao subgrupo 16SrIII-J foram variáveis para as enzimas *AluI*, *Bstul*, *MluCI*, e *TaqI* (Figura 18).

Figura 18 - Padrões de restrição de RFLP gerados pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região completa dos genes *rpIV* e *rpsC*, da estirpe LeSt-Br03 do fitoplasma detectado em Alho-poró (A), e de diferentes fitoplasmas representantes do subgrupo 16SrIII-J: *Bellis virescence* phytoplasma (B), *Cucurbita virescence* phytoplasma (C), *Garlic decline* phytoplasma GDIII (D), *Garlic decline* phytoplasma GDIII207 (E) e *Tomato reddening* phytoplasma (F). Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *MluCI* (*Tsp509I*), *RsaI*, *SspI*, *TaqI*. M= marcador ϕ X174-DNA *HaeIII* digest

Galdeano et al. (2013) mostrou que os fitoplasmas do grupo 16SrIII-J possuem uma alta similaridade mesmo para o gene da proteína ribossomal. E estes autores relataram para estes fitoplasmas uma homologia entre as sequências maior que 99%. No presente estudo foi possível observar para ambos os genes, a alta homologia das sequências para fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII-J, entretanto o gene *rp* apresentou menores valores de homologia quando comparado como gene 16S rRNA (Tabela 12).

Tabela 12 - Comparativo da homologia das sequências (%) entre o gene 16S rRNA e o gene da Proteína Ribossomal dos fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII-J e a estirpe LeSt-Br03 do fitoplasma detectado em planta de Alho-poró

Classificação do gene 16S rRNA	Gene 16S rRNA / Gene RP					
	LeSt-Br03	Vir	GDIII	GDIII-207	Tom Red	Curvir
LeSt-Br03 (16SrIII-J)	100/100					
BellVir (16SrIII-J)	98.55/98.87	100/100				
GDIII (16SrIII-J)	99.44/99.03	98.63/99.03	100/100			
GDIII207 (16SrIII-J)	99.48/98.95	98.88/98.95	99.40/99.11	100/100		
TomRed (16SrIII-J)	99.68/98.95	98.7/99.76	99.76/99.11	99.57/99.8	100/100	
CucVir (16SrIII-J)	99.36/99.03	98.96/99.84	99.44/99.19	99.40/99.92	99.52/99.92	100/100

Para os fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrXIII, a homologia das sequências do gene *rp* é claramente menor do aquela encontrada nas sequências do gene 16S rRNA (Tabela 13). A disponibilidade na literatura de sequências do gene *rp* irá permitir a diferenciação entre as estirpes e proporcionar um maior entendimento dos relacionamentos filogenéticos para este grupo. Até o momento, constam no banco de dados do GenBank, para os representantes do grupo 16SrXIII, apenas as três sequências utilizadas neste trabalho.

Tabela 13 - Comparativo da homologia das sequências (%) entre o gene 16S rRNA e o gene da Proteína Ribossomal dos fitoplasmas representantes do grupo 16SXIII e a estirpe LeSt-Br01 do fitoplasma detectado em planta de Alho-poró

Classificação do gene 16S rRNA	Gene 16S rRNA / Gene RP		
	MPV	StraW1	LeSt-Br01
MPV (16SXrIII-A)	100/100		
StraW1 (16SXrIII-B)	98.71/97.34	100/100	
LeSt-Br01 16SrXIII	99.12/ 97.51	98.47/96.27	100/100

A estirpe LeSt-Br01 do fitoplasma emergiu de um ramo diferente dos fitoplasmas afiliados aos subgrupos 16SrXIII-A e 16SrXIII-B, confirmando o resultado obtido nos cálculos de coeficientes de similaridade e na análise de RFLP para os genes *rp* e 16S rRNA. Isto sugere que a estirpe LeSt-Br01 é, provavelmente, representante de um novo subgrupo dentro do grupo 16SrXIII.

Os fitoplasmas afiliados ao subgrupo 16SrIII-J formaram uma clado separado dos demais representantes do grupo 16SrIII, mostrando a estreita relação filogenética entre os representantes deste subgrupo. O alto valor de bootstrapping no

ramo que separa a estirpe LeSt-Br03 dos demais afiliados ao subgrupo 16SrIII-J, suporta a estabilidade do ramo (Figura 19).

