Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Caracterização molecular e diversidade de fitoplasmas em pomares de citros no Estado de São Paulo

Júlio César Barbosa

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

Piracicaba
2010

Júlio César Barbosa
Engenheiro Agrônomo

Caracterização molecular e diversidade de fitoplasmas em pomares de citros no Estado de São Paulo

Orientador:
Prof. Dr. **ARMANDO BERGAMIN FILHO**

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

Piracicaba
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Barbosa, Júlio César
Caracterização molecular e diversidade de fitoplasmas em pomares de citros no Estado de São Paulo / Júlio César Barbosa. - - Piracicaba, 2010.
100 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Citricultura 2. Doenças de plantas 3. Epidemiologia 4. Fitoplasmas 5. Insetos vetores 6. Laranja 7. Plantas daninhas I. Título

CDD 634.3
B238C

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

À Bárbara

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Armando Bergamin Filho, pela confiança e, sobretudo, por sempre respeitar minhas idéias.

Aos Professores Jorge Alberto Marques Rezende e Luis Eduardo Aranha Camargo, pela cooperação durante as análises moleculares deste estudo.

À Professora Lílian Amorim pela cooperação durante os experimentos com insetos no Laboratório de Doenças de Pós-colheita.

Ao Professor Ivan Paulo Bedendo por compartilhar comigo seus conhecimentos e experiências sobre os fitoplasmas.

À Dra Alice Kazuko Inoue-Nagata pelos ensinamentos sobre clonagem e análise de seqüências.

Às Dras. Ana Clara de Souza Mello Lucena Gonçalves e Keti Maria Rocha Zanol, pela identificação dos cicadelídeos.

Ao Renato Barbosa Salaroli pela ajuda na obtenção das fotos de microscopia eletrônica.

Aos amigo(a)s do Laboratório de Epidemiologia: Alécio, Ana Raquel, Carol, Felipe, Guilherme, Isabela, Juliana, Sílvia, Thaïs e Thimotheo; e do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos: Daniela, Evandro, Rafaela e Thais, pela convivência agradável e muito descontraída.

À Dra. Maria Cândida de Godoy Gasparoto pelas incontáveis caronas nas idas e vindas a Araraquara e por sua amizade “de toda hora”.

Ao Dr. Fabrício Packer e o Msc. Geraldo José Silva Jr. pela ajuda nas coletas de amostras em Bebedouro e Taquarituba.

À Dra. Bárbara Eckstein pela grande ajuda na identificação dos fitoplasmas.

À Fapesp pela concessão da bolsa e por compreender as dificuldades enfrentadas durante o decorrer do meu doutorado.

A todos, que de alguma forma me ajudaram, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO **9**
ABSTRACT **11**
LISTA DE FIGURAS **13**
LISTA DE TABELAS **17**
LISTA DE ANEXOS **19**
1 INTRODUÇÃO **21**
2 DESENVOLVIMENTO **23**
2.1 Revisão bibliográfica **23**
2.1.1 Fitoplasmas **23**
2.1.2 Classificação de fitoplasmas **24**
2.1.3 Fitoplasmas no Brasil **27**
2.1.4 Fitoplasmas em citros **31**
2.2 Material e métodos **32**
2.2.1 Coleta de amostras de plantas de citros em pomares do Estado de São Paulo **32**
2.2.2 Identificação de inseto (s) candidato (s) a vetor **33**
2.2.3 Identificação de plantas daninhas hospedeiras de fitoplasmas **34**
2.2.4 Extração de DNA de amostras foliares de plantas de citros e plantas daninhas **34**
2.2.5 Extração de DNA dos cicadelídeos **34**
2.2.6 Detecção dos fitoplasmas por *nested* PCR **35**
2.2.7 Análise de RFLP **35**
2.2.8 Clonagem **36**
2.2.9 Seqüenciamento da região 16S rDNA “F2n/R2” dos fitoplasmas e análise das seqüências **37**
2.2.10 Análise de RFLP *in silico* **37**
2.2.11 Análise do coeficiente de similaridade **37**
2.2.12 Análise filogenética **40**

2.3 Resultados e Discussão **40**

2.3.1 Fitoplasmas em plantas de citros **40**

2.3.1.1 Detecção e identificação de fitoplasmas em plantas de citros por *nested* PCR **40**

2.3.1.2 Identificação de fitoplasmas por RFLP **43**

2.3.1.3 Identificação de fitoplasmas por RFLP *in silico* **46**

2.3.1.4 Cálculo do coeficiente de similaridade **48**

2.3.1.5 Análise filogenética **51**

2.3.2 Fitoplasmas em plantas daninhas **55**

2.3.2.1 Detecção e identificação de fitoplasmas em plantas daninhas por PCR **55**

2.3.2.2 Identificação de fitoplasmas por RFLP **58**

2.3.2.3 Identificação de fitoplasmas por RFLP *in silico* **61**

2.3.2.4 Cálculo do coeficiente de similaridade **64**

2.3.2.5 Análise filogenética **66**

2.3.3 Fitoplasmas em cicadelídeos **69**

2.3.3.1 Identificação de possíveis vetores de fitoplasmas em pomares de citros **69**

2.3.3.2 Detecção e identificação de fitoplasmas em cicadelídeos por *nested* PCR **69**

2.3.3.3 Identificação de fitoplasmas por RFLP **72**

2.3.3.4 Identificação de fitoplasmas por RFLP *in silico* **73**

2.3.3.5 Cálculo do coeficiente de similaridade **74**

2.3.3.6 Análise filogenética **76**

3 CONCLUSÕES **81**

REFERÊNCIAS **83**

ANEXOS **95**

RESUMO

Caracterização molecular e diversidade de fitoplasmas em pomares de citros no Estado de São Paulo

Recentemente, um fitoplasma do grupo 16SrIX foi associado a plantas de citros com sintomas de huanglongbing (HLB) no Estado de São Paulo. No entanto, em razão da ampla diversidade de fitoplasmas que tem se observado em várias culturas no Brasil, seria possível que além do fitoplasma do grupo16SrIX, outros fitoplasmas também pudessem estar associados a plantas de citros no Estado de São Paulo. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar se outros fitoplasmas, além daquele do grupo 16SrIX, estão associados a plantas de citros no Estado de São Paulo. Amostras foliares de plantas de citros, plantas daninhas e cicadelídeos foram coletados entre os meses de Junho a Outubro de 2010, em pomares localizados em quatro municípios: Araraquara, Bebedouro, Piracicaba e Taquarituba. Análises de *nested* PCR evidenciaram a presença de fitoplasmas associados a plantas de citros (sintoma: clorose foliar); a plantas daninhas: *Bidens pilosa* (sintomas: filodia e virescência), *Leonorus sibiricus* (sintoma: deformação foliar), *Solanum americanus* (sintoma: superbrotamento foliar), *Erigeron bonariensis* (sintomas: avermelhamento e superbrotamento foliar) e *Euphorbia heterophylla* (sintoma: deformação foliar); e a cicadelídeos da espécie *Agallia albidula* (Uhler, 1895) (subfamília Agalliinae). A confirmação da presença e caracterização molecular dos fitoplasmas foi realizada através de análises de RFLP e seqüenciamento da região 16S rDNA. Uma ampla diversidade de fitoplasmas foi identificada. Fitoplasmas dos grupos 16SrIII e 16SrIX foram associados a plantas de citros em Piracicaba, enquanto um fitoplasma do grupo 16SrVII foi associado a plantas de citros em Bebedouro. Fitoplasmas do grupo 16SrIII foram associados a plantas daninhas das espécies *B. pilosa*, *L. sibiricus* e *S. americanus* em Piracicaba e fitoplasmas do grupo 16SrVII foram associados a plantas de *E. bonariensis* e *E. heterophylla* em Piracicaba e Taquarituba, respectivamente. Um fitoplasma do grupo 16SrIII foi associado a *A. albidula* em Taquarituba, sugerindo ser este um potencial inseto vetor de fitoplasmas em pomares de citros. Com base na análise da região 16S rDNA, muitos dos fitoplasmas encontrados apresentaram-se distintos dos fitoplasmas já relatados. Em virtude disto, estes fitoplasmas foram propostos como representantes de novos subgrupos pertencentes aos grupos 16SrIII, 16SrVII e 16SrIX. Os resultados obtidos neste estudo não nos permite a associação dos fitoplasmas encontrados com o HLB ou qualquer outra doença já descrita, sendo, portanto, necessários mais estudos visando confirmar o papel destes fitoplasmas como patógenos de citros e plantas daninhas.

Palavras-chave: Citricultura; Doenças de plantas; Epidemiologia; Fitoplasmas; Insetos vetores; Laranja; Plantas daninhas

ABSTRACT

Molecular characterization and diversity of phytoplasmas in citrus orchards in the Sao Paulo state

Recently a phytoplasma of the 16SrIX group was associated with citrus trees exhibiting symptoms of huanglongbing (HLB) in Sao Paulo state. However, due to the wide diversity of phytoplasmas that have been observed in several crops in Brazil, it is possible that in addition to the phytoplasma of group 16SrIX other phytoplasmas could also be associated with citrus trees. Therefore, the objective of this study was to investigate if others phytoplasmas besides that of the 16SrIX group are associated with citrus plants in the São Paulo state. Leaf samples from citrus trees, weeds and cicadellids were collected between June and October of 2010 from citrus orchards of four municipalities of the Sao Paulo state: Araraquara, Bebedouro, Piracicaba and Taquarituba. Nested PCR analysis revealed the presence of phytoplasmas associated with citrus trees (symptom: leaf chlorosis), weeds: *Bidens pilosa* (symptoms: phyllody and virescence), *Leonorus sibiricus* (symptom: leaf distortion), *Solanum americanus* (symptom: witches' broom), *Erigeron bonariensis* (symptoms: redning and witches' broom) e *Euphorbia heterophylla* (symptom: leaf distortion); and cicadellids of specie *Agallia albidula* (Uhler, 1895) (subfamily Agalliinae). The confirmation of the phytoplasma presence and molecular characterization was carried out by RFLP analysis and sequencing of the 16S rDNA region. A wide diversity of phytoplasmas was verified. Phytoplasmas of the 16SrIII and 16SrIX groups were associated with citrus trees in Piracicaba, while a phytoplasma of the 16SrVII group was associated with citrus trees in Bebedouro. Phytoplasmas of the 16SrIII group were associated with weeds belonging to the species *B. pilosa, S. americanus* and *L. sibiricus* in Piracicaba and a phytoplasma of the 16SrVII group was identified associated with plants of *E. bonariensis* and *E. heterophylla* in Piracicaba and Taquarituba, respectively. A phytoplasma of the 16SrIII group was associated with *A. albidula* in Taquarituba, suggesting that this cicadelid is a potential vector of phytoplasmas in citrus orchards. Based on the analysis of the 16S rDNA region, many of the found phytoplasmas are distinct from those already reported. Due to this distinction, these phytoplasmas were proposed as representatives of new subgroups of the groups 16SrIII, 16SrVII and 16SrIX. The results of this study don't allow us associate the found phytoplasmas with HLB or any other described disease. Thus, more studies are needed to identify the role of theses phytoplasmas as pathogens of citrus trees and weeds.

Keywords: Citrus crop; Plant diseases; Epidemiology; Phytoplasmas; Vector insects; Orange; Weeds

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do Estado de São Paulo indicando os municípios (setas) onde pomares foram amostrados 33

Figura 2 - Plantas de citros exibindo sintomas de clorose foliar [Piracicaba (a); Araraqura (b); Piracicaba (c)] em pomares no Estado de São Paulo 41

Figura 3 - Detecção em gel de agarose (1%) de fitoplasmas encontrados em amostras de plantas de citros coletadas em pomares no Estado de São Paulo (a). M= marcador molecular (1kb ladder); 1= amostras sintomáticas de citros coletadas em Araraquara; 2 e 3= amostras sintomáticas de citros coletadas em Taquarituba; 4= amostras sintomáticas de citros coletadas em Bebedouro e 4 a 16= amostras sintomáticas de citros coletadas em Piracicaba; C-= controle negativo, amostra sadia de citros; +F= controle positivo, fitoplasma do grupo 16Sr IX encontrado em plantas de *Catharanthus roseus* (Vinca) (Barbosa, J. C., dados não publicados). Análise em gel de agarose (1%) do produto da *duplex* PCR para detecção de '*Ca.* Liberibacter americanus' e '*Ca.* Liberibacter aiaticus' em amostras de plantas de citros em pomares do Estado de São Paulo (b). +Li= controle positivo, '*Ca.* Liberibacter americanus' e '*Ca.* Liberibacter aiaticus'.....43

Figura 4 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA dos isolados de fitoplasmas CTp1-BR a CTp5-BR pertencentes ao grupo 16SrIII, com o uso das enzimas *Hha*I, *Bst*UI , *Alu*I, *Taq*I, *Mse*I, *Rsa*I, *Hpa*II; M: marcador molecular ØX174-*Hae*III 45

Figura 5 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA dos isolados de fitoplasmas CTb1-BR (a) e CTp10-BR (b) pertencentes ao grupo 16SrVII e 16SrIX, respectivamente , com o uso das enzimas *Alu*I, *Hae*III, *Hinf*II, *Hha*I, *Mse*I, *Taq*I; M: marcador molecular ØX174-*Hae*III 46

Figura 6 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA "F2n/R2" do isolado CTp3-BR (16SrIII) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf* I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (*Mbo*I), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III 47

Figura 7 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA "F2n/R2" do isolado CTp10-BR (16SrIX) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I,

*Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (*Mbo*I), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III 47

Figura 8 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA "F2n/R2" do isolado CTb1-BR (16SrVII) pelo uso de 17 enzimas: *Alu* I, *Bam* HI, *Bfa* I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (*Mb* I), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III 48

Figura 9 - Árvore filogenética construída usando o método *Neighbor-Joining* através das seqüências da região 16S rDNA "F2n/R2" dos isolados de fitoplasmas identificados em plantas de citros (em negrito) neste estudo e fitoplasmas representantes dos grupos 16SrI, 16SrII, 16SrIII, [16SrIII-K e 16SrIII-R (ZHAO et al., 2009)], 16SrVII, 16SrIX e 16SrXV (Tabela 2). *Acholeplasma laidlawii* (WEISBURG et al., 1989) foi usado como *outgroup.* Os números nos ramos são os valores de *bootstrap*.....51

Figura 10 - Plantas daninhas sintomáticas coletadas em um pomar de citros em Piracicaba, Estado de São Paulo. *Bidens pilosa* (a), *Erigeron bonariensis* (b), *Leonourus sibiricus* (c) e *Solanum americanum* (d) 55

Figura 11 - Plantas daninhas sintomáticas coletadas em um pomar de citros em Taquarituba, Estado de São Paulo. *Solanum americanum* (a), *Leonourus sibiricus* (b), *Phyllanthus niruri* (c), *Euphorbia heterophylla* (d) e Plantas da família Poaceae (e) 56

Figura 12 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA dos isolados de fitoplasmas BPp7-BR, BPp8-BR e LSp3-BR pertencentes ao grupo 16SrIII, com o uso das enzimas *Bst*U, *Hha*I, *Hpa*II, *MseI*, *Rsa*I e *Alu*I; M: marcador molecular ØX174-*Hae*II 59

Figura 13 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA dos isolados de fitoplasmas SAp1-BR e SAp2-BR pertencentes ao grupo 16SrIII, com o uso das enzimas *Alu* I, *Bst*U, *Hha*I, *Hpa*II, *MseI* e *Rsa*I; M: marcador molecular ØX174-*Hae*III 59

Figura 14 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA dos isolados de fitoplasmas EBp5-BR a EBp7-BR pertencentes ao grupo 16SrIII, com o uso das enzimas *Alu*I, *Mse* I, *Hinf*I, *Dra*I, *Taq*I, *Hae*III e *Hha*II; M: marcador molecular ØX174-*Hae*III 60

Figura 15 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA dos isolados de fitoplasmas EHt1-BR a EHt4-BR pertencentes ao grupo 16SrIII, com o uso das enzimas *Alu*I, *Mse*I, *Hinf*I, *Dra*I, *Taq*I, *Hae*III e *Hha*II; M: marcador molecular ØX174-*Hae*III 60

Figura16 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA "F2n/R2" do isolado BPp8-BR (16SrIII) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III 61

Figura 17 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do isolado LSp3-BR (16SrIII) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III.....62

Figura 18 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA "F2n/R2" do isolado SAp2-BR (16SrIII) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III 62

Figura 19 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do isolado EBp7-BR (16SrVII) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III.....62

Figura 20 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do isolado EHt4-BR (16SrVII) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III.....63

Figura 21 - Árvore filogenética construída usando método *Neighbor-Joining* através das seqüências da região 16S rDNA "F2n/R2" dos isolados de fitoplasmas identificados em plantas de citros e em plantas daninhas (setas) neste estudo, fitoplasmas representantes dos grupos 16SrIII, [16SrIII-K e 16SrIII-R (ZHAO et al., 2009)], 16SrVII e 16SrIX (Tabela 2). '*Ca.* Phytoplasma brasiliense' (Tabela 2) foi usando como *outgroup.* Os números nos ramos da árvore são os valores de *bootstrap*.....67

Figura 22 - *Agallia albidula*: Cicadelídeo da subfamília Agalliinae capturado em pomares de citros no Estado de São Paulo 71

Figura 23 - Dimensão de *Agallia albidula*: Ninfa (a) e adulto (b, c) 71

Figura 24 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA dos isolados de fitoplasmas Ag1-BR e Ag2-BR pertencentes ao grupo 16SrIII, com o uso das enzimas *Alu*I, *Bst*U, *Hha*I, *Hpa*II, *Mse*I, *Rsa*I; M: marcador molecular ØX174-*Hae*III 72

Figura 25 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA "F2n/R2" do isolado Ag1-BR pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III 73

Figura 26 - Árvore filogenética construída usando método *Neighbor-Joining* através das seqüências da região 16S rDNA "F2n/R2" dos isolados de fitoplasmas identificados em plantas de citros, plantas daninhas e em cicadelídeos da espécie *Agallia albidula* (seta) neste estudo, fitoplasmas representantes dos grupos 16SrIII, [16SrIII-K e 16SrIII-R (ZHAO et al., 2009)], 16SrVII e 16SrIX (Tabela 2). '*Ca.* Phytoplasma brasiliense' foi usando como *outgroup.* Os números nos ramos da árvore são os valores de *bootstrap*.....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Plantas hospedeiras de fitoplasmas no Brasil 28
Tabela 2 - Fitoplasmas representantes dos subgrupos incluídos dentro dos grupos 16SrIII, 16SrVII, 16SrIX e fitoplasmas representantes dos grupos 16SrI, 16SrII e 16SrXV utilizados nas análises de RFLP *in silico* e na construção da árvore filogenética 39
Tabela 3 - Detecção e identificação de fitoplasmas em plantas sintomáticas de citros encontradas em pomares no Estado de São Paulo 44
Tabela 4 - Coeficiente de similaridade derivado das análises de padrão de RFLP *in silico* das seqüências da região 16S rDNA 'F2nR2' do isolado CTp3-BR e de outros fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII 49
Tabela 5 - Coeficiente de similaridade derivado das análises de padrão de RFLP *in silico* das seqüências da região 16S rDNA 'F2nR2' do isolado CTp10-Br e de outros fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIX 50
Tabela 6 - Coeficiente de similaridade derivado das análises de padrão de RFLP *in silico* das seqüências da região 16S rDNA 'F2nR2' do isolado CTb1-Br e de outros fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrVII 50
Tabela 7 - Detecção e identificação de fitoplasmas em espécies de plantas daninhas, coletadas em pomares de citros no Estado de São Paulo 57
Tabela 8 - Coeficiente de similaridade derivado das análises de padrão de RFLP *in silico* das seqüências da região 16S rDNA "F2nR2" dos isolados BPp8-BR, LSp3-BR , SAp2-BR e de outros fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII 65
Tabela 9 - Coeficiente de similaridade derivado das análises de padrão de RFLP *in silico* das seqüências da região 16SrDNA "F2nR2" do isolado EHt4-BR e de outros fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrVII 66
Tabela 10 - Cicadelídeos identificados em pomares de citros do Estado de São Paulo, detecção e identificação de fitoplasma 70
Tabela 11 - Coeficiente de similaridade derivado das análise de padrão de RFLP *in silico* das seqüências da região 16S rDNA "F2nR2" do isolado Ag1-BR e de outros fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII 75

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA "F2n/R2" de fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII, subgrupos 16SrIII-A, 16SrIII-B, 16SrIII-C, 16SrIII-D, 16SrIII-F, 16SrIII-G, 16SrIII-J, 16SrIII-L e 16SrIII-M (Tabela 2) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III 97

ANEXO B - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA de fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII, subgrupos 16SrIII-N, 16SrIII-O, 16SrIII-P, 16SrIII-Q, 16SrIII-S e 16SrIII-U (Tabela 2) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III 98

ANEXO C - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA de fitoplasmas representantes do grupo 16SrVII (Tabela 2) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III 99

ANEXO D - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA de fitoplasmas representantes do grupo 16SrIX (Tabela 2) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III 100

1 INTRODUÇÃO

A citricultura é a segunda maior atividade agrícola do Estado de São Paulo, ficando atrás apenas do cultivo da cana-de-açúcar (FNP, 2009). Assim como toda cultura cultivada de modo intensivo no Brasil, a citricultura é afetada por muitos problemas fitossanitários, incluindo as doenças causadas por fungos, vírus, nematóides e, principalmente por, bactérias. Neste contexto, atualmente o principal problema fitossanitário da citricultura é o huanglongbing (HLB) (ex-greening). Apesar da falta do cumprimento dos Postulados de Koch, '*Candidatus* Liberibacter spp.' é considerada o agente etiológico do HLB (CHEN et al., 2009).

Em fevereiro de 2007, plantas de citros exibindo sintomas de folhas mosqueadas, frutos deformados, sementes abortadas e feixes vasculares da columela apresentando coloração alaranjada foram observadas em uma área livre de HLB no Estado de São Paulo (TEIXEIRA et al., 2008). Estes sintomas, característicos de HLB, sugeriram a presença de '*Ca.* Liberibacter spp.' nas plantas amostradas. Análises de PCR com *primers* espécificos revelaram a ausência de '*Ca.* Liberibacter spp.' nestas plantas. No entanto, análises de microscopia eletrônica revelaram corpos pleomórficos habitando os vasos do floema destas plantas, os quais são característicos de fitoplasmas. Através de análises de PCR com o uso de *primers* universais para estes procariotos, um fragmento da região compreendida entre o gene ribosomal 16S rRNA e a região intergênica 16S rRNA-23S rRNA foi amplificado. Com base no seqüenciamento desta região um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrIX ('*Ca.* Phytoplasma phoenicium') foi identificado nas plantas com sintomas de HLB. Assim, de acordo com Teixeira et al. (2008), três agentes são associados a sintomas de HLB no Brasil: duas alpha-proteobactérias ('*Ca*. L. americanus' e '*Ca*. L. asiaticus') e um fitoplasma pertecente ao grupo 16SrIX.

Em razão da ampla diversidade de fitoplasmas que tem se observado em várias culturas no Brasil (MONTANO et al., 2007; Tabela 1), é possível que além do fitoplasma do grupo16SrIX, outros fitoplasmas também possam estar associados à plantas de citros em pomares de diferentes regiões citrícolas do Estado de São Paulo. Em suporte a esta hipótese, foi verificado na China a associação de um fitoplama pertencente ao grupo 16SrI ('*Ca.* Phytoplasma asteris') a plantas de citros exibindo sintomas de HLB (CHEN et al., 2009). Além disto, um fitoplasma pertecente ao grupo 16SrII ('*Ca.* Phytoplasma aurantifolia') é associado a uma doença letal do citros, denominada *Witches'-broom disease of lime* (WBDL) (ZREIK et al., 1995), a qual é de ocorrência restrita a

países do oriente médio (BOVÉ, 1986; AROCHA et al., 2007; GARNIER; ZREIK; BOVÉ, 1991; GHOSH et al., 1999; BOVÉ et al., 2000).

