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

**Ocorrência e identificação molecular de fitoplasmas em
pessegueiro, nectarineira e mostarda-do-campo**

Ticyana Carone Banzato

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

**Piracicaba
2018**

Ticyana Carone Banzato
Engenheira Agrônoma

**Ocorrência e identificação molecular de fitoplasmas em pessegueiro,
nectarineira e mostarda-do-campo**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **IVAN PAULO BEDENDO**

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

Piracicaba
2018

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

Banzato, Ticyana Carone

Ocorrência e identificação molecular de fitoplasmas em pessegueiro, nectarineira e mostarda-do-campo / Ticyana Carone Banzato. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.
79 p.

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

1. Mollicutes 2. Bactérias fastidiosas 3. Procariotos sem parede celular I.
Título

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por tornar tudo possível.

Ao meu orientador, Professor Dr. Ivan Paulo Bedendo, pela confiança, respeito e amizade. A ele, minha sincera admiração!

Ao Professor Dr. José Otavio Menten, pelas oportunidades, amizade e confiança.

A todos os Professores que me acompanharam na minha trajetória acadêmica, principalmente ao Professor Dr. João Lopes: completei mais uma etapa!

À Professora Dr^a. Ana Paula de Oliveira Amaral Mello, pela confiança e amizade ao ceder as amostras desse trabalho para análise.

Aos Produtores Claudenir, Cláudia e Guilherme, por me receberem tão bem em suas propriedades e permitir as coletas dos materiais utilizados nesse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concedida.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Fitopatologia, pela estrutura e oportunidades oferecidas.

Às minhas amigas e amigos da Fitopatologia, pelos momentos de descontração e pelos conhecimentos compartilhados tantas vezes.

Aos meus amigos de laboratório, que sem a amizade e paciência teria sido mais difícil finalizar minha tese, em especial ao Jacson Ferreira e à Thays Pereira pelos conhecimentos compartilhados em classificação de fitoplasmas, à Líllian Bibiano que me ajudou muito na época da minha qualificação e ao Anderson Ramos que sempre me ajudou para tudo que precisei.

Às minhas amigas de Divino Pote e BK Sarah, Thays e Ariane.

A todos os funcionários e professores do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À família que formei e à família que me formou: obrigada pelo amor e paciência.

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

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

Muito Obrigada.

EPÍGRAFE

*“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu,
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu.
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações,
E assim ter amigos contigo em todas as situações. ”.*

Ana Vilela

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE QUADROS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
REFERÊNCIAS	16
2 OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FITOPLASMAS EM PESSEGUEIRO E NECTARINEIRA	19
RESUMO	19
ABSTRACT.....	19
2.2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.3.1. COLETA DE AMOSTRAS	25
2.3.2. CONDIÇÕES DE PCR E PADRÕES.....	26
2.3.3. CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO.....	28
2.3.3.1 PURIFICAÇÃO	28
2.3.3.2 LIGAÇÃO	29
2.3.3.3 TRANSFORMAÇÃO	29
2.3.3.4 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL E CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO	30
2.3.4. ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS E DE SÍTIOS PUTATIVOS DE RESTRIÇÃO.....	30
2.3.5. ANÁLISE FILOGENÉTICA	31
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
2.4.1 DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FITOPLASMAS POR PCR	32
2.4.2 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO FRAGMENTO 16S rDNA DO FITOPLASMA	35
2.4.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SEQUÊNCIAS DO FRAGMENTO 16S rDNA DE FITOPLASMAS	40
2.5 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICES	47
3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FITOPLASMAS EM PLANTAS DE MOSTARDA-DO-CAMPO (BRASSICA RAPA L)	50
RESUMO	50
ABSTRACT.....	50
3.2 REVISÃO DE LITERATURA	52
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.3.1 COLETA DE AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL.....	54
3.3.2 TESTES DE PCR PARA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FITOPLASMAS	54
3.3.3 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO.....	56
3.3.1.2 PURIFICAÇÃO	56
3.3.3.2 LIGAÇÃO	57
3.3.3.3 TRANSFORMAÇÃO	57
3.3.3.4 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL E CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO DO FRAGMENTO NO PLASMÍDEO ..	58
3.3.4 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS E DE SÍTIOS PUTATIVOS DE RESTRIÇÃO.....	58
3.3.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA	59
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60

3.4.1	DETECÇÃO DE FITOPLASMAS NAS AMOSTRAS DE MOSTARDA-DO-CAMPO	60
3.4.2	IDENTIFICAÇÃO DO FITOPLASMA ASSOCIADO A PLANTAS DE MOSTARDA-DO-CAMPO	62
3.4.3	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO FRAGMENTO 16S rDNA DE FITOPLASMAS	64
3.4.4	ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SEQUÊNCIAS DO FRAGMENTO 16S rDNA DE FITOPLASMAS	72
3.5	CONCLUSÕES.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75
	APÊNDICES.....	77

RESUMO

Ocorrência e identificação molecular de fitoplasmas em pessegueiro, nectarineira e mostarda-do-campo

Fitoplasmas são organismos procarióticos desprovidos de parede celular, parasitas intracelulares obrigatórios de floema e patogênicos às plantas. Numerosas doenças associadas a este tipo de agentes patogênicos têm sido frequentemente relatadas em espécies cultivadas e plantas daninhas. No presente estudo, sintomas tipicamente induzidos por fitoplasmas, tais como clorose e avermelhamento foliar, redução no tamanho das folhas, diminuição dos órgãos florais, superbrotamento de ramos e declínio da planta, foram observados em pomares de fruteiras de caroço como pessegueiro e nectarineira. Além disto, em campos de couve-flor, plantas daninhas conhecidas como mostarda-do-campo também manifestaram sintomas que pareciam ter sido provocados por fitoplasmas, expressados por superbrotamento de ramos finos e redução no tamanho de folhas e flores. Assim, o presente trabalho teve por objetivos detectar, identificar e classificar a nível molecular os possíveis fitoplasmas associados às plantas sintomáticas citadas anteriormente, utilizando as técnicas de PCR, análise de RFLP virtual e o método de classificação on-line denominado de *iPhyClassifier*. Para tanto, o DNA das amostras das fruteiras de caroço e da erva daninha foi extraído com o auxílio de um kit comercial ou através do protocolo 2X CTAB. A detecção dos fitoplasmas foi conduzida por duplo PCR com os primers universais R16mF2/mR1 e SN910601/SN011119 na primeira reação e com o par R16F2n/R2 na segunda reação. Para a mostarda, a identificação dos fitoplasmas também foi realizada através de duplo PCR com os primers e R16(III)F2/R16(III)R1 específicos para fitoplasmas do grupo 16SrIII. A aplicação de PCR com primers universais permitiu a detecção consistente desses agentes nos tecidos das plantas sintomáticas de pessegueiro, nectarineira e mostarda-do-campo pela amplificação de um fragmento genômico de 1250 pb, correspondente ao gene 16S rRNA. Para todos os hospedeiros analisados, os produtos amplificados por duplo PCR com os primers universais foram purificados, clonados em *Escherichia coli* e submetidos ao sequenciamento. A análise de RFLP virtual e *iPhyClassifier* permitiram classificar os fitoplasmas encontrados em mostarda nos grupos 16SrIII e 16SrVII. Os fitoplasmas detectados na mostarda-do-campo, foram definitivamente classificados como representantes dos subgrupos 16SrIII-B, 16SrIII-J e 16SrIII-U e 16SrVII-B. Em relação aos fitoplasmas encontrados no pessegueiro e nectarineira, foi possível classificar os fitoplasmas nos grupos 16SrI e 16SrIII, sendo definitivamente classificados como representantes dos subgrupos 16SrI-B em pessegueiro, e em nectarineira, classificados em 16SrI-B e 16SrIII-J.

Palavras-chave: Bactérias Fastidiosas; Mollicutes; Procariotos sem parede celular

ABSTRACT

Occurrence and molecular identification of phytoplasmas in peach, nectarine and mustard-field

Phytoplasmas are prokaryotic organisms devoid of cell wall, obligate intracellular phloem parasites and pathogenic to plants. Numerous diseases associated with this type of pathogen have been frequently reported in cultivated species of plants and weeds. In this present study, symptoms typically induced by phytoplasmas, such as yellowing and reddening leaves, small leaves and flowers, “witches’ broom” appearance on terminal new bud growth, and death in plants, were observed in orchards of stone fruit trees such as peach and nectarines. In addition, in fields of cauliflower, weeds known as mustard-field also exhibited symptoms that appeared to have been caused by phytoplasmas, expressed by thin branches and reduced leaf and flower size. The objective of this present study was to detect, identify and classify at molecular level the phytoplasmas possibly associated with the symptomatic plants. PCR techniques, virtual RFLP analysis and the online method known as *iPhyClassifier* were used. Total DNA was extracted using a commercial kit or through the CTAB protocol. The detection of phytoplasmas was conducted by nested PCR with the universal primers R16mF2/mR1 and SN910601/SN011119 in the first reaction and R16F2n/R2 pair in the second reaction. For mustard-field, the identification of the phytoplasmas was also performed through nested PCR with the primers R16(III) F2/R16(III) R1, which are specific to detection of 16SrIII group phytoplasmas. The application of PCR with universal primers allowed the consistent detection of these agents in the tissues in symptomatic plants of peach, nectarine and mustard-field by the amplification of a 1250 bp genomic fragment, corresponding to the 16S rRNA gene. For all hosts analyzed, the products amplified by nested PCR with the universal primers were purified, cloned in *Escherichia coli* and sequenced. The analysis of virtual RFLP and *iPhyClassifier* allowed to classify the phytoplasmas found in mustard in the 16SrIII and 16SrVII groups. The phytoplasmas detected in mustard-field were definitively classified as representatives of the subgroups 16SrIII-B, 16SrIII-J and 16SrIII-U and 16SrVII-B. The phytoplasmas found in the peach and nectarine were classified within the 16Srl and 16SrIII groups, as representatives of the subgroups 16Srl-B for peach and 16Srl-B and 16SrIII-J for nectarine.

Keywords: Bacteria fastidious; Mollicutes; Prokaryotes without cell wall

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Representação das amplificações do fragmento do gene 16S rDNA para isolados de fitoplasmas encontrados em plantas de nectarina (amostras 313, 314, 316, 317) e pêssgo (amostras 320, 324, 325, 326 e 327). A coluna assinalada por Chu representa o controle positivo, enquanto H₂O e AA representam controles negativos. A coluna M representa o marcador molecular 1kb Ladder. Estes resultados foram obtidos pelo uso de duplo PCR com os primers R16P1/Tint, R16P1/R16 P7, seguido de R16F2n/R2, com eletroforese em gel de agarose 1%.33
- Figura 2 Representação das amplificações do fragmento do gene 16S rRNA para isolados de fitoplasmas encontrados em plantas de nectarina (amostras 343, 358, 359 e 366) e pêssgo (amostras 341, 360, 361 e 363). A coluna assinalada por Chu representa o controle positivo, enquanto AA representa o controle negativo. A coluna M representa o marcador molecular 1kb Ladder. Estes resultados foram obtidos pelo uso de duplo PCR com os primers R16P1/Tint, R16 P1/R16 P7, seguido de R16F2n/R2, com eletroforese em gel de agarose 1%.34
- Figura 3 Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição. Os géis identificados por AP-Br01 e AN-Br02 representam o fitoplasma presente em pessegueiro e nectarineira, respectivamente. O perfil identificado por Maize bushy stunt representa o fitoplasma de referência do subgrupo 16Srl-B.37
- Figura 4 Sítios putativos de restrição do fragmento 16S rDNA de fitoplasma do subgrupo 16Srl-B, identificado nas amostras AN-Br02 e AP-Br01 (Mapas de restrição A e B) e do fitoplasma da do enfeazamento vermelho do Milho, cuja sequência está depositada no GenBank (AY265208) (Mapa de restrição C)38
- Figura 5 Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição. O perfil identificado por AN-Br01 representa o fitoplasma presente em nectarineira. O perfil identificado por *Cabbage stunt phytoplasma* representa o fitoplasma de referência do subgrupo 16SrIII-J.....39
- Figura 6 Sítios putativos de restrição do fragmento 16S rDNA de fitoplasma do subgrupo 16SrIII-J, identificado na amostra AN-Br01 (Mapas de restrição D) e do fitoplasma da do enfeazamento do repolho, cuja sequência está depositada no GenBank (JQ766307) (Mapa de restrição E)39
- Figura 7 Árvore filogenética construída pelo método 'Neighbor-Joining', com representantes de 18 diferentes subgrupos de fitoplasma, representantes do grupo 16SrIII, o procarioto *Acholeplasma laidlawii* e os fitoplasmas detectados nesse trabalho, oriundos de amostras de nectarineira. Os números nos ramos representam valores de confiança no 'bootstrapping'.....41
- Figura 8 Árvore filogenética construída pelo método 'Neighbor-Joining', com representantes de 17 diferentes subgrupos de fitoplasma, representantes do grupo 16Srl, o procarioto *Acholeplasma laidlawii* e os fitoplasmas detectados nesse trabalho, oriundos de amostras de pessegueiro e nectarineira. Os números nos ramos representam valores de confiança no 'bootstrapping'.41
- Figura 9 Detecção de fitoplasmas em plantas de mostarda-do-campo. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16F2n/R2 na segunda reação. Colunas de 1-10: amostras de plantas analisadas; M: marcador molecular 1kb Ladder; (-)

controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo sadia; (+) controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma do grupo 16SrIII... 60

Figura 10 Detecção de fitoplasmas em plantas de mostarda-do-campo. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16F2n/R2 na segunda reação. Colunas de 11-19: amostras de plantas analisadas; M: marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo sadia; (+) controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma do grupo 16SrIII... 61

Figura 11. Identificação de fitoplasmas em plantas de mostarda-do-campo, com o uso dos iniciadores específicos para representantes do grupo 16SrIII. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16(III)F2/R16(III)R na segunda reação. Colunas de 1-10: amostras de plantas analisadas;(M): marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo sadia; (+): controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma de grupo 16SrIII. 62