Galdeano et al. (2013) ao estudarem os relacionamentos filogenéticos dos representantes do grupo 16SrIII presentes na Argentina, com base nos genes 16S rRNA e *rp*, obtiveram resultados de agrupamento semelhante àqueles observados neste trabalho, ou seja, um clado único contendo todos os representantes do subgrupo 16SrIII-J para ambos os genes.

Figura 19 - Árvore filogenética construída com as sequências do gene da Proteína Ribossomal das estirpes LeSt-Br01 e LeSt-Br03 dos fitoplasmas identificados em Alho-poró, de fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII e grupo 16SrXIII, representantes dos grupos relatados no Brasil e do procarioto *Acholeplasma palmae*, como raiz da árvore

Galdeano et al., (2013) reportam que a análise do gene da proteína ribossomal tem sido útil para a diferenciação de estirpes dentro do subgrupo 16SrIII-B, bem como para mostrar a proximidade existente entre os representantes do subgrupo 16SrIII-J. Martini e colaboradores (2007) descrevem o gene *rp* como a melhor ferramenta molecular para classificação de fitoplasmas e, por apresentar uma sequência mais variada, é ideal para ser usado na análise de RFLP para uma

fina diferenciação entre estirpes ecológica ou biologicamente diferentes que foram classificadas dentro de um mesmo subgrupo 16Sr.

4.4 Conclusões

Dois fitoplasmas foram encontrados em associação com a doença denominada enfezamento do Alho-poró. A identificação destes fitoplasmas baseada na análise do gene 16S rRNA, permitiu classificar um como representante do subgrupo 16SrIII-J e o outro como afiliado ao grupo 16SrXIII. Para o fitoplasma do grupo 16SrXIII foram caracterizadas quatro estirpes, dentre elas, uma foi classificada no subgrupo 16SrXIII-E e as demais podem ser indicadas como representantes de três novos subgrupos.

O gene *SecY* mostrou maior variabilidade genética em relação ao gene 16S rRNA. No entanto, este gene não permitiu a distinção de estirpes dentre os fitoplasmas afiliados ao subgrupo 16SrIII-J. Já o gene *rp* mostrou que a estirpe LeSt-Br03 do fitoplasma associado ao enfezamento do Alho-poró foi similar, porém não idêntico, aos fitoplasmas do subgrupo 16SrIII-J descritos até o momento. O gene *rp* mostrou para estirpe LeSt-Br01, do fitoplasma associado ao enfezamento do Alho-poró, um indicado de um novo representante de subgrupo dentro do grupo 16SrXIII.

Referências

ACINAS, S.G.; MARCELINO, L.A.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M.F. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.186, n.9, p. 2629–2635, 2004.

AMARAL MELLO, A.P.O. **Identificação de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença**. 2007. 64p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

AMARAL-MELLO, A.P.O.; RIBEIRO, L.F.C.; BEDENDO, I.P. Enfezamento em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) associado a fitoplasma no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 260, 2003.

AMARAL-MELLO, A.P.O.; RIBEIRO, L.F.C.; BEDENDO, I.P. Heterogeneidade da sequência do gene 16S rDNA de um fitoplasma afiliado ao grupo 16SrIII, associado ao enfezamento em plantas de berinjela. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p.151, 2004.

AMARAL-MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; CAMARGO, L.E.A. Sequence heterogeneity in the 16S rDNA of tomato big bud phytoplasma belonging to group 16SrIII. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.154, p.245–249, 2006.

AMARAL MELLO, A.P.O.A ; ECKSTEIN, B. ; FLORES, D. ; KERYCI, 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.

BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Molecular evidence for the presence of maize bushy stunt phytoplasma in corn In Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 957, 1997.

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.

BERNAERT, N.;PAEPE. D.DE; BOUTEN, C.; CLERCQ, H.DE.; STEWART, D.; BOCKSTAELE, E.V.; LOOSE, M.DE.; DROOGENBROECK, B.V. Antioxidant capacity, total phenolic and ascorbate content as a function of the genetic diversity of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*). **Food Chemistry**, London, v.134, p.669–677, 2012.

BERTACCINI, A.; FRANOVA, J.; PALTRINIERI,S.; MARTINI, M.; NAVRATIL, M.; LUGARESI, C.; NEBESAROVA, J.; SIMKOVA, M. Leek proliferation: A new phytoplasma disease in the Czech Republic and Italy. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.105, p. 487–493, 1999.

BERTACINI, A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. **Frontiers in Bioscience**, Bologna, v. 12, p. 673-689, 2007.