Com base no exposto acima, os objetivos deste estudo foram:

(i) verificar a ocorrência e a diversidade de fitoplasmas associados a plantas de citros em diferentes regiões citrícolas do Estado de São Paulo através da análise da região 16S rDNA, e além disto;

(ii) identificar plantas daninhas hospedeiras dos fitoplasms encontrados em citros e;

(iii) identificar o(s) insetos(s) que possam ser potenciais vetores de fitoplasmas em pomares de citros.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Fitoplasmas

Fitoplasmas são bactérias fitopatogênicas habitantes de floema que estão associadas a mais de 700 doenças nas mais diversas culturas em todo o mundo (BERTACCINI, 2007). Estes procariotos pertencem à classe Mollicutes, a qual engloba bactérias pleomórficas, envoltas por uma única membrana, cujo tamanho varia de 200 a 800nm (WEISBURG et al., 1989; BERTACCINI, 2007). Os fitoplasmas geralmente causam danos no desenvolvimento de suas plantas hospedeiras, sendo que a colonização das plantas por eles é expressa na forma dos mais variados tipos de sintomas, entre eles os mais comuns são clorose generalizada, declínio de plantas, superbrotamento de ramos, deformação de folhas e órgão florais, enfezamento, avermelhamento de folhas, necrose de vasos do floema, filodia e virescência (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000; HOGENHOUT et al., 2008).

Os fitoplasmas perderam muitas rotas metabólicas durante sua evolução, como aquelas para a síntese de ATP, aminoácidos e até nucleotídeos, os quais são obtidos diretamente dos seus hospedeiros e, por esta grande dependência, ainda não são cultivados em meio artificial (BAI et al., 2006; OSHIMA et al., 2004), o que tem dificultado o seu estudo, principalmente com relação a testes de patogenicidade.

Os fitoplasmas são disseminados na natureza principalmente por insetos vetores (DAVIS et al., 1995), da seguinte maneira: os fitoplasmas são adquiridos durante a alimentação em plantas infectadas, os quais, uma vez no interior dos insetos, atravessam as células do trato digestivo, replicam-se em vários órgãos do inseto, atravessam as glândulas salivares e, por fim, alcançam a saliva e são subseqüentemente introduzidos em outras plantas (HOGENHOUT et al., 2008). Os insetos vetores de fitoplasmas são, em sua maioria, sugadores de floema de plantas, principalmente cigarrinhas pertencentes à família Cicadellidae, da ordem Auchenorrhyncha, às famílias Cixiidae, Delphacidae, Derbidae e Flatidae, da infraordem Fulgoromorpha, e psilídeos da família Psyllidae, ordem Sternorrhyncha. A grande maioria dos vetores está na família Cicadellidae e, dentro desta família, a subfamília Deltocephalinae é a mais importante por abrigar 75% das espécies conhecidas de vetores. Outras nove subfamílias da família Cicadellidae também comportam cigarrinhas vetoras de fitoplasmas, as quais são: Agallinae; Aphrodinae; Cicadellinae; Coelidiinae; Idiocerinae;

Macropsinae; Scarinae e Typhlocybinae (WEINTRAUB; WILSON, 2009; WEINTRAUB; BEANLAND, 2005).

2.1.2 Classificação de fitoplasmas

As bactérias conhecidas atualmente como fitoplasmas foram inicialmente denominados como organismos do 'tipo micoplasma', por serem morfologicamente parecidos com micoplasmas de animais, conforme observado através de microscopia eletrônica de transmissão (DOI et al., 1967). Além de serem morfologicamente parecidos com os micoplasmas de animais, que são bactérias da classe Mollicutes (desprovidas de parede celular), foi observado que esses organismos encontrados em plantas também eram sensíveis ao antibiótico tetraciclina, reforçando a sua classificação como procariotos (DOI et al., 1967). Com o avanço das técnicas moleculares, foi realizado o seqüenciamento da região 16S rDNA altamente conservada, a qual contém informações que permitem a análise filogenética das bactérias (VANDAMME et al., 1996). A análise da região 16S rDNA, através do seqüenciamento de nucleotídeos, mostrou que os organismos do 'tipo micoplasma' formam um grupo monofilético dentro da classe Mollicutes (LIM; SEARS, 1989; GUNDERSEN et al., 1994), a mesma classe que comporta os micoplasmas de animais, no entanto são mais próximos filogeneticamente dos Acholeoplasmas. No ano de 1994 os fitopatógenos deste grupo monofilético foram designados com o termo trivial fitoplasmas (INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATIC BACTERIOLOGY SUBCOMMITTEE ON THE TAXONOMY OF MOLLICUTES, 2004).

Atualmente a identificação e classificação de fitoplasmas são baseadas na análise do gene 16S rRNA. A partir da análise de um fragmento deste gene denominada região 16S rDNA "F2n/R2" (amplificada por PCR com o par de *primers* 16F2n/16R2), os fitoplasmas são classificados em grupos e subgrupos pela técnica de RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorphism-RFLP), e a partir da similaridade de nucleotídeos da região 16S rDNA "F2n/R2", são classificados em espécies putativas, referidas como '*Candidatus* Phytoplasma'.

A análise de RFLP da região 16S rDNA "F2n/R2" amplificada por PCR, tem fornecido bases moleculares confiáveis para a identificação e classificação de uma ampla gama de fitoplasmas (ZHAO et al., 2009) e este esquema facilitou muito os estudos tanto na diversidade genômica de

fitoplasmas quanto na epidemiologia das doenças associadas a fitoplasmas (LEE, DAVIS, GUNDERSEN-RINDAL, 2000).

O primeiro esquema de classificação de fitoplasmas baseado na técnica de RFLP foi publicado em 1993 (LEE et al., 1993). Neste trabalho 40 fitoplasmas distintos foram analisados da seguinte maneira: a região 16S rDNA "F2n/R2" foi digerida por 15 enzimas de restrição e com base no coeficiente de similaridade (*F*) (NEI; LI, 1979), derivado dos perfis de RFLP, foram diferenciados nove grupos, designados de 16SrI até 16SrIX, e 14 subgrupos, os quais são identificados por letras, como por exemplo, 16SrI-A. Em 1998 o esquema foi ampliado (LEE et al., 1998) e 14 grupos e 32 subgrupos foram estabelecidos, com base também em coeficientes de similaridade dos padrões de RFLP de 17 enzimas de restrição, análise filogenética e similaridade de nucleotídeos seqüenciados. Neste esquema, um fitoplasma de um novo subgrupo era descrito quando apresentava diferença no perfil de restrição correspondente a uma ou mais enzimas, quando comparado com os demais fitoplasmas do mesmo grupo, enquanto que os fitoplasmas de diferentes grupos possuíam coeficiente de similaridade de no máximo 0,87. Vários novos grupos e subgrupos de fitoplasmas foram descritos seguindo estes critérios (MONTANO et al., 2000, 2001; JOMANTIENE et al., 2002; BARROS et al., 2002; LEE et al., 2004; AROCHA et al., 2005).

Uma das alternativas para a geração de perfis de RFLP é a restrição *in silico* (realizada através de programas computacionais) a partir do seqüenciamento da região 16S rDNA "F2n/R2" dos fitoplasmas. Através deste método, novos grupos e subgrupos foram delineados e no momento existem 29 grupos e mais de 100 subgrupos descritos (WEI et al., 2007; 2008; ZHAO et al., 2009; DAVIS et al., 2010). A digestão *in silico* facilitou a identificação de fitoplasmas, uma vez que a digestão em laboratório com as 17 enzimas de restrição é inviável para a análise de grande quantidade de amostras.

Recentemente foram estabelecidas regras claras para o delineamento de novos grupos e subgrupos de fitoplasmas, as quais são (ZHAO et al., 2009): quando dois fitoplasmas apresentam coeficiente de similaridade com valor 1,0, significa que eles pertencem ao mesmo grupo e subgrupo, quando o valor é de 0,98 ou 0,99, os fitoplasma são variantes de um mesmo subgrupo, se for igual ou menor de 0,97 quando comparado com todos os outros fitoplasmas de um subgrupo ele é considerado um novo subgrupo (WEI et al., 2008), e somente é considerado como representante de um novo grupo quando o valor do coeficiente de similaridade é de 0,85 ou menor.

A proposição da classificação de fitoplasmas em espécies putativas, denominadas de '*Ca.* Phytoplasma', teve origem na mesma época em que foram publicados os primeiros esquemas de classificação baseados na análise de RFLP da região 16S rDNA "F2n/R2". Na mesma ocasião em que o termo fitoplasma foi adotado para designar os até então organismos do tipo micoplasma, foi feita a proposta de que fitoplasmas poderiam ser distinguidos ao nível taxonômico de gênero (INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATIC BACTERIOLOGY SUBCOMMITTEE ON THE TAXONOMY OF MOLLICUTES, 1993). A partir de então, entre 1994 e 2004, várias espécies putativas de '*Ca.* Phytoplasma' foram descritas, porém não havia um delineamento exato do que seria uma espécie candidata.

As orientações para a descrição de novas espécies putativas foram estabelecida em 2004 pelo IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma taxonomy group (PHYTOPLASMA/ SPIROPLASMA WORKING TEAM – PHYTOPLASMA TAXONOMY GROUP, 2004). Segundo esta publicação, a descrição de uma espécie '*Ca.* Phytoplasma' é baseada em uma seqüência única da região 16S rDNA (>1.200 pb, representando a região "F2nR2"), onde um fitoplasma pode ser descrito como uma nova espécie '*Ca*. Phytoplasma' se a seqüência da sua região 16S rDNA tiver valor de similaridade de 97,5% ou menor com a seqüência de qualquer isolado de referência de uma espécie '*Ca*. Phytoplasma' descrita.

Existe um consenso de que cada grupo 16Sr relatado pela técnica de RFLP deve representar ao menos uma espécie putativa (LEE et al., 1998; PHYTOPLASMA/ SPIROPLASMA WORKING TEAM – PHYTOPLASMA TAXONOMY GROUP, 2004; WEI et al., 2007; 2008). No entanto, existem casos nos quais fitoplasmas que compartilham >97,5% da sua seqüência da região 16S rDNA "F2n/R2" e são pertencentes ao mesmo grupo 16Sr, claramente representam populações separadas ecologicamente, e por isso, merecem uma descrição como uma espécie distinta. Para estes casos, a descrição de duas espécies putativas diferentes é recomendada somente quando todas as três condições descritas a seguir se aplicam: a) os dois fitoplasmas são transmitidos por vetores diferentes; b) os dois fitoplasmas têm hospedeiros naturais diferentes (ou, pelo menos, seu comportamento é significantemente diferente na mesma planta hospedeira); c) há evidências de diversidade molecular significante, a qual é obtida tanto por hibridização de sondas de DNA clonadas, como por reações sorológicas ou ensaios baseados em reações de PCR (INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATIC BACTERIOLOGY SUBCOMMITTEE ON THE TAXONOMY OF MOLLICUTES, 2004). É o que acontece no caso dos fitoplasmas

pertecentes ao grupo 16SrX que causam proliferação da macieira, declínio da pereira e amarelos em fruteiras de caroço na Europa. Estes fitoplasmas são classificados como espécies putativas '*Ca*. Phytoplasma mali', '*Ca*. Phytoplasma pyri' e '*Ca*. Phytoplasma prunorum', respectivamente. Embora todos pertençam ao grupo 16SrX, são classificados em diferentes espécies putativas por possuírem diferentes vetores, hospedeiros naturais e apresentarem diversidade molecular (SEEMÜLLER; SCHNEIDER, 2004).

Existem até o momento 26 espécies de '*Ca.* Phytoplasma' descritas (AROCHA et al., 2005; DAVIS et al., 1997; GRIFFITHS et al., 1999; HIRUKI; WANG, 2004; PHYTOPLASMA/ SPIROPLASMA WORKING TEAM – PHYTOPLASMA TAXONOMY GROUP, 2004; JUNG et al., 2002, 2003a, 2003b; LEE et al., 2004a, 2004b; MARCONE et al., 2004a, 2004b; MONTANO et al., 2001a; SAWAYANAGI et al., 1999; SCHNEIDER et al., 2005; VALIUNAS et al., 2006; VERDIN et al., 2003; ZREIK et al., 1995). No entanto, outras espécies putativas'*Ca.* Phytoplasma' ainda deve ser descritas.

2.1.3 Fitoplasmas no Brasil

Os fitoplasmas foram descobertos através da técnica de microscopia eletrônica em 1967 (DOI et al., 1967) e, pela mesma técnica, foram relatados no Brasil já no ano de 1968, em plantas de tomate (KITAJIMA; COSTA, 1968). Com os avanços na área da biologia molecular e a utilização de técnicas de PCR, RFLP e seqüenciamento, que deram origem a esquemas de classificação de fitoplasmas, conforme descrito anteriormente, foi possível conhecer a diversidade genética de fitoplasmas encontrados no Brasil. Fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVII, 16SrIX, 16SrXIII e 16SrXV foram descritos no país até o momento, associados a mais de 35 doenças de plantas cultivadas ou não cultivadas (Tabela 1) (DAVIS et al., 1994; BEDENDO et al., 1998; 1999; AMARAL MELLO, 2003; BARROS et al., 2002; MELO, 2007; 2008; MONTANO et al., 2001a; 2007a; TEIXEIRA et al., 2008; DUARTE et al., 2009; RAPUSSI-DA-SILVA, 2010; ECKSTEIN, 2010).

Dentre os fitoplasmas encontrados no país, vários deles foram descritos pela primeira vez no Brasil, como, por exemplo, os fitoplasmas do grupo 16SrIII, subgrupo J (16SrIII- J), do grupo 16SrVII, subgrupo B (16SrVII- B) e os fitoplasmas do grupo 16Sr XV, os quais são associados a sintomas de superbrotamento em *Sechium edule* (chuchuzeiro) (MONTANO et al., 2000), *Erigeron*

sp. (buva) (BARROS et al., 2002) e *Hibiscus rosa-sinensis* (hibisco) (MONTANO et al., 2001b), respectivamente. Estes fitoplasmas são aparentemente restritos à América do Sul, uma vez que não foram relatados em outras regiões do mundo.

Fitoplasmas associados a doenças de grande importância econômica foram descritos no Brasil, como o fitoplasma 16SrI, subgrupo B (16SrI-B), agente causal do enfezamento vermelho do milho (BEDENDO et al., 1998), o fitoplasma do grupo 16SrIX, associado a plantas de citros com sintomas de HLB (TEIXEIRA et al., 2008) e do grupo 16SrIII, subgrupo B, associado ao superbrotamento da mandioca (BARROS et al., 1998; FLÔRES, 2010).

Tabela 1 - Plantas hospedeiras de fitoplasmas no Brasil

(continua)

Família	**Espécie**	**Grupo 16Sr**	**Local**	**Referência**
Amaranthaceae	*Celosia spicata*	16SrIII-J	SP	Eckstein, 2008
	C. argêntea	16SrIII-J	SP	Eckstein, 2008
Ampelidaceae	*Vitis vinifera*	16SrI –B	SP, PR	Neroni, 2009
		16SrIII	SP	Neroni, 2009
		16SrIII-J	PR	Neroni, 2009
Asteraceae	*Agetarum conyzoides*	16SrIII	SP	Eckstein, 2010
	Emilia sonchifolia	16SrIII, 16SrVII	SP	Eckstein, 2010
	Sonchus oleraceae	16SrIII, 16SrVII	SP	Eckstein, 2010

Tabela 1 - Plantas hospedeiras de fitoplasmas no Brasil

(continuação)

Asteraceae	*Bidens pilosa*	16SrIII, 16SrVII	SP	Eckstein, 2010
Apocynaceae	*Catharanthus roseus*	16SrII	SP,RN	Barros et al., 1998
		16SrII	SP	Bedendo et al., 1999
		16SrIX	PE, SP, RN	Barros et al., 1998
		16SrIX	MT	Bedendo et al., 1999
		16SrIII	RJ	Montano et al., 2001c
		16SrIX	MG	Eckstein et al., 2009
		16SrXV	RJ	Montano et al., 2001b
		16SrXV	SP	Kreyci et al., 2010
Begoniaceae	*Begonia* sp.	16SrIII	SP	Ribeiro et al., 2006
Brassicaceae	*Brassica oleraceae* var. *capitata*	16SrI-B, 16SrIII	SP	Mello, 2007
	B. oleraceae var. *botrytis*	16SrIII-J, 16SrI, 16SrIII,	SP	Rapussi-da-Silva, 2010
		16SrXV	RS	Rapussi-da-Silva, 2010
	B. oleraceae var. *italica*	16SrI-B, 16SrIII, 16SrXIII		Eckstein, 2010
	Lepidium virginicum	16SrIII	RS	Eckstein, 2010
Caricaceae	*Papaya* sp.	16SrXIII	ES	Melo, 2007
Compositae	*Erigeron bonariensis*	16SrI	SP	Bianchini; Bedendo, 2000
		16SrVII-B	SP	Barros et al., 2002
		16SrIII	SP	Eckstein, 2010
Cucurbitaceae	*Cucurbita moschata*	16SrIII-J	RJ	Montano et al., 2006
	Luffa cylindrica	16SrIII	RJ	Montano et al., 2007
	Momordica charantia	16SrIII-J	RJ	Montano et al., 2000
	Sechium edule	16SrIII-J	RJ	Montano et al., 2000

Tabela 1 - Plantas hospedeiras de fitoplasmas no Brasil

(continuação)

Cucurbitaceae	*Sicana odorífera*	16SrIII	RJ	Montano et al., 2007
	Cucurbita pepo	16SrIII	SP	Melo et al., 2009
Euphorbiaceae	*Manihotis esculenta*	16SrIII-B	CE,SP	Barros et al., 1998
		16SrIII-B	SP	Flôres, 2010
	Euphorbia pulcherrima	16SrIII	SP	Ribeiro et al., 2006
		16SrIII	RJ	Pereira et al., 2006
	Ricinus communis	16SrIII	SP	Eckstein, 2010
Graminae	*Zea mays*	16SrI-B	ND	Bedendo et al., 1998
		16SrIII-B	SP	Barros et al., 1998
Lamiaceae	*Saccharum* sp.	16SrI-B	SP	Silva et al., 2009
	Leonorus sibiricus	16SrIII	SP	Eckstein, 2010
Leguminosae	*Crotalaria juncea*	16SrIII-B	SP	Barros et al., 1998
	Crotalaria lanceolata	16SrV	SP	Amaral Mello et al., 2004
		16SrIII	SP	Eckstein, 2010
Malvaceae	*Hibiscus rosa-sinensis*	16SrXV	RJ	Montano et al., 2001a
			SP	Silva et al., 2009
	Sida sp.	16SrXV	SP	Eckstein et al., 2010
	Sida rhombifolia	16SrIII	SP	Eckstein, 2010
Meliaceae	*Melia azeradach*	16SrIII-B	RG	Duarte et al., 2009
Nyctaginaceae	*Bouganvillea spectabilis*	16SrI	SP	Silva et al, 2006
Palmae	*Elaeis guineensis*	16SrI	PA	Brioso et al., 2006
Passifloraceae	*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*	16SrIII- B	SP, RJ, SE, PR, BA	Ribeiro, 2008
Rosaceae	*Malus domestica*	16SrIII	RS	Ribeiro et al., 2007

Tabela 1 - Plantas hospedeiras de fitoplasmas no Brasil

(conclusão)

	Fragaria sp.	16SrIII, 16SrXIII	ES	Melo, 2008
Rubiaceae	*Paulicourea marcgravii*	16SrIII	SP	Eckstein, 2010
	Citrus sp.	16SrIX	SP	Teixeira et al., 2008
Solanaceae	*Lycopersicon esculentum*	16SrIII	SP	Amaral Mello, 2003
		16SrIII	ES	Amaral Mello, 2003
	Solanum melongena	16SrIII-B	SP,DF	Barros et al., 1998
		16SrIII-U	SP	Amaral Mello et al., 2010
	Nicandra physalodes	16SrIII-J	SP	Eckstein, 2010

Nota:
SP: São Paulo; PR: Paraná; RN: Rio Grande do Norte; PE: Pernambuco; MT: Mato Grosso; RJ: Rio de Janeiro; MG: Minas Gerais; ES: Espirito Santo; CE: Ceará; RS: Rio Grande do Sul; BA: Bahia; SE: Sergipe; DF: Distrito Federal
ND - Local não definido

2.1.4 Fitoplasmas em citros

Em muitas partes do mundo fitoplasmas já foram associados a doenças na cultura do citros (BOVÉ, 1986; GARNIER; ZREIK; BOVÉ, 1991; GHOSH et al., 1999; BOVÉ et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2008; CHEN et al., 2009).

Um fitoplasma do grupo 16SrII, '*Ca.* Phytoplasma aurantifolia', é associado à *Witches' Broom Disease of Lime* (WBDL) em plantas de citros. A primeira ocorrência da WBDL ocorreu em Omã por volta de 1970 (BOVÉ, 1986; GARNIER; ZREIK; BOVÉ, 1991). Os sintomass de WBDL são superbrotamento, folhas pequenas e seca dos ponteiros (TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000). O cicadelídeo *Hishimonus phycitis* (Distant) foi identificado como um candidato a vetor (BOVÉ, et al., 1993). A WBDL ainda não foi identificada no Brasil e a sua ocorrência está restrita a países do continente asiático, sendo já identificada em pomares de citros em Omã (BOVÉ, 1986), Emirados Árabes (GARNIER et al., 1991), Índia (GHOSH et al., 1999) e Irã (BOVÉ et al., 2000).

Na China, em 2006, e no Brasil, em 2007, distintos fitoplasmas foram associados ao HLB. Na China, o fitoplasma associado ao HLB foi identificado como um membro do grupo 16SrI, '*Ca.* Phytoplasma asteris' (CHEN et al., 2009), enquanto no Brasil, um fitoplasma membro do grupo 16SrXI, '*Ca*. Phytoplasma phoenicium', foi identificado no Estado de São Paulo (TEIXEIRA et al., 2008). Sobre estes fitoplasmas, pouco se sabe.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Coleta de amostras de plantas de citros em pomares do Estado de São Paulo

Entre os meses de junho e outubro de 2010, pomares localizados nos municípios de Araraquara, Bebedouro, Piracicaba e Taquarituba, Estado de São Paulo, foram amostrados (Figura 1). Em cada pomar, plantas de citros encontradas com sintomas de clorose foliar (Figura 2) foram coletadas para análises visando a detecção de fitoplasmas. Amostras foliares assintomáticas também foram coletadas.

Figura 1 - Mapa do Estado de São Paulo indicando os municípios (setas) onde pomares foram amostrados

2.2.2 Identificação de inseto (s) candidato (s) a vetor

Em cada pomar, localizados nos municípios indicados na Figura 1, insetos foram coletados na vegetação daninha localizada no interior e em áreas adjacentes aos pomares. Os insetos foram coletados com auxílio de uma rede entomológica e transferidos para sacos plásticos. Em laboratório, os insetos sugadores de floema pertencentes à família Cicadellidae (cicadelídeos) foram separados em mofortipos.

Exemplares de cada morfotipo foram secos em estufa a 60°C por 24 h para posterior identificação taxonômica, a qual foi realizada pelas Dras. Ana Clara de Souza Mello Lucena Gonçalves (Universidade Federal do Rio de Janeiro) e Keti Maria Rocha Zanol (Universidade Federal do Paraná).