Figura 12 Identificação de fitoplasmas em plantas de mostarda-do-campo, com o uso dos iniciadores específicos para representantes do grupo 16SrIII,. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16(III)F2/R16(III)R na segunda reação. Colunas de 11-19: amostras de plantas analisadas;(M): marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo assintomática; (+): controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma de grupo 16SrIII..... 63

Figura 13 Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição com 17 endonucleases (Wei et al., 2007). SM-Br01 e SM-Br02: fitoplasmas encontrados em plantas de mostarda-do-campo; subgrupo de referência 16SrVII-B: *Erigeron witches'-broom phytoplasma* (AY034608) 67

Figura 14 Sítios putativos de restrição do fragmento 16S rDNA de fitoplasma do subgrupo 16SrVII-B, identificado nas amostras SM-Br01 e SM-Br02 (Mapas de restrição F e G) e do *Erigeron witches'-broom phytoplasma*, cuja sequência está depositada no GenBank (AY034608) (Mapa de restrição H)..... 68

Figura 15 Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição com 17 endonucleases (Wei et al.,2007). SM-Br03: fitoplasma encontrado em plantas de mostarda-do-campo; subgrupo referência 16SrIII-B: '*Manihot Esculenta*' *Witches'-Broom Phytoplasma* - GU193977 69

Figura 16 Sítios putativos de restrição do fragmento 16S rDNA de fitoplasma do subgrupo 16SrIII-B, identificado na amostra SM-Br03: fitoplasma mostarda-do-campo (Mapas de restrição I) e do '*Manihot Esculenta*' *Witches'-Broom Phytoplasma*, cuja sequência está depositada no GenBank (GU193977) (Mapa de restrição J) 69

Figura 17 Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição com 17 endonucleases (Wei et al., 2007). SM-Br04: fitoplasma encontrado em plantas de mostarda-do-campo; subgrupo referência 16SrIII-J: *Cabbage stunt phytoplasma* - JQ766307 70

Figura 18 Sítios putativos de restrição do fragmento 16S rDNA de fitoplasma do subgrupo 16SrIII-J, identificado na amostra SM-Br04 (Mapas de restrição K) e do

<i>Cabbage Stunt Phytoplasma</i> , cuja sequência está depositada no GenBank (JQ766307) (Mapa de restrição E)	70
Figura 19 Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição com 17 endonucleases (Wei et al., 2007). SM-Br05: fitoplasma encontrado em plantas de mostarda-do-campo; subgrupo referência 16SrIII-U: <i>Eggplant Giant Calyx phytoplasma</i> - HM589213.....	71
Figura 20 Sítios putativos de restrição do fragmento 16S rDNA de fitoplasma do subgrupo 16SrIII-J, identificado na amostra SM-Br05 (Mapas de restrição M) e do <i>Eggplant Giant Calyx phytoplasma</i> , cuja sequência está depositada no GenBank (HM589213) (Mapa de restrição N)	71
Figura 21 Árvore filogenética construída pelo método 'Neighbor-Joining', com representantes de 4 diferentes subgrupos de fitoplasmas representantes do grupo 16SrVII, 18 subgrupos de fitoplasmas representantes do subgrupo 16SrIII, o procarioto <i>Acholeplasma laidlawii</i> e os fitoplasmas detectados nesse trabalho (SM-Br01, SM-Br02, SM-Br03, SM-Br04 e SM-Br05 oriundos de amostras de mostarda-do-campo. Os números nos ramos representam valores de confiança no <i>bootstrapping</i>	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Relação das amostras analisadas com resultados de detecção molecular de fitoplasmas.....	32
Quadro 2 Comparação dos coeficientes de similaridade calculados para os fitoplasmas detectados nas amostras AP-Br01 e AN-Br02 de pessegueiro e nectarineira, respectivamente, com outros fitoplasmas pertencentes a subgrupos do grupo 16SrI..	37
Quadro 3 Comparação dos coeficientes de similaridade calculados para os fitoplasmas detectados nas amostras AN-Br01 em nectarineira, com outros fitoplasmas pertencentes a subgrupos do grupo 16SrIII.....	37
Quadro 4 Comparação dos coeficientes de similaridade calculados para os fitoplasmas detectados nas amostras SM-Br01 e SM-Br02 de mostarda-do-campo, respectivamente, com outros fitoplasmas pertencentes a subgrupos do grupo 16SVII	65
Quadro 5 Comparação dos coeficientes de similaridade calculados para os fitoplasmas detectados nas amostras SM-Br03, SM-Br04 e SM-Br05, de mostarda-do-campo, com outros fitoplasmas pertencentes a subgrupos do grupo 16SrIII.....	66

1 INTRODUÇÃO

O cultivo das fruteiras de caroço, especialmente o pessegueiro e a nectarineira, é uma atividade de alta rentabilidade para os produtores, além de estar relacionada com a geração de empregos no campo, por exigir mão de obra especializada e contínua (CASTRO; CAMPOS, 2003; BUAINAIN; BATALHA, 2007). Estas culturas foram implantadas inicialmente em áreas geográficas com temperaturas amenas, localizadas nos estados do Sul do país, expandindo-se, posteriormente, para regiões de clima apropriado, encontrado nos estados da região Sudeste (CASTRO et al., 2008).

As condições de mercado têm sido altamente favoráveis à comercialização, havendo espaço para o crescimento da produção nacional, uma vez que parte da demanda é coberta pela importação destas frutas produzidas em outros países (KIST et al., 2012). Em razão do enorme potencial econômico, políticas de desenvolvimento regional têm sido implantadas para apoiar e incentivar o desenvolvimento destas culturas nas regiões favoráveis às suas exigências climáticas (MÜLLER, 2013). Apesar do papel relevante na economia nacional, das fruteiras de caroço produzidas no Brasil, e o cenário promissor para sua expansão, alguns problemas fitossanitários têm exigido muita atenção por parte dos produtores.

Além disto, destaca-se que devido à ausência de programas de certificação, mudas destas rosáceas são produzidas e distribuídas sem que haja a indexação para viroses ou fitoplasmas. As suspeitas da presença de fitoplasmas em rosáceas cultivadas nas principais áreas produtoras dos Estados do Sul e Sudeste datam do ano de 2007. Sintomas similares aos relatados para infecção causada por fitoplasmas em fruteiras de caroço de outros países, como clorose e avermelhamento foliar, redução no tamanho das folhas, diminuição dos órgãos florais, superbrotamento de ramos e declínio da planta (CARRARO; OSLER 2003, DAVIS, 1995; FIALOVÁ et al., 2004; FOISSAC; WILSON, 2010; JARAUSCH; JARAUSCH, 2010; KISON; SEEMULLER, 2001; LAVIÑA et al., 2004), têm sido observados, porém atribuídos a diversos outros fatores, entre eles deficiências nutricionais, anomalias genéticas ou condições ambientais e, principalmente, a danos causados por herbicidas. A ausência de estudos e/ou levantamentos sobre a incidência do patógeno tem contribuído para o aumento das doenças.

Numerosas espécies vegetais silvestres e daninhas, pertencentes a diversas famílias botânicas, têm sido relatadas como hospedeiras alternativas de fitoplasmas

(ALHUDAIB et al., 2009). Estas plantas, muitas vezes, não apresentam sintomas externos, o que dificulta sua identificação como portadoras de fitoplasmas (HAAS, 2005). No entanto, podem atuar como fonte de inóculo, sendo responsáveis tanto pela sobrevivência de patógenos como pela sua introdução e permanência no interior da cultura (BANZATO, 2013). No Brasil, uma diversidade de fitoplasmas tem sido identificada em espécies hospedeiras alternativas pertencentes a várias famílias botânicas, entre elas *Amaranthaceae*, *Arecaceae*, *Asteraceae*, *Apocynaceae*, *Begoniaceae*, *Bignoniaceae*, *Brassicaceae*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Meliaceae*, *Nyctaginaceae*, *Passifloraceae*, *Poaceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae* e *Solanaceae* (RAPUSSI DA-SILVA, 2010; BEDENDO, 2011; ECKSTEIN et al., 2010).

Especificamente no estado de São Paulo, pesquisas têm revelado a ocorrência de fitoplasmas em diversas ervas daninhas que frequentemente crescem nas adjacências e no interior de culturas de brócolis e couve-flor. Na cultura de brócolis, foram detectados fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII em mentrasto (*Ageratum conyzoides*), crotalária (*Crotalaria lanceolata*), mentruz (*Lepidium virginicum*), juá-de-capote (*Nicandra physalodes*), erva-de-rato (*Paulicourea marcgravii*) e serralha amarela (*Sonchus oleraceae*) (ECKSTEIN, 2010). Em buva (*Conyza bonariensis*), falsa serralha (*Emilia sonchifolia*), picão-preto (*Bidens pilosa*) e rubim (*Leonorus sibiricus*), além de fitoplasmas de grupo 16SrIII, também foi identificado um fitoplasma de grupo 16SrVII (ECKSTEIN, 2010). Em áreas cultivadas com citros, daninhas como picão preto (*Bidens pilosa*), rubim (*Leonorus sibiricus*) e maria-pretinha (*Solanum americanum*) foram identificadas em associação com fitoplasmas do grupo 16SrIII, enquanto buva (*Erigeron bonariensis*) e amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) foram associadas à presença de fitoplasmas de grupo 16SrVII, sugerindo sua atuação como reservatórios destes agentes de doença (BARBOSA, 2010). Plantas daninhas têm sido consideradas peças chave para o entendimento de aspectos epidemiológicos relacionados a diversas doenças de etiologia fitoplasmática, principalmente no que se refere às fases de sobrevivência e disseminação destes agentes fitopatogênicos.

A espécie invasora conhecida por mostarda-do-campo (*Brassica rapa*) tem sido encontrada com alta frequência em terrenos cultivados com couve-flor. Plantas infectadas mostram superbrotamento de ramos finos e redução no tamanho das folhas e flores. Botanicamente, a planta apresenta a parte aérea variando de 30 a 90 cm de altura. As ramificações são glabras, porém, às vezes apresentam o terço inferior dos ramos ligeiramente pubescente. As folhas baixas são lobadas, com nervação pinada e

bordos recortados, formando fendas que chegam até a metade do limbo. As folhas superiores são lanceoladas ou oblongas, sésseis, abraçando a haste, formando uma aurícula. As flores formam uma inflorescência amarela brilhante e seus pedicelos se espalham ascendentemente, podendo perdurar nas vagens (BRITTON; BROWN, 1913).

Fitoplasmas são organismos procarióticos desprovidos de parede celular, com dimensões variáveis entre 200 a 800nm. Estas bactérias são parasitas intracelulares obrigatórios de floema, apresentam reprodução por fissão binária ou gemulação, mostram sensibilidade a antibióticos do grupo das tetraciclinas e são patogênicas às plantas (DAVIS, 1995; BERTACCINI, 2007; BEDENDO, 2011). Esses procariotos pleomórficos, pertencentes à classe Mollicutes, possivelmente divergiram de um ancestral Gram positivo do gênero *Acholeplasma*, *Clostridium* ou *Lactobacillus* através da redução do genoma e perda da parede celular (STRETEN; GIBB, 2006; WEISBURG et al., 1989; WOESE, 1987).

Com seu genoma reduzindo ao longo da evolução, perderam muitas rotas metabólicas como aquelas relacionadas à síntese de ATP, aminoácidos e até nucleotídeos (BAI et al., 2006; OSHIMA et al., 2004). Dessa forma, o patógeno passou a consumir essas moléculas diretamente das células dos seus hospedeiros. Por esse motivo, os fitoplasmas ainda não dispõem de um meio de cultura que torne possível seu cultivo fora do hospedeiro, tornando inviável sua caracterização pelas técnicas usualmente empregadas para a identificação e classificação binomial de bactérias (BOVÉ; GARNIER, 1998). Isto dificulta os estudos relacionados a sua patogenicidade, uma vez que este procarioto apresenta grande dependência dos metabólicos sintetizados pela planta viva (BARBOSA, 2010).

Plantas colonizadas por fitoplasmas podem exibir, entre outros, sintomas do tipo superbrotamento de ramos, clorose foliar, enfezamento da planta, filodia, virescência, e esterilidade (IRPCM, 2004). Desde a década de 80, as técnicas moleculares vêm se desenvolvendo e se popularizando no meio científico. Atualmente, os fitoplasmas são identificados molecularmente com base nas sequências nucleotídicas do gene 16S rRNA e classificados com base nas técnicas de PCR, RFLP e programas especialmente desenvolvidos para esta finalidade, como a plataforma *iPhyClassifier* (ZHAO et al., 2009).

O sequenciamento dos nucleotídeos do gene 16S rRNA também é usado rotineiramente na identificação molecular desses patógenos, pois constitui a base das

análises que revelam a similaridade ou diversidade genética existente entre fitoplasmas (DAVIS, 1995).

O presente estudo teve por objetivos detectar, identificar molecularmente e classificar os fitoplasmas ocorrentes em plantas sintomáticas de pessegueiro e nectarineira, bem como na planta daninha mostarda-do-campo. Com isto, visa-se associar estes agentes a doenças presentes nestas espécies, revelar novos hospedeiros de fitoplasmas e estender o conhecimento sobre a diversidade genética de fitoplasmas presentes no agroecossistema brasileiro.

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.
- BAI, X.; ZHANG, J.; EWING, A.; MILLER, S.A.; RADEK, A.J., SCHEVCHENKO, D.V.; TSUKERMAN, K.; WALUNAS, T.; LAPIDUS, A.; CAMPEBELL, J.W.; HOGENHOUT, S. Living whit genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant host. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, v. 188, n. 10, p. 3682-2696, 2006.
- BANZATO, T.C.; Mostarda-do-campo (*Brassica rapa*) um hospedeiro alternativo e cigarrinhas da espécie *Agalia albidula* um potencial vetor de um fitoplasma do grupo 16SrIII encontrado em campos de couve-flor. 2013. 48 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- BARBOSA, J.C. Caracterização molecular e diversidade de fitoplasmas em pomares de citros no Estado de São Paulo. 2010. 101 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- BEDENDO, I.P. Fitoplasmas e espiroplasmas. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p. 255-270.
- BERTACCINI, A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, Alberston, v. 12, p. 673-689, 2007
- BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. Walled and wall-less eubacteria from plants: sieve-tube-restricted plant pathogens. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Urbana, v. 52, p. 7⁻¹⁶, 1998.