CANALE, M.C.; MELLO, A.P.O.A.; MARTINS, T.D.; BEDENDO, I.P. Patossistema Fitoplasma-Brássicas: Identificação do Agente em Repolho, Couve-Flor e Brócolis, Potenciais Vetores e Epidemiologia. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 151-176, 2012.

CABI. Crop Protection Compendium. CAB International, Wallingford, UK. Disponível em:< <http://www.cabi.org/cpc/datasheet/4248>>. Acesso em: 7 Out. 2015.

DAVIS, R.E.; LEE, I-M. Cluster-Specific Polymerase Chain Reaction Amplification of 16S rDNA Sequences for Detection and Identification of Mycoplasma-like Organisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v.83, p. 1008-1011, 1993.

DAVIS, R.E.; ZHAO, Y.; DALLY, E.L.; JOMANTIENE, R.; LEE, I-M.; WEI, W.; KITAJIMA, E.W. ‘*Candidatus Phytoplasma sudamericanum*’, a novel taxon, and strain PassWB-Br4, a new subgroup 16SrIII-V phytoplasma, from diseased passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 62, p. 984–989, 2012.

DAVIS, R.E.; ZHAO, Y.; DALLY, E.L.; LEE, I.-M.; JOMANTIENE, R.; DOUGLAS, S.M. '*Candidatus Phytoplasma pruni*', a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multilocus characterization based on 16S rRNA, secY, and ribosomal protein genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.63, p.766–776, 2013.

DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; ZHAO, Y.; LEE, I.-M.; WEI, W.; WOLF, T.K.; BEANLAND, L.; LEDOUX, D.G.; JOHNSON, D.A.; FIOLA, J.A.; WALTER-PETERSON, H.; DAMI, I.; CHIEN, M. Unraveling the Etiology of North American Grapevine Yellows (NAGY): Novel NAGY Phytoplasma Sequences Related to '*Candidatus Phytoplasma pruni*'. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, n. 8, p. 1087-1097, 2015.

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.

FERNANDEZ, 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. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 65, p.2741–2747, 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.

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.

GALDEANO, E.; GUZMÁN, F.A.; FERNÁNDEZ, F.; CONCI, R.L. Genetic diversity of 16SrIII group phytoplasmas in Argentina. Predominance of subgroups 16SrIII-J and B and two new subgroups 16SrIII-W and X. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.137, p.753–764, 2013.

GREEN M.J.; THOMPSON, D.A.; MACKENZIE, D.J. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v.83, p.482-485, 1999.

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.

GUZMÁN, F.; GIOLITTI, F.; FERNÁNDEZ, F.; NOME, C.; LENARDON, S.; CONCI, L. Identification and molecular characterization of a phytoplasma associated with sunflower in Argentina. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.138, n.4, p.679-683, 2014.

IRPCM. '*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.

JOMANTIENE, R.; DAVIS, R.E.; VALIUNAS, D.; ALMINAITE, A. New group 16SrIII phytoplasma lineages in Lithuania exhibit rRNA interoperon sequence heterogeneity. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.108, p.507–517, 2002.

JUNG, H-Y.; MIYATA, S-I.; OSHIMA, K.; AKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; WEI, W.; SUZUKI, S.; UGAKI, M.; HIBI, T.; NAMBA, S. First Complete Nucleotide Sequence and Heterologous Gene Organization of the Two rRNA Operons in the Phytoplasma Genome. **DNA and Cell Biology**, New York, v. 22, n.3, p. 209–215, 2003.

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

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 Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, 337–347. 2004.

LEE, I.-M.; BOTTLNER-PARKER, K.D.; ZHAO, Y.; DAVIES, R.E.; HARRISON, N.A. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 60, p. 2887-2897, 2010a.

LEE, I.-M.; ZHAO, Y.; DAVIES, R.E. Prospects of multiple gene-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. **Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors**. Wallingford: CAB International, 2010b. chap. 4, p. 51-63.

LEE, I.-M.; POLASHOCK, J.; BOTTLNER-PARKER, K. D.; BAGADIA, P. G.; RODRIGUEZ-SAONA, C.; ZHAO, Y.; DAVIS, R. E. New subgroup 16SrIII-Y phytoplasmas associated with false-blossom diseased cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) plants and with known and potential insect vectors in New Jersey. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.139, p.399–406, 2014.

LI, W.; COWLEY, A.; ULUDAG, M.; GUR, T.; MCWILLIAM, H.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y.M.; BUSO, N.; LOPEZ, R. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 43, p. 580-584, 2015.