Outros exemplares dos morfotipos foram utilizados para testes de transmissão. Cicadelídeos dos diferentes morfotipos foram confinados individualmente em plantas-teste de citros (*Citrus limonia* Osbeck) por um período de acesso a inoculação (PAI) de sete dias. Após o PAI, os cicadelídeos foram coletados e armazenados a -20ºC. Posteriormente estes cicadelídeos foram

analisados individualmente quanto à presença de fitoplasma por *nested* PCR, conforme descrito no item 2.2.6.

As plantas-teste serão futuramente analisadas a fim de verificar a transmissão de fitoplasmas.

2.2.3 Identificação de plantas daninhas hospedeiras de fitoplasmas

Plantas daninhas encontradas no interior e em áreas adjacentes aos pomares localizados nos municípios indicados na Figura 1 foram coletadas para as análises de *nested* PCR para verificar a presença de fitoplasmas. As plantas coletadas foram taxonomicamente identificadas de acordo com Lorenzi (1990; 2006)**.**

2.2.4 Extração de DNA de amostras foliares de plantas de citros e plantas daninhas

As extrações do DNA total das amostras foliares de plantas de citros e plantas daninhas foram realizadas conforme protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). Um pedaço de tecido foliar foi macerado em tubos de 2,0 mL com o auxílio de um pistilo, na presença de 500 µl de tampão de extração CTAB e 1 µl de β-mercaptoetanol. Após a maceração, a suspensão foi incubada a 60°C. Após 2 horas, a suspensão foi submetida a uma centrifugação (13000 rpm/10 minutos). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 600 µL de CIA (24 partes de clorofórmio e uma parte de álcool isoamílico). A mistura foi agitada em vortex e submetida a uma centrifugação (1300 rpm/10 minutos). O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo onde adicionou-se 200 µL de isopropanol. A mistura foi incubada a -4 °C. Após duas horas, procedeu-se a uma centrifugação (1000 rpm/5 minutos) e todo o sobrenadante foi removido. O *pellet* foi lavado com álcool 70%, seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de água milliQ.

2.2.5 Extração de DNA dos cicadelídeos

As extrações de DNA total dos insetos coletados foram realizadas conforme protocolo descrito por Marzachi, Veratti e Bosco (1998). Cidadelídeos individualizados foram macerados em tubos de 1,5mL contendo 100 µL do tampão CTAB com o auxílio de um pistilo. Após a maceração, a suspensão foi incubada por 30 min a 60°C. Em seguida, foram adicionados 200 µL de uma solução

de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1, respectivamente, e a mistura foi agitada em vortex e submetida à centrifugação (13000 rpm/20 minutos). O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de 1,5mL, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol. A mistura foi incubada a -4°C por um período mínimo de 12 horas e então centrifugada (13000 rpm/5 minutos). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com álcool 70%, seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de água milliQ.

2.2.6 Detecção dos fitoplasmas por *nested* PCR

O DNA total extraído de insetos ou plantas foi utilizado em reações de *nested* PCR com o emprego dos *primer*s universais P1/P7 (DENG; HIRUKI, 1991; SMART et al., 1996) e F2n/R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996) para detecção de fitoplasmas. Cada reação de PCR constou de um volume de 18,4 µL de água milliQ; 0,5 µL de cada *primer* (20 pmol.μl^{-1}); 2 µL de solução de deoxinucleotídeo trifosfato (2,5 mM de cada nucleotídeo); 3,0 µL de tampão de PCR (10X); 0,1 µL de taq 5 U.μL^{-1} (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 0,5 µL de DNA total extraído de inseto ou planta, num volume final de 25 µL. As amplificações foram visualizadas em transiluminador ultravioleta, após a aplicação de *Sybr safe* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ao gel de agarose (1%).

2.2.7 Análise de RFLP

Os fragmentos genômicos da região 16S rDNA "F2n/R2" amplificados em *nested* PCR com os *primers* F2n/R2 foram submetidos à análise de RFLP através da digestão com enzimas de restrição (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA), segundo as instruções dos fabricantes. Fitoplasmas do grupo 16SrIII foram analisados com o uso das enzimas *Alu*I, *BstU*I, *Hha*I, *Hpa*II, *Mse*I e *Rsa*I, enquanto que fitoplasmas do grupo 16SrVII foram analisados com as enzimas *Alu*I, *Bfa*I, *Dra*I, *Hae*III, *Hinf*I, *Hha*I, *Mse*I e *Taq*I, e aqueles pertencentes ao grupo 16SrIX com as enzimas *Alu*I, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Rsa*I e *Taq*I.

Os produtos da digestão foram analisados através da eletroforese em gel de poliacrilamida (5%), o qual foi corado com *Sybr Safe* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A visualização das bandas foi realizada em transiluminador ultravioleta. O marcador molecular utilizado como padrão foi o Ø174 *Hae*III *digest* (Fermentas, Carlsbad, CA, USA). Os padrões de RFLP obtidos foram

comparados com padrões de RFLP da região 16S rDNA “F2n/R2” de fitoplasmas pertencentes aos diversos grupos e subgrupos de fitoplasmas disponíveis na literatura (LEE et al., 1998; MONTANO et al., 2000; BARROS et al., 2002; ZHAO et al., 2009; AMARAL MELLO et al., 2010; DAVIS et al., 2010).

2.2.8 Clonagem

Os fragmentos de PCR amplificados correspondentes à região 16S rDNA “F2n/R2” dos fitoplasmas foram purificados com o uso do *Kit* PuriLink (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e quantificados pela comparação do fragmento do marcador Lambda DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em quantidades estimadas os fragmentos de PCR foram ligados em vetor plasmidial pGEM utilizando-se o *kit* pGEM-T Easy Vector System I (Promega, Sunnyvale, CA, USA). Os produtos desta ligação foram inseridos em *Escherichia coli* DH5 α através da transformação pelo método do choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Em seguida, às células transformadas foram adicionados 200 µL de meio de cultura SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) pré-aquecido a 37 ºC. Os tubos foram mantidos por 2-3 horas em agitador a velocidade de 200 rpm, à temperatura de 37 ºC, para o crescimento das células transformadas. Após este período, uma alíquota de 100 µL da suspensão de células transformadas foi transferida para placas de Petri contendo meio LB sólido (Luria-Bertani) (BERTANI, 1951; LURIA; BURROUS, 1957) acrescido de 20 µL do antibiótico ampicilina (100 $mg.mL^{-1}$), 20 µL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosida) e 20 µL de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosida) na concentração de 50 mg/mL. As placas foram incubadas a 37 ºC até o crescimento das colônias. Foram selecionadas várias colônias transformadas de cada amostra e transferidas, em câmara de fluxo, para tubos do tipo *Falcon*, contendo 5 mL de meio de cultura LB líquido. A incubação ocorreu sob temperatura de 37 ºC por 12 h, em agitador ajustado para a velocidade de 200 rpm.

Para cada colônia multiplicada correspondente a um clone, uma alíquota da suspensão bacteriana foi submetida à reação de PCR utilizando-se o par de *primers* universais R16F2n/16R2 para verificar a presença do fragmento correspondente à região 16S rDNA “F2n/R2” no vetor plasmidial e assim, confirmar a clonagem. Reações de PCR foram realizadas para várias colônias selecionadas aleatoriamente até a obtenção de cinco clones de cada amostra. Após a confirmação da

clonagem, a extração plasmidial foi realizada individualmente de cada clone utilizando o *Kit* GeneJET™ *Plasmid Miniprep* (Fermentas, Carlsbad, CA, USA).

2.2.9 Seqüenciamento da região 16S rDNA "F2n/R2" dos fitoplasmas e análise das seqüências

Cinco clones de cada amostra correspondentes a região 16S rDNA "F2n/R2" foram seqüenciados pela empresa *Macrogen* (Seul, Coreia do Sul) usando o par de *primers* SP6/T7.

As seqüências obtidas foram montadas em *contigs* com o auxílio dos programas *Bio Edit* V. 7.0.5.3 (HALL, 1999) e *Staden Package* (STADEN, 1996).

2.2.10 Análise de RFLP *in silico*

Foi realizada a análise de RFLP simulada por computador (*in silico*) da região 16S rDNA "F2n/R2" dos fitoplasmas encontrados neste estudo e de fitoplasmas relacionados descritos na literatura (ANEXOS A, B, C e D). As seqüências de nucleotídeos foram cortadas e alinhadas, no programa Bio Edit V. 7.0.5.3 (HALL, 1999) e exportadas para o programa *pDRAW*32 (AcaClode Software) para a digestão simulada por computador (WEI et al., 2007). Cada "fragmento" de DNA foi "digerido" com 17 enzimas de restrição distintas estabelecidas para a classificação de fitoplasmas em grupos e subgrupos (LEE et al., 1998; WEI et al., 2007). Estas enzimas foram *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*AI (*Mbo*I), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I e *Taq*I. Após a restrição *in silico*, foi gerada uma imagem simulada da eletroforese em um gel de agarose a 3%.

2.2.11 Análise do coeficiente de similaridade

Para o cálculo do coeficiente de similaridade, os padrões de RFLP *in silico* dos fitoplasmas encontrados neste estudo foram comparados com os perfis dos fitoplasmas representantes dos subgrupos referentes ao grupo aos quais pertenciam. Os representantes de subgrupos dos grupos 16SrIII, 16SrVII e 16SrIX utilizados nesta análise estão descritos na Tabela 2. Os fitoplasmas representantes dos grupos 16SrIII-K, 16SrIII-R e 16SrIII-T (ZHAO et al., 2009; VALIUNAS et al.,

2009) não foram incluídos nesta análise por não possuírem seqüencias de nucleotídeos de tamanho mínimo para tal análise (WEI et al., 2007; 2008; ZHAO et al., 2009).

O coeficiente de similaridade (*F*) foi calculado para cada par de fitoplasma de acordo com a fórmula previamente descrita por Nei e Li (1979): $F=2N_{xy}/(N_x + N_y)$, na qual *x* e *y* são dois determinados fitoplasmas em análise, N_x e N_y são o número total de bandas resultantes da digestão pelas 17 enzimas nos fitoplasmas *x* e *y*, respectivamente, e N_{xy} é o número de bandas compartilhadas pelos dois fitoplasmas.

Tabela 2 - Fitoplasmas representantes dos subgrupos incluídos dentro dos grupos 16SrIII, 16SrVII, 16SrIX e fitoplasmas representantes dos grupos 16SrI, 16SrII e 16SrXV utilizados nas análises de RFLP *in silico* e na construção da árvore filogenética

Grupo	**Subgrupo**	**Isolados**	**Referência**
16SrIII	A	CX	ZHAO et al., 2009
16SrIII	B	CYE-C	ZHAO et al., 2009
16SrIII	C	PB1	ZHAO et al., 2009
16SrIII	D	GR1	ZHAO et al., 2009
16SrIII	F	MW1	ZHAO et al., 2009
16SrIII	G	WWB rnnA	ZHAO et al., 2009
16SrIII	J	ChWBIII	ZHAO et al., 2009
16SrIII	L	EFMN	ZHAO et al., 2009
16SrIII	M	PPT-MT117-1	ZHAO et al., 2009
16SrIII	N	PPT-AR6	ZHAO et al., 2009
16SrIII	O	DanVir rnnA	ZHAO et al., 2009
16SrIII	P	DanVir rnnB	ZHAO et al., 2009
16SrIII	Q	BRWB	ZHAO et al., 2009
16SrIII	S	WX	ZHAO et al., 2009
16SrIII	U	EGW	AMARAL MELLO et al., 2010
16SrVII	A	AshY1	LEE et al., 1998
16SrVII	B	EriWB	BARROS et al., 2002
16SrVII	C	ArAWB	CONCI et al., 2005
16SrIX	A	PPWB	LEE et al., 1998
16SrIX	B	Phoenicium str 21	VERDIN et al., 2003
16SrIX	C	PEY	SEEMUELLER et al., 1998
16SrIX	D	Phoenicium str A4	VERDIN et al., 2003
16SrIX	E	JunWB	DAVIS et al., 2010
16SrIX	ND	HLB	TEIXEIRA et al., 2008
16SrI	ND	ND	LIM; SEARS, 1989
16SrII	ND	WBDL	ZREIK et al., 1995
16SrXV	ND	HibWB26	MONTANO et al., 2001

Nota:
ND - Não determinado

2.2.12 Análise filogenética

Árvores filogenéticas foram construídas com base na seqüência de nucleotídeos correspondente a região 16S rDNA "F2n/R2" usando o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2004) através de múltiplos alinhamentos obtidos com o programa *Clustal* W (THOMPSON et al., 1994). O método de agrupamento *Neighbor-joining* foi utilizado na construção das árvores filogenéticas com *bootstrap* igual a 1000. Os fitoplasmas utilizados na construção da árvore estão listados na Tabela 2. A seqüência da região 16S rDNA do *Acholeplasma laidlawii* (WEISBURG et al., 1989) foi usada como *outgroup*.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Fitoplasmas em plantas de citros

2.3.1.1 Detecção e identificação de fitoplasmas em plantas de citros por *nested* PCR

Amostras foliares de plantas de citros encontradas com sintomas de clorose foliar (Figura 2) foram coletadas em pomares localizados nos municípios de Araraquara, Bebedouro, Piracicaba e Taquarituba, Estado de São Paulo.

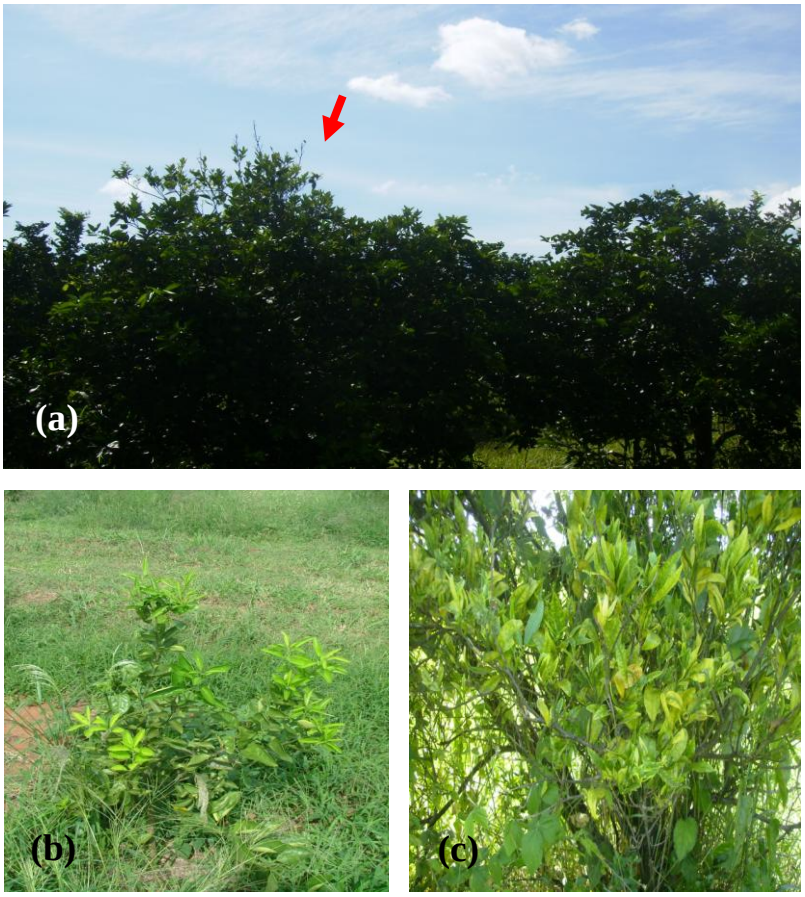


Figura 2 - Plantas de citros exibindo sintomas de clorose foliar [Piracicaba (a); Araraqura (b); Piracicaba (c)] em pomares no Estado de São Paulo

Um fragmento de DNA de aproximadamente 1,2 Kb foi amplificado a partir de amostras foliares de plantas de citros sintomáticas (Figura 2) quando o par de *primer* 16F2n/16R2 foi usado em *nested* PCR evidenciando a presença de fitoplasmas (Figura 3a).

Fitoplasmas foram detectados em amostras foliares oriundas dos pomares localizados nos municípios de Bebedouro (2 amostras) e Piracicaba (11 amostras) (Tabela 3). Fitoplasmas não foram detectados em amostras foliares de plantas assintomáticas.

Todas as amostras foliares também foram analisadas em *duplex* PCR com os *primers* específicos GB1/GB3 (TEIXEIRA et al., 2005) e A2/J5 (HOCQUELLET et al., 1999) a fim de verificarmos a presença de '*Ca.* Liberibacter americanus' e/ou '*Ca.* Liberibacter asiaticus', respectivamente. Todas as reações de *duplex* PCR foram negativas (Figura 3b).

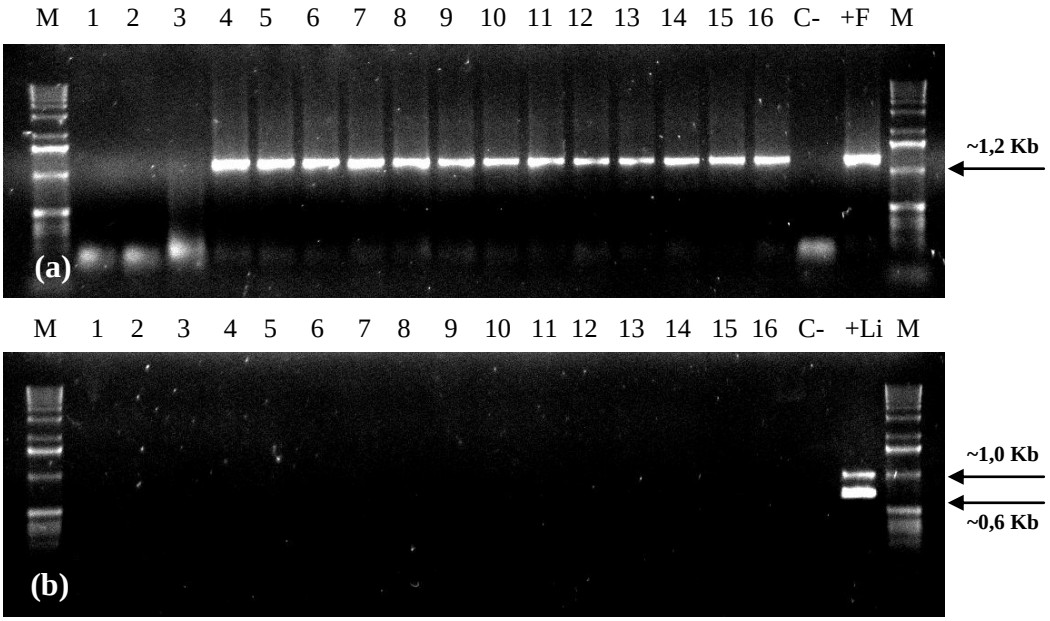


Figura 3 - Detecção em gel de agarose (1%) de fitoplasmas encontrados em amostras de plantas de citros coletadas em pomares no Estado de São Paulo (a). M= marcador molecular (1kb ladder); 1= amostra sintomática de citros coletada em Araraquara; 2 e 3= amostras sintomáticas de citros coletadas em Taquarituba; 4 e 5= amostras sintomáticas de citros coletadas em Bebedouro e 6 a 16= amostras sintomáticas de citros coletadas em Piracicaba; C-= controle negativo, amostra sadia de citros; +F= controle positivo, fitoplasma do grupo 16SrIX encontrado em plantas de *Catharanthus roseus* (vinca) (Barbosa, J. C., dados não publicados). Análise em gel de agarose (1%) do produto da *duplex* PCR para detecção de *Ca.* Liberibacter americanus' e '*Ca.* Liberibacter aiaticus' em amostras de plantas de citros coletadas em pomares do Estado de São Paulo (b). +Li= controle positivo, '*Ca.* Liberibacter americanus' e '*Ca.* Liberibacter asiaticus'

Para identificar os fitoplasmas quanto ao subgrupo a que pertencem, a região 16S rDNA "F2n/R2" foi submetida a análise de RFLP a partir do produto de PCR amplificado com o par de *primer* 16F2n/16R2.

2.3.1.2 Identificação de fitoplasmas por RFLP

A comparação dos padrões de RFLP aqui obtidos com aqueles já publicados para a região 16S rDNA "F2n/R2" de outros fitoplasmas (ANEXOS A, B, C e D), revelou a presença de fitoplasmas distintos associados a plantas de citros em Bebedouro e Piracicaba. Assim, com base nas análises de RFLP, os isolados de Bebedouro, denominados CTb1-BR e CTb2-BR, pertencem ao grupo 16SrVII (Tabela 3), enquanto os isolados de Piracicaba, CTp1-BR a CTp9-BR e CTp11-BR pertencem ao grupo 16SrIII (Tabela 3) e o isolado CTp10-BR pertence ao grupo 16SrIX (Tabela 3). Todos estes isolados apresentaram perfis novos para alguma enzima utilizada para análise de RFLP, os quais não foram observados para nenhum outro fitoplasma do respectivo grupo (Tabela 3; Figuras 4 e 5; ANEXOS A, B, C e D). Os isolados CTp1-BR a CTp9-BR e CTp11-B, grupo 16SrIII, apresentaram um novo perfil de RFLP para a enzima *Rsa*I. Este novo perfil está apresentado na Figura 4, representado pelos isolados CTp1-BR a CRp5-BR. Já o isolado CTp10-BR, grupo 16SrIX, apresentou novos perfis de RFLP para as enzimas *Alu*I e *Hae*III (Figura 5b). Os isolados CTb1-BR e CTb2-BR, grupo 16SrVII, apresentaram um novo perfil de RFLP para a enzima *Mse*I (Figura 5a), representado pelo isolado CTb1-BR. A existência destes novos perfis nos leva a entender que os fitoplasma identificados em plantas de citros são novos fitoplamas, que ainda não foram descritos.