- BRITTON, N.L.; BROWN, H.C. An illustrated flora of the Northern United States and Canada. New York: Charles Scribner's Sons, 1913. v. 2: Amaranthaceae to Loganiaceae.
- BUAINAIN, A.M.; BATALHA, M.O. Cadeia produtiva de frutas. Brasília: IICA; MAPA; SPA, 2007. v. 7, 102p.
- CASTRO, L.A.S.; NAKASU, B.H.; PEREIRA, J.F.M. Ameixeira: histórico e perspectivas do cultivo. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 10p. (Circular Técnica, 70).
- CASTRO, L.A.S.; CAMPOS, A.D. Introdução. In: CASTRO, L.A.S. (Coord.). Ameixa: produção. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 9^o12. (Série Frutas do Brasil; 43).
- 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.
- ECKSTEIN, B. Enfezamento do brócolis: identificação de fitoplasmas, potenciais insetos vetores e hospedeiros alternativos e epidemiologia da doença. 2010. 103 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- HAAS, I.C.R. Gramíneas forrageiras como potenciais hospedeiros alternativos para o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho. 2005. 38 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- IRPCM PHYTOPLASMA/SPIROPLASMA WORKING TEAM. Phytoplasma taxonomy group. ‘Candidatus Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, v. 54, p. 1243-1255, 2004.
- KIST, B.B.; VENCATO, A.C.; SANTOS, C.; CARVALHO, C.; REETZ, E.R.; POLL, H.; BELING, B.R. Anuário brasileiro da fruticultura 2012. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2012. 128p.
- MÜLLER, C. Xylella fastidiosa de ameixeira: transmissão por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) e colonização de plantas hospedeiras. 2013. 105 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2013.
- 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.
- RAPUSSI-DA-SILVA, M.C.C. Enfezamento da couve-flor: identificação molecular de fitoplasma, 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.

- STRETEN, C.; GIBB, K.S. Phytoplasma diseases in sub-tropical and tropical Australia. *Australasian Plant Pathology*, Sydney, v. 35, p. 129-146, 2006.
- WEISBURG, W.G.; TULLY, J.G.; ROSE, D.L.; PETZEL, J.P.; OYAIKU, H.; YANG, D.; MANDELCO, L.; SECHREST, J.T.G.; VAN ETEN, J.L.; MANILOFF, J.; WOESE, C.R. A phylogenetic analysis of mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 171, p. 6455-6467, 1989.
- WOESE, C.R. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, Washington, v. 51, p. 221-271, 1987.
- 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*, 59 (Pt 10), 2582–2593, 2009.

2 OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FITOPLASMAS EM PESSEGUEIRO E NECTARINEIRA

Resumo

Plantas de pêsego e nectarina apresentando sintomas tipicamente induzidos por fitoplasmas foram encontradas em pomares comerciais nas cidades Atibaia, Bragança Paulista, Campinas, Jundiaí e Mogi das Cruzes. Os sintomas foram evidenciados por redução da copa das árvores, presença de folhas menores que as normais, produção de frutos pequenos e desenvolvimento de coloração avermelhada no limbo foliar. Com os objetivos de demonstrar a associação constante entre estas plantas afetadas e fitoplasmas, além de caracterizar molecularmente os fitoplasmas detectados, foi conduzida a presente investigação. Para isto, plantas sintomáticas e assintomáticas foram amostradas e seu DNA foi extraído para ser empregado nos ensaios de duplo PCR, conduzidos com os iniciadores R16mF2/mR1, SN910601/SN011119 e 16F2n/R2. Produtos gerados por repetidos PCRs permitiram detectar a presença de fitoplasmas nas amostras sintomáticas, e algumas assintomáticas, por meio de ampliações de fragmentos genômicos de 1.2 kb, correspondentes ao gene 16S rRNA. Uma vez demonstrada a consistente associação entre fitoplasmas e a doença, buscou-se determinar a identificação molecular deste patógeno, visando sua classificação dentro dos atuais grupos reconhecidos internacionalmente. Assim, procedeu-se à obtenção de clones do gene 16S rRNA destes fitoplasmas, os quais foram enviados para sequenciamento deste fragmento de DNA, cuja variabilidade genética é usada como critério para classificação destes procariotos. Com base na análise de RFLP virtual e na plataforma on-line de classificação *iPhyClassifier*, estes fitoplasmas foram classificados como representantes dos subgrupos 16Srl-B e 16SrlII-J, ao serem comparados com fitoplasmas associados a doenças de mesma natureza e descritas em outros países. A presente pesquisa contribuiu para melhor compreensão dos aspectos relacionados às doenças causadas por fitoplasmas em pessegueiro e nectarineira. Ainda, gerou maior conhecimento sobre a diversidade genética de fitoplasmas presentes no agroecossistema brasileiro, o que poderá contribuir para futuros estudos epidemiológicos. Finalmente, os resultados poderão servir de base para a implantação de testes de sanidade em mudas, visando conhecer a qualidade fitossanitária das mesmas, uma vez que as mudas são produzidas através de propagação vegetativa.

Palavras-chave: Fruteiras de caroço; Identificação molecular; RFLP virtual; Sanidade de mudas

Abstract

Plants of peach and nectarine exhibiting symptoms typically induced by phytoplasmas were found in commercial orchards, which was in Atibaia, Bragança Paulista, Campinas, Jundiaí e Mogi das Cruzes cities. The symptoms were evidenced by reduction of the crown's trees, presence of small leaves, production of small fruits and development of reddish color on the leaf limb. In order to demonstrate a constant association between these affected plants and the presence of phytoplasmas and also to characterize molecularly the detected phytoplasmas, the present investigation was conducted. For this, symptomatic and asymptomatic plants were sampled and their DNA was extracted to be used in nested PCR assays, performed with primers R16mF2 / mR1 and 16F2n / R2. Products generated by repeated PCRs allowed to detect the presence of phytoplasmas in the symptomatic samples, and also in some asymptomatic, through amplifications of genomic fragments of

1.2 kb, corresponding to the 16S rRNA gene. After this step it was conducted the molecular identification, in order to classify these phytoplasmas within the groups and subgroups currently recognized to classification of phytoplasmas. Thus, 16S rDNA fragments generated by PCR were cloned and sequenced and the their genetic variability was analyzed. Based on the virtual RFLP analysis and the online classification platform *iPhyClassifier*, these phytoplasmas were classified as representatives of the subgroups 16Srl-B and 16SrlII-J, when compared to phytoplasmas associated with diseases of the same nature and described in other countries. The present research contributed to a better understanding of the aspects related to diseases caused by phytoplasmas in peach and nectarines. It also generated greater knowledge about the genetic diversity of phytoplasmas present in the Brazilian agroecosystem, which may contribute to future epidemiological studies. Finally, the results may serve as a basis for the implementation of sanitation tests on seedlings, aiming to know the phytosanitary quality of the seedlings, since the seedlings are produced through vegetative propagation

Keywords: Stone fruit plants; Molecular identification; Virtual RFLP ; Seedlings phytosanitary quality

2.1 INTRODUÇÃO

A produção de pêssigo e nectarina somou, em 2014, cerca de 2,1 milhões de toneladas anuais, colhidos de uma área de 18,2 mil hectares, sendo a quase totalidade desta produção concentrada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (FAOSTAT, 2014).

Nestas culturas, numerosas doenças têm sido descritas, destacando-se aquelas causadas por vírus e fitoplasmas. Um agravante para as doenças causadas por estes agentes é o favorecimento da sua disseminação, pois as fruteiras de caroço são propagadas por meio de enxertia. Assim, material propagativo originário de matriz infectada resulta na produção de mudas portadoras dos patógenos, comprometendo a implantação de novos pomares. Além disso, a falta de programas de certificação fitossanitária e a facilidade de distribuição de mudas concorrem positivamente para disseminação de doenças.

Os fitoplasmas compreendem um grupo emergente de patógenos de plantas. São procariotos cujas células são desprovidas de parede celular, parasitas intracelulares obrigatórios que se distribuem sistemicamente no hospedeiro através dos vasos de floema (DAVIS et al, 1994). Em razão da dificuldade de seu desenvolvimento em meio de cultura, técnicas moleculares têm sido empregadas para a sua detecção em plantas, para fins de diagnose de doenças.

Relatos desses patógenos infectando várias espécies de fruteiras de caroço são abundantes no mundo. No Brasil, pouco é conhecido sobre as doenças associadas aos fitoplasmas, destacando-se entre elas o “amarelo”, descrita em pomares de

ameixeira implantados no estado de São Paulo (FLÔRES, 2013). Os principais sintomas apresentados pelas plantas afetadas são clorose, avermelhamento foliar, redução no tamanho das folhas e frutos, diminuição dos órgãos florais, superbrotamento de ramos e, em alguns casos, o declínio da planta (FLÔRES, 2013).

Em pomares comerciais de pêssego e nectarina instalados na região de Campinas têm sido observadas plantas exibindo sintomas tipicamente induzidos por fitoplasmas. Em razão da importância econômica destas culturas e com base nos danos provocados por doenças deste tipo em outros países, o presente estudo tem por objetivos demonstrar a associação de fitoplasmas com as plantas doentes encontradas nos plantios comerciais, bem como caracterizar molecularmente e filogeneticamente estes fitoplasmas, visando classificá-los entre aqueles já identificados em outras regiões do mundo.

2.2 REVISÃO DE LITERATURA

Doença é um dos fatores que interfere na produtividade das culturas. Os danos são expressos tanto em termos parciais como, às vezes, totais, quando a doença se torna fator limitante da produção. As perdas de lucratividade da cultura envolvem tanto os gastos indiretos com o controle da doença, como gastos diretos, representados pelo menor ganho decorrente da redução na produção.

As doenças podem ser causadas por diferentes agentes, entre eles os agentes bióticos de natureza diversa como fungos, bactérias, vírus, nematoides e fitoplasmas. Estes últimos se constituem em um grupo emergente de patógenos que foram descobertos como agentes causais de doenças de plantas no final dos anos 1960. Fitoplasmas são procariotos, sem parede celular, parasitas obrigatórios, habitantes exclusivos de vasos do floema e transmitidos por insetos sugadores, principalmente pelas cigarrinhas (DAVIS, 1994).

Os fitoplasmas têm desempenhado um importante papel como agentes causais de doenças ocorrentes em fruteiras de caroço cultivadas nas diversas regiões produtoras do mundo. Estas doenças são genericamente conhecidas por “amarelos das fruteiras de caroço” (LORENZ et al., 1994; LORENZ et al., 1995) e, especificamente em relação ao pessegueiro, os “amarelos “ são considerados como praga quarentenária para os países pertencentes à EPPO (European Plant Protection Organization). Epidemias causadas pelos fitoplasmas agentes dos amarelos foram responsáveis por sérias perdas em pomares comerciais presentes em determinadas áreas dos EUA, desencadeando, inclusive, a determinação de medidas legislativas de controle da doença (WELLIVER, 1999).

Na Europa, todas as espécies de fruteiras de caroço são afetadas por diversas doenças associadas aos fitoplasmas, ocasionando importantes danos às culturas e significativas perdas econômicas. Algumas fruteiras têm sido apontadas como mais sensíveis à infecção por este tipo de patógenos, entre elas o pessegueiro, a ameixeira japonesa, a ameixeira europeia e o damasqueiro (KISON; SEEMULLER, 2001). Os “amarelos” das fruteiras de caroço chegam a ser fator limitante na produção de damasco e ameixa japonesa nas principais áreas de cultivo da Europa, onde causam perdas econômicas significativas devido à alta mortalidade de árvores infectadas (JARAUSCH; JARAUSCH, 2010).

No gênero *Prunus*, a ocorrência de perdas é frequente na Europa e na Ásia Menor, devido a infecção por fitoplasmas, os quais provocam a morte de aproximadamente 5% das árvores de damasqueiro por ano, no sul da França (FOISSAC; WILSON, 2010). Estudos realizados na República Tcheca mostraram a ocorrência de fitoplasmas em diversas espécies do gênero *Prunus*, incluindo principalmente pessegueiro, ameixeira e damasqueiro (FIALOVÁ et al., 2004). Além do pessegueiro, a nectarineira e outras espécies do gênero foram relatadas como hospedeiras alternativas do fitoplasma agente dos “amarelos”, mostrando a abrangência de hospedeiros do patógeno, o que pode se constituir num fator importante para o desenvolvimento de epidemias (WELLIVER, 1999).

Para o damasco, outra fruteira de caroço, foi relatada nas regiões Sul e Central da Europa, uma doença denominada de “enrolamento clorótico das folhas” também associada a um fitoplasma. A doença, considerada como uma das mais importantes para a cultura, foi inicialmente descrita na Espanha, ainda na década de 1930 (SALA, 1935). Muitos anos depois, a mesma doença foi relatada para damasco e ameixa também em pomares espanhóis (AVINENT; LLÁCER, 1994). Ainda na Espanha, pesquisas em pomares de fruteiras de clima temperado mostraram fitoplasmas associados às doenças do tipo “amarelos” em ameixeira, pessegueiro, damasqueiro, nectarineira e cerejeira, sendo que a doença atingiu elevados níveis de incidência variáveis entre 25 a 78% (LAVIÑA et al., 2004).