LIEFTING, L.W.; ANDERSEN, M.T.; BEEVER, R.E.; GARDNER, R.C.; FORSTER, R.L.S. Sequence Heterogeneity in the Two 16S rRNA Genes of Phormium Yellow Leaf Phytoplasma. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3133–3139, 1996.

LIM, P.-O.; SEARS, B.B. Evolutionary Relationships of a Plant-Pathogenic Mycoplasma-like Organism and *Acholeplasma laidlawii* Deduced from Two Ribosomal Protein Gene Sequences. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, n. 8, p. 2606-2611, 1992.

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

MARTINI, M.; LEE, I.-M.; BOTTLNER, K.D.; ZHAO, Y.; BOTTI, S.; BERTACCINI, A.; HARRISON, N.A.; CARRARO, L.; MARCONE, C.; KHAN, A.J.; OSLER, R. 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.

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 Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, n. 4, p. 429-436, 2000.

MUNHOZ, E.M. **Caracterização molecular de um fitoplasma associado ao superbrotamento do melão-de-São Caetano (*Monordica charantia* L.) com base nas sequências dos genes 16S rRNA e sec Y**. 2012. 64p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

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.

PROMEGA CORPORATION. **Technical manual: pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector**. Disponível em: < Systems www.promega.com/protocols/ >. Acesso em: 15 Set. 2015.

RAPPUSSI, M.C.C.; ECKSTEIN, B.; FLÔRES, D.; HAAS, I.C.R.; AMORIM, L.; BEDENDO, I.P. Cauliflower stunt associated with a phytoplasma of subgroup 16SrIII-J and the spatial pattern of disease. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.133, n.4, p.829-840, 2012.

SCHNEIDER, B.; SEEMULLER. Presence of Two Sets of Ribosomal Genes in Phytopathogenic Mollicutes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.9, p.3409-3412, 1994.

SCHNEIDER, B.; SEEMULLER, E.; SAMRT, C.D.; KIRKPATRICK, B.C. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. Academic Press, 1995. p. 369-380.

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.

VALIUNAS, D.; JOMANTIENE, R.; IVANAUSKAS, A.; ABRAITIS, R.; STANIENE, G.; ZHAO, Y.; DAVIS, R. E. First Report of a New Phytoplasma Subgroup, 16SrIII-T, Associated with Decline Disease Affecting Sweet and Sour Cherry Trees in Lithuania. **Plant Disease**, Saint Paul, v.93, n.5, p.550, 2009.

WEI, W.; DAVIS, R.E.; LEE, I.M.; ZHAO, Y. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma group. **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.; WEI, W.; LEE, I-M.; SHAO, J.; SUO, X.; DAVIS, R.E. Construction of na 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.

APÊNDICES

Sequência do fitoplasmas MaLL-BR01 - KP828428 obtido na reação de PCR com os primers P1A/16S-SR

```
>GAAACGGTTGCTAAGACTGGATAGGAAACAGAAAGGCATCTTTTTGTTTTTAAAAGACCTTT
TTCGGAAGGTATGCTTAAAGATGGGCTTGCGCCACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCT
ACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTCTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACG
GCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGA
GCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTGAAGAAGAAAAA
ATAGTGGA AAAA ACTATCTTGACGTTATTCAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGG
CGGTTAGGAAAGTCTATAATTTAATTTTCAGTGCTTAACGCTGTCTTGTTATAGAAACTACCT
TGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGGAATTCATGTGTAGCGGTAAAATGTGTAAATATAT
GGAGGAACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTGACTGACGCTGAGGCACGAAAGCG
TGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGT
CGGGGTAAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCA
AGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTC
GAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGTCTTGACATGCTTTGCAAAGCTATAGAAATATAGTG
GAGGTTATCAGGGACACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGTTCGTGTCGTGAGATGTTAGGT
TAAGTCCTAAACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTA
GCGAGACTGCCAATTAAAAATTGGAGGAAGGTGAGGATTACGTCAAATCATCATGCCCTTA
TGATCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGAGTAGCTGAAGCGCGAGTTTTT
GGCAAATCTCAAAAAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGTAACCTCGACTTCATGAAGTT
GGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTGCGGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACA
CCGCCCGTCA
```