Tabela 3 - Detecção e identificação de fitoplasmas em plantas sintomáticas de citros encontradas em pomares no Estado de São Paulo

Localidade	**S[1]**	**AS[2]**	**Amostra[3] positiva**	**Fitoplasma Grupo 16S rDNA**
Araraquara	0/9	0/10	--	--
Bebedouro	2/11	0/5	CTb1	VII
			CTb2	VII
Piracicaba	11/20	0/9	CTp1	III
			CTp2	III
			CTp3	III
			CTp4	III
			CTp5	III
			CTp6	III
			CTp7	III
			CTp8	III
			CTp9	III
			CTp10	IX
			CTp11	III
Taquarituba	0/7	0/5	--	--

[1]Amostras foliares de plantas sintomáticas
[2]Amostras foliares de plantas assintomáticas
[3]Código correspondente à identificação dos isolados de fitoplasmas acrescido do sufixo ‘Br’
Nota:
-- Amostras negativas

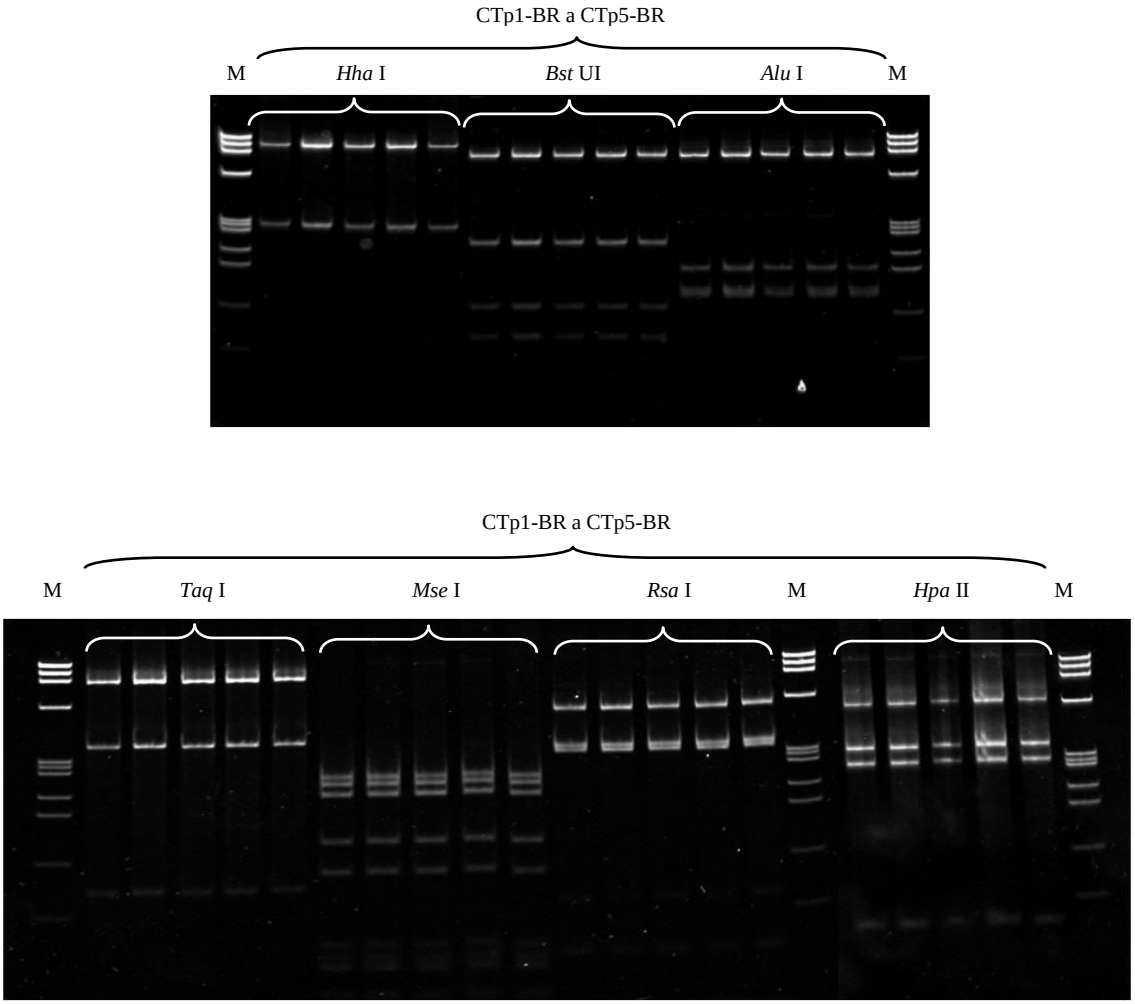


Figura 4 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA dos isolados de fitoplasmas CTp1-BR a CTp5-BR pertencentes ao grupo 16SrIII, com o uso das enzimas *Hha*I, *Bst*UI , *Alu*I, *Taq*I, *Mse*I, *Rsa*I, *Hpa*II; M: marcador molecular ØX174-*Hae*III

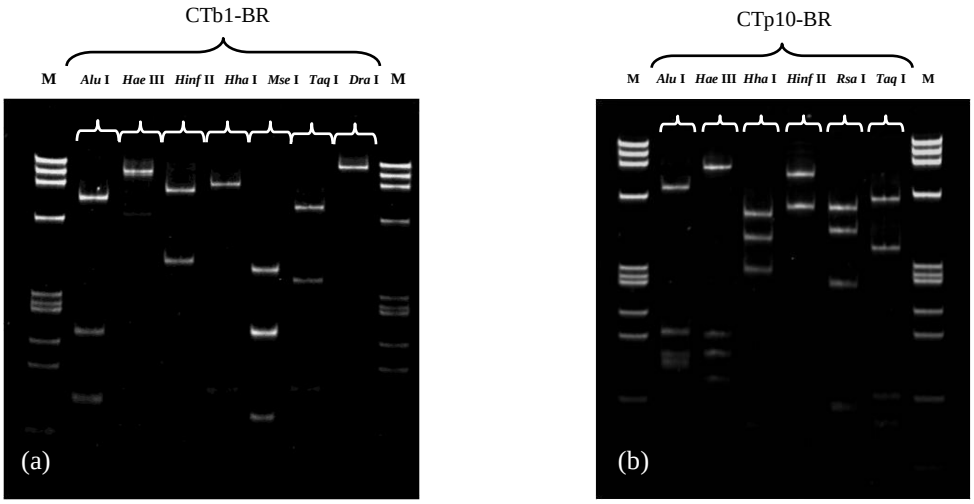


Figura 5 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA dos isolados de fitoplasmas CTb1-BR (a) e CTp10-BR (b) pertencentes ao grupo 16SrVII e 16SrIX, respectivamente, com o uso das enzimas *Alu*I, *Hae*III, *Hinf* II, *Hha*I, *Mse*I, *Taq*I; M: marcador molecular ØX174-*Hae*III

2.3.1.3 Identificação de fitoplasmas por RFLP *in silico*

Os produtos de PCR de aproximadamente 1,2 Kb referente a região 16S rDNA "F2n/R2" e amplificados pelos *primers* 16F2n/16R2 dos isolados CTp3-BR, CTb1-BR e CTp10-BR foram clonados em vetor pGEM-T (Promega, Sunnyvale, CA, USA). Cinco clones de cada isolado foram seqüenciados. As seqüências obtidas referentes a cada isolado foram idênticas entre si (100% de similaridade). As seqüências consenso dos clones foram utilizadas para a identificação de fitoplasma por RFLP virtual.

Os padrões de RFLP *in silico* obtidos (Figuras 6, 7 e 8) foram idênticos àqueles obtidos em análises de RFLP previamente conduzidas com as enzimas de restrição em laboratório. Assim, as evidências de que os fitoplasmas do grupo 16SrIII, 16SrVII e 16SrIX detectados em plantas de citros são fitoplasmas não descritos, foi confirmada.

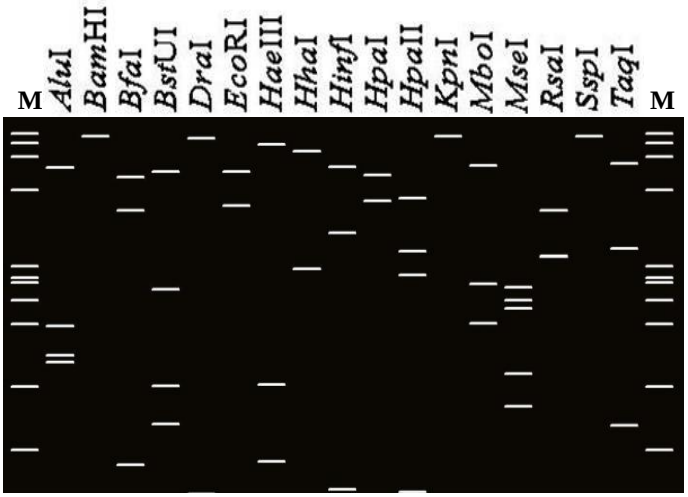


Figura 6 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do isolado CTp3-BR (16SrIII) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha* I), *Dra* I, *Eco*R I, *Hae* III, *Hha*I, *Hinf* I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (*Mbo*I), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III

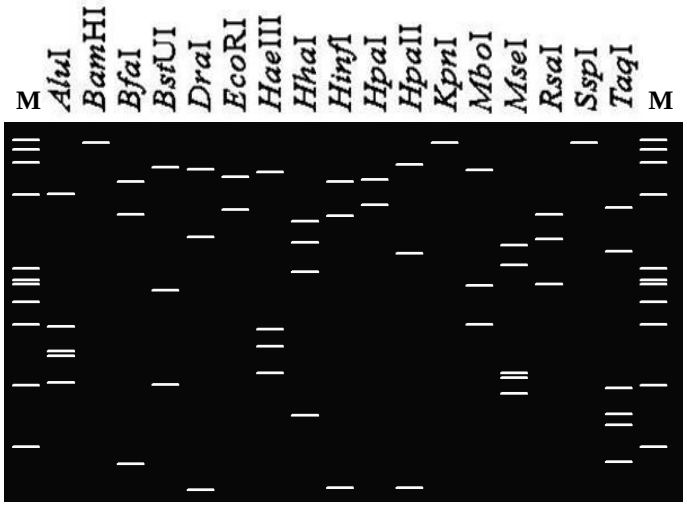


Figura 7 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do isolado CTp10-BR (16SrIX) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha* I), *Dra* I, *Eco*R I, *Hae* III, *Hha*I, *Hinf* I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (*Mbo*I), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III

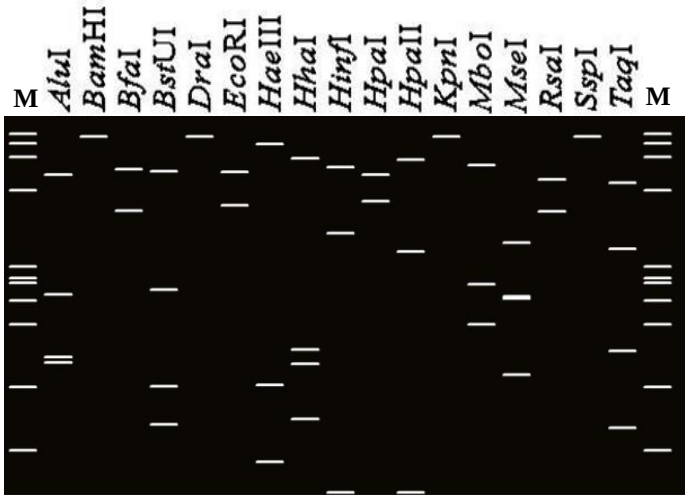


Figura 8 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do isolado CTb1-BR (16SrVII) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha* I), *Dra* I, *Eco*R I, *Hae* III, *Hha*I, *Hinf* I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (*Mbo*I), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III

2.3.1.4 Cálculo do coeficiente de similaridade

O coeficiente de similaridade foi calculado através dos padrões de RFLP *in silico* obtidos com as seqüências consensos referente à região 16S rDNA "F2n/R2" dos isolados CTp3-BR, CTb1-BR e CTp10-BR, e a seqüência de outros fitoplasmas membros dos grupos 16SrIII, 16SrVII e 16SrIX (Tabela 2; ANEXOS A, B, C e D).

Os isolados CTp3-BR, CTb1-BR e CTp10-BR apresentaram maiores coeficientes de similaridade de 0,97, 0,95 e 0,94 quando comparado aos fitoplasmas representante dos grupos 16SrIII, subgrupo B (16SrIII-B); grupo 16SrVII, subgrupo B (16SrVII-B) e grupo 16SrIX, subgrupo A (16SrIX-A), respectivamente (Tabelas 4, 5 e 6).

Os valores de coeficiente de similaridade (menor ou igual 0,97) observados para estes isolados aliados ao fato de eles apresentarem distintos perfis de RFLP nos permite agora inferir que os isolados de fitoplasmas CTp3-BR, CTb1-BR e CTp10-BR são representantes de novos subgrupos dos grupos 16SrIII, 16SrVII e 16SrIX, respectivamente.

Tabela 4 - Coeficiente de similaridade derivado das análises do padrão de RFLP *in silico* das seqüências da região 16S rDNA "F2nR2" do isolado CTp3-BR e de outros fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII

Subgrupos	16SrIII-A	16SrIII-B	16SrIII-C	16SrIII-D	16SrIII-F	16SrIII-G	16SrIII-J	16SrIII-L	16SrIII-M	16SrIII-N	16SrIII-O	16SrIII-P	16SrIII-Q	16SrIII-S	16SrIII-U	**CTp3-Br**
16SrIII-A	1															
16SrIII-B	0,93	1														
16SrIII-C	0,86	0,93	1													
16SrIII-D	0,85	0,92	0,93	1												
16SrIII-F	0,88	0,95	0,98	0,95	1											
16SrIII-G	0,95	0,94	0,85	0,89	0,87	1										
16SrIII-J	0,90	0,97	0,96	0,95	0,98	0,89	1									
16SrIII-L	0,96	0,91	0,83	0,82	0,85	0,95	0,88	1								
16SrIII-M	0,85	0,92	0,97	0,94	0,97	0,84	0,95	0,82	1							
16SrIII-N	0,80	0,87	0,90	0,87	0,92	0,78	0,90	0,79	0,89	1						
16SrIII-O	0,84	0,91	0,88	0,87	0,90	0,83	0,93	0,82	0,87	0,84	1					
16SrIII-P	0,87	0,94	0,93	0,92	0,95	0,85	0,97	0,84	0,92	0,87	0,96	1				
16SrIII-Q	0,87	0,94	0,93	0,92	0,95	0,88	0,97	0,84	0,92	0,87	0,88	0,94	1			
16SrIII-S	0,97	0,90	0,82	0,82	0,85	0,94	0,87	0,93	0,82	0,76	0,87	0,90	0,83	1		
16SrIII-U	0,94	0,97	0,92	0,91	0,94	0,88	0,94	0,87	0,91	0,85	0,88	0,90	0,90	0,86	1	
CTp3-Br	**0,9**	**0,97**	**0,9**	**0,89**	**0,92**	**0,88**	**0,94**	**0,87**	**0,89**	**0,83**	**0,88**	**0,91**	**0,95**	**0,86**	**0,96**	**1**

Tabela 5 - Coeficiente de similaridade derivado das análises do padrão de RFLP *in silico* das seqüências da região 16S rDNA "F2nR2" do isolado CTp10-Br e de outros fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIX

Subgrupos	16Sr IX-A	16Sr IX-B	16Sr IX-C	16Sr IX-D	16Sr IX-E	**16Sr IX HLB**	**CTp10-Br**
16SrIX-A	1						
16SrIX-B	0,76	1					
16SrIX-C	0,89	0,76	1				
16SrIX-D	0,77	0,97	0,86	1			
16SrIX-E	0,89	0,85	0,96	0,84	1		
16SrIX HLB	**0,92**	**0,72**	**0,82**	**0,72**	**0,91**	**1**	
CTp10-Br	**0,94**	**0,72**	**0,85**	**0,73**	**0,88**	**0,88**	**1**

Tabela 6 - Coeficiente de similaridade derivado das análises do padrão de RFLP *in silico* das seqüências da região 16S rDNA "F2nR2" do isolado CTb1-Br e de outros fitoplasmas pertencentes ao grupo 16Sr VII

Subgrupos	16SrVII-A	16SrVII-B	16SrVII-C	**CTb01-Br**
16SrIII-A	1			
16SrIII-B	0,92	1		
16SrIII-C	0,8	0,89	1	
CTb01-Br	**0,86**	**0,95**	**0,86**	**1**

Todos estes resultados apresentados em conjunto, nos permitem classificar o isolado CTp3-BR como um membro do grupo16SrIII e novo subgrupo "V" (16SrIII-"V"); o isolado CTp10-BR como um membro do grupo16SrIX e novo subgrupo "F" (16SrIX-"F"), e o isolado CTb1-BR como um membro do grupo16SrVII e novo subgrupo "D" (16SrVII-"D").

2.3.1.5 Análise filogenética

Baseado nas seqüências da região 16S rDNA “F2n/R2”, uma árvore filogenética foi construída (Figura 9). Verificamos que o isolado CTp3-BR, está filogeneticamente relacionado aos fitoplasmas do grupo 16SrIII e se encontra em um ramo distinto na árvore filogenética (Figura 9), indicando ser uma nova linhagem de fitoplasma pertencente ao grupo 16SrIII. O isolado CTb1-BR é mais próximo filogenéticamente do subgrupo 16SrVII-B, e o isolado CTp10-BR ao fitoplasma do subgrupo 16SrIX-A e também ao fitoplasma do grupo 16SrIX, que foi recentemente associado a sintomas de HLB no Brasil (TEIXEIRA et al., 2008).

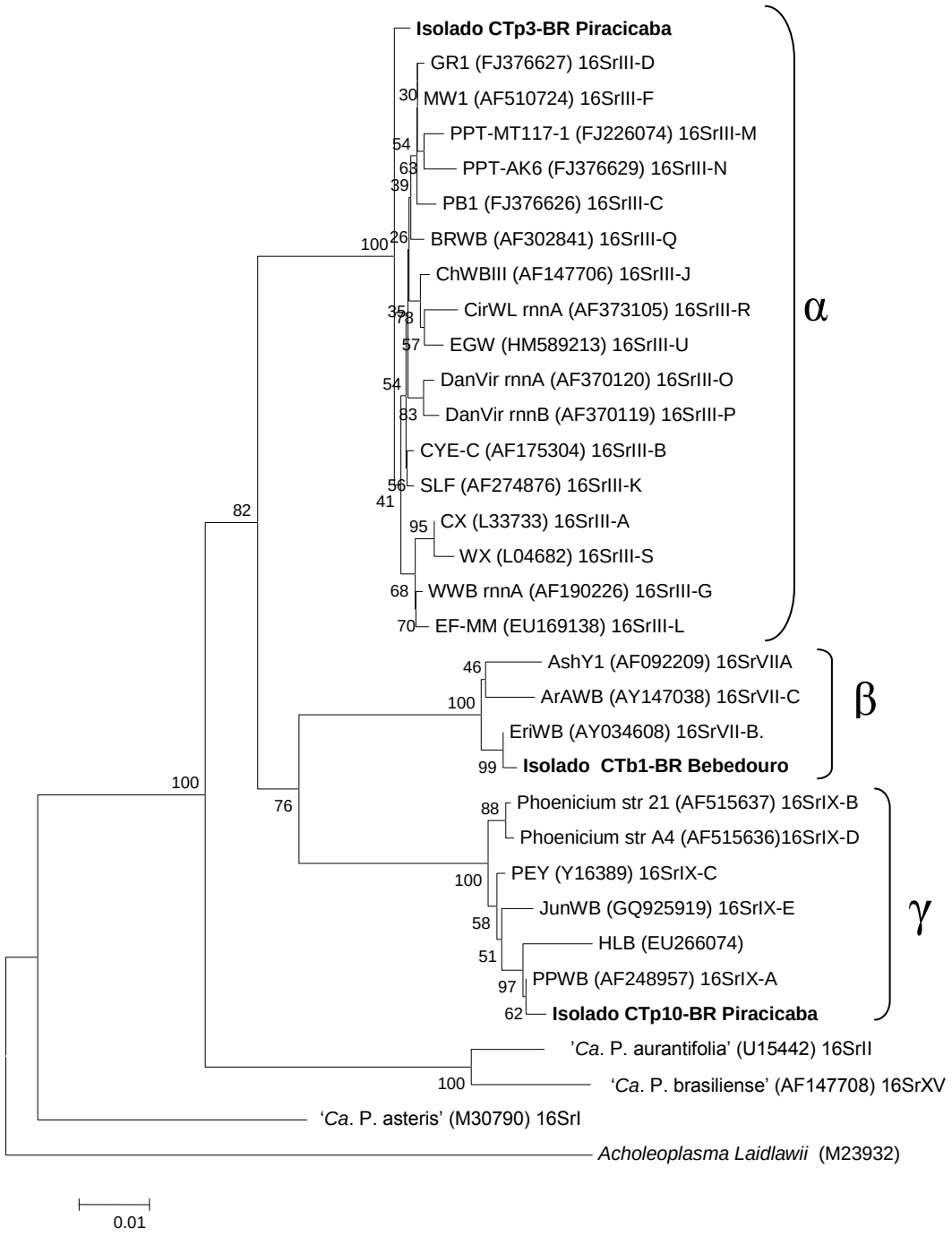


Figura 9 - Árvore filogenética construída usando o método *Neighbor-Joining* através das seqüências da região 16S rDNA "F2n/R2" dos isolados de fitoplasmas identificados em plantas de citros (em negrito) neste estudo e fitoplasmas representantes dos grupos 16SrI, 16SrII, 16SrIII, [16SrIII-K e 16SrIII-R (ZHAO et al., 2009)], 16SrVII, 16SrIX e 16SrXV (Tabela 2). *Acholeplasma laidlawii* (WEISBURG et al., 1989) foi usado como *outgroup*. Os números nos ramos são os valores de *bootstrap*

Inicialmente neste estudo nós descrevemos a associação de diferentes fitoplasmas com plantas de citros exibindo sintomas de clorose foliar em pomares dos municípios de Bebedouro e Piracicaba, no Estado de São Paulo. Ao serem classificados, verificamos que estes fitoplasmas possuem características distintas dos fitoplasmas já relatados, e esta distinção é verificada nos resultados das análises de RFLP, coeficientes de similaridade e análise filogenética da região 16S rDNA "F2n/R2". Em razão disto, são aqui descritos como representantes de novos subgrupos dos grupos 16SrIII, 16SrVII e 16SrIX. Estes novos subgrupos foram designados subgrupo 16SrIII-"V", representado pelo isolado CTp3-BR, subgrupo 16SrVII-"D", representado pelo isolado CTb1-BR, e subgrupo 16SrIX-"F", representado pelo isolado CTp10-BR.

A análise filogenética dos isolados CTp3-BR, CTb1-BR e CTp10-BR revela a ausência de uma recente relação evolutiva entre estes fitoplasmas, embora compartilhem um ancestral comum. Na árvore filogenética (Figura 9), identificamos três clados principais, os quais denominamos clados α, β e γ.

O isolado CTp3-BR, novo subgrupo 16SrIII-"V" encontra-se no clado α, juntamente com outros fitoplasmas do grupo 16SrIII. Fitoplasmas do grupo 16SrIII são predominantes no Brasil, sendo já descritos afetando muitas culturas (MONTANO et al., 2000; AMARAL MELLO et al., 2007; 2010; ECKSTEIN, 2010).

O isolado CTb1-BR, novo subgrupo 16SrVII-"D" encontra-se no clado β e filogeneticamente mais próximo aos fitoplasmas do subgrupo 16SrVII-B do que dos demais fitoplasmas do grupo 16SrVII. O fitoplasma do subgrupo 16SrVII-B foi descrito por Barros et al (2002) infectando plantas de *C. roseous* e *E. bonariensis* encontradas no Estado de São Paulo. Nesta ocasião estes autores ao analisarem a seqüência da região 16S rDNA "F2n/R2" sugeriram ser este fitoplasma representado pelo isolado EriWB (Figura 9), uma nova linhagem distinta de outros do fitoplasmas do grupo 16SrVII.

O isolado CTb1-BR, novo subgrupo 16SrIX-"F", encontra-se no clado γ agrupado aos outros fitoplasmas do grupo 16SrIX. Fitoplasmas do grupo 16SrIX, foram primeiramente identificados em 1990 em plantas de *Prunus* sp. (amêndoas) no Irã e Líbano (VERDIN et al., 2003). Desde então, o cultivo de amêndoas nestes paises tem sido seriamente afetado por fitoplasmas deste grupo. No Brasil, fitoplasmas do grupo 16SrIX foram detectados em plantas de citros (TEIXEIRA et al., 2008). Fitoplasmas deste grupo também já foram detectados em plantas de *Catharanthus roseus* (vinca) coletadas de jardins municipais em Araraquara, Carmo do

Paranaíba e Recife nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Pernambuco, respectivamente (BEDENDO et al., 1999; ECKSTEIN; BARBOSA; BEDENDO, 2009). Estes relatos no Brasil revelam que fitoplasmas do grupo 16SrIX estão amplamente disseminados no país. No entanto, a caracterização molecular de todos estes fitoplasmas não foi realizada e isto não nos permite comparar muitos destes com o isolado CTp10-BR, subgrupo 16SrIX-"F". Por outro lado, a disponibilidade da seqüência de nucleotídeos do fitoplasma do grupo 16SrIX associado ao HLB no GenBank, nos permitiu compará-lo com o isolado CTp10-BR, subgrupo 16SrIX-"F". A comparação por RFLP virtual mostrou que as enzimas *Alu*I, *Hae*III, *Hpa*II e *Rsa*I apresentam perfis distintos para estes fitoplasmas (Figuras 5a e 7; ANEXO D). Isto associado ao baixo coeficiente de similaridade observado entre estes dois fitoplasmas demonstra a existência de diferentes fitoplasmas do grupo 16SrIX no Brasil. Possivelmente, o fitoplasma associado ao HLB também é representante de um novo subgrupo do grupo 16SrIX, o qual não foi descrito até o momento.