Na República Tcheca, a presença de fitoplasmas em fruteiras de caroço foi relatada principalmente em damasqueiro, além de pessegueiro e ameixeira, espécies estas consideradas como hospedeiras alternativas para os patógenos (FIALOVÁ et al., 2004). Doenças de etiologia fitoplasmática tem ocorrido com alta frequência e intensidade na América do Norte, sendo responsáveis por grandes perdas de produção, principalmente em cultivos de pessegueiro, a partir do final da década de 1970 (PURCELL et al., 1981).

Nos Estados Unidos, o eixo de produção de pêssegos chegou a ser deslocado para outros estados a partir de locais tradicionalmente produtores devido à incidência de doenças causadas por fitoplasmas (DAVIS, 1995). Fitoplasmas associados a doenças de frutíferas perenes na Europa, Américas do Norte e do Sul, Ásia e Austrália estão se disseminando rapidamente devido a transmissão por insetos vetores e à produção de mudas por de enxertia, ou seja, propagação vegetativa (HEINRICH et al., 2001). As plantas afetadas geralmente mostram ausência de sabor, diminuição no

tamanho dos frutos, florescimento prematuro e malformação dos frutos (CARRARO; OSLER 2003).

Considerando-se o importante papel dos fitoplasmas como agentes de doenças em fruteiras de caroço nas diversas regiões produtoras do mundo e que estas espécies cultivadas no Brasil têm sido introduzidas a partir de material originário destas regiões, é alta a probabilidade da ocorrência de fitoplasmas no território brasileiro. No Brasil, devido à ausência de pesquisas sobre o assunto, praticamente não se dispõem de informações sobre a presença de doenças de etiologia fitoplasmática em fruteiras de caroço. Dessa maneira, evidências da ocorrência de doenças associadas a fitoplasmas têm surgido com frequência, como por exemplo, no caso da ameixeira. Foi detectada a presença deste tipo de patógeno nos tecidos amostrados de plantas de pomares comerciais apresentando sintomas típicos de doenças causadas por fitoplasmas. Essa constatação levantou a suspeita da ocorrência de fitoplasmas em outras fruteiras de caroço, despertando o interesse para esse tipo de estudo, uma vez que germoplasmas de frutíferas são trocados entre países na forma de gemas dormentes, não só pela facilidade de propagação, mas também pelo fácil estabelecimento em porta-enxerto doméstico.

O conhecimento sobre a ocorrência de doenças associadas a fitoplasmas em fruteiras de caroço cultivadas no território brasileiro pode contribuir tanto para demonstrar a presença destes agentes nos pomares destas espécies, como para fornecer subsídios para programas de quarentena, visando minimizar os riscos de importação do patógeno de outros países. Ainda, pode contribuir para o conhecimento da qualidade fitossanitária das mudas atualmente produzidas e distribuídas entre as diferentes regiões produtoras do país, permitindo certificar matrizes e mudas. Com isto, pode-se prevenir os danos ocasionados pela ocorrência endêmica das doenças, bem como evitar o risco de potenciais epidemias, como já verificado em outros países.

Com base no exposto, foram investigadas plantas de pessegueiro e nectarineira que apresentavam típicos sintomas de infecção por fitoplasmas. O presente estudo buscou identificar molecularmente estes fitoplasmas, visando classificá-los dentro dos atuais grupos e subgrupos reconhecidos para a classificação destes procariotos.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Coleta de amostras

No presente trabalho foram utilizadas 21 amostras sintomáticas e uma assintomática de pessegueiro e 19 amostras sintomáticas e uma assintomática de nectarineira. As plantas sintomáticas apresentavam clorose e avermelhamento foliar, redução no tamanho das folhas, diminuição dos órgãos florais, superbrotamento de ramos. Todas estas amostras se mostraram positivas para fitoplasmas em testes de PCR previamente realizados. As amostras, constituídas de folhas e ramos, foram retiradas de plantas presentes em pomares comerciais localizados em Atibaia, Bragança Paulista, Campinas, Jundiaí e Mogi das Cruzes (Quadro 1). O controle positivo foi representado por plantas de chuchu infectadas pelo fitoplasma do superbrotamento, enquanto os controles negativos foram representados por plantas sadia de ambas as espécies e água, usada nas reações em substituição ao ácido nucléico.

As extrações de DNA total foram realizadas seguindo os protocolos de Lee et al. (1993) e de um kit produzido comercialmente (Invisorb Spin Plant Mini Kit - Invitex). Para ambos os protocolos, o material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido. No protocolo descrito por Lee et al. (1993), ao material vegetal, foram adicionados 14mL de solução tampão de extração, sendo o material macerado transferido para tubos de vidro de 30 mL e centrifugados em rotor SS-34 a 8000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O tampão foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 8 mL de tampão de extração, 160 µL de proteinase K e 880 µL de sarcosyl 10%. Após um período de incubação de 2 h a 55 °C, foi feita nova centrifugação a 8000 rpm por 10 min. Ao sobrenadante foram adicionados 5,5 mL de isopropanol e os tubos mantidos a -20 °C, por uma noite. Após esse período, as amostras foram centrifugadas durante 15 min a 8000 rpm, e o precipitado foi ressuspensionado em 3 mL de tampão 1X TE, 75 µL de SDS 20% e 60 µL de proteinase K. O material foi incubado por 1 h a 37 °C e, em seguida, adicionados 525 µL de NaCl 5M e 420 µL de CTAB/NaCl em cada tubo. Uma nova incubação por 10 min a 65 °C. À mistura foram adicionados 4 mL de CIA (clorofórmio isoamil), sendo a mesma centrifugada a 8000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, aos quais foram adicionados 4 mL de CIA. Nova centrifugação foi feita a 8000 rpm por 5 min. Ao sobrenadante foram adicionados 2 mL de fenol e 2 mL de CIA e a

mistura centrifugada a 8000 rpm por 5 min. A seguir, o sobrenadante foi novamente transferido para novo tubo, sendo adicionados 4 mL de CIA. Após nova centrifugação a 8000 rpm por 5 min foram adicionados 2 mL de isopropanol. A mistura permaneceu no gelo por 1 h. Terminado esse processo, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 8 mL de etanol 70%. O material foi mantido durante 30 min no gelo e, após esse período, centrifugado por 10 min a 8000 rpm. O álcool foi descartado, os tubos colocados invertidos sobre papel toalha e após estarem devidamente secos, os precipitados foram ressuspendidos em 200 µL de tampão 1X TE.

Seguindo o protocolo do kit comercial, 100 mg de material fresco foram macerados em nitrogênio líquido e ao macerado foram adicionados 400 µL do tampão Lysis P e 20µL de proteinase K. Os componentes foram misturados por inversão dos tubos. Em seguida, incubou-se a mistura a 65°C por 30 minutos. As suspensões foram transferidas para filtros Spin colocados em tubos coletores de 2mL. Após centrifugação a 14000 rpm por 1 minuto, os filtros foram descartados e aos conteúdos foram adicionados 200µL de tampão Binding P, os quais foram agitados levemente. As soluções foram colocadas em novos filtros e incubadas por 1 minuto. Posteriormente realizou-se uma centrifugação a 14000 rpm por 1 minuto, os conteúdos foram descartados e os filtros recolocados nos tubos coletores. A estes tubos foram adicionados 550 µL do tampão Wash I e centrifugou-se a 14000 rpm por 1 minuto. Novamente os conteúdos foram descartados e os filtros recolocados nos tubos. Foram adicionados 550 µL de tampão Wash II e centrifugou-se a 14000 rpm por 1 minuto. Os conteúdos foram descartados, o processo repetido e finalmente centrifugou-se a 14000 rpm por 2 minutos. Os filtros foram colocados em tubos coletores de 1,5 mL e o tampão de eluição, pré-aquecido (65°C), foi adicionado. Após 3 minutos, a mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 1 minuto.

Uma alíquota de 2 µL do DNA total extraído de cada amostra foi diluída em água miliQ em duas concentrações, ou seja, 1:5 e 1:50, as quais foram usadas como modelo ('template') para as reações de PCR, visando a detecção de fitoplasma. O restante do DNA extraído foi armazenado a -20 °C.

2.3.2. Condições de PCR e padrões

Para a detecção de fitoplasmas foi empregado duplo PCR, sendo a primeira reação conduzida com os iniciadores universais R16mF2/mR1 (GUNDERSEN; LEE, 1996) e SN910601/SN011119 (JUNG et al., 2003). Na segunda reação de PCR foram usados os iniciadores R16F2n/R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996), que amplificam uma sequência nucleotídica de aproximadamente 1,2 kb, a partir do DNA genômico de fitoplasmas, correspondente ao gene 16S rRNA.

As seqüências dos iniciadores utilizados encontram-se descritas a seguir:

R16P1 – 5'- AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT- 3'; (DENG & HIRUKI, 1991 E SCHNEIDER *et al.*, 1995)

R16TINT – 5' TCAGGCGTGTGCTCTAACCAGC -3'; (SMART *et al.*, 1996)

R16P1 – 5'- AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT- 3'; (DENG & HIRUKI, 1991 E SCHNEIDER *et al.*, 1995)

R16P7 – 5'- CGTCCTTCATCGGCTCTT- 3'; (GUNDERSEN & LEE, 1996)

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

R16 R2– 5' TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G3' (GUNDERSEN; LEE, 1996).

SN910601 – 5' GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATT-3' (NAMBA et al., 1993)

SN011119 – 5' TCG CCG TTA ATT GCG TCC TT-3' (JUNG et al., 2003)

As misturas de reação de PCR para cada amostra foram compostas por 1 µL do DNA diluído e 24 µL de uma mistura que continha 18,14 µL de água deionizada autoclavada (miliQ), 2,5 µL de solução tampão 10 X PCR (Go Taq® Green Master Mix, Promega, USA), 2 µL de dNTP (na concentração final de 200 µM, de cada dNTP), 0,6 µL de cada iniciador (na concentração de 20 pmol/ µL) e 0,16 µL de Amplitaq 5 U/ µL.

Na reação com os pares mF2/mR1 e F2n/R2, foi utilizado termociclador programado para 35 ciclos. Cada ciclo foi composto por 6 minutos, sendo: 1 minuto a 94 °C para desnaturação, 2 minutos a 50 °C para anelamento, 3 minutos a 72 °C para extensão. No início há uma única etapa de desnaturação com duração de 1 minuto a 94 °C e uma etapa final de extensão de 7 minutos a 72 °C. Para SN910601/SN011119, o termociclador foi programado com 1 ciclo de 2 min a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturação do ácido nucléico, 30 segundos a 55°C para o anelamento e 90 segundos a 72°C para a extensão, com um ciclo final de 7 min a 72°C.

Os produtos obtidos nas reações de duplo PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% preparado com tampão TBE 0,5 X e contendo o corante Sybr safe® 1%. Aplicando uma corrente elétrica de 65 volts por 60 minutos foi possível visualizar os fragmentos de DNA através do transiluminador de luz ultravioleta. O marcador molecular utilizado foi o 1Kb ladder.

2.3.3. Clonagem e sequenciamento

O processo de clonagem seguiu as seguintes etapas: purificação do produto de cada amostra amplificada em duplo PCR, ligação do DNA amplificado ao plasmídeo, utilizando o kit de clonagem pGEM-T Easy Vector System I (Promega), transformação em *Escherichia coli* termocompetentes, extração do DNA plasmidial e confirmação da inserção do fragmento através de PCR e digestão enzimática. Os plasmídeos, cujo inserto do fitoplasma foi confirmado, foram considerados um clone e foram enviados para a empresa Macrogen (Coreia), para o sequenciamento de bases nucleotídicas. As etapas são descritas a seguir.

2.3.3.1 Purificação

O produto de PCR foi purificado utilizando-se “kit” de purificação PureLink™ (Invitrogen), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Assim, em microtubo de 1,5mL foram adicionados 300 µL de tampão de captura (“binding buffer”) e 75 µL de produto do PCR obtido na reação com R16F2n/R2. A mistura foi homogeneizada delicadamente com micropipeta e colocada em coluna com filtro, acoplada ao tubo coletor e centrifugada a 8.000 rpm, em temperatura ambiente. O produto filtrado foi descartado e a coluna foi recolocada no tubo coletor. Foram adicionados 650 µL de tampão de lavagem (“Wash buffer”) e uma nova centrifugação foi conduzida a 8.000 rpm. O conteúdo filtrado foi descartado mais uma vez e a coluna com filtro recolocada no tubo coletor para mais uma centrifugação a 13.000 rpm, por 3 minutos. Em um novo tubo, foi colocado a mesma coluna e adicionados 50 µL de tampão de eluição. A coluna contendo o tampão de eluição e o DNA das amostras foi incubada à temperatura ambiente por 1 minuto e em seguida centrifugada a 8.000 rpm, por 2 min.

O produto final (fragmento de DNA purificado) foi armazenado a -20 °C, para posterior utilização na reação de clonagem.

2.3.3.2 Ligação

O fragmento do DNA purificado foi ligado ao vetor plasmidial, com o uso do “kit” pGEM T Easy Vector System I (Promega). Para isso, seguiu-se o seguinte protocolo, fornecido pelo fabricante: em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 3,0 µL do DNA purificado, 1 µL do vetor (25 ng. µL⁻¹), 5,0 µL de tampão ligase 2X e 1,0 µL de T4 DNA ligase (3 U. µL⁻¹), totalizando 10 µL da mistura para a ligação. A mistura foi mantida por 12h a 4 °C. Em seguida, foi armazenada a -20 °C até o uso para as células competentes de *E. coli*.