Sequência do fitoplasmas MaLL-BR01 - KR363128 obtido na reação de PCR com os primers fU5/rU3

```
>GAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTA
TTGAAGAAGAAAAAATAGTGGA AAAA ACTATCTTGACGTTATTCAATGAATAAGCCCCGGCTA
ACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGT
AAAGGGTGCGTAGGCGGTTAGGAAAAGTCTATAATTTAATTTTCAGTGCTTAACGCTGTCTTGT
TATAGAAACTACCTTGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGGAATTCATGTGTAGCGGTAAA
ATGTGTAAATATATGGAGGAACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTGACTGACGCT
GAGGCACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA
TGAGTACTAAGTGTGCGGGTAAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGA
GTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATC
ATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGTCTTGACATGCTTTGCAAAGCT
ATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGACACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGTTCGTGTC
GTGAGATGTTAGGTAAAGTCCTAAAACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCACGTAA
TGGTGGGGACTTTAGCGAGACTGCCAATTAAAAATTGGAGGAAGGTGAGGATTACGTCAAAT
CATCATGCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAA
```

Sequência do fitoplasmas CfS-BR10 - KR270802 obtido na reação de PCR com os primers P1A/16S-SR

```
>GAAACGGTTGCTAAGACTGGATAGGAAACAGAAAGGCATCTTTTTGTTTTTAAAAGACCTTT
TTCGGAAGGTATGCTTAAAGATGGGCTTGCGCCACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCT
ACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTCTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACG
GCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGA
GCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTGAAGAAGAAAAA
ATAGTGGA AAAA ACTATCTTGACGTTATTCAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGG
CGGTTAGGAAAGTCTATAATTTAATTTTCAGTGCTTAACGCTGTCTTGTTATAGAAACTACCT
```

TGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGTGTAAATATAT
 GGAGGAACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTGACTGACGCTGAGGCACGAAAGCG
 TGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGT
 CGGGGTAAAACCTCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCA
 AGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTC
 GAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGTCTTGACATGCTTTGCAAAGCTATAGAAATATAGTG
 GAGGTATCAGGGACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGTTCGTGTCGTGAGATGTTAGGT
 TAAGTCCTAAAACGAGCGCAACCCCTTGTCGTTAATTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTA
 GCGAGACTGCCAATTA AAAAATTGGAGGAAGGTGAGGATTACGTCAAATCATCATGCCCTTA
 TGATCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGAGTAGCTGAAGCGCGAGTTTTT
 GGCAAATCTCAAAAAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGTAACCTCGACTTCATGAAGTT
 GGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACA
 CCGCCCGTCA

Sequência do fitoplasmas CfS-BR10- KT444690 obtido na reação de PCR com os primers fU5/rU3

>CGGCAATGGAGGAaACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGaAGTATTTTCGGTATGTA
 AAGTTCTTTTATTGAAGAAGAAAAAATAGTGGAAAACTATCTTGACGTTATTCAATGAATA
 AGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAA
 TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAGGAAAGTCTATAATTTAATTTTCAGTGCTTAA
 CGCTGTCTTGTATAGAACTACCTTGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGGAATTCCATGT
 GTAGCGGTAAAATGTGTAAATATATGGAGGAACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCT
 TGACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
 GCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCTGGGGTAAAACCTCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGT
 ACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACA
 AGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGTCTTGACATGC
 TTTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT
 CAGTTCGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGCAACCCCTTGTCGTTAATTG
 CCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCGAGACTGCCAATTA AAAAATTGGAGGAAGGTGAGGA
 TTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACA
 AAGAGTAGCTGAA

Sequência do fitoplasmas LeSt-Br03 - KT444696 obtido na reação de PCR com os primers P1A/16S-SR

>GAAACAGTTGCTAAGACTGGATAGGAAAAGTAAGGGCATCTTTACTTTTTTAAAAGACCTTC
 TTTGAAGGTATGCTTAAGGAGGGGCTTGCGACACATTAGTTAGTTGGCAGGGTAAAGGCCTA
 CCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGG
 CCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAG
 CAACGCCGCGTGAACGATGAAGTACCTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTAAGGAAGAAAAA
 GAGTGGAAAAACTCCCTTGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAG
 CCGCGGTAATACATAAGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGC
 GGTTTAATAAGTCTATAGTTTAAATTTTCAGCGCTTAACGCTGTTGTGCTATAGAACTGTTTT
 ACTAGAGTGAGTTAGAGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGG
 AGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTTGCTGGGACTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTG
 GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCG
 GGTA AAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTA
 TGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAG
 ATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATTTTCTTGCGAAGTTATAGAAATATAATGAAG
 GTTATCAGGAAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAA
 GTTCTAAAACGAGCGCAACCCCTTGTCGTTAATTGCCAGCATGTAATGATGGGGACTTTAACG
 AGACTGCCAATGAAAAATTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA

TCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGTTGATACAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTCTTAGC
CAATCTCACAAAATCAATCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGA
ATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCG
CCCGTCA

Sequência do fitoplasmas LeSt-Br01 - KT444691 obtido na reação de PCR com os primers P1A/16S-SR

>GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGATAAGAAGGCATCTTCTTATTTTTTAAAAGACCTAG
CAATAGGTATGCTTAAGGAGGGGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTAC
CAAGACGATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGCTGAACGGCCACATTGGAAGTGAAGACACGGT
CCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGC
AACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGATACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAAAAGAT
GGTGGAAAAACCATTTATGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGC
CGCGGTAAATACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCG
GTTTAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTTAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTGA
CTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGGAAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGA
GGAACACCATGAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTAAGTACGCTGAGGCACGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAGATGTTGG
GTTAAACCAGTGTCGAAGTTAACACATTAAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTAT
GAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGG
TACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGTTGTAGAAATACAGTGGAGG
TTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTTGTTAATTGCCATCATTAAGTTGGGGACTTTAGCAAGA
CTGTCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCT
GGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGCTTTTGGCAA
TCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATC
GCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCC
GTCA

Sequência do fitoplasmas LeSt-Br02 - KT444692 obtido na reação de PCR com os primers P1A/16S-SR

>GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGATAAGAAGGCATCTTCTTATTTTTTAAAAGACCTAG
CAATAGGTATGCTTAAGGAGGGGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTAC
CAAGACGATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGCTGAACGGCCACATTGGAAGTGAAGACACGGT
CCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGC
AACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGATACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAAAAGAT
GGTGGAAAAACCATTTATGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGC
CGCGGTAAATACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCG
GTTTAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTTAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTGA
CTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGGAAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGA
GGAACACCATGAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTAAGTACGCTGAGGCACGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAGACGTTGG
GTTAAACCAGTGTCGAAGTTAACACATTAAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTAT
GAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGG
TACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAATACAGTGGAGG
TTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGGTGTTGGGTAAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTTGTTAATTGCCATCATTAAGTTGGGGACTTTAGCAAGA
CTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCT
GGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGCTTTTGGCAA
TCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATC

GCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTGCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCC
GTCA

Sequência do fitoplasmas LeSt-Br06 - KT444693 obtido na reação de PCR com os primers P1A/16S-SR

>GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGATAAGAAGGCATCTTCTTATTTTTTAAAAGACCTAG
CAATAGGTATGCTTAAGGAGGGGCTTGCCTCACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTAC
CAAGACGATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGCTGAACGGCCACATTGGAAGTGAAGACACGGT
CCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGC
AACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGATACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAAAAGAT
GGTGGAAAAACCATTATGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGCAGGCG
GTTTAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTTAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTGA
CTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGA
GGAACACCATGAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTAAGTACGCTGAGGCACGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAGACGTTGG
GTTAAACCAGTGTCGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTAT
GAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCGTGTTGTTTAATTCTGAAGG
TACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGTTGTAGAAATACAGTGGAGG
TTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTGTTAATTGCCATCATTAAAGTTGGGGACTTTAGCAAGA
CTGTCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCT
GGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGCTTTTGGCAA
TCTCAAAAAACAGTCTCGGTTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATC
GCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTGCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCC
GTCA

Sequência do fitoplasmas LeSt-Br07 - KT444694 obtido na reação de PCR com os primers P1A/16S-SR

>GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGATAAGAAGGCATCTTCTTATTTTTTAAAAGACCTAG
CAATAGGTATGCTTAAGGAGGGGCTTGCCTCACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTAC
CAAGACGATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGCTGAACGGCCACATTGGAAGTGAAGACACGGT
CCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGC
AACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAAAAGAT
GGTGGAAAAACCATTATGACGGTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCG
GTTTAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTTAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTGA
CTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGA
GGAACACCATGAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTAAGTACGCTGAGGCACGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAGATGTTGG
GTTAAACCAGTGCCGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTAT
GAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCTGAAGG
TACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGTTGTAGAAATACAGTGGAGG
TTACCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTGTTAATTGCCATCATTAAAGTTGGGGACTTTAGCAAGA
CTGTCAGTGATAAATTGGGGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCT
GGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGCTTTTGGCAA
TCTCAAAAAACAGTCTCAGTTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATC
GCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTGCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCC
GTCA