Quando Chen et al. (2009) associaram um fitoplama do grupo 16SrI, '*Ca*. Phytoplasma asteris', ao HLB na China, foi levantada por estes autores a necessidade de mais estudos para melhor estabelecer a associação destes fitoplasmas com o HLB e, além disso, cogitaram a possibilidade de que outros fitoplasmas pudessem ser encontrados associados a plantas de citros com sintomas de HLB. Curiosamente, em nosso trabalho nós verificamos a associação de múltiplos fitoplasmas associados a plantas de citros exibindo sintomas de clorose foliar, sintoma este que pode ser atribuído ao HLB (GASPAROTO, 2010). Mas o fato destes fitoplasmas estarem associados a plantas com sintomas de clorose foliar, não nos permite a associação com uma doença já descrita, como o HLB. Concordamos com Chen et al. (2009), quanto à necessidade de mais estudos, pois o verdadeiro papel etiológico de fitoplasmas para o HLB parece incerto.

2.3.2 Fitoplasmas em plantas daninhas

2.3.2.1 Detecção e identificação de fitoplasmas em plantas daninhas por *nested* PCR

Em pomares de citros nos municípios de Araraquara, Bebedouro, Piracicaba e Taquarituba no Estado de São Paulo, plantas daninhas sintomáticas e assintomáticas foram coletadas visando a detecção de fitoplasma (Tabela 7). Fitoplasmas foram detectados em plantas

daninhas sintomáticas coletadas nos municípios de Piracicaba e Taquarituba (Tabela 7; Figuras 10 e 11)

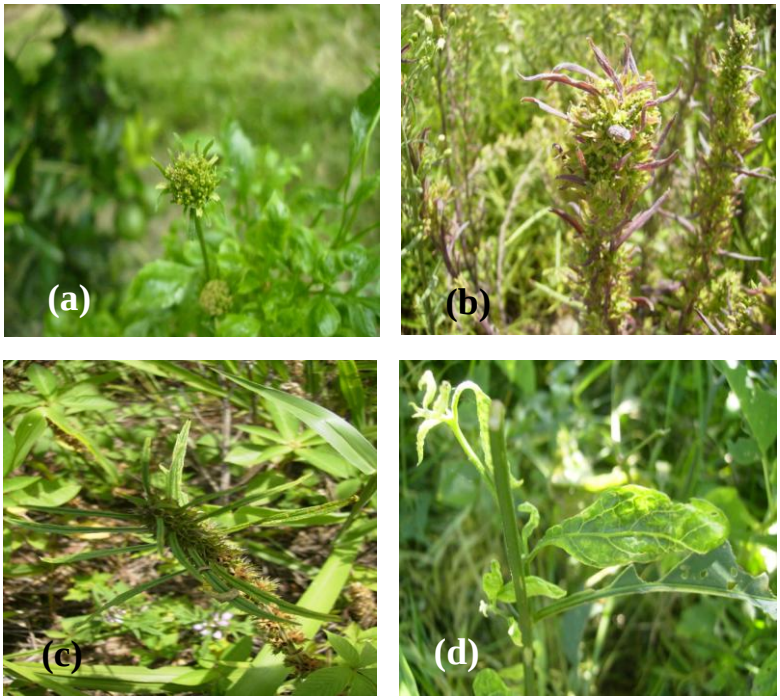


Figura 10 - Plantas daninhas sintomáticas coletadas em um pomar de citros em Piracicaba, Estado de São Paulo. *Bidens pilosa* (a), *Erigeron bonariensis* (b), *Leonourus sibiricus* (c) e *Solanum americanum* (d)

Figura 11 - Plantas daninhas sintomáticas coletadas em um pomar de citros em Taquarituba, Estado de São Paulo. *Solanum americanum* (a), *Leonourus sibiricus* (b), *Phyllanthus niruri* (c), *Euphorbia heterophylla* (d) e plantas da família Poaceae (e)

Baseados nos resultados de RFLP, fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII foram encontrados em plantas de *B. pilosa* (picão), *L. sibiricus* (rubim) e *S. americanum* (maria-pretinha) coletadas em um pomar de citros em Piracicaba e fitoplasmas representantes do grupo

16SrVII foram encontrados plantas de *E. bonariensis* (Buva) e *E. heterophylla* (Amendoin-bravo) coletadas em pomares de citros em Taquarituba.

Tabela 7 - Detecção e identificação de fitoplasmas em espécies de plantas daninhas, coletadas em pomares de citrus no Estado de São Paulo

Localidade	**Família**	**Espécie**	**Sintomas**[(1)]	**+/T**[(2)]	**Amostra**[(3)]	**Fitoplasma Grupo 16S rDNA**
Araraquara	Poaceae	*Brachiaria spp.*	As	0/4	--	--
	Portulacaceae	*Portulaca oleracea*	As	0/3	--	--
Bebedouro	Asteraceae	*Erigeron bonariensis*	As	0/4	--	--
Piracicaba	Amaranthaceae	*Amaranthus spinosus*	As	0/6	--	--
	Asteraceae	*Erigeron bonariensis*	Su, Av	7/8	EBp1 a EBp7	VII
	Asteraceae	*Bidens pilosa*	Fi, Vi	8/10	BPp1 a BPp8	III
	Lamiaceae	*Leonurus sibiricus*	Df	3/5	LSp1 a LSp3	III
	Solanaceae	*Solanum americanum*	Df	2/2	SAp1 a SAp2	III
Taquarituba	Solanaceae	*Solanum americanum*	Su	0/20	--	--
	Asteraceae	*Bidens pilosa*	As	0/4	--	--
	Lamiaceae	*Leonurus sibiricus*	Cl	0/1	--	--
	Phyllanthaceae	*Phyllanthus niruri*	Cl	0/2	--	--
	Poaceae	NI	Cl	0/4	--	--
	Euphorbiaceae	*Euphorbia heterophylla*	Df	5/7	EHt1 a EHt5	VII

[(1)]Tipos de sintomas exibidos pelas espécies de plantas daninhas. Su: superbrotamento; Cl: clorose generalizada; Vi: virescência, Fi: filodia; Ef: enfezamento; Df: deformação foliar; Av: avermelhamento foliar; As: assintomática.
[(2)]Número de amostras positivas/nº de amostras analisadas. Cada amostra analisada corresponde a uma planta
[(3)]Código correspondente a identificação dos isolados de fitoplasmas acrescido do sufixo 'Br'
Nota:
NI - Espécie não identificada; -- Amostras negativas

2.3.2.2 Identificação de fitoplasmas por RFLP

Com base nos resultados de RFLP dos produtos amplificados referentes a região 16S rDNA "F2n/R2", os fitoplasmas detectados em plantas de *B. Pilosa, L. sibiricus* e *S. americanum* coletadas em Piracicaba, denominados isolados BPp1-BR a BPp8-BR, LSp1-BR a LSp3-BR e SAp1-BR a SAp2-BR, respectivamente, foram identificados como membros do grupo 16SrIII (Tabela 7). Os fitoplasmas detectados em planta de *E. bonariensis*, denominados isolados EBp1-BR a EBp7-BR, foram identificados como membros do grupo 16SrVII (Tabela 7).

Os isolados BPp1-BR a BPp8-BR e LSp1-BR a LSp3-BR detectados em plantas de *B. pilosa* e *L. sibiricus* apresentaram perfis de restrição idênticos ao apresentado pelo fitoplasma do subgrupo 16SrIII- "V", o qual foi identificado neste estudo associado a plantas de citros. Na Figura 12 estes perfis está representado pelos isolados BPp7-BR, BPp8-BR e LSp3-BR. Já os isolados SAp1-BR e SAp2-BR detectados em plantas de *S. americanum,* apresentaram perfis novos em RFLP para as enzimas *Rsa*I e *Alu*I (Figura 13). O perfil obtido com a enzima *Rsa*I para estes fitoplasmas foram anteriormente observado para os fitoplasmas do subgrupo 16SrIII-"V", identificados em plantas de citros, *B. pilosa* e *L. sibiricus.* No entanto, o perfil obtido com a enzima *Alu*I é diferente de qualquer outro perfil de RFLP da região 16S rDNA "F2n/R2" já relatado para fitoplasma do grupo 16SrIII (ANEXOS A e B), sugerindo ser este um fitoplasma membro do grupo16SrIII ainda não descrito.

Os isolados EBp1-BR a EBp7-BR, detectados em plantas de *E. bonariensis*, apresentaram um perfil de RFLP, que já foi descrito como o perfil característico do fitoplasma do subgrupo 16SrVII-B (Figura 14; ANEXO C), primeiramente identificado em plantas de *C. roseus* e *E. Bonariensis*, caracterizado por Barros et al. (2002) no Brasil. Assim, estes isolados pertencem ao subgrupo 16SrVII-B.

Os fitoplasmas detectados em plantas de *E. heterophylla*, coletadas em Taquarituba, isolados EHt1-BR a EHt4-BR também foram identificados como membros do grupo 16SrVII. Um novo perfil de RFLP obtido com a enzima *Hae*III para estes isolados também indica ser este um fitoplasma membro do grupo16SrVII ainda não descrito. Este perfil também é diferente do obtido para fitoplasma do subgrupo 16SrVII-"D" anteriormente identificado em planta de citros e está representado na Figura 15 pelos isolados EHt1-BR a EHt4-BR.

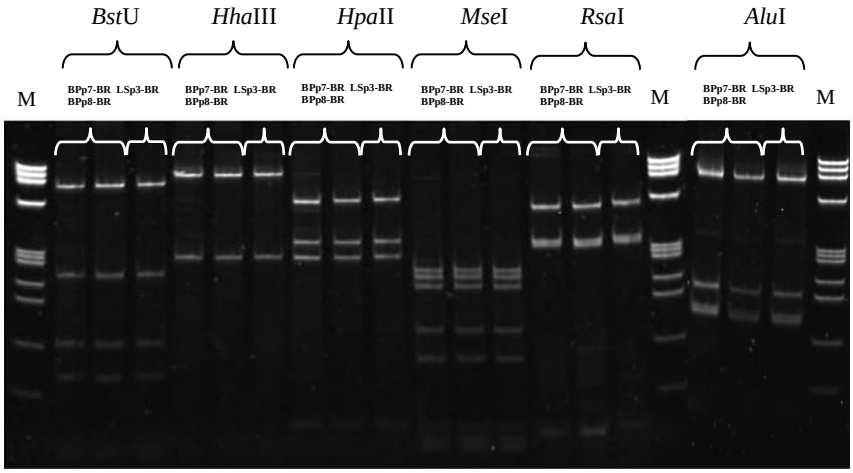


Figura 12 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA dos isolados de fitoplasmas BPp7-BR, BPp8-BR e LSp3-BR pertencentes ao grupo 16SrIII, com o uso das enzimas *Bst*U, *Hha*I, *Hpa*II, *MseI*, *Rsa*I e *Alu*I; M: marcador molecular ØX174-*Hae*III

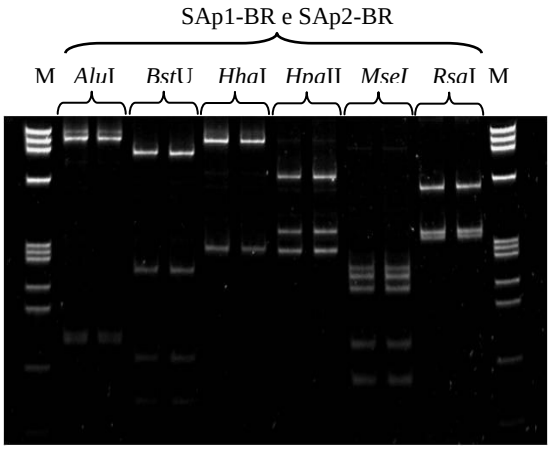


Figura 13 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA dos isolados de fitoplasmas SAp1-BR e SAp2-BR pertencentes ao grupo 16SrIII, com o uso das enzimas *Alu*I, *Bst*U, *Hha*I, *Hpa*II, *MseI* e *Rsa*I; M: marcador molecular ØX174-*Hae* III

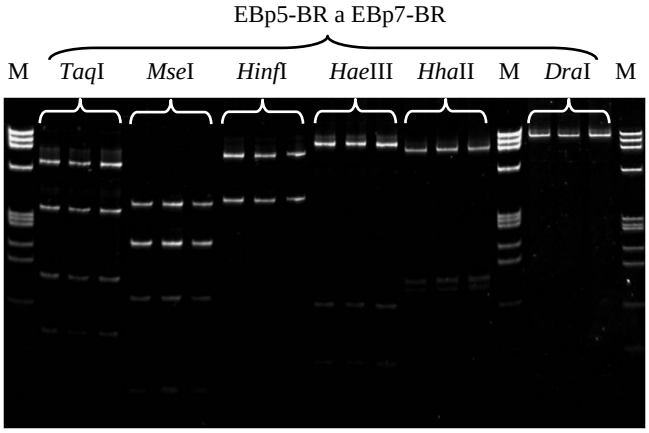


Figura 14 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA dos isolados de fitoplasmas EBp5-BR a EBp7-BR pertencentes ao grupo 16SrVII, com o uso das enzimas *Taq*I, *Mse*I, *Hinf*I, *Hae*III, *Hha*II e *Dra*I; M: marcador molecular ØX174-*Hae*III

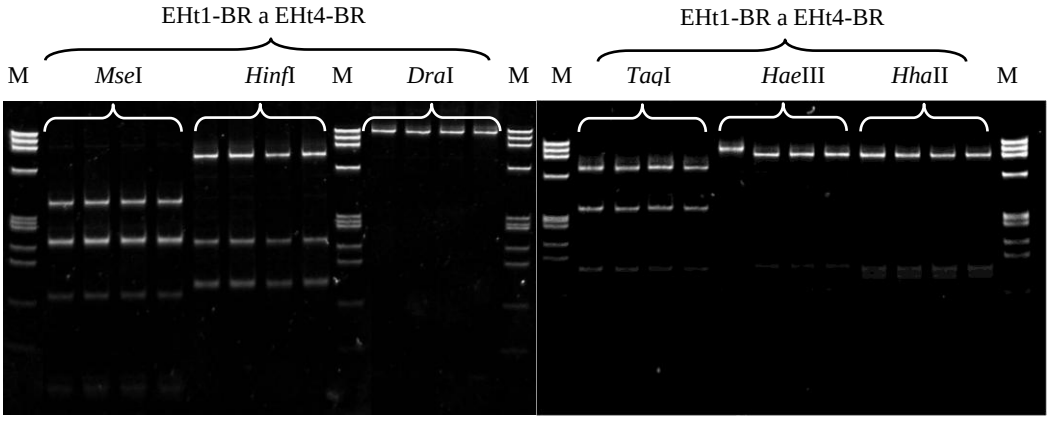


Figura 15 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA dos isolados de fitoplasmas EHt1-BR a EHt4-BR pertencentes ao grupo 16SrVII, com o uso das enzimas *Mse*I, *Hinf*I, *Dra*I, *Taq*I, *Hae*III e *Hha*II; M: marcador molecular ØX174-*Hae*III

2.3.2.3 Identificação de fitoplasmas por RFLP *in silico*

Cinco clones de cada isolado identificado como membro do grupo 16SrIII, BPp8-BR, LSp3-BR e SAp2-BR, e do grupo16SrVII, EBp7-BR e EHt4-BR, foram seqüenciados. As seqüências obtidas referentes a cada isolado foram idênticas entre si (100% de similaridade). Uma seqüência consenso representante de cada isolado foi obtida e utilizada para a realização do RFLP *in silico*. Os padrões de RFLP *in silico* (Figuras 16, 17, 18, 19 e 20) obtidos foram idênticos àqueles obtidos em análises de RFLP previamente conduzidas com as enzimas de restrição em laboratório (Figuras 12, 13, 14 e 15), confirmando assim os resultados até aqui obtidos.

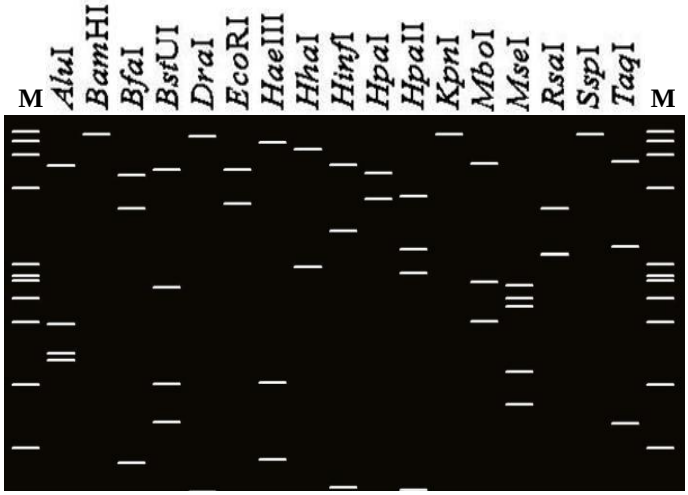


Figura16 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do isolado BPp8-BR (16SrIII) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha* I), *Dra* I, *Eco*R I, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (*Mbo*I), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Ha* III

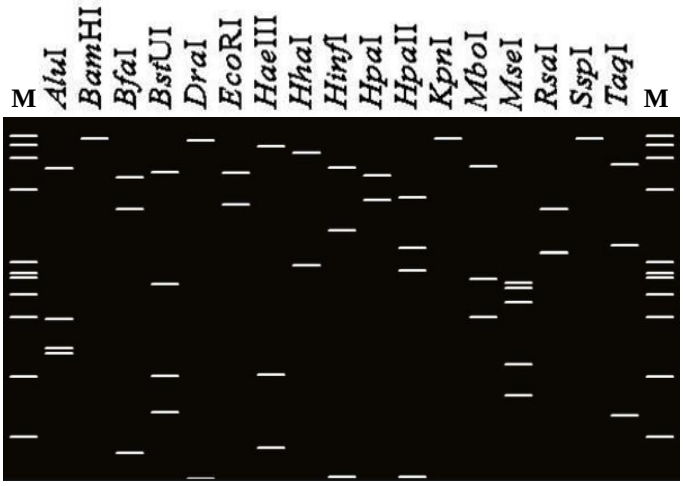


Figura 17 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do isolado LSp3-BR (16SrIII) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra* I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf* I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (*Mbo*I), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III

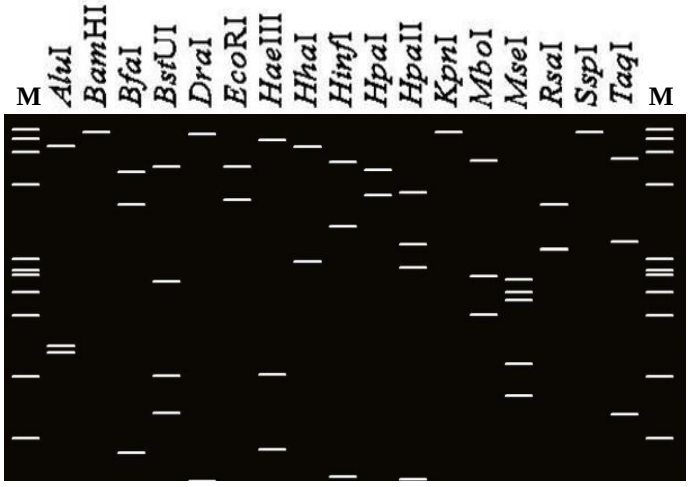


Figura 18 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do isolado SAp2-BR (16SrIII) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra* I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf* I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (*Mbo*I), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III

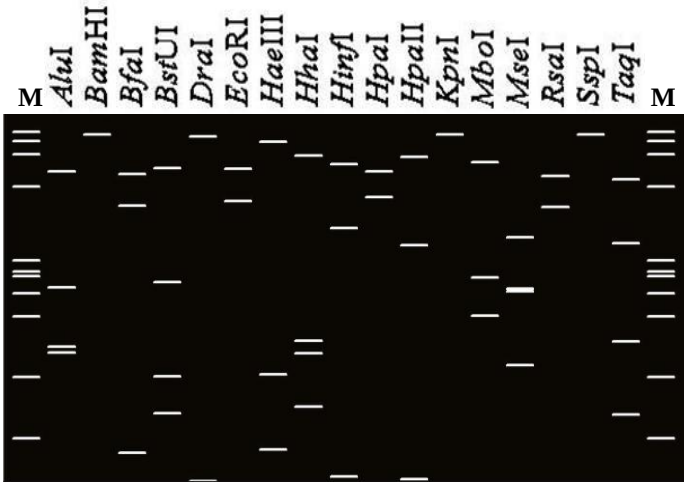


Figura 19 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do isolado EBp7-BR (16SrVII) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra* I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf* I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (*Mbo*I), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III

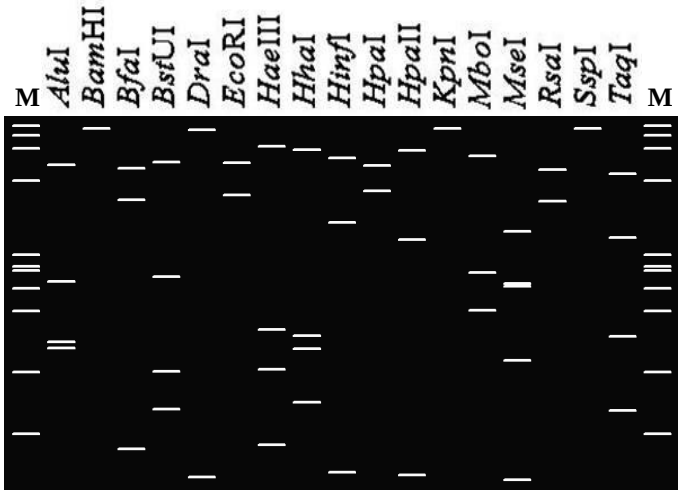


Figura 20 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do isolado EHt4-BR (16SrVII) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra* I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf* I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (*Mbo*I), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III

2.3.2.4 Cálculo do coeficiente de similaridade

O coeficiente de similaridade foi calculado entre os isolados BPp8-BR, LSp3-BR, SAp2-BR, EBp7-BR e EHt4-BR e outros fitoplasmas membros dos grupos 16SrIII, 16SrVII (Tabelas 8 e 9), incluindo aqueles que já foram identificados neste trabalho.

Os isolados BPp8-BR e LSp3-BR apresentaram o maior coeficiente de similaridade (1,0) quando comparados ao fitoplasma representante 16SrIII-"V" (deste estudo). O valor do coeficiente de similaridade (maior que 0,97) associado aos perfis idênticos obtidos em RFLP, indica que os isolados BPp8-BR e LSp3-BR pertencem ao subgrupo 16SrIII-"V".

O isolado SAp2-BR apresenta os maiores coeficientes de similaridade (0,94 e 0,95) quando comparado aos fitoplasmas representante dos subgrupos 16SrIII-B e 16SrIII-"V" (deste estudo), respectivamente. O valor do coeficiente de similaridade (menor que 0,97) associado aos distintos perfis de RFLP apresentados com a enzima *Alu*I (Figura 18) nos permite inferir que este isolado de fitoplasma, membros do grupo16SrIII, são representantes de um novo subgrupo.

O isolado EHt4-BR apresentou os maiores coeficientes de similaridade (0,97) quando comparado aos fitoplasmas representantes dos subgrupos 16SrVII-B e 16SrIII-"D" (deste estudo). No entanto, para este isolado, verificamos em RFLP um distinto perfil apresentado com a enzima *Hae*III (Figura 20) indicando também ser este isolado de fitoplasma um membro do grupo16SrVII, representante de um outro novo subgrupo.