2.3.3.3 Transformação

Para a transformação das células termocompetentes, foram adicionados 3 µL do produto da ligação em 50 µL de células competentes de *E. coli*, estirpe DH5α. A mistura foi colocada no gelo por 30 minutos, em seguida foi submetida a choque térmico por incubação a 42 °C por 50 segundos e, imediatamente, colocada no gelo por 2 minutos. A seguir, foram adicionados 450 µL de meio SOC (1% de triptona; 0,5% extrato de levedura; 8,5 mM NaCl; 2,5 mM de KCl; 0,01 mM MgCl₂; 0,02 mM de glicose e água para completar volume de 1000 mL) pré-aquecido a 37°C por 2 horas em agitador mecânico a 20g. Após o período de crescimento, foram plaqueados 80 µL da suspensão de células transformadas em 20 ml de meio LB (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,25% de NaCl; 4% de ágar) acrescido de 20 µL de ampicilina (100 mg.mL⁻¹), 20 µL X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosida) na concentração de 50ng/ml e 20 µL IPTG (isopropil-α-D tiogalactopiranosida) concentração de 50 mg.mL⁻¹. Os componentes X-gal e IPTG serviram para avaliar a atividade da α-galactosidase nas células transformadas, permitindo diferenciá-las das não transformadas. A placa foi mantida por 12h em estufa a 37 °C. As colônias recombinantes com o fragmento de DNA inserido no sítio de clonagem exibiram a cor branca (produzindo α-galactosidase não-funcional), enquanto as colônias não recombinantes ficaram azuis (produzindo α-galactosidase funcional). Foram selecionados 3 clones (colônias isoladas de células transformadas) e transferidos para

tubos plásticos esterilizados de 40 mL com tampa, contendo 10 mL de meio LB líquido e 10 µL de ampicilina (100 mg.mL⁻¹). Esses tubos foram incubados a 37°C por 12 horas.

2.3.3.4 Extração de DNA plasmidial e confirmação da inserção

As extrações dos plasmídeos foram feitas seguindo o protocolo descrito pelo fabricante do kit comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Posteriormente à extração dos plasmídeos e antes do sequenciamento dos fragmentos de DNA inseridos no vetor, foi realizado a confirmação do sucesso dessa etapa, através de uma reação de PCR, utilizando-se os iniciadores universais SP6/T7 (MALEMBIC-MAHER et al., 2008) e digestão com a enzima EcoR1.

2.3.4. Análise de sequências nucleotídicas e de sítios putativos de restrição

As sequências obtidas nesse trabalho, foram comparadas com a de outros fitoplasmas com as sequências depositadas no 'GenBank'. As sequências foram analisadas utilizando-se programas computacionais para construção e análise (Bioedit, Phred phrap, pDraw32, *iPhyClassifier*).

Para editá-las foram usados os programas Phred-phrap da Embrapa (<http://bioinformatica.cenargem.embrapa.br/phph/>) e Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), sendo todas as sequências editadas comparadas na ferramenta online *iPhyClassifier* (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iPhyClassifier.cgi>). O programa *iPhyClassifier* é uma ferramenta online, baseada principalmente na análise molecular do gene 16S rRNA, para expandir a eficácia e a capacidade do atual sistema de classificação de fitoplasma. No caso, são analisadas as semelhanças entre as sequências, simulada a digestão por enzimas de restrição e gerados perfis virtuais de RFLP. Com esses padrões de RFLP, são calculados os coeficientes de similaridade existente entre as sequências. Dessa forma, o *iPhyClassifier* indica prontamente a classificação do fitoplasma em estudo, ao nível de grupo e subgrupo (ZHAO, 2009).

Para confirmação dessa informação, o cálculo do coeficiente de similaridade é realizado pela fórmula descrita por Nei; Li (1979), $F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$, onde N_x e N_y representam o número total de fragmentos no perfil de cada fitoplasma resultantes da

digestão virtual com 17 enzimas e Nxy é o número de fragmentos compartilhadas pelos dois fitoplasmas (considerando os fragmentos de até 50 pb para os cálculos).

2.3.5. Análise filogenética

A árvore filogenética foi gerada pelo programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), versão 7 (KUMAR et al., 2016), a partir das sequências nucleotídicas selecionadas para representar os fitoplasmas encontrados nas plantas de pessegueiro e nectarineira e sequências dos fitoplasmas afiliados aos diversos subgrupos dentro dos grupos 16Srl e 16SrIII. Assim, foram definidas 17 sequências para fitoplasmas do grupo 16Srl, 18 sequências para fitoplasmas membros do grupo 16SrIII, todas depositadas no GenBank. A sequência do mollicute *Acholeplasma laidlawii* foi utilizada como raiz para a construção das árvores.

As sequências foram alinhadas pelo CLUSTAL-W e a árvore filogenética foi construída pelo método 'Neighbour-joining', sendo o 'bootstrapping' processado por 1000 vezes.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Detecção e identificação de fitoplasmas por PCR

Nos testes preliminares, a amplificação do fragmento correspondente ao gene 16S rRNA foi obtida com o uso dos pares de iniciadores universais R16P1/Tint, R16 P1/R16 P7 na primeira reação e R16F2N/R2 na segunda reação.

Os isolados usados para a classificação dos fitoplasmas encontrados nas amostras usadas no presente trabalho estão selecionados na Quadro 1.

Quadro 1 Relação das amostras analisadas com resultados de detecção molecular de fitoplasmas

Material	NºAmostra	Região	Amostra	PCR
Nectarineira	277	Jundiaí/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	278	Jundiaí/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	279	Jundiaí/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	280	Jundiaí/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	281	Jundiaí/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	298	Jundiaí/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	313	Jundiaí/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	314	Jundiaí/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	315	Jundiaí/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	316	Mogi/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	317	Mogi/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	322	Atibaia/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	334	Atibaia/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	342	Bragança/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	343	Bragança/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	358	Campinas/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	359	Campinas/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	364	Atibaia/SP	Folhas e ramos	+
Nectarineira	365	Jundiaí/SP	Folhas assintomáticas	+
Nectarineira	366	Jundiaí/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	296	Jundiaí/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	299	Jundiaí/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	300	Jundiaí/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	318	Mogi/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	319	Mogi/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	320	Mogi/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	321	Mogi/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	324	Jundiaí/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	325	Jundiaí/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	326	Atibaia/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	327	Jarinu/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	328	Jarinu/SP	Folhas e ramos	+

Pessegueiro	329	Jarinu/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	330	Jarinu/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	335	Atibaia/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	339	Bragança/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	340	Bragança/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	341	Bragança/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	360	Campinas/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	361	Campinas/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	363	Atibaia/SP	Folhas e ramos	+
Pessegueiro	367	Jundiaí/SP	Folhas assintomáticas	+

Na detecção dos fitoplasmas, um fragmento genômico de aproximadamente 1.2 Kb foi gerado, típico para o conjunto de iniciadores utilizados nas reações de PCR. Resultado idêntico foi obtido para o padrão positivo, representado por DNA extraído de planta de chuchu. No entanto, nenhuma amplificação ocorreu para os padrões negativos correspondentes ao DNA de plantas saudáveis e água. Os resultados da amplificação para alguns dos isolados representativos dos fitoplasmas encontrados em amostras de nectarineira (313, 314, 316, 317, 343, 358, 359 e 366) e pessegueiro (320, 324, 325, 326 e 327, 341, 360, 361 e 363) estão representados nas Figuras 1 e 2.

Figura 1 Representação das amplificações do fragmento do gene 16S rDNA para isolados de fitoplasmas encontrados em plantas de nectarina (amostras 313, 314, 316, 317) e pêssgo (amostras 320, 324, 325, 326 e 327). A coluna assinalada por Chu representa o controle positivo, enquanto H₂O e AA representam controles negativos. A coluna M representa o marcador molecular 1kb Ladder. Estes resultados foram obtidos pelo uso de duplo PCR com os primers R16P1/Tint, R16P1/R16 P7, seguido de R16F2n/R2, com eletroforese em gel de agarose 1%.

Figura 2 Representação das amplificações do fragmento do gene 16S rRNA para isolados de fitoplasmas encontrados em plantas de nectarina (amostras 343, 358, 359 e 366) e pêssgo (amostras 341, 360, 361 e 363). A coluna assinalada por Chu representa o controle positivo, enquanto AA representa o controle negativo. A coluna M representa o marcador molecular 1kb Ladder. Estes resultados foram obtidos pelo uso de duplo PCR com os primers R16P1/Tint, R16 P1/R16 P7, seguido de R16F2n/R2, com eletroforese em gel de agarose 1%.

Os resultados da detecção revelaram a existência de associação entre plantas sintomáticas e a ocorrência de fitoplasmas nos tecidos vegetais. No entanto, pelo fato da ausência ou do pouco conhecimento sobre as doenças causadas por fitoplasmas, agricultores e técnicos ligados à produção destas espécies de fruteiras de caroço, geralmente têm atribuído os sintomas observados nas plantas a outros fatores. Consideram, como causa dos sintomas, fatores relacionados a deficiências nutricionais, condições ambientais e características das variedades cultivadas. Este tipo de entendimento, o qual exclui os fitoplasmas como um possível fator que provoca doença, pode ter colaborado para o agravamento da doença, pois a disseminação do agente associado aos “amarelos” pode ter acontecido sem a percepção dos agricultores.

A falta de inspeção quanto à produção de mudas, aliada à possibilidade da existência de vetores compatíveis com fitoplasmas encontrados nos pomares contribuem para aumentar o risco de novas infecções no campo e, mesmo, para a manutenção do inóculo nas plantas de interesse econômico e em hospedeiros alternativos, como, por exemplo, as plantas daninhas.

O DNA extraído das duas plantas assintomáticas usadas neste trabalho gerou amplificação do gene 16S rRNA de fitoplasmas, mostrando que estas amostras eram portadoras do patógeno. Esse resultado mostra a importância da sanidade das plantas matrizes e da inspeção no campo, pois uma planta doente e assintomática pode ser fonte de inóculo quando for usada como matriz para formação de novas mudas ou quando há o vetor presente no campo. Kaminska e Sliwa (2005), em estudos com

vincas experimentalmente inoculada, têm reportado que infecções latentes desempenham um papel importante na ecologia e epidemiologia das doenças associadas aos fitoplasmas. Torres e colaboradores (2004) relatam que plantas assintomáticas de damasco e ameixa têm sido observadas como importantes fontes de inóculo para a disseminação de fitoplasmas em algumas áreas produtoras da Espanha. Diversos estudos têm mostrado o papel relevante da relação entre a doença *European Stone Fruit Yellows Phytoplasma* e a existência de inseto vetor (o psílideo *Cacopsylla pruni*) na cultura da ameixa japonesa, na região Norte da Itália (CARRARO et al., 1998), e na cultura do damasco no Sul da França (JARAUSCH et al., 2001) e Nordeste da Espanha. No Brasil ainda não se dispõe de informações sobre o agente disseminador do fitoplasma em fruteiras de caroço, havendo necessidade em mais estudos conduzidos nesse sentido, buscando-se possíveis vetores e também hospedeiros alternativos do patógeno.

2.4.2 Análise das sequências do fragmento 16S rDNA do fitoplasma

Foram sequenciados cinco isolados de fitoplasmas dentre aqueles encontrados nas plantas de pessegueiro (três clones cada) e cinco isolados de plantas de nectarineira (três clones cada). Cada isolado representou uma amostra de planta. Após o alinhamento, para cada isolado foi selecionada uma sequência consenso. Dentre estas sequências foram selecionadas sequências representativas dos subgrupos aos quais pertenciam os isolados identificados em nectarineira e pessegueiro. Utilizando a ferramenta on-line *iPhyClassifier*, um fitoplasma pertencente ao grupo 16Srl, subgrupo B, foi molecularmente identificado em pessegueiro e nectarineira, enquanto um fitoplasma afiliado ao grupo 16SrIII, subgrupo J, foi caracterizado em nectarineira. A análise dos padrões de restrição gerados pela técnica de RFLP *in silico*, com o emprego de 17 endonucleases (Figuras 3 e 5), confirmou a identidade dos fitoplasmas, em perfeita concordância com os resultados da análise processada com a ferramenta *iPhyClassifier*. Cálculos dos valores de coeficiente de similaridade baseados nos padrões de restrição de RFLP virtual confirmaram que os fitoplasmas detectados nas plantas de pêssogo e nectarina se enquadravam como membros do grupo 16Srl-B e do grupo 16SrIII-J (Quadro 2 e Quadro 3). As sequências selecionadas para representar os fitoplasmas classificados nesse trabalho foram designadas como AN-Br01 (1246 bp), representativa do fitoplasma do grupo 16SrIII-J encontrado em nectarineira; AN-

Br02 (1244 pb), representativa do fitoplasma do grupo 16Srl-B, também encontrado em nectarineira; e AP-Br01 (1246 pb) representativa do fitoplasma do grupo 16Srl-B encontrado em pessegueiro. Fitoplasmas pertencentes aos grupos de classificação 16Srl e 16SrIII também foram relatados em pessegueiros que apresentavam sintomas similares àqueles observados nas plantas amostradas que fizeram parte do presente trabalho (ANFOKA; FATTASH, 2004).

Segundo Wei et al. (2007), para que dois fitoplasmas sejam considerados do mesmo subgrupo, o valor do coeficiente de similaridade entre eles deve ser maior que 0,97. Assim, os valores dos coeficientes de similaridade calculados neste estudo demonstraram que os fitoplasmas identificados pelas sequências AN-Br02 e AP-Br01 são pertencentes ao grupo 16Srl, subgrupo B. De maneira idêntica, os mesmos cálculos permitiram classificar o fitoplasma representado pela sequência AN-Br02 como um afiliado ao grupo 16SrIII, subgrupo J. Os fitoplasmas representados pelas sequências AN-Br02 e AP-Br01 foram submetidos à análise dos sítios putativos de restrição e apresentaram os mesmos sítios de restrição para todas as enzimas selecionadas para a análise, quando em comparação com o perfil da sequência do fitoplasma representante do subgrupo 16Srl-B (Figura 4). Por outro lado, o fitoplasma representado pela sequência AN-Br01 não apresentou uma identidade total com os padrões de restrição exibidos pelo fitoplasma referência do subgrupo 16SrIII-J, evidenciando que o mesmo é um variante dentro do subgrupo 16SrIII-J (Figura 6). Esta discrepância explica o valor do coeficiente de similaridade de 0,99 encontrado entre ambos os fitoplasmas, confirmando o fitoplasma da nectarineira como pertencente ao subgrupo 16SrIII-J, porém mostrando ser um variante dentro deste subgrupo (Quadro 3).