Sequência do fitoplasmas LeSt-Br01 - KT588313 obtido na reação de PCR com os primers rpF1C/rp(I)R1A

```
>ATGGAAATGTCAGCAAAACAGGCTAAAGCGATTGCATCTAAAGTTTCAATTGCTCCTCGTAA
AGCACGTTTtagTTGTTGATTTAATTAGAGGTAAAAACATTGCTCAAGCTCAAGCTATTTTAA
CTTTTACTCCAAAAGTAGCTGCTCCCGTTATTTTAAAACTTTTAAACAGTGCAGTTGCTAAT
GCTACTAATAATTTAAAACTAAATCATGAACAACCTTTATGTTAAAGAAGTTTTTGTTAACGA
AGGCTTACGTTTAAAAACGTATGTTCCACGAGCTAAGGGTTCTGGCGATATGATTAAAAAAA
GAACTAGCCATATTACTTTAGTAGTGGCTTTAAAAAACGAACAAATACTAAAGGAGGCACAA
GATGGGTCAGAAAATCAATCCTAATGGTTTAAAGATTAGGAATTATTAGAAGTTGGGATTCTC
AATGGTTTGTTCAGATAAAGAAATTCCTGCTTTAATCAAAGAAGATTATTTAATCCGTGAA
TTAATTAATAATTTTAGCAAAAAAAGTGCGATTAGCCAAATTGAAATCCAACGCTTAAAGA
AAAACTAAAAATCGTATTAAGATTCATATTCATACAGCCAAACCAGGTGTTATCATCGGCA
GAGACGGCGAAACACGTAATAAAATGGTTGCTAAATTAAAAGAATTAACTCAAAAAGCTGTT
GATTTAAACATTTTAGAAGTTAAAAATTCTGAAAAAATAGCTTTATTAATAGCTCAAAATAT
AGCTGAACAATTAGAAAATCGTATGAATTTCCGACGTGTTCAAAAAATGGCTATTCAAAAAG
CCCTTAAAGCAGGAGTTAAAGGGATTAAACCTTAGTCTCTGGACGCTTAAATGGTGCTGAA
ATAGCTCGTAGTGAAGGCAGTGCCGAAGGAAGAGTCCCCCTACATACTTTAAGAGCAGATAT
TGATTATGCTTCTTTACAAGCTCATACTACTTATGGTGTTTTAGGAGTTAAAGTATGGATTT
TTCATGGTGAAGTTTTACCAGGCCAAACTATTTTAGATACTAGAAAACCTTTTGTCTACT
ACAACAGAAATAGTAAACGCCCTTCTCGTTATTTCAAAGGAGGCCCTAAAAATGTTAATGC
CAAAAAGAAC
```

Sequência do fitoplasmas LeSt-Br03 - KT588312 obtido na reação de PCR com os primers rp(III)FN/rp(I)R1A

```
>ATGAATGTAAAAGCTATTGCAAATCAGATGTCTGTTGCTCCTAGAAAACTCGTTTAGTAGC
GGATTTAATCCGTGGCAAACATGTTAGAGAAGcGCAAGCAATTTTGATGtTTACTCCAAAAG
CAGCATcTCCAATCGTTTCaAAACTTTTAAAAAGTGCTGTTGCCAACGCTGTTTATAATtTT
AGCCTTAAAGAAGAAGAATTATACGTGAAAGAAATTTTTGTTAATGAAGGTCTTCGTTTAAc
TCGTTTATTGCCAAGAGCTAAAGGAAAACTGATAAAATTAAGAAAAGAACTTCTCATATTA
CAATAGTTGTTTCTTCCAAAACGGTAGAAGAAAAGAAAACAGTTAAACAGCAATCAGTCATC
CAACAAATAGAAGAAAAGGAGATAGTTGAAAATGGGTCAAAAGAGTAGTCCAACCGGTTTAA
GATTAGGAATCATTAGAAATTGGGATTCCAAATGGTACGCCGAAGATAACAAGTCCCTAAT
TTAATTCTTGAAGATTATCAAATCAGAAATTTAATTAATAACCATTTATCCTAAAGCAACTAT
TTCCCGTATCGAAATTCACGTTTTTAAAAAATCCAACAAAGAACAATCCAAATTTTTTTAT
ACACTTCAAATTAGGCATAGTTGTTGGACCTGAAAACAAAGAAAAAAATAAATTAGTTGAA
AAAATCAAAAAATTAATTAaaaaAGATATCATTTTAAACGTCTTAGAAATTAaaaACCCTGA
TAAAGTGGCTATATTGGTAGCGCAAAATTTAGCTATCCAATTGGAGCAAAGAGCTTTTTTCC
GCGCTGCTCAAAAAATGACAGTGCAAAAAGTTTTAAAAACAGGCGTTAAAGGTGTTAAATTT
ATTATTTCCGGTCGTTTAGGCGGCGCTGAAATAGCTAGACAAGAAACCTTTCTAAAGGACT
TGTTCCCCTTCACACTCTAAGAGCGGATATTGATTATGCTTTTGAAGAAGCTCACACTACTT
ATGGCGTTTTTAGGCGTTAAAGTATGGATTTATCATGGTGAAGTTTTACCTAAACAACTATC
GAAGATACTAGAAAATTTATTAGTTTCTCAACATGATGAAAAAAGAGTTAATCCTCAAGACAG
AAAACCAAAATTTGATGACAGAAGAGCTAAATTTTCTGATAGAAAGTCAAAATTTGAAAATA
AAAAACCATTTTCAAAAAAAGTTAACAATACTAAAAATGTTAAACCAAAATAACGTCctag
```