O isolado EBp7-BR apresentou o maior coeficiente de similaridade (1,0; maior que 0,97) quando comparado ao fitoplasma representante do subgrupo 16SrVII-B.

Tabela 8 - Coeficiente de similaridade derivado das análises do padrão de RFLP *in silico* das seqüências da região 16S rDNA "F2nR2" dos isolados BPp8-BR, LSp3-BR , SAp2-BR e de outros fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII

Subgrupos	16SrIII-A	16SrIII-B	16SrIII-C	16SrIII-D	16SrIII-F	16SrIII-G	16SrIII-J	16SrIII-L	16SrIII-M	16SrIII-N	16SrIII-O	16SrIII-P	16SrIII-Q	16SrIII-S	16SrIII-U	**CTp3-Br**	**BPp8-BR**	**LSp3-BR**	**SAp2-BR**
16SrIII-A	1																		
16SrIII-B	0,93	1																	
16SrIII-C	0,86	0,93	1																
16SrIII-D	0,85	0,92	0,93	1															
16Sr III-F	0,88	0,95	0,98	0,95	1														
16Sr III-G	0,95	0,94	0,85	0,89	0,87	1													
16Sr III-J	0,90	0,97	0,96	0,95	0,98	0,89	1												
16SrIII-L	0,96	0,91	0,83	0,82	0,85	0,95	0,88	1											
16SrIII-M	0,85	0,92	0,97	0,94	0,97	0,84	0,95	0,82	1										
16SrIII-N	0,80	0,87	0,90	0,87	0,92	0,78	0,90	0,79	0,89	1									
16SrIII-O	0,84	0,91	0,88	0,87	0,90	0,83	0,93	0,82	0,87	0,84	1								
16SrIII-P	0,87	0,94	0,93	0,92	0,95	0,85	0,97	0,84	0,92	0,87	0,96	1							
16SrIII-Q	0,87	0,94	0,93	0,92	0,95	0,88	0,97	0,84	0,92	0,87	0,88	0,94	1						
16SrIII-S	0,97	0,90	0,82	0,82	0,85	0,94	0,87	0,93	0,82	0,76	0,87	0,90	0,83	1					
16SrIII-U	0,94	0,97	0,92	0,91	0,94	0,88	0,94	0,87	0,91	0,85	0,88	0,90	0,90	0,86	1				
CTp3-Br	**0,9**	**0,97**	**0,9**	**0,89**	**0,92**	**0,88**	**0,94**	**0,87**	**0,89**	**0,83**	**0,88**	**0,91**	**0,95**	**0,86**	**0,96**	**1**			
BPp8-BR	**0,9**	**0,97**	**0,9**	**0,89**	**0,92**	**0,88**	**0,94**	**0,87**	**0,89**	**0,83**	**0,88**	**0,91**	**0,95**	**0,86**	**0,96**	**1**	**1**		
LSp3-BR	**0,9**	**0,97**	**0,9**	**0,89**	**0,92**	**0,88**	**0,94**	**0,87**	**0,89**	**0,83**	**0,88**	**0,91**	**0,95**	**0,86**	**0,96**	**1**	**1**	**1**	
SAp2-BR	**0,88**	**0,94**	**0,84**	**0,85**	**0,88**	**0,85**	**0,88**	**0,79**	**0,83**	**0,82**	**0,84**	**0,81**	**0,79**	**0,79**	**0,83**	**0,95**	**0,95**	**0,95**	**1**

Tabela 9 - Coeficiente de similaridade derivado das análises de padrão do RFLP *in silico* das seqüências da região 16S rDNA "F2nR2" do isolado EHt4-BR e de outros fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrVII

Subgrupos	16SrVII-A	16SrVII-B	16SrVII-C	**EBp7-BR**	**CTp10-BR**	**EHt4-BR**
16SrVII-A	1					
16SrVII-B	0,92	1				
16SrVII-C	0,8	0,89	1			
EBp7-BR	**0,92**	**1**	**0,89**	**1**		
CTp10-BR	**0,86**	**0,95**	**0,86**	**0,95**	**1**	
EHt4-BR	**0,89**	**0,97**	**0,86**	**0,97**	**0,9**	**1**

De acordo com estes resultados apresentados em conjunto, os isolados BPp8-BR e LSp3-BR são pertencentes ao subgrupo 16SrIII-"V". Já o isolado SAp2-BR foi classificado como um membro do grupo 16SrIII e novo subgrupo "X" (16SrIII-"X"). Da mesma, o isolado EHt4-BR foi classificado como um membro do grupo16SrVII e novo subgrupo "E" (16SrVII-"E"). Já o isolado EBp7-BR é um membro do subgrupo 16SrVII-B.

2.3.2.5 Análise filogenética

Com base na árvore filogenética construída (Figura 21), confirmamos que os isolados BPp8-BR, LSp3-BR e SAp2-BR estão filogeneticamente relacionados ao fitoplasma do subgrupo 16SrIII-"V", enquanto os isolados EBp7-BR e EHt4-BR estão relacionados aos fitoplasmas dos subgrupos 16SrVII-B e 16SrVII-"D".

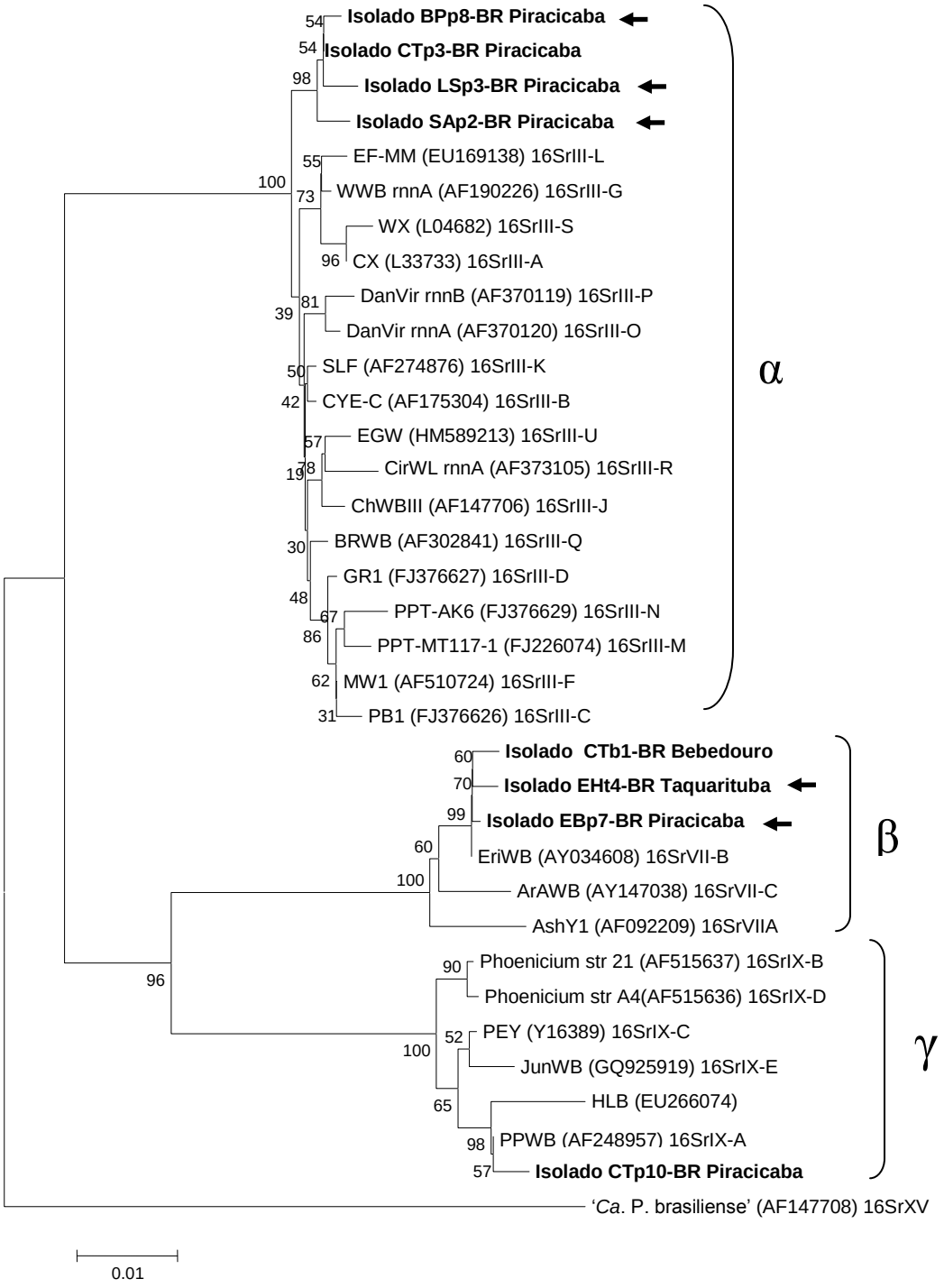


Figura 21 - Árvore filogenética construída usando método *Neighbor-Joining* através das seqüências da região 16S rDNA "F2n/R2" dos isolados de fitoplasmas identificados em plantas de citros e em plantas daninhas (setas) neste estudo, fitoplasmas representantes dos grupos 16SrIII, [16SrIII-K e 16SrIII-R (ZHAO et al., 2009)], 16SrVII e 16SrIX (Tabela 2). '*Ca.* Phytoplasma brasiliense' (Tabela 2) foi usando como *outgroup*. Os números nos ramos da árvore são os valores de *bootstrap*

O fitoplasma identificado associado a plantas de *B. pilosa* e *L. sibiricus* pertencente ao subgrupo 16SrIII-“V” é o mesmo identificado em plantas de citros. Sendo assim, estas plantas daninhas podem atuar com reservatório deste fitoplasma e ter um papel na sua disseminação. A idéia de que plantas daninhas possam atuar como reservatórios de fitoplasmas e possíveis fontes de inóculo vem sendo freqüentemente discutida (ALHUDAIB et al., 2009; ECKSTEIN, 2010; WULFF et al., 2009). Na Arábia Saudita, plantas daninhas das espécies *Chenopodium morale*, *Plantago lanceolata* e *Convolvulus arvenis* infectadas com fitoplasmas dos grupos 16SrII (‘*Ca.* Phytoplasma aurantifolia’) associado a WDBL foram identificadas em pomares de citros (ALHUDAIB et al., 2009). De acordo com os autores, estas plantas daninhas podem ter um importante papel da disseminação da doença, servindo com um hospedeiro alternativo para os fitoplasma e também suportando a reprodução de insetos vetores. No Brasil, plantas do gênero *Crotalaria* sp., as quais estão amplamente distribuídas no Estado de São Paulo, foram consideradas por Teixeira et al. (2008) como possíveis hospedeiras do fitoplasma do grupo 16Sr IX associado ao HLB.

Os fitoplasmas pertencentes aos subgrupos 16SrIII-“X”, 16SrVII-B e 16SrVII-“E” identificados associados a plantas de *S. americanum*, *E. bonariensis* e *E. heterophylla*, respectivamente, não foram detectados em plantas de citros. Mas por outro lado, o fato da coexistência destas plantas daninhas com plantas de citros em pomares localizados em Piracicaba e Taquarituba, torna possível a ocorrência destes fitoplamas em planta de citros. É de importância salientar que neste estudo três novos fitoplasmas, de distintos grupos, estão sendo propostos associados a citros, podendo ser essa diversidade de fitoplasmas associados a plantas de citros maior do que a aqui revelada.

2.3.3 Fitoplasmas em cicadelídeos

2.3.3.1 Identificação de possíveis vetores de fitoplasmas em pomares de citros

Cicadelídeos sugadores de floema pertencentes as subfamílas Agalliinae e Deltocephalinae foram encontrados em pomares de citros de diferentes regiões citrícolas do Estado de São Paulo, constituindo uma entomofauna diversa e que era até então desconhecida para as condições brasileiras (Tabela 10).

Um total de 12 morfotipos de cicadelídeos foram identificados ao nível de espécie e um ao nível de gênero (Tabela 10).

2.3.3.2 Detecção e identificação de fitoplasmas em cicadelídeos por *nested* PCR

Os cicadelídeos coletados e identificados foram analisados por *nested* PCR com o par de *primer* 16F2n/16R2. Um fragmento de DNA de aproximadamente 1,2 Kb foi amplificado em amostras de *Agallia albidula* (Uhler, 1895) coletadas na vegetação daninha encontrada nas bordas de um pomar localizado no município de Taquarituba, indicando a presença de fitoplasmas em cicadelídeos desta espécie (dados não apresentados).

Tabela 10 - Cicadelídeos identificados em pomares de citros do Estado de São Paulo, detecção e identificação de fitoplasma

Localidade	Subfamília	Espécies	+/T [(1)]	Amostras[(2)]	Fitoplasma Grupo 16S rDNA
Araraquara	Agalliinae	*Agallia albidula* (Uhler, 1895)	0/1	--	--
	Agalliinae	*Agalliana sticticollis* (Stal, 1859)	0/3	--	--
	Deltocephalinae	*Balclutha hebe* (Kirkaldi, 1906)	0/5	--	--
	Deltocephalinae	*Stirellus personatus* (Berg, 1884)	0/2	--	--
	Deltocephalinae	*Unerus colonus* (Uhler, 1895)	0/3	--	--
Bebedouro	Agalliinae	*Agallia cezia* (Dutra, 1967)	0/1	--	--
	Deltocephalinae	*Balclutha hebe* (Kirkaldi, 1906)	0/1	--	--
	Deltocephalinae	*Planicephalus flavicosta* (Stål, 1860)	0/3	--	--
Piracicaba	Agalliinae	*Agallia albidula* (Uhler, 1895)	0/2	--	--
	Deltocephalinae	*Atanus. nitidus* (Linnavuori, 1955)	0/1	--	--
	Deltocephalinae	*Balclutha hebe* (Kirkaldi, 1906)	0/31	--	--
	Deltocephalinae	*Exitianus obscurinervis* (Stål, 1859)	0/1	--	--
	Deltocephalinae	*Haldorus* sp.	0/1	--	--
	Deltocephalinae	*Planicephalus flavicosta* (Stål, 1860)	0/5	--	--
	Deltocephalinae	*Stirellus bicolor* (VanDuzee, 1892)	0/3	--	--
	Deltocephalinae	*Stirellus elegantulus* (Linnavuri, 1954)	0/4	--	--
	Deltocephalinae	*Stirellus personatus* (Berg, 1884)	0/1	--	--
	Deltocephalinae	*Unerus colonus* (Uhler, 1895)	0/2	--	--
Taquarituba	Agalliinae	*Agallia albidula* (Uhler, 1895)	4/6	Ag1 a Ag4	III
	Deltocephalinae	*Balclutha hebe* (Kirkaldi, 1906)	0/9	--	--
	Deltocephalinae	*Exitianus obscurinervis* (Stål, 1859)	0/1	--	--
	Deltocephalinae	*Planicephalus flavicosta* (Stål, 1860)	0/2	--	--
	Deltocephalinae	*Stirellus personatus* (Berg, 1884)	0/1	--	--

[(1)]Número de amostras positivas/nº de amostras analisadas. Cada amostra analisada corresponde a um cicadelídeo

[(2)]Código correspondente a identificação dos isolados de fitoplasmas acrescido do sufixo 'Br'

Nota:

-- Amostras negativas

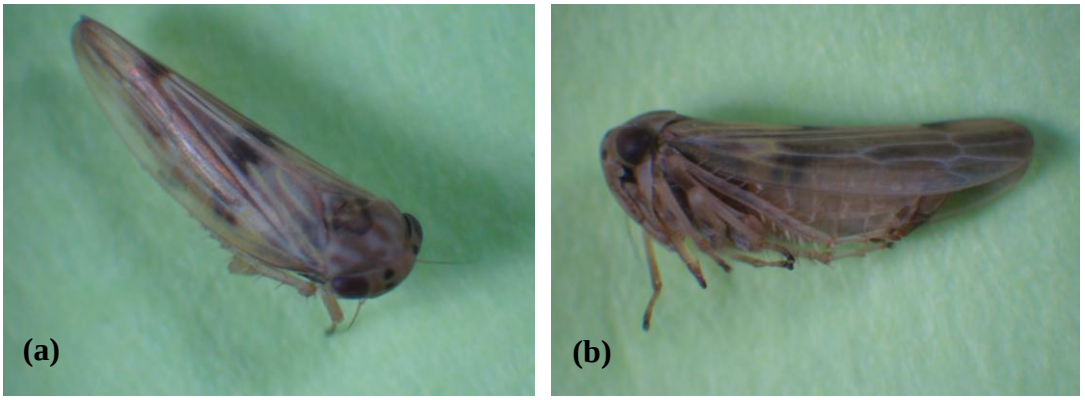


Figura 22 - *Agallia albidula*: Cicadelídeo da subfamília Agalliinae capturado em pomares de citros no Estado de São Paulo

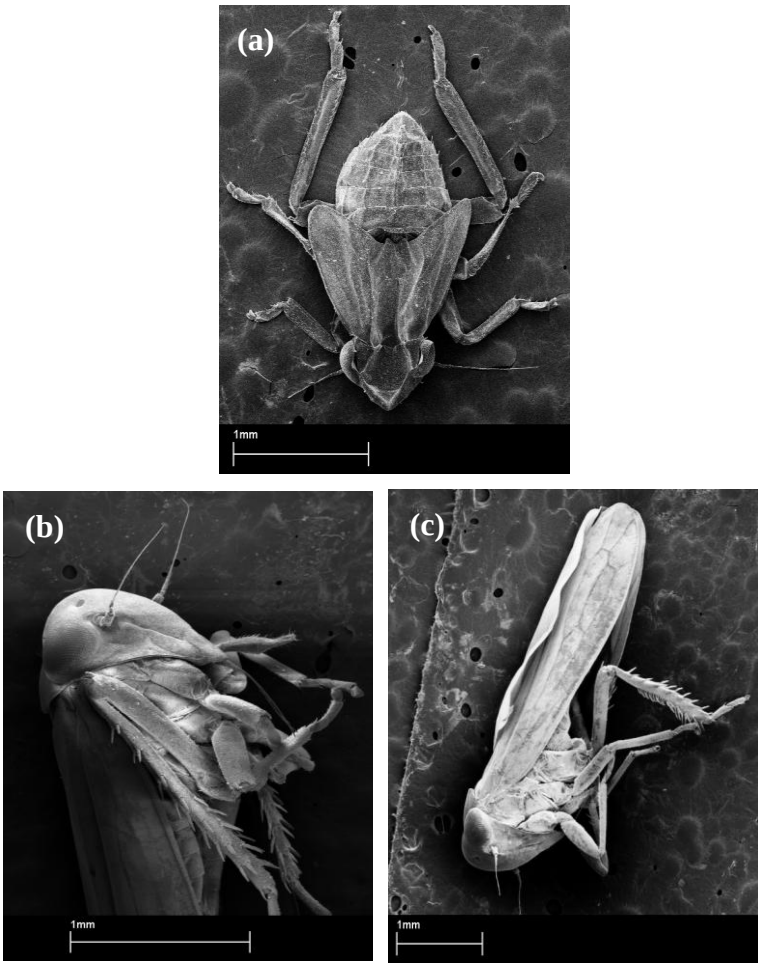


Figura 23 - Dimensão de *Agallia albidula*: Ninfa (a) e adulto (b, c)

2.3.3.3 Identificação de fitoplasmas por RFLP

Os resultados de RFLP referente aos produtos amplificados da região 16S rDNA "F2n/R2" dos isolados Ag1-BR a Ag4-BR, representados pelos isolados Ag1-BR e Ag2-BR (Figura 24), revelam ser o fitoplasma detectado em *A. albidula*, um membro do grupo 16SrIII. Ao compararmos os padrões de RFLP obtidos em laboratório com de outros fitoplasmas, verificamos que o perfil obtido com a enzima *Hpa*II é distinto de qualquer outro perfil de RFLP da região 16S rDNA "F2n/R2" já estabelecido com esta enzima para fitoplasmas do grupo 16SrIII (Figura 24; ANEXOS A e B). Assim como anteriormente, este resultado sugere a ocorrência de um fitoplasma do grupo16SrIII não descrito associado a *A. albidula*.

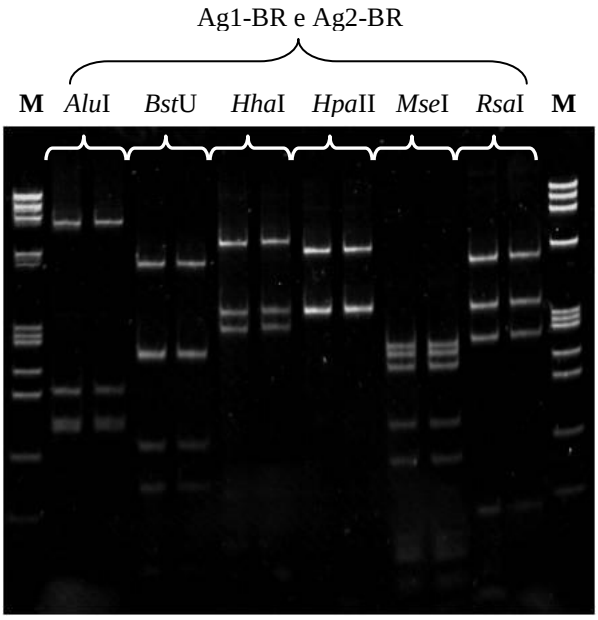


Figura 24 - Padrões de restrição de RFLP obtidos a partir do DNA dos isolados de fitoplasmas Ag1-BR e Ag2-BR pertencentes ao grupo 16SrIII, com o uso das enzimas *Alu*I, *Bst*U, *Hha*I, *Hpa*II, *Mse*I, *Rsa*I; M: marcador molecular ØX174-*Hae*III

2.3.3.4 Identificação de fitoplasmas por RFLP *in silico*

A região 16S rDNA “F2n/R2” do isolado Ag1-BR foi clonada e seqüenciada. As seqüências obtidas foram idênticas entre si (100% de similaridade). Uma seqüência consenso representante do isolado foi obtida e utilizada para a realização do RFLP *in silico*.

Os padrões de RFLP *in silico* obtidos para o isolado Ag1-BR (Figura 25) confirmaram os resultados de RFLP previamente obtidos com as enzimas de restrição em laboratório (Figura 24) e permitiram a comparação com padrões de RFLP já relatados para fitoplasma do grupo 16SrIII (ANEXOS A e B).

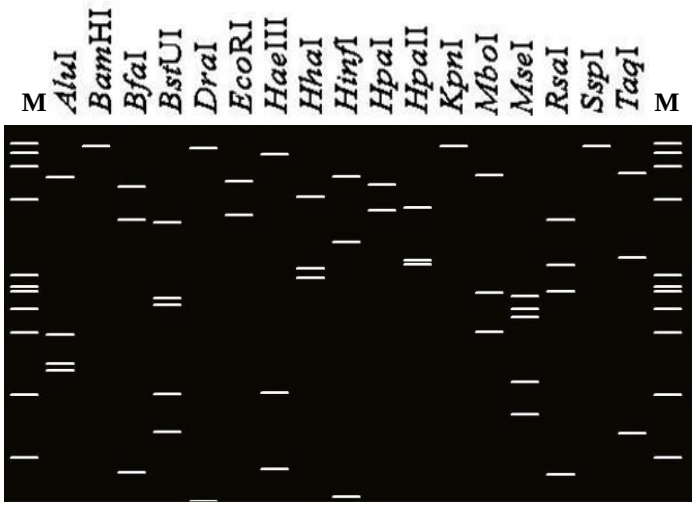


Figura 25 - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA do isolado Ag1-BR (16SrIII) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III

2.3.3.5 Cálculo do coeficiente de similaridade

O isolado Ag1-BR apresentou maior coeficiente de similaridade (0,94; menor que 0,97) quando comparado aos fitoplasmas do subgrupo 16SrIII-“V”, os quais descrevemos anteriormente associados a plantas de citros e plantas daninhas (Tabela 11).