Quadro 2 Comparação dos coeficientes de similaridade calculados para os fitoplasmas detectados nas amostras AP-Br01 e AN-Br02 de pessegueiro e nectarineira, respectivamente, com outros fitoplasmas pertencentes a subgrupos do grupo 16Srl

Subgrupos	16Srl-A	16Srl-B	16Srl-C	16Srl-D	16Srl-E	16Srl-F	16Srl-K	16Srl-L	16Srl-M	16Srl-O	16Srl-P	16Srl-Q	16Srl-R	16Srl-S	16Srl-T	16Srl-U	16Srl-V	AN-Br02	AP-Br01
16Srl-A	1,00																		
16Srl-B	0,92	1,00																	
16Srl-C	0,91	0,94	1,00																
16Srl-D	0,94	0,97	0,90	1,00															
16Srl-E	0,92	0,93	0,92	0,91	1,00														
16Srl-F	0,87	0,87	0,89	0,86	0,87	1,00													
16Srl-K	0,90	0,92	0,91	0,89	0,91	0,92	1,00												
16Srl-L	0,89	0,97	0,90	0,94	0,90	0,86	0,89	1,00											
16Srl-M	0,88	0,96	0,93	0,96	0,89	0,84	0,89	0,93	1,00										
16Srl-O	0,87	0,87	0,80	0,84	0,84	0,77	0,81	0,84	0,83	1,00									
16Srl-P	0,92	0,94	0,93	0,91	0,93	0,94	0,81	0,91	0,90	0,81	1,00								
16Srl-Q	0,84	0,92	0,89	0,89	0,89	0,84	0,84	0,89	0,92	0,81	0,86	1,00							
16Srl-R	0,91	0,93	0,89	0,90	0,92	0,87	0,91	0,90	0,93	0,80	0,93	0,89	1,00						
16Srl-S	0,90	0,92	0,93	0,89	0,91	0,88	0,92	0,89	0,88	0,81	0,94	0,84	0,93	1,00					
16Srl-T	0,84	0,92	0,85	0,89	0,85	0,80	0,85	0,89	0,90	0,83	0,86	0,90	0,85	0,84	1,00				
16Srl-U	0,87	0,93	0,88	0,90	0,87	0,81	0,85	0,90	0,90	0,85	0,87	0,87	0,89	0,87	0,88	1,00			
16Srl-V	0,85	0,93	0,87	0,90	0,87	0,81	0,85	0,92	0,90	0,83	0,87	0,87	0,87	0,85	0,88	0,94	1,00		
AN-Br02	0,92	1,00	0,95	0,97	0,93	0,90	0,93	0,97	0,97	0,85	0,94	0,95	0,95	0,95	0,92	0,90	0,93	1,00	
AP-Br01	0,92	1,00	0,95	0,97	0,95	0,90	0,93	0,97	0,95	0,89	0,94	0,91	0,93	0,95	0,92	0,95	0,91	0,97	1,00

Quadro 3 Comparação dos coeficientes de similaridade calculados para os fitoplasmas detectados nas amostras AN-Br01 em nectarineira, com outros fitoplasmas pertencentes a subgrupos do grupo 16SrlII

Subgrupos	16SrlII-A	16SrlII-B	16SrlII-C	16SrlII-D	16SrlII-F	16SrlII-G	16SrlII-J	16SrlII-L	16SrlII-M	16SrlII-N	16SrlII-P	16SrlII-Q	16SrlII-S	16SrlII-U	16SrlII-V	16SrlII-W	16SrlII-X	16SrlII-Y	AN-Br01
16SrlII-A	1,00																		
16SrlII-B	0,93	1,00																	
16SrlII-C	0,86	0,93	1,00																
16SrlII-D	0,85	0,92	0,93	1,00															
16SrlII-F	0,88	0,95	0,98	0,95	1,00														
16SrlII-G	0,95	0,94	0,85	0,89	0,87	1,00													
16SrlII-J	0,90	0,97	0,96	0,95	0,98	0,89	1,00												
16SrlII-L	0,96	0,91	0,83	0,82	0,85	0,95	0,88	1,00											
16SrlII-M	0,85	0,92	0,97	0,94	0,97	0,84	0,95	0,82	1,00										
16SrlII-N	0,80	0,87	0,90	0,87	0,92	0,78	0,90	0,79	0,89	1,00									
16SrlII-P	0,87	0,94	0,93	0,92	0,95	0,85	0,97	0,84	0,92	0,87	1,00								
16SrlII-Q	0,87	0,94	0,93	0,92	0,95	0,88	0,97	0,84	0,92	0,87	0,94	1,00							
16SrlII-S	0,97	0,90	0,82	0,82	0,85	0,94	0,87	0,93	0,82	0,76	0,90	0,83	1,00						
16SrlII-U	0,94	0,97	0,92	0,91	0,94	0,88	0,94	0,87	0,91	0,85	0,90	0,90	0,86	1,00					
16SrlII-V	0,86	0,93	0,88	0,87	0,90	0,87	0,90	0,84	0,87	0,82	0,87	0,87	0,83	96,00	1,00				
16SrlII-W	0,86	0,93	0,86	0,85	0,88	0,85	0,90	0,84	0,85	0,80	0,87	0,89	0,83	0,90	0,87	1,00			
16SrlII-X	0,89	0,96	0,89	0,88	0,91	0,88	0,93	0,87	0,88	0,83	0,90	0,92	0,86	0,93	0,90	0,96	1,00		
16SrlII-Y	0,84	0,90	0,88	0,87	0,90	0,82	0,92	0,81	0,87	0,82	0,88	0,86	0,80	0,89	0,86	0,84	0,87	1,00	
AN-Br01	0,87	0,96	0,95	0,96	0,97	0,88	0,99	0,86	0,96	0,89	0,96	0,96	0,85	0,91	0,88	0,93	0,94	0,95	1,00

AP-Br01

AN-Br02

Maize bushy stuntphytoplasma - AY265208

Figura 3 Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição. Os géis identificados por AP-Br01 e AN-Br02 representam o fitoplasma presente em pessegueiro e nectarineira, respectivamente. O perfil identificado por Maize bushy stunt representa o fitoplasma de referência do subgrupo 16Srl-B.

AN-Br02

Mapa A

AP-Br01

Mapa B

Maize bushy stunt phytoplasma

Mapa C

Figura 4 Sítios putativos de restrição do fragmento 16S rDNA de fitoplasma do subgrupo 16SrI-B, identificado nas amostras AN-Br02 e AP-Br01 (Mapas de restrição A e B) e do fitoplasma da do enfeazamento vermelho do Milho, cuja sequência está depositada no GenBank (AY265208) (Mapa de restrição C)

AN-Br01

Cabbage stunt phytoplasma - JQ766307

Figura 5 Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição. O perfil identificado por AN-Br01 representa o fitoplasma presente em nectarineira. O perfil identificado por *Cabbage stunt phytoplasma* representa o fitoplasma de referência do subgrupo 16SrIII-J.

AN-Br01
Mapa D

Cabbage stunt phytoplasma
Mapa E

Figura 6 Sítios putativos de restrição do fragmento 16S rDNA de fitoplasma do subgrupo 16SrIII-J, identificado na amostra AN-Br01 (Mapas de restrição D) e do fitoplasma da do enfeazamento do repolho, cuja sequência está depositada no GenBank (JQ766307) (Mapa de restrição E)

2.4.3 Análise filogenética das sequências do fragmento 16S rDNA de fitoplasmas

As árvores filogenéticas foram construídas a partir das sequências consenso selecionadas para representar os subgrupos revelados nesse trabalho e os fitoplasmas representativos dos grupos 16Srl e 16SrIII. Foram usadas 17 sequências representantes de cada subgrupo do grupo 16Srl e 18 sequências representantes de cada subgrupo do grupo 16SrIII, além da sequência de *Acholeplasma laidlawii*, como grupo externo, todas oriundas de depósitos no Genbank (Figura 7 e 8).

A sequência nucleotídica AN-Br01 se mostrou uma relação filogenética estritamente relacionada com a sequência representativa do *Cabbage Stunt Phytoplasma* (JQ766307) (Figura 7), em perfeita concordância com os resultados revelados pela análise de coeficientes de similaridade, a qual mostrou que o valor obtido entre os fitoplasmas foi igual a 1.

No entanto, as sequências AN-Br02 e AP-Br01 apresentaram relação filogenética mais próxima das sequências representativas dos fitoplasmas dos subgrupos 16Srl-B, 16Srl-U e 16 Srl-V. Isto pode ser explicado pelo alto grau de similaridade existente entre as sequências parciais destes fitoplasmas. Devido à similaridade entre as sequências os valores de confiança revelaram que não há suporte estatístico suficiente para mostrar uma relação filogenética mais próxima das sequências AN-Br02 e AP-Br01 com a sequência do representante do subgrupo 16Srl-B, como ficou demonstrado pelos cálculos dos valores dos coeficientes de similaridade. Neste caso, estes fitoplasmas apenas compartilharam nós internos dos ramos, sugerindo um ancestral hipotético comum entre eles.

Figura 7 Árvore filogenética construída pelo método 'Neighbor-Joining', com representantes de 18 diferentes subgrupos de fitoplasma, representantes do grupo 16SrIII, o procarioto *Acholeplasma laidlawii* e os fitoplasmas detectados nesse trabalho, oriundos de amostras de nectarineira. Os números nos ramos representam valores de confiança no 'bootstrapping'.

Figura 8 Árvore filogenética construída pelo método 'Neighbor-Joining', com representantes de 17 diferentes subgrupos de fitoplasma, representantes do grupo 16Srl, o procarioto *Acholeplasma laidlawii* e os fitoplasmas detectados nesse trabalho, oriundos de amostras de pessegueiro e nectarineira. Os números nos ramos representam valores de confiança no 'bootstrapping'.

2.5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentado neste trabalho, foi possível associar a ocorrência de fitoplasmas com plantas de nectarineira e pessegueiro com sintomas de amarelo.

Os fitoplasmas associados em nectarineira foram identificados e classificados como pertencentes aos grupos 16Srl-B e 16SrIII-J, e o fitoplasma do pessegueiro como um representante de 16Srl-B.

REFERÊNCIAS

- ANFOKA, G. H. & FATTASH, I. Detection and Identification of Aster Yellows (16Srl) Phytoplasma in Peach Trees in Jordan by RFLP Analysis of PCR-Amplified Products (16S rDNAs) J. Phytopathology, 152: 210–214, 2004. ANFOKA, G. H. & FATTASH, I. Detection and Identification of Aster Yellows (16Srl) Phytoplasma in Peach Trees in Jordan by RFLP Analysis of PCR-Amplified Products (16S rDNAs) J. Phytopathology, 152: 210–214, 2004.
- AVINENT, L.; LLACER, G. Detección de fitoplasmas en frutales mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Invest. Agrar. Fuera Serie 2: 201-205, 1994.
- CARRARO L., OSLER R., LOI N., ERMACORA P., REFATTI E. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by Cacopsylla pruni. Journal of Plant Pathology, 80: 233-239, 1998.
- CARRARO L.; OSLER R. European stone fruit yellows a destructive disease in the Mediterranean basin, options méditerranéennes. Series B: Studies and Research, 45, CIHEAM-IAMB, 2003.
- DAVIS R. E., DALLY E. L., LEE I. -M., RESENDE R. O., KITAJIMA E. W., Detection and characterization of mycoplasma-like organisms (MLOs) in diverse plants species in Brazil. Fitopatologia Brasileira, n. 19, p.340, 1994.
- DAVIS, R.E. Fitoplasmas: Fitopatógenos procarióticos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodos. Revisão Anual de Patologia de Planta, 3: 1-27, 1995.
- DENG, S.; HIRUKI, C. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. J. Microbiol. Methods.14:53-61. 1991.
- FAOSTAT – Food And Agriculture Organization Of The United Nations Statistics. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 13 nov. 2017.
- FIALOVÁ, R.; NAVRÁTIL, M.; VÁLOVÁ, P.; LAUTERER, P.; KOCOUREK, F.; POCAROVÁ-VORÁCKOVÁ, Z. Epidemiology of European stone fruit yellows phytoplasma in the Czech Republic. Acta Horticulturae, The Hague, v. 657, p.483-487, 2004.
- FLÔRES, D. Amarelo da ameixeira: caracterização molecular do fitoplasma e modelo de colonização do hospedeiro. 2013. 67p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- FOISSAC, X.; WILSON, M.R. Current and possible future distributions of phytoplasma diseases and their vectors. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors. Wallingford: CAB International, 2010. chap. 17, p. 309-324, 2010.

- GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.-M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathology Mediterranea*. 35: 144-151, 1996.
- HANAHAN D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580, 1983.
- HEINRICH, M.; BOTTI, S.; CAPRARA, L.; ARTHOFER, W.; STROMMER, S.; HANZER, V.; KATINGER, H.; BERTACCINI, A.; MACHADO, M.L.C. Improved detection methods for fruit tree phytoplasmas. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 169–179, 2001.
- JARAUSCH, B.; JARAUSCH, W. Psyllid vectors and their control. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Wallingford: CAB International, chap. 14, p. 250-271, 2010.
- JARAUSCH, W., JARAUSCH-WEHRHEIM, B., DANET, J. L., BROQUAIRE, J. M., DOSBA, F., SAILLARD, C. & GARNIER, M. Detection and identification of European stone fruit yellows and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in southern France. *Eur J Plant Pathol*, 107: 209–217, 2001.
- JUNG, H.Y.; HHAM, Y.I.; LEE, J.T.; HIBI, T.; NAMBA, S. Characterization of a phytoplasma associated with *Potato Witches' broom* disease in Korea. *Journal of General Plant Pathology*, Reading, v .69, p. 87-89, 2003.
- KAMINSKA, M. & ŚLIWA, H. The reaction of *Catharanthus roseus* test plant to infection with two polish strains of aster yellows phytoplasma. 2005.
- KISON, H.; SEEMULLER, E. Differences in strain virulence of the European stone fruit yellows phytoplasma and susceptibility of stone fruits trees on various rootstocks to this pathogen. *Journal of Phytopathology*, 149: 533–541, 2001.
- KUMAR S., GLEN S., KOICHIRO TAMURA; MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 33, Issue 7, 1 July 2016, Pages 1870–1874, <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- LAVIÑA, A., SABATÉ, J., GARCÍA-CHAPA, M., BATLLE, A. AND TORRES, E. Occurrence and epidemiology of European Stone Fruit Yellows phytoplasma in Spain. *Acta Hort. (ISHS)* 657:489-494, 2004.
- LEE, I.M; HAMMOND, R.W; DAVIS, R.E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83: 834-842, 1993.
- LORENZ K.H., DOSBA F., POGGI POLLINI C., LLACER G., SEEMÜLLER E. Phytoplasma diseases of *Prunus* species in Europe are caused by genetically similar organisms. *Journal of Plant Disease and Protection*, 101: 567-575, 1994.