Sequência do fitoplasmas LeSt-Br03 - KY588314 obtido na reação de PCR com os *primers* SecY-F1(III)/SecY-R1(III)

```
>ATGAAAATGGTAATAGATTTTCTTCGTGATAAAAGTAAAATAATTAAAAAATTTTATTTAC
TTTAGTTATTTTATTTATCTTTGTTATCGGTAATAAATTAGTCATTCCCTTATGTAACAGTTC
AAGAAAAATTTCTTTTTTGACATTAAATCGGCAATTAAACAAATGTCTGGTTTATTCGAAGCT
AATGGTTCCTATATATTTTTTATCTTTAGGGGTTTATCCTTATATTACTGCCTCTATTATTGT
CCAGTTTGCGCAAAAATTATTTCCTTTTATGAAAGAATGGCAAGAACAAGGCGAAAGAGGAA
AATATAAAACCAATTTAGTGACTCGTTCTTTGACTTTGCTGTTTGCAGTAGGATTGGCTTTA
TCTTCAATTCAACGCGATGGAATTGCCACGCTCGCTAACAATAAAGCGCATGTTTTAACCAT
AGTGTTTTTTTTTAGTAGTCGGAGCTTTCATTAGCGTTTGGTTAGCTGATTTAATCACTTCCA
AAGGAATAGGAAACGGTATTTCTATTTTCGTAGCAATTAGTGTCAGTAAGAATTTATTTGAA
ACACTGCAATTTTTAACAAAAATCGACGATACAAATGTAACTAAAAGAATCTTGACTTTAGT
AGTTTTGTTAATCTTGTTAATTTTAAACAGTGATTTTATCAGCTGCTTATTTAAAAGTTCCAA
TCACTTACGCTACTAAACAAAATAATGATAAAATAACAATCACATCCCTTTAAACTTAAC
ACTTCAGGAATTTTGTGAGTAATTTTAGCCAACAGTTTATTGCAATTTTTTGGCACTATTTT
GCTTTTGTGTTGGGACCAGAAAATGGTTTTTCCAAATGGGTAACTCAATTTCAAGCCTCTCAA
GTAATTATTTAGGTTTAGGTTTTTTTGTCTTACTTATTATTAATTTTGTATTTTCAGTTTTT
TCTACTTTTATAACTATCAATCCGGCAGATATTGCCGAACATTTATCAAAACAAGATGCTTA
CTTAGAAGGGGTAAAACCTGGAGACGAAACAGTTTATAAAATTACTCAAAAATTATTTAAAG
TAACAATCATCGGCGCTTTTGCTTTAACTGTCTTAGCTGCTTTACCTGAATTGATTAAATTT
TTTGTTTGGACTAATGAATCTGACCGAACAGTTAAAGTTCAATTAGGTGGTACTAGTCTTTT
AATTGTTGTAGGTGTGGCTGTTGAAGTAATGCAACGTATAACGACTCAAACCTAACGTTAAGA
AATTATACAAAAAATTATTTT
```