Tabela 11 - Coeficiente de similaridade derivado das análises de padrão de RFLP *in silico* das seqüências da região 16S rDNA "F2nR2" do isolado Ag1-BR e de outros fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII

Subgrupos	16SrIII-A	16SrIII-B	16SrIII-C	16SrIII-D	16SrIII-F	16SrIII-G	16SrIII-J	16SrIII-L	16SrIII-M	16SrIII-N	16SrIII-O	16SrIII-P	16SrIII-Q	16SrIII-S	16SrIII-U	**CTp3-Br**	**BPp8-Br**	**LSp3-BR**	**SAp2-BR**	**Ag1-BR**
16SrIII-A	1																			
16SrIII-B	0,93	1																		
16SrIII-C	0,86	0,93	1																	
16SrIII-D	0,85	0,92	0,93	1																
16SrIII-F	0,88	0,95	0,98	0,95	1															
16SrIII-G	0,95	0,94	0,85	0,89	0,87	1														
16SrIII-J	0,90	0,97	0,96	0,95	0,98	0,89	1													
16Sr III-L	0,96	0,91	0,83	0,82	0,85	0,95	0,88	1												
16SrIII-M	0,85	0,92	0,97	0,94	0,97	0,84	0,95	0,82	1											
16SrIII-N	0,80	0,87	0,90	0,87	0,92	0,78	0,90	0,79	0,89	1										
16SrIII-O	0,84	0,91	0,88	0,87	0,90	0,83	0,93	0,82	0,87	0,84	1									
16SrIII-P	0,87	0,94	0,93	0,92	0,95	0,85	0,97	0,84	0,92	0,87	0,96	1								
16SrIII-Q	0,87	0,94	0,93	0,92	0,95	0,88	0,97	0,84	0,92	0,87	0,88	0,94	1							
16SrIII-S	0,97	0,90	0,82	0,82	0,85	0,94	0,87	0,93	0,82	0,76	0,87	0,90	0,83	1						
16SrIII-U	0,94	0,97	0,92	0,91	0,94	0,88	0,94	0,87	0,91	0,85	0,88	0,90	0,90	0,86	1					
CTp3-Br	**0,9**	**0,97**	**0,9**	**0,89**	**0,92**	**0,88**	**0,94**	**0,87**	**0,89**	**0,83**	**0,88**	**0,91**	**0,95**	**0,86**	**0,96**	**1**				
BPp8-BR	**0,9**	**0,97**	**0,9**	**0,89**	**0,92**	**0,88**	**0,94**	**0,87**	**0,89**	**0,83**	**0,88**	**0,91**	**0,95**	**0,86**	**0,96**	**1**	**1**			
LSp3-BR	**0,9**	**0,97**	**0,9**	**0,89**	**0,92**	**0,88**	**0,94**	**0,87**	**0,89**	**0,83**	**0,88**	**0,91**	**0,95**	**0,86**	**0,96**	**1**	**1**	**1**		
SAp2-BR	**0,88**	**0,94**	**0,84**	**0,85**	**0,88**	**0,85**	**0,88**	**0,79**	**0,83**	**0,82**	**0,84**	**0,81**	**0,79**	**0,79**	**0,83**	**0,95**	**0,95**	**0,95**	**1**	
Ag1-BR	**0,81**	**0,83**	**0,8**	**0,87**	**0,84**	**0,91**	**0,93**	**0,88**	**0,85**	**0,82**	**0,85**	**0,89**	**0,85**	**0,85**	**0,87**	**0,94**	**0,94**	**0,94**	**0,86**	**1**

2.3.3.6 Análise filogenética

Embora o maior coeficiente de similaridade (0,94) apresentado pelo isolado Ag1-BR tenha sido obtido quando comparado aos fitoplasmas do subgrupo 16SrIII-“V”, verificamos que, com base na árvore filogenética construída (Figura 26), este isolado está filogeneticamente relacionado aos fitoplasmas dos subgrupos 16SrIII-J, 16SrIII-P e 16SrIII-U. No entanto, independente da metodologia utilizada, a distinção deste isolado com os outros fitoplasmas é observada. Sendo assim, o isolado Ag1-BR é classificado como um membro do grupo16SrIII e novo subgrupo designado subgrupo “Z” (16SrIII -“Z”).

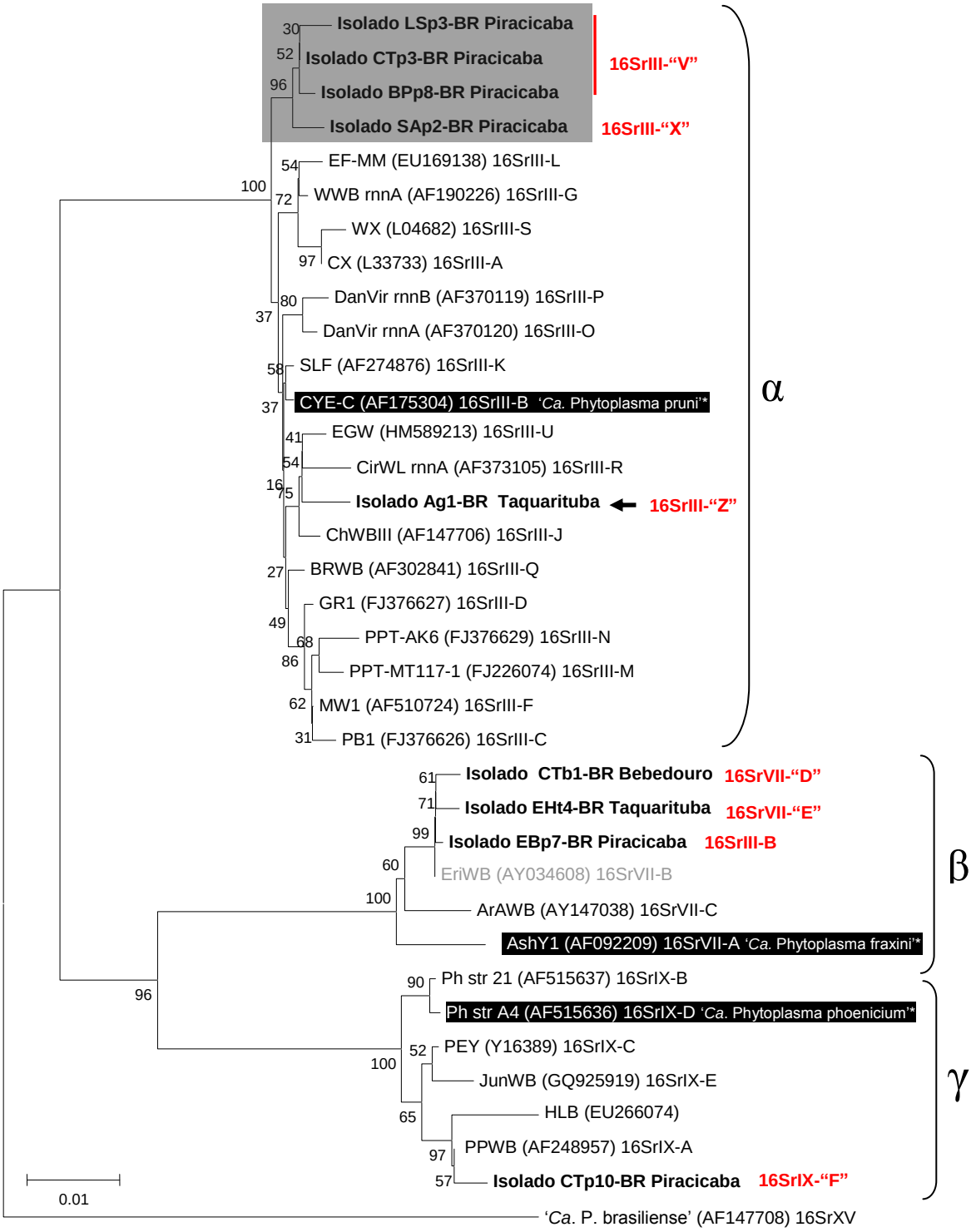


Figura 26 - Árvore filogenética construída usando método *Neighbor-Joining* através das seqüências da região 16S rDNA "F2n/R2" dos isolados de fitoplasmas identificados em plantas de citros, plantas daninhas e em cicadelídeos da espécie *Agallia albidula* (seta) neste estudo, fitoplasmas representantes dos grupos 16SrIII, [16SrIII-K e 16SrIII-R (ZHAO et al., 2009)], 16SrVII e 16SrIX (Tabela 2). '*Ca.* Phytoplasma brasiliense' foi usando como *outgroup*. Os números nos ramos da árvore são os valores de *bootstrap* *Isolados de referência

Dentre as espécies de cicadelídeos identificadas neste trabalho (Tabela 10), somente *D. flavicosta* é reconhecida como vetor de fitoplasma na Jamaica (DABEK, 1982). Isto nos leva a acreditar que é possível que os vetores de fitoplasmas de ocorrência no Brasil sejam distintos dos vetores já relatados em outros países.

O cicadelídeo *A. albidula* é uma espécie da subfamília Agalliinae que se encontra amplamente distribuída no Brasil (COELHO, 1997). Sua presença já foi relatada na Bolívia, Paraguai e Argentina (COELHO et al., 2001). De acordo com Costa (1957), este cicadelídeo é comumente encontrada em cultivos de *Gossypium* spp. (algodão), *Solanum tuberosum* (batata), *S. lycopersicum* (tomate) e sobre diversas plantas daninhas.

Agallia albidula é vetor do vírus *Brazilian tomato curly top* (BTCV), causador do broto crespo do tomateiro (SAUER, 1946), mas inexiste qualquer relato deste cicadelídeo como vetor de fitoplasmas. O fato de fitoplasmas terem sido detectados em *A. albidula* o torna um potencial inseto vetor de fitoplasmas. Embora tenhamos identificado um fitoplasma do grupo 16SrIII em *A. albidula*, não indica, se caso for um vetor, que seja específico deste fitoplasma. Os estudos demonstram que, de um modo geral, não há especificidade do cicadelídeo na transmissão de determinado fitoplasma. Como por exemplo, *Euscelidius variegatus* (Kirschbaum) é vetor de fitoplasmas dos grupos 16SrI (GIANNOTTI, 1969), 16SrIII (JENSEN, 1969) e 16SrV (BOUDON-PADIEU; LARRUE; CAUDWELL, 1989); assim como *Circulifer tenellus* (Baker) é vetor de fitoplasmas do grupo 16SrV (WEINTRAUB et al., 2004), 16SrVI (SHAW; KIRKPATRICKM; GOLINO, 1993) e 16SrIX (WEINTRAUB et al., 2004).

Quase a totalidade dos trabalhos que descrevem novos subgrupos de fitoplasmas é baseada nas análises dos perfis de restrição e os respectivos coeficientes de similaridade gerados. Estas metodologias são pontuais e tem como indicativos a diversidade dos sítios de nucleotídeos reconhecidos por determinadas enzimas de restrição. Já a análise filogenética e a similaridade de nucleotídeos utilizada para decrever espécies de '*Ca*. Phytoplasma' considera a seqüência da região 16S rDNA "F2n/R2" como um todo. De um modo geral, as análises de coeficiente de similaridade nos sugerem uma proximidade dos fitoplasmas dos subgrupos 16SrIII-"V" e 16SrIII-"X" aos fitoplasmas do subgrupo 16SrIII-B, devido ao maior coeficiente de similaridade obtido entre estes fitoplasmas (Tabela 11). Por outro lado, na árvore filogenética verificamos que os fitoplasmas dos subgrupos 16SrIII-"V" e 16SrIII-"X" estão relacionados e compõem uma linhagem distinta das demais incluindo aquela que pertence os fitoplasmas do subgrupo 16SrIII-B (Figura 26). Da mesma forma, o fitoplasma do subgrupo 16SrIII-"Z" apresenta um maior coeficiente de similaridade quando comparado com os fitoplasmas do subgrupo 16SrIII-"V". No entanto, verificamos que na árvore filogenética, o fitoplasma do subgrupo 16SrIII-"Z" está relacionado aos fitoplasmas dos subgrupos 16SrIII-R e 16SrIII-U. Com base nestes dois casos do presente estudo, constatamos que, com as metodologias aqui adotadas, os isolados de fitoplasmas do grupo 16SrIII encontrado em plantas de citros, plantas daninhas e em *A. albidula* são semelhantes a outros fitoplasmas deste grupo, porém apresentam uma evolução divergente a partir de um ancestral comum daqueles que são mais próximos segundo o coeficiente de similaridade.

As espécie candidatas propostas para os fitoplasmas dos grupos 16SrIII, 16SrVII e 16SrIX são '*Ca.* Phytoplasma pruni', '*Ca.* Phytoplasma fraxini' e '*Ca*. Phytoplasma phoenicium', respectivamente (PHYTOPLASMA/ SPIROPLASMA WORKING TEAM – PHYTOPLASMA TAXONOMY GROUP, 2004; VERDIN et al., 2003). Com a análise da similaridade das seqüências de nucleotídeos da região 16S rDNA "F2n/R2" dos fitoplasmas aqui encontrados (dados não apresentados) com os isolados de referência de '*Ca.* Phytoplasma pruni', 'Ca. Phytoplasma fraxini' e '*Ca*. Phytoplasma phoenicium' (Tabela 2) verificamos que a menor similaridade entre os fitoplasmas dos grupos 16SrIII, 16SrVII e 16SrIX encontrados neste estudo com as espécies candidatas correspondentes foi de 98%. De acordo com PHYTOPLASMA/ SPIROPLASMA WORKING TEAM – PHYTOPLASMA TAXONOMY GROUP (2004), quando as seqüências da região 16S rDNA "F2n/R2" de fitoplasmas apresentam uma

similaridade maior que 97,5% com a seqüência de um isolado referência de uma espécie '*Ca.* Phytoplasma', é um indicativo de que estes fitoplasmas são relacionados à respectiva espécie. Sendo assim, os fitoplasmas dos grupos 16SrIII, incluindo os fitoplasmas dos subgrupos 16SrIII-"V", 16SrIII-"X" e 16SrIII-"Z" são relacionados a espécie '*Ca.* Phytoplasma pruni'; os fitoplasmas dos grupos 16SrVII, incluindo os fitoplasmas dos subgrupos 16SrVII-"D" e 16SrVII-"E" são relacionados a '*Ca.* Phytoplasma fraxini', da mesma forma que os fitoplasmas do grupo 16SrIX, incluindo o fitoplasma do grupos 16SrIX-"F", são relacionados a '*Ca*. Phytoplasma phoenicium'. Esta relação pode ser consolidada e adotada até a caracterização completa do genoma destes fitoplasmas associados a teste de patogenecidade, a identidade de um inseto vetor e gama de plantas hospedeiras.

3 CONCLUSÕES

Existe uma grande diversidade de espécies '*Ca*. Phytoplasma' associadas a plantas de citros, plantas daninhas e cicadelídeos em pomares de citros no Estado de São Paulo.

Fitoplasmas dos grupos 16SrIII ('*Ca.* Phytoplasma pruni') e 16SrIX ('*Ca*. Phytoplasma phoenicium') foram identificados associados a plantas de citros em um pomar localizado em Piracicaba. Um fitoplasma do grupo 16SrVII ('*Ca*. Phytoplasma fraxini') foi identificado associado a plantas de citros em um pomar localizado em Bebedouro.

Fitoplasmas do grupo 16SrIII ('*Ca.* Phytoplasma pruni') foram identificados associados a plantas de *Bidens pilosa, Leonorus sibiricus* e *Solanum americanus* em um pomar localizado em Piracicaba.

Fitoplasmas do grupo 16SrVII ('*Ca*. Phytoplasma fraxini') foram identificados associados a plantas de *Erigeron bonariensis* e *Euphorbia heterophylla* em pomares localizados em Piracicaba e Taquarituba, respectivamente.

Um fitoplasma do grupo 16SrIII ('*Ca.* Phytoplasma pruni') foi identificado associado a cicadelídeos da espécie *Agallia albidula* (Uhler, 1895), coletados em um pomar de citros localizado em Taquarituba.

REFERÊNCIAS

ALHUDAIB, K.; AROCHA, Y.; WILSON, M.; JONES, P. Molecular identification, potential vectors and alternative hosts of the phytoplasma associated with a lime decline disease in Saudi Arabia. **Crop Protection**, Guildford, v. 28, p. 13-18, 2009.

AMARAL MELLO, A.P.O. **Identificação molecular de um fitoplasma associado ao enfezamento do tomateiro (*Lycopersicum sculento* L.) e da berinjela (*Solanum melongena* L)**. 2003. 52 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

_____. Identificação de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença. 2007. 64 p. 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.; MASSOJA JUNIOR, N.S.; BEDENDO, I.P. Um fitoplasma do grupo 16SrV associado ao superbrotamento da crotalária. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 30, p. 432-435, 2004.

AMARAL MELLO, A.P.O.; ECKSTEIN, B.; FLORES, D.; KREYCI, P.F.; BEDENDO, I.P. Identification by computer-simulated RFLP of phytoplasmas associated with eggplant giant calyx representative of two subgroups, a lineage of 16SrIII-J and the new 16SrIII-U. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010.** Doi: 10.1099/ijs.o.019141-0, 2010.

AROCHA, Y.; LÓPEZ, M.; PIÑOL, B.; FERNANDEZ, M.; PICORNELL, B.; ALMEIDA, R.; PALENZUELA, I.; WILSON, M.R.; JONES, P. '*Candidatus Phytoplasma graminis*' and '*Candidatus Phytoplasma caricae*', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 2451-2463, 2005.

BAI, X.; ZHANG, J.; EWING, A.; MILLER, S.A.; RADEK, A.J.; SCHEVCHENKO, D.V.; TSUKERMAN, K.; WALUNAS, T.; LAPIDUS, A.; CAMPBELL, J.W.; HOGENHOUT, S. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 188, p. 3682-2696, 2006.

BARROS, T.L.S.; KITAJIMA, E.W.; RESENDE, R.O. Diversidade de isolados brasileiros de fitoplasmas através da análise de 16S rDNA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 459-465, 1998.

BARROS, T.S.L.; DAVIS, R.E.; RESENDE, R.O.; DALLY, E.L. Erigeron Witche's broom phytoplasma in Brazil represents new subgroup VII-B in 16S rRNA gene group VII, the Ash Yellows Phytoplasma group. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 1142-1148, 2002.

BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Identificação molecular do fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.329, 1998.

_____. Detecção e caracterização de fitoplasmas em plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) e de pimenteira (*Capsicum frutensis*) através das técnicas de duplo PCR e RFLP. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 25, p.197-201, 1999.

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

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. The mode of phage libertation by lysogenic *Escherichia coli.* **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 62, p. 293-300, 1951.

BIANCHINI, L.; BEDENDO I. P. Presença de um fitoplasma do grupo I, evidenciado por PCR, em plantas de Erigeron (*Erigeron bonariensis* L.) com superbrotamento. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 348, 2000.

BOUDON-PADIEU, E., LARRUE, J., CAUDWELL, A. ELISA and Dot-Blot detection of Flavescence dorée MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative state. **Current Microbiology,** New York, v. 19, p. 357-64, 1989.

BOVÉ, J.M. Witches' broom disease of lime. **FA0 Plant Protection Bulletin**, Rome, v. 34, p. 217-218, 1986.

BOVÉ, J.M.; DANET, J.L.; BANANEJ, K.; HASSANZADEH, N.; TAGHIZADEH, M.; SALEHI, M.; GARNIER, M. Witches'-broom disease of lime in Iran. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION CITRUS VIROLOGY, 14., 2000, Riverside. **Proceedings…** Riverside: IOCV, 2000. p. 207-212.

BRIOSO, P.S.T.; MONTANO, H.G.; FIGUEIREDO, D.V.; POLTRONIERI, J.S.; FURLAN JÚNIOR, J. Amarelecimento fatal do dendezeiro: seqüenciamento parcial do fitoplasma associado. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, p. 50, 2006.

CHEN, J.; PU, X.; DENG, X.; LIU, S.; LI, H.; CIVEROLO, E. A Phytoplasma Related to "*Candidatus* Phytoplasma asteri" detected in Citrus showing Huanglongbing (Yellow Shoot Disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99 p. 236-242, 2009.

COELHO, L.B.N. **Análise faunística de cicadellideae (Insecta: Homoptera) em área de mata atlântica**. 1997. 85 p. Tese (Doutorado em Entomologia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

COELHO, L.B. N.; DA-SILVA, E.L.; FERREIRA, P.S.F. Registros novos e adicionais de Agalliinae, Gyponinae E Nirvaniinae (Homoptera: Cicadellidae) para o Estado de Minas Gerais, Brasil. **Entomotropica antes/formerly Boletín de Entomología Venezolana,** Maracay, v. 16, p. 131-135, 2001.

CONCI, L.; MENEGUZZI, N.; GALDEANO, E.; TORRES, L.; NOME, C.; NOME, S. Detection and molecular characterisation of na alfafa phytoplasma in Argentina that represents a

new subgroup in the 16S rDNA Ash Yellows group (‘*Candidatus* phytoplasma fraxini’). **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 113, p. 255-265, 2005.

COSTA, A.S. Alguns insetos e ácaros usados na transmissão de moléstias de vírus das plantas. **Bragantia,** Campinas, v. 6, p. 15-21, 1957.

DABEK, A.J. Transmission experiments on coconut lethal yellowing disease with *Deltocephalus flavicosta* Stål, a leafhopper vector of periwinkle phyllody in Jamaica. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 103, p. 103-109, 1982.

DAVIS, R.E. Fitoplasmas: fitopatógenos procarióticos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas,** Passo Fundo, v. 3, p. 1-27, 1995.

DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; GUNDERSEN, D.E.; LEE, I-M.; HANILI, N. ‘Candidatus phytoplasma australiense,’ a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 47, p. 262-269, 1997.

DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; LEE, I-M.; RESENDE, R.O.; KITAJIMA, E.W.; Detection and characterization of mycoplasmalike organisms (MLOs) in diverse plant species in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 340, 1994.

DAVIS, R.E. ; DALLY, E.L.; ZHAO, Y.; LEE, I.-M.; JOMANTIENE, R.; DETWEILER, A.J.; PUTNAM, M.L. First report of a new subgroup 16SrIX-E (‘*Candidatus* Phytoplasma phoenicium’-related) phytoplasma associated with juniper witches’ broom disease in Oregon, USA. **Plant Pathology**, London, v. 20, p. 35, 2010.

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

DOI, Y.; TERANAKA, M.; YORA, K.; ASUYAMA, H. Mycoplasma or PLT-like organisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows and *Paulownia* wicthes' broom. **Annual of Phytopathology Society of Japan**, Tokyo, v.33, p.259-266, 1967.

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.

DUARTE, V.; SILVA, E.G.; HASS, I.C.R.; BEDENDO, I.P.; KITAJIMA, E.W. First report of a group 16SrIII-B phytoplasma associated with decline of china tree in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, p. 666, 2009.

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

_____. **Enfezamento do brocólis: identificação molecular de fitoplasmas, potenciais insetos vetores e hospedeiros alternativos, e análise epidemiológica da doença**. 2010. 103 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ECKSTEIN, B.; BARBOSA, J.C.; BEDENDO, I.P. Ocorrência de fitoplasmas do grupo 16SrIX em vinca na região do Alto Paranaíba. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.35, 2009. 1 CD-ROM.

ECKSTEIN, B.; BARBOSA, J.C.; REZENDE, J.A.M.; BEDENDO, I.P. Sida sp. a new host for 'Candidatus Phytoplasma brasiliensis' in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, 2010. In press.