- LORENZ, K.-H., SCHNEIDER, B., AHRENS, U. ; SEEMULLER, E. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*, 85: 771–776, 1995.
- MALEMBIC-MAHER S., CONSTABLE F., CIMERMAN A., ARNAUD G., CARLE P., FOISSAC X., et al. A chromosome map of the *Flavescence Doree Phytoplasma*. *Microbiology* 154 1454–1463, 2008.
- NAMBA, S.; KATO,S.; IWANAMIS, S.; OYAIZU, H.; SHIOZAWA,H.; TSUCHIZAKI, T. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organism using polymerase chain reaction. *Phytopathology*, Saint Paul, v.83, p. 786-791, 1993.
- PURCELL, A.H.; NYLAND, G.; RAJU, B.C.; HERINGER, M.R. Peach yellow leaf roll epidemic in northern California: effects of peach cultivar, tree age, and proximity to pear orchards. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 65, p. 365-368, 1981.
- SALA R. El ciruelo y su cultivo.- Biblioteca Agrícola Salvat, Ed. Salvat Editores S.A., Barcelona, España, 1935.
- SCHNEIDER, B.; SEEMÜLLER, E.; SMART, C.D.; KIRKPATRICK, B. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin S, Tully JG, eds. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*. San Diego, CA: Academic Press, 369–80. 1995.
- SMART, C. D.; SCHNEIDER, B.; BLOMQUIST, C. L.; GUERRA, L. J.; HARRISON, N. A.; AHRENS, U.; LORENZ, K. H.; SEEMÜLLER, E.; KIRKPATRICK, B.C. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied Environment Microbiology*, 62: 2988-2993, 1996.
- TORRES E., MARTÍN M.P., PALTRINIERI S., VILA A., MASALLES R., BERTACCINI A. Spreading of ESFY phytoplasmas in stone fruit in Catalonia (Spain). *Journal of Phytopathology*, 152: 432–437, 2004.
- WEI, W.; DAVIS, R.E.; LEE, I-M.; ZHAO, Y. Computer simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v.57, p.1855-1867, 2007.
- WELLIVER R. Diseases caused by phytoplasmas. *Regulatory Horticulture*, Pennsylvania Department of Agriculture, Bureau of Plant Industry, Plant Pathology, 82: 17-22, 1999.
- 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.

APÉNDICES

>AN-Br01

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAAAGTAAGGGCATCTTTACTTTTTTAAAAG
 ACCTTCTTTGAAGGTATGCTTAAGGAGGGGCTTGCGACACATTAGTTAGTTGGCAG
 GGTAAGGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCA
 CATTGGGACTGAGGCACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTT
 CGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTACCTC
 GGCATGTAAAGTTCTTTTATTAAGGAAGAAAAAGAGTGGA AAAACTCCCTTGACG
 GTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAA
 GGGGCGAGCGTTACCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGCTTAATA
 AGACTATAGTTTAATTTACGCGCTTAACGCTGTTGTGCTATAGAACTGTTTTACTA
 GAGTGAGTTAGAGGCAAGCGGAATTCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATAT
 GGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTTGCTGGGACTTTACTGACGCTGAGGCA
 CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
 ATGAGTACTAAGTGTCGGGTAAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCG
 CCTGAATAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACA
 AGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGATCTTG
 ACATTTTCTTGCGAAGTTATAGAAATATAATGAAGGTTACCAGAAAAACAGGTGTGC
 ATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTTCTAAAACGAGCGCA
 ACCCTTGTCGTTAATTGCCAGTATGTAATGATGGGGACTTTAACGAGACAGCCAAT
 GAAAAATTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATCTGG
 GCTACAAACGTGATACAATGGTTGATACAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTCTTAG
 CCAATCTCACAAAATCAATCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAA
 GTTGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTACAGGGG
 TTTGTACACACCGCCCGTCA

>AN-Br02

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAG
 ACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGG
 GGTAAGGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGGTTGAACGGCCACA
 TTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCG
 GCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTCCGT
 ACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTAC
 CTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGG
 GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGT
 TTATGGTCTAAGTGCAACGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAG
 TAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGA
 GGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAA
 AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA
 GTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTG
 AGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGC
 GGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACA
 TGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGC
 ATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC
 AACCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAG
 TGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT
 GGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTT
 GGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCAT

GAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTGACG
GGGTTTGTACACACCGCCCGTCA

>AP-Br01

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAG
ACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGG
GGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCA
CATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTT
CGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCG
GTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGT
ACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGG
GGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAA
GTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAG
AGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATG
GAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCAC
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA
TGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGC
CTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAA
GCGGTGGATCATGTTGTTTAATTGGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGA
CATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGT
GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCC
AGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAC
CTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTT
TTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTC
ATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTC
GGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA

3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FITOPLASMAS EM PLANTAS DE MOSTARDA-DO-CAMPO (*Brassica rapa* L)

RESUMO

Plantas de mostarda-do-campo (*Brassica rapa*) exibindo intenso superbrotamento de ramos finos, com folhas e flores de tamanho reduzido, foram observadas em campos cultivados com couve-flor, tanto na presença da cultura como durante o pousio. Como os sintomas se mostravam similares àqueles induzidos por fitoplasmas, suspeitou-se que esta espécie daninha estava infectada por este tipo patógeno. Visando confirmar a presença de fitoplasmas associados aos sintomas, plantas foram amostradas e seu DNA extraído para ser usado em ensaios de duplo PCR, conduzidos com os iniciadores R16mF2/mR1, SN910601/SN011119, 16F2n/R2 e R16(III)F2/16(III)R. As amplificações de fragmentos genômicos de 1.2 kb, correspondentes ao 16S rRNA, revelaram uma constante associação entre fitoplasmas e as plantas sintomáticas. A doença foi denominada de superbrotamento. Produtos de 0.8 kb amplicados em duplo PCR com os iniciadores R16(III)F2/16(III)R revelaram a ocorrência de representantes do grupo 16SrIII. Através da identificação molecular por análise de RFLP virtual e pela plataforma *iPhyClassifier*, os fitoplasmas foram identificados como pertencentes aos subgrupos 16SrIII-B, 16SrIII-J, 16SrIII-U e 16SrVII-B. Com base nos resultados obtidos no presente estudo, plantas de mostarda-do-campo servem como hospedeiras alternativas de fitoplasmas dos grupos 16SrIII e 16SrVII, os quais foram anteriormente associados à doença conhecida como enfezamento, ocorrente em outras espécies de brássica, entre elas a couve-flor. Assim, esta espécie daninha pode abrigar o agente de doença em couve-flor, garantindo sua sobrevivência e atuando como fonte de inóculo para as culturas comerciais. A presente pesquisa contribuiu para melhor compreensão dos aspectos relacionados às doenças causadas por fitoplasmas em brássicas, envolvendo diversidade de fitoplasmas e ocorrência de hospedeiros alternativos destes agentes de doença.

Palavras-chave: *Brassica rapa*; Fitoplasma; Plantas daninhas; Brassicas

ABSTRACT

Mustard-field plants (*Brassica rapa*), present in fields cultivated with cauliflower and even after harvest of the plants, were observed showing an intense proliferation of thin branches with leaves and flowers of small size. As the symptoms were similar to those induced by phytoplasmas, it was suspected that this weed was infected by this type of pathogen. In order to confirm the presence of phytoplasmas associated with the symptoms, the plants were sampled and their DNA extracted for use in nested PCR assays, with primers R16mF2 / mR1, SN910601 / SN011119, 16F2n / R2 and R16 (III) F2 / 16 (III) R. The amplifications of 1.2 kb genomic fragments, corresponding to 16S rRNA, revealed a constant association between phytoplasmas and symptomatic plants. The disease was called shoot proliferation. Amplified products of 0.8 kb in PCR primed by R16 (III) F2 / 16 (III) R revealed the occurrence of representatives of the 16SrIII group. Through molecular identification by virtual RFLP analysis and the *iPhyClassifier* platform, phytoplasmas were identified as belonging to the subgroups 16SrIII-B, 16SrIII-J, 16SrIII-U and 16SrVII-B. Based on the results obtained in this study, it was evidenced that plants of mustard-field may serve as alternative host of phytoplasmas affiliated with 16SrIII and 16SrVII groups, which were previously associated with the disease known as stunt, occurring in other brassica species, including cauliflower. Thus, this weed species may harbor the disease agent that occur in cauliflower, ensuring its survival and acting as a inoculum source for commercial crops. The present research contributed to a better understanding of the diseases related to

phytoplasmas, considering their genetic diversity and the discovery of new alternative hosts of these disease agents.

Keywords: *Brassica rapa*; Phytoplasmas; Weeds; Mustard-field

3.1 INTRODUÇÃO

A região do cinturão verde da cidade de São Paulo se destaca pela produção de brássicas, principalmente o repolho, a couve-flor e o brócolis. Uma doença denominada de enfezamento, associada a fitoplasmas, surgiu nesta região há duas décadas, sendo intensa e frequentemente encontrada nas referidas brássicas. Após o aparecimento da doença, a sua importância aumentou de modo significativo ao longo do tempo, chegando a atingir níveis de incidência da ordem de até 90%. Fitoplasmas são organismos procarióticos desprovidos de parede celular, parasitas intracelulares obrigatórios de floema e patogênicos a um grande e diversificado número de plantas. Especificamente em relação à couve-flor, as plantas infectadas por fitoplasmas exibem redução no crescimento, bordos foliares de coloração avermelhada, malformação de inflorescência e um anel escuro na região dos vasos, observado quando a haste é seccionada transversalmente. Brotações podem ser encontradas na base da haste. Os danos se expressam por redução no rendimento e na qualidade do produto comercial, pois a inflorescência se apresenta assimétrica e de menor tamanho que aquelas provenientes de plantas normais. Análises epidemiológicas têm mostrado que a doença é mais intensa nos bordos das áreas cultivadas, evidenciando que o patógeno é disseminado de fora para o interior da cultura. Além disto, quando a cultura é retirada do campo, há a ocorrência abundante de plantas de mostarda-do-campo (*Brassica rapa*) mostrando sintomas tipicamente induzidos por fitoplasmas. Estes sintomas se caracterizam por intenso superbrotamento de ramos finos e presença de folhas e flores de tamanho reduzido. Estas plantas são suspeitas de abrigarem fitoplasmas na ausência da cultura principal, atuando na sobrevivência do patógeno. Além disto, também são suspeitas de atuarem como reservatórios do patógeno, servindo como fonte de inóculo para plantas da safra seguinte. Assim, o presente estudo teve por objetivo detectar e identificar possíveis fitoplasmas nas plantas sintomáticas de mostarda-do-campo, demonstrando seu papel de hospedeiro alternativo dos mesmos fitoplasmas encontrados nas plantas da cultura de couve-flor.

3.2 REVISÃO DE LITERATURA

A cultura da couve-flor está sujeita a diversas doenças de etiologia bacteriana, entre elas a podridão negra, podridão mole e mancha foliar translúcida (MARINGONI, 2005). No entanto, há aproximadamente duas décadas e especialmente nos últimos anos, na região do Cinturão Verde de São Paulo, uma doença de etiologia fitoplasmática, denominada de enfezamento, tem se destacado em decorrência das perdas relevantes que tem causado. Observações em campos comerciais têm mostrado incidências que chegam a 90% (RAPUSSI-DA-SILVA, 2010). As perdas são significativas tanto pela redução na produção como na qualidade do produto que perde valor de mercado. Quando em altas incidências, a manutenção da cultura é comprometida, o que leva os produtores a abandonar a cultura ou substituí-la por outra espécie.

O enfezamento se caracteriza por um conjunto de sintomas expressos pela planta afetada, tais como redução no crescimento, folhas com bordos avermelhados, deformação da inflorescência (cabeça) e necrose dos vasos condutores (RAPUSSI et al., 2012). Uma característica da doença é sua disseminação a partir dos bordos para o interior da cultura. Análise epidemiológica mostrou que a doença se propaga de fora para dentro da cultura e que plantas daninhas ou silvestres que crescem nas adjacências das áreas cultivadas provavelmente podem servir de abrigo e fonte de inóculo do patógeno.

Fitoplasmas são bactérias fitopatogênicas que não apresentam parede celular, habitantes do floema, não cultiváveis em meios de cultura e naturalmente transmitidas por insetos vetores do tipo cigarrinhas. São atualmente classificadas em grupos e subgrupos, principalmente com base na diversidade genética apresentada pelo gene 16S rRNA. A sua detecção em plantas pode ser feita de modo direto por meio de observações ao microscópio eletrônico ou pelo uso de técnica molecular de PCR. A identificação é feita por meio de técnicas moleculares como PCR (Polymerase Chain Reaction) e RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism). No Brasil, em plantas de couve-flor, foram identificados diversos fitoplasmas classificados em distintos grupos e subgrupos, tais como representantes de 16SrIII-J (RAPUSSI et al., 2012), 16SrXIII (RAPUSSI-DA-SILVA, 2010) e 16SrXV-A (CANALE ; BEDENDO, 2013).

Uma diversidade de fitoplasmas pode ocorrer em plantas cultivadas, daninhas e silvestres. Especificamente para o caso de brássicas, uma gama de fitoplasmas

foram identificados em espécies representantes de várias famílias botânicas que crescem nas adjacências ou no interior das culturas, tais como Amaranthaceae, Arecaceae, Asteraceae, Apocynaceae, Begoniaceae, Bignoniaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Meliaceae, Nyctaginaceae, Passifloraceae, Poaceae, Rosaceae, Rutaceae e Solanaceae (RAPUSSI-DA-SILVA, 2010; ECKSTEIN et al., 2010). Observações realizadas em campos de couve-flor, instalados na região do cinturão verde de São Paulo, revelaram a ocorrência intensa e frequente de uma espécie de brássica daninha conhecida por mostarda-do-campo (*Brassica rapa*). Esta espécie se desenvolve dentro das áreas de cultivo e, quando a cultura é retirada do campo, aparece de forma abundante no terreno. Nos campos, a incidência de plantas sintomáticas é bastante alta, sendo os sintomas tipicamente induzidos por fitoplasmas. Estes sintomas se caracterizam por intenso superbrotamento de ramos finos e presença de folhas e flores de tamanho reduzido. Estas plantas foram suspeitas de abrigarem fitoplasmas na ausência da cultura principal, sugerindo sua atuação na sobrevivência do patógeno. Além disto, também são suspeitas de atuarem como reservatório do patógeno, servindo como fonte de inóculo para plantas da safra seguinte. Plantas daninhas hospedeiras de fitoplasmas, podem ser consideradas peças chave para o entendimento de aspectos epidemiológicos relacionados a diversas doenças de etiologia fitoplasmática, principalmente no que se refere às fases de sobrevivência e disseminação destes agentes fitopatogênicos (RAPUSSI-DA-SILVA, 2010; ECKSTEIN et al., 2010).

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Coleta de amostras e Extração de DNA total

As amostras de mostarda-do-campo foram coletadas no interior e nas áreas marginais de campos cultivados com couve-flor, localizados no município de Araçoiaba, SP. Plantas desta invasora também foram amostradas quando os campos se encontravam em estado de pousio, ou seja, na ausência de plantas da espécie cultivada. As amostras consistiram da parte aérea das plantas, compreendendo hastes, folhas e flores. No total, 19 plantas, sintomáticas e assintomáticas foram coletadas, embaladas separadamente em sacos plásticos e levadas para laboratório.

As extrações de DNA total foram feitas seguindo-se o protocolo descrito por Doyle; Doyle (1990). Três gramas de material vegetal fresco foram macerados em nitrogênio líquido e transferidos para microtubo de 1,5 mL. Ao macerado foram adicionados 800µl de 2X CTAB + 0,2% β-mercaptoethanol aquecido a 60°C. A mistura foi homogeneizada em vortex e incubada à 60°C por 60 minutos. Após a incubação, foram adicionados 600µl de CIA e nova agitação foi processada até a emulsão ficar leitosa e homogênea. A parte superior da emulsão foi transferida para novo tubo e foram acrescentados 540µl de isopropanol gelado (-20°C). Os tubos foram suavemente invertidos para precipitação dos ácidos nucleicos. O material permaneceu por uma noite incubado à -20°C. Em seguida, foi processada centrifugação a 14000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 80% por 5 minutos. Ao precipitado foram adicionados 500mL de NaCl 1M e o material foi incubado em geladeira por 30 minutos. Nova centrifugação a 14000 rpm foi processada durante 10 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 350µl de isopropanol e os tubos foram invertidos suavemente para precipitação dos ácidos nucleicos. Após incubação por uma noite à -20°C, a mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 80%. A secagem do precipitado foi feita à temperatura ambiente e o mesmo foi ressuspendido com 100µl água miliQ. O armazenamento do DNA extraído foi feito à -20°C.

3.3.2 Testes de PCR para detecção e identificação de fitoplasmas

Os ensaios para detecção de fitoplasmas foram conduzidos pelo uso de duplo PCR com os primers universais R16mF2/mR1 (GUNDERSEN; LEE, 1996) e/ou SN910601/SN011119 (JUNG et al., 2003) na primeira reação e com o par R16F2n/R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996) na segunda reação. As sequências utilizadas encontram-se descritas a seguir:

R16 mF2 – 5'CAT GCA AGT CGA ACG GA 3'; (GUNDERSEN; LEE, 1996)

R16 mR1 – 5'CTT AAC CCC AAT CAT CGA C 3'; (GUNDERSEN; LEE, 1996)

SN910601 – 5' GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATT-3' (NAMBA et al., 1993)

SN011119 – 5' TCG CCG TTA ATT GCG TCC TT-3' (JUNG et al., 2003)

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

R16 R2– 5' TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G3'(GUNDERSEN; LEE,1996).

A identificação dos fitoplasmas detectados nas reações de duplo PCR foi feita a partir de produtos amplificados pelos iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119. Estes produtos foram diluídos 1:50 em água MiliQ autoclavada e submetidos à re-amplificação, empregando-se os iniciadores R16(III)F2/16(III)R1, os quais são específicos para a identificação de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII (LEE et al., 1994).

As sequências dos iniciadores específicos estão descritas a seguir:

R16(III)F2 – 5'AAG AGT GGA AAA ACT CCC 3' (LEE et al., 1994)

R16(III)R1 – 5'TCC GAA CTG AGA TTG A 3' (LEE et al., 1994)

Cada reação de PCR foi composta por 1 µL do DNA (40ng/µL) e 24 µL de uma mistura contendo 18,14 µL de água deionizada autoclavada (miliQ), 2,5 µL de solução tampão 10 X PCR, 2 µL de dNTP, 0,6 µL de cada iniciador (na concentração de 20 pmol/ µL) e 0,16 µL de Amplitaq 5 U/ µL.

Na reação com os pares mF2/mR1, F2n/R2 e R16(III)F2/16(III)R1 foi utilizado termociclador programado para 35 ciclos. Cada ciclo foi composto por 6 minutos, sendo: 1 minuto a 94 °C para desnaturação, 2 minutos a 50 °C para anelamento, 3 minutos a 72 °C para extensão. No início ocorreu uma única etapa de desnaturação com duração de 1 minuto a 94 °C e uma etapa final de extensão de 7 minutos a 72 °C. Para os primers SN910601/SN011119, o termociclador foi programado para 1 ciclo de 2 min a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para

desnaturação do ácido nucléico, 30 segundos a 55°C para o anelamento e 90 segundos a 72°C para a extensão, com um ciclo final de 7 min a 72°C. Os produtos obtidos nas reações de duplo PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, preparado com tampão TBE 0,5 X e contendo o corante Sybr safe® 1%. Aplicação de uma corrente elétrica de 65 volts por 60 minutos foi feita para visualização dos fragmentos amplificados, através do transiluminador de luz ultravioleta.

Nos testes de detecção de fitoplasmas, o controle negativo foi representado por reação contendo extrato de plantas sadias de mostarda-do-campo e como controle positivo foi utilizado extrato de plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) comprovadamente infectadas com fitoplasmas. Nos testes de identificação, o controle positivo foi representado pelo DNA extraído de plantas de vinca infectadas por fitoplasma pertencente ao grupo 16SrIII, enquanto como controle negativo foi utilizada uma amostra de mostarda-do-campo, cujos resultados de PCR foram negativos para todos os iniciadores utilizados, inclusive aquele específico para fitoplasmas do grupo 16SrIII.

3.3.3 Clonagem e sequenciamento

O processo de clonagem foi conduzido seguindo várias etapas. Purificação do produto de 1,2 Kb amplificado em duplo PCR, ligação do DNA ao plasmídeo utilizando o kit de clonagem pGEM-T Easy Vector System I (Promega), transformação em *Escherichia coli* termocompetentes, extração do DNA plasmidial e confirmação da inserção do fragmento através de PCR e digestão enzimática. Os plasmídeos, cujo inserto do fitoplasma foi confirmado, foram considerados um clone e foram enviados para a empresa MacroGen (Coreia), para o sequenciamento de bases nucleotídicas. Seguem as descrições das etapas.

3.3.1.2 Purificação

O produto de PCR foi purificado utilizando-se “kit” de purificação PureLink™ (Invitrogen), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Em microtubo de 1,5mL foram adicionados 300 µL de tampão de captura (“binding buffer”) e 75 µL de produto do PCR obtido na reação com R16 F2n/R2. A mistura foi homogeneizada delicadamente com micropipeta e colocada em coluna com filtro, acoplada ao tubo coletor e centrifugada a 8000 rpm, em temperatura ambiente. O produto filtrado foi

descartado e a coluna foi recolocada no tubo coletor. Foram adicionados 650 μL de tampão de lavagem ("Wash buffer") e uma nova centrifugação foi conduzida a 8000 rpm. O conteúdo filtrado foi descartado mais uma vez e a coluna com filtro recolocada no tubo coletor para mais uma centrifugação a 14000 rpm, por 3 minutos. Em um novo tubo, foi colocado a mesma coluna e adicionados 50 μL de tampão de eluição. A coluna contendo o tampão de eluição e o DNA das amostras foi incubada a temperatura ambiente por 1 minuto e, em seguida, centrifugada a 8000 rpm, por 2 min. O produto final, representado pelo fragmento de DNA purificado, foi armazenado a -20°C , para posterior utilização na reação de clonagem.

3.3.3.2 Ligação

O fragmento do DNA purificado foi ligado ao vetor plasmidial, com o uso do "kit" pGEM T Easy Vector System I (Promega), para isso, seguiu-se o seguinte protocolo, fornecido pelo fabricante: em microtubo de 1,5 μL foram adicionados 3,0 μL do DNA purificado, 1 μL do vetor ($25 \text{ ng. } \mu\text{L}^{-1}$), 5,0 μL de tampão ligase 2X e 1,0 μL de T4 DNA ligase ($3 \text{ U. } \mu\text{L}^{-1}$), totalizando 10 μL da mistura para a ligação. A mistura foi mantida por 12h a 4°C . Em seguida, foi armazenada a -20°C até o uso para as células competentes de *E. coli*.

3.3.3.3 Transformação

Para a transformação das células termocompetentes de *E. coli*, foram adicionados 3 μL do produto da ligação em 50 μL de células competentes, estirpe DH5 α . A mistura colocada no gelo por 30 minutos. Em seguida, foram submetidas a choque térmico por incubação a 42°C por 50 segundos e, imediatamente, colocadas no gelo por 2 minutos. Na sequência, foram adicionados 450 μL de meio SOC (1% de triptona; 0,5% extrato de levedura; 8,5 mM NaCl; 2,5 mM de KCl; 0,01 mM MgCl_2 ; 0,02 mM de glicose e água para completar volume de 1000 mL) e pré-aquecido a 37°C por 2 horas em agitador mecânico a 20g. Após o período de crescimento, foram plaqueados 80 μL da suspensão de células transformadas em 20 ml de meio LB (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,25% de NaCl; 4% de ágar) acrescido de 20 μL de ampicilina (100 mg.mL^{-1}), 20 μL X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosida) na concentração de 50ng/ml e 20 μL IPTG (isopropil- α -D tiogalactopiranosida) concentração de 50 mg.mL^{-1} . Os componentes X-gal e IPTG serviram para avaliar a

atividade da α -galactosidase nas células transformadas, permitindo diferenciá-las das não transformadas. A placa foi mantida por 12h em estufa a 37 °C. As colônias recombinantes com o fragmento de DNA inserido no sítio de clonagem exibiram a cor branca (produzindo α -galactosidase não-funcional), enquanto as colônias não recombinantes ficaram azuis (produzindo α -galactosidase funcional). Três clones foram selecionados (colônias isoladas de células transformadas) e transferidos para tubos plásticos de 40 mL com tampa, contendo 10 mL de meio LB líquido e 10 μ L de ampicilina (100 mg.mL⁻¹). Esses tubos foram incubados a 37°C, sob 20g de agitação, por 12 horas

3.3.3.4 Extração de DNA plasmidial e confirmação da inserção do fragmento no plasmídeo

Foi feita a extração do DNA plasmidial dos três clones crescidos em meio líquido como citado no item anterior. As extrações dos plasmídeos foram feitas seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante do kit comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Posteriormente à extração do plasmídeo e antes do sequenciamento dos fragmentos de DNA inseridos no vetor, foi realizado a confirmação do sucesso dessa etapa através de uma reação de PCR, utilizando-se os iniciadores universais SP6/T7 (MALEMBIC-MAHER et al., 2008) e digestão com a enzima EcoR1. O sequenciamento foi conduzido pela empresa Macrogen (Coreia).

3.3.4 Análise de sequências nucleotídicas e de sítios putativos de restrição

As sequências obtidas nesse trabalho, foram comparadas com aquelas de outros fitoplasmas depositadas no 'GenBank'. Foram analisadas utilizando-se programas computacionais para construção e análise (Bioedit, Phred phrap, pDraw32, *iPhyClassifier*).

Para editá-las foram usados os programas Phred-phrap da Embrapa (<http://bioinformatica.cenargem.embrapa.br/phph/>) e Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), sendo todas as sequências editadas comparadas na ferramenta online *iPhyClassifier* (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iPhyClassifier.cgi>). O programa

iPhyClassifier é uma ferramenta online, baseada principalmente na análise molecular do gene 16S rRNA, para expandir a eficácia e a capacidade do atual sistema de classificação de fitoplasma. No caso, são analisadas as semelhanças entre as sequências, e simulada a digestão por enzimas de restrição e gerados perfis de virtuais de RFLP. Com esses padrões de RFLP, são calculados os coeficientes de similaridade existente entre as sequências. Dessa forma, o *iPhyClassifier* indica prontamente a classificação do fitoplasma em estudo, ao nível de grupo e subgrupo (ZHAO, 2009).

Para confirmação dessa informação, o cálculo do coeficiente