FLÔRES, D. **Caracterização molecular e análise filogenética do fitoplasma da mandioca (Manihot esculenta L.) no Estado de São Paulo**. 2009. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrinual 2009**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2009. p. 329-383.

GARNIER, M.; ZREIK, L.; BOVÉ, J.M. Witches' broom, a lethal mycoplasmal disease of lime trees in the Sultanate of Oman and the United Arab Emirates. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, p. 546-551, 1991.

GASPAROTO, M.C.G. **Epidemiologia comparativa entre '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' e '*Candidatus* Liberibacter americanus' em ambiente controlado**. 2010. 109 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

GHOSH, D.K.; DAS, A.K.; SINGH, S.; SINGH, S.J.; AHLAWAT, Y.A. Occurrence of witches'- broom, a new phytoplasma disease of acid lime (*Citrus aurantifolia*) in India. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 302, 1999.

GIANNOTTI, J. Transmission of clover phyllody by a new leafhopper vector, *Euscelidius variegatus*. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 53, p. 173, 1969.

GRIFFITHS, 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 of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 49, p. 144-151, 1999.

GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primers pair. **Phytopathology Mediterranea**, Bologna, v. 36, p. 144-151, 1996.

GUNDERSEN, D.E.; LEE, I-M.; CHANG, C.; DAVIS, R.E. RFLP analysis of ribosomal protein genes reveal strain diversity in MLO 16S rRNA groups I and III. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 1128-1132, 1994.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleid Acids Symposium Series**, New York, v. 41, p. 95-98, 1999.

HIRUKI, C.; WANG, K. Clover proliferation phytoplasma: '*Candidatus Phytoplasma trifolii*'. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v.54, p.1349-1353, 2004.

HOCQUELLET, A.; TOORAWA, P.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. Detection and identification of the two *Candidatus* Liberobacter species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the beta operon. **Molecular and Cellular Probes,** London**,** v. 13, p. 373-379, 1999.

HOGENHOUT, S.A.; OSHIMA, K.; AMMAR, E-D.; KAKIZAWA, S.; KINGDOM, H.; NAMBA, S. Phytoplasmas: bactéria that manipulate plants and insects. **Molecular Plant Pathology**, Reading, v.9, p.403-423, 2008.

IRPCM Phytoplasma/ Spiroplasma working team – Phytoplasma taxonomy group. '*Candidatus* phytoplasma', a taxon for the wall-less, non helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. **International Journal of Systematic Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1243-1255, 2004.

_____. International Committee on Systematic Bacteriology. Subcommittee on Taxonomy of Mollicutes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Iowa, v. 43, p. 394-397, 1993.

JENSEN, D.D. Comparative transmission of Western X-disease virus by *Colladonus montanus*, *C. geminatus*, and a new leafhopper vector *Euscelidius variegates*. **Journal of Econony Entomology**, Baltimore, v. 62, p. 147-50, 1969.

JUNG, H.Y.; SAWAYANAGI, T.; WONGKAEW, T.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; WEI, W.; OSHIMA, K.; MIYATA, S.; UGAKI, M.; HIBI, T.; NAMBA, S. '*Candidatus Phytoplasma oryzae*', a novel phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** Reading, v. 53, p. 1925-1929, 2003b.

KITAJIMA, E.W.; COSTA, A.S. Estruturas do tipo mycoplasma no floema de tomateiro afetado pelo cálice gigante. **Bragantia,** Campinas, v. 27, p. XCVII-XCIX, 1968.

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.; DAVIS, R.E.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Phytoplasma: phythopatogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology,** Washington, v. 54, p. 221-252, 2000.

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

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

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

LIM, P.O.; SEARS, B.B. 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasmalikeorganisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 11, p. 5901-5906, 1989.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas:** plantio direto e convencional. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1990. 269 p.

_____. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas:** plantio direto e convencional. 6. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2006. 269 p.

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

MARCONE, C.; SCHNEIDER, B.; SEEMÜLLER, E. '*Candidatus Phytoplasma cynodontis'*, the phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1077-1082, 2004a.

MARCONE, C.; GIBB, K.B.; STRETEN, C.; SCHNEIDER, B. '*Candidatus Phytoplasma spartii'*, *'Candidatus Phytoplasma rhamni'* and '*Candidatus Phytoplasma allocasuarinae'*, respectively associated with spartium witches'- broom, buckthorn witches'- broom and allocasuarina yellows diseases. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1025-1029, 2004b.

MARZACHI, C.; VERATTI, F.; BOSCO, D. Direct PCR detection of phytoplasmas in experimentally infected insects. **Annals of Applied Biology**,Warwick, v. 133, p. 45-54, 1998.

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

MELO, L.A. **Identificação molecular de fitoplasmas associados ao amarelo da abobrinha-de-moita e à filodia de frutos do morangueiro**. 2008. 88 p. Dissertação (Dissertação em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MELO, L.A.; BEDENDO, I.P.; YUKI, V.A. Abobrinha-de-moita: um novo hospedeiro de fitoplasma do grupo 16SrIII. **Tropical Plant Pathology,** Brasília, v. 34, n. 2, p. 114-117, 2009.

MELO, L.A.; VENTURA, J.A.; COSTA, H.; BEDENDO, I.P. Fitoplasmas do grupo 16SrXIII associados a plantas de mamão com a anomalia conhecida por vira-cabeça. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. S214-S214, 2007.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T.; PIMENTEL, J.P. List of phytoplasma hosts in Brazil. **Bulletin of Insectology,** Bologna, v. 60, p. 129-130, 2007.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T.; PEREIRA, R.C.; PIMENTEL, J.P. *Sicana odorifera* (Cucurbitaceae) a new phytoplasma host. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 287-288, 2007.

MONTANO, H.G.; CURE, C.A.M.; CUNHA JUNIOR, J.O.; BRIOSO, P.S.T. 16S rRNA III phytoplasma associated with *Catharanthus roseus* virescence in Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz de Iguaçu. **Resumos…** Foz de Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia**,** 2001c. p.22.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T.; PIMENTEL, J.P.; FIGUEIREDO, D.V.; CUNHA JUNIOR, J.O. *Cucurbita moschata*, new phytoplasma host in Brazil**. Journal of Plant Pathology**, Reading, v. 88, p. 226, 2006.

MONTANO, H.G.; DALLY, E.L.; DAVIS, R.E.; PIMENTEL, J.P.; BRIOSO, P.S.T. First report of a natural infection by "*Candidatus* Phytoplasma brasiliense" in *Catharanthus roseus*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n.11, p.1209, 2001b.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.; CUNHA JUNIOR, J.O.; FIGUEIREDO, D.V.; PIMENTEL, J.P. First reporto f group 16SrIII phytoplasma in loofah (Luffa cylindrica). **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, p. 277-278, 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 chayote in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 429-436, 2000.

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

NEI, M.; LI, W.H. Matematical model for studing genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** Washington, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

NERONI, R.C. **Amarelos da videira: identificação e análise filogenética dos fitoplasmas, transmissão dos agentes causais e otimização da diagnose**. 2009. 96 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

NERONI, R.C.; BEDENDO, I.P.; KUNIYUKI, H. Identificação molecular de fitoplasmas associados ao amarelo da videira. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 31, p. 243, 2006.

OSHIMA, K.; MIYATA, S.; UGAKI, M.; HIBI, T.; NAMBA, S. '*Candidatus phytoplasma ziziphi*', a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches'-broom disease, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1037-1041, 2003.

OSHIMA, K.; UGAKI, M.; LEE, J.T.; HIBI, T.; NAMBA, S. '*Candidatus phytoplasma castaneae'*, a novel phytoplasma taxon associated with chestnut witches' broom disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, p. 1543-1549, 2002.

OSHIMA, K.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; JUNG, H-I, WEI, W.; SUZUKI, S.; ARASHIDAL, R.; NAKATA, D.; MIYATAL, S-I.; UGAKI, M.; NAMBA, S. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. **Nature Genetics**, London, v. 36, n. 1, p. 27-29, 2004

PEREIRA, R.C.; A-JIMENEZ, N.Z.; NASCIMENTO, R.R.S.; BRIOSO, P.S.T.; MONTANO, H.G. Fitoplasma associado à "proliferação da poinsétia" em plantas envassadas de Euphorbia pulcherrima. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, 16., 2006, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2006. 1 CD-ROM.

RAPUSSI-DA-SILVA, M.C.C. **Enfezamento da couve-flor: identificação molecular de fitoplasmas, evidência de potencial vetor e análise epidemiológica da doença.** 2010. 106 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010**.**

RIBEIRO, L.F. **Fitoplasma do superbrotamento do maracujazeiro: identificação molecular, análise filogenética e prova de patogenicidade**. 2008. 58 p (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

RIBEIRO, L.F.; AMARAL MELLO, A.P.; GIORIA, R. Phytoplasma associated with shoot proliferation in begônia. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, p. 475-477, 2006.

RIBEIRO, L.F.; BEDENDO, I.P.; SANHUEZA, R.M.V. Evidência molecular da ocorrência de um fitoplasma associado ao lenho mole da macieira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 30-33, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning:** a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Sprig Harbor, 2001. 2344 p.

SAUER, H.F.G. A cigarrinha *Agallia álbidula* Uhl. (Horn., Cicadel.) vectora de uma doença de vírus do tomateiro. **Biológico**, São Paulo, v. 12, p. 176-178, 1946.

SAWAYANAGI, T.; HORIKOSHI, N.; KANEHIRA, T.; SHINOHARA, M.; BERTACCINI, A.; COUSIN, M.T.; HIRUKI, C.; NAMBA, S. '*Candidatus* phytoplasma japonicum', a new phytoplasma taxon associated with Japanese Hydrangea phyllody**. International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 49, p. 1275-1285, 1999.

SCHNEIDER, B.; TORRES, E.; MARTIN, M.P.; SCHRODER, M.; BEHNKE, H.D.; SEEMÜLLER, E. '*Candidatus* Phytoplasma pini', a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 303-307, 2005.

SEEMÜLLER, E.; SCHNEIDER, B. '*Candidatus* Phytoplasma mali', '*Candidatus* Phytoplasma pyri' and '*Candidatus* Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellowa, respectively. **International of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1217-1226, 2004.

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

SHAW, M.E.; KIRKPATRICK, B.C.; GOLINO, D.A. The beet leafhopper-transmitted virescence agent causes tomato big bud disease in California. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 290-295, 1993.

SILVA, E.G.; BEDENDO, I.P.; CASAGRANDE, V.; MORAES, V.A. Molecular identification and phylogenetic analysis of a group 16SrI-B phytoplasma associated with sugarcane yellow leaf syndrome in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, p. 771-774, 2009.

SILVA, E.G.; BEDENDO, I.P; MASSOLA, N.S.; SILVA, R.F. '*Candidatus* Phytoplasma brasiliense' associado ao superbrotamento do hibisco. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, p. 234-236, 2009.

SILVA, E.G.; HAAS, I.C.R.; BEDENDO, I.P.; FLÔRES, D. Detecção de fitoplasma em plantas de primavera (Bougainvillea spectabilis) com sintomas de superbrotamento. **Summa Phytopathologica,** Botucatu, v. 32, p. 45, 2006.

SMART, C.D.; SCHNEIDER, B.; BLOMQUIST, C.L.; GUERRA, L.J.; HARRISON, N.A.; AHRENS, U.; LORENZ, K.-H.; SEEMU LLER, E.; KIRKPATRICK. B.C. Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. **Applied and Environmental Microbiology**, Reading, v. 62, p. 2988-2993, 1996.

STADEN, R. Indexing and using sequence databases. **Methods Enzymology**, New York, v. 266, p. 105-114, 1996.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS, W.C., JR.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; BASSANEZI, E.B.; AYRES, A.J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. Citrus huanglongbing in São Paulo, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus*' Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes,** London**,** v. 19, p. 173-179, 2005.

TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.; MARTINS, E.C.; KITAJIMA, E.W.; BASSANEZI, R.; AYREX, A.J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'-broom phytoplasma (16SrIX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the State of São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 9, p. 977-984, 2008.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity ofprogressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gagpenalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. **Compendium of citrus diseases**. 2nd ed. Saint Paul: APS Press, 2000. 80 p.

VALIUNAS, D.; JOMANTIENE, R.; IVANAUSKAS, A. 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, p. 550, 2009.

VALIUNAS, D.; SANIULIS, J.; DAVIS, R.E. '*Candidatus Phytoplasma fragariae'*, a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 277-281, 2006.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K. ; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews,** Washington, v. 20, p. 407-438, 1996.

VERDIN, E.; SALAR, P.; DANET, J.L.; CHOUEIRI, E.; JREIJIRI, F.; ZAMMAR, S.; GELIE, B.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. *'Candidatus* phytoplasma phoenicium' sp. nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 833-838, 2003.

WEI, W.; DAVIS, R.E.; LEE, I-M.; ZHAO, Y. Computer simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma grups. **International Journal of 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 for rapid deliniation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 2368-2377, 2008.

WEINTRAUB, P.G.; BEANLAND, L. Insect vectors of phytoplasmas. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 59, p. 91-111, 2006.

WEINTRAUB, P.G.; WILSON, M. R. Control of phytoplasma diseases and vectors. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. **Phytoplasmas, genomes, plant hosts and vectors.** Oxon: CABI, 2009. chap. 13, p. 233-249.

WEINTRAUB, P.G.; PIVONIA, S.; ROSNER, A.; GERA, A. A new disease in *Limonium* hybrids. II. Insect vectors. **HortScience**, London, v. 39, p. 1060-1061, 2004.

WEISBURG, W.G.; TULLY, J.G.; ROSE, D.L.; PETZEL, J.P.; OYAIZU, H.; YANG, D.; MANDELCO, L.; SECHREST, J.; LAWRENCE, T.G.; Van ETTEN, J. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, p. 6455-6467, 1989.

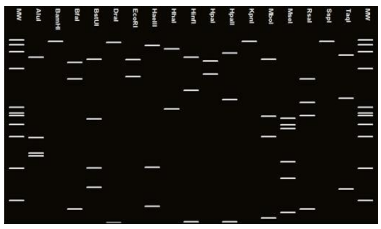
ZHAO, Y.; WEI, W.; LEE, I-M.; SHAO, J.; SUO, X.; DAVIS, R.E. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**,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

ZREIK, L.; CARLE, P.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. Characterization of the mycoplasmalike organism associated with with witches'-broom disease of lime and proposition of a Candidatus taxon for the organism, '*Candidatus* phytoplasma aurantifolia'. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 45, p. 449-453, 1995.

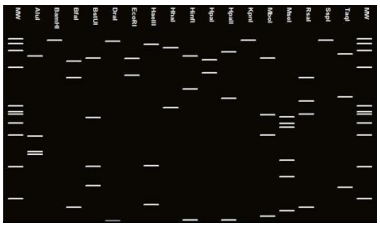
ANEXOS

ANEXO A - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA “F2n/R2” de fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII, subgrupos 16SrIII-A, 16SrIII-B, 16SrIII-C, 16SrIII-D, 16SrIII-F, 16SrIII-G, 16SrIII-J, 16SrIII-L e 16SrIII-M (Tabela 2) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III

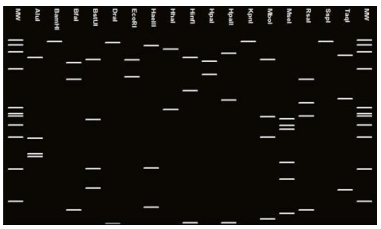
16Sr III A (GenBank: L33733)



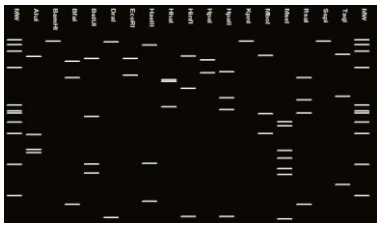
16Sr III B (GenBank: AF175304)



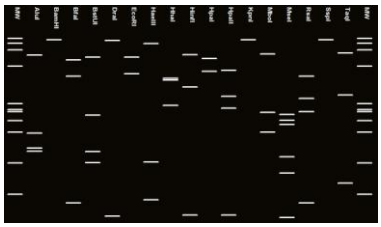
16Sr III C (GenBank: FJ376626)



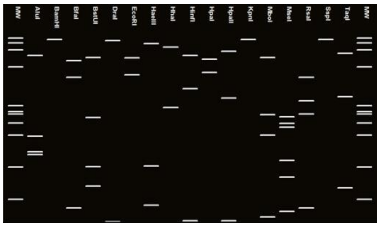
16Sr III D (GenBank: FJ376627)



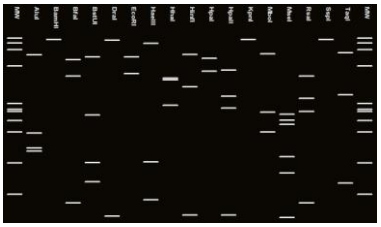
16Sr III F (GenBank: AF510724)



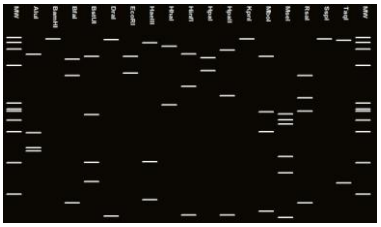
16Sr III G (GenBank: AF190226)



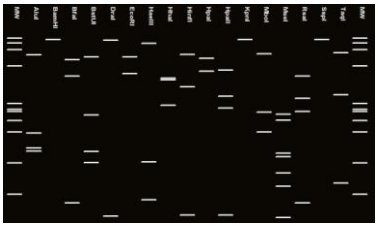
16Sr III J (GenBank: AF147706)



16Sr III L (GenBank: EU169138)

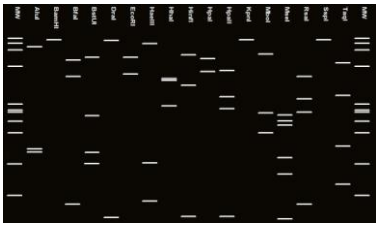


16SrIII-M (GenBank: FJ226074)

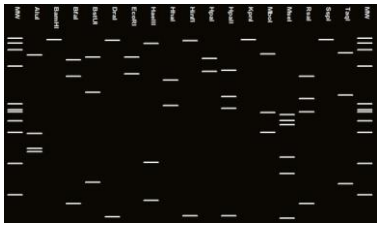


ANEXO B - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA de fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII, subgrupos 16SrIII-N, 16SrIII-O, 16SrIII-P, 16SrIII-Q, 16SrIII-S e 16SrIII-U (Tabela 2) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III

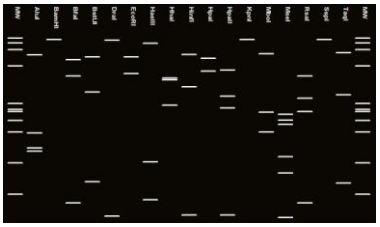
16SrIII-N (GenBank:FJ376629)



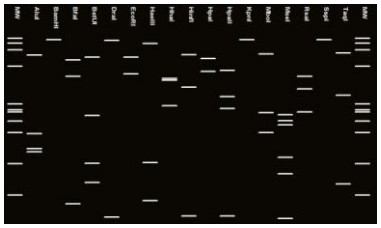
16SrIII-O (GenBank: AF370120)



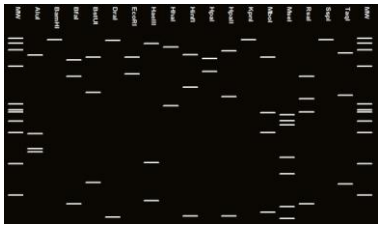
16SrIII-P (GenBank: AF370119)



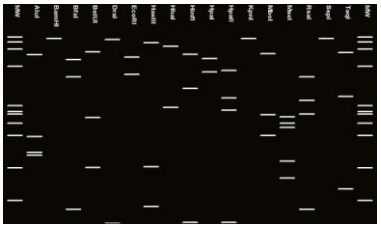
16SrIII-Q (GenBank: AF302841)



16SrIII-S (GenBank: L04682)

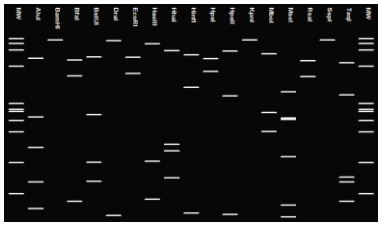


16SrIII-U (GenBank: HM589213)

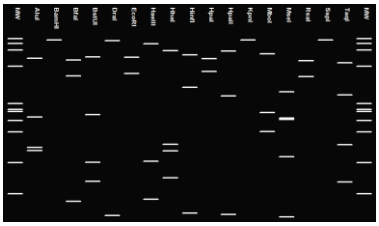


ANEXO C - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA de fitoplasmas representantes do grupo 16SrVII (Tabela 2) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III

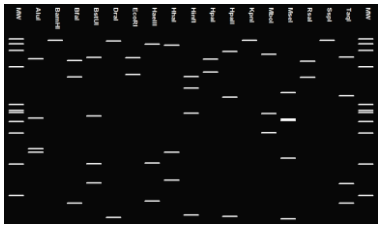
16SrVII-A (GenBank: AF092209)



16SrVII-B (GenBank: AY034608)

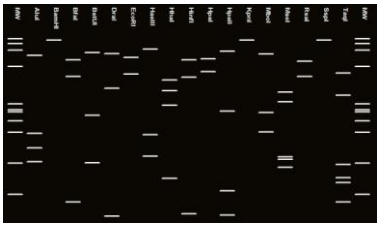


16SrVII-C (GenBank: AY147038)

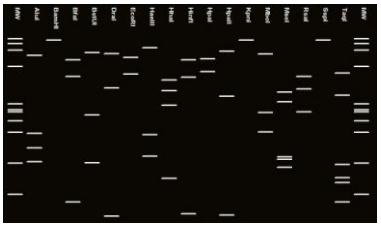


ANEXO D - Padrões de restrição de RFLP da digestão *in silico* de fragmentos da região 16S rDNA de fitoplasmas representantes do grupo 16SrIX (Tabela 2) pelo uso de 17 enzimas: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (MboI), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, e *Taq*I. M: marcador, ØX174 DNA-*Hae*III

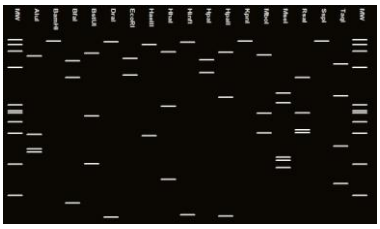
16SrIX-A (GenBank: AF248957)



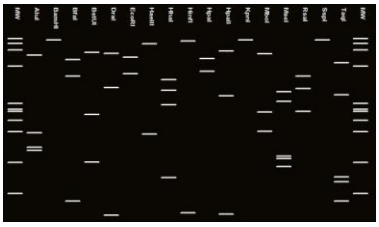
16SrIX-B (GenBank: AF515637)



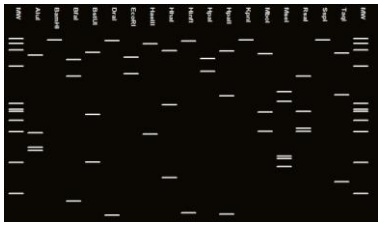
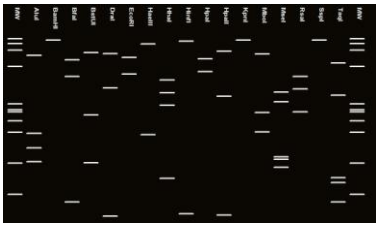
16SrIX-C (GenBank: Y16389)



16SrIX-D (GenBank: AF515636)



16SrIX-E(GenBank: GQ925919)



16SrIX HLB (GenBank: EU266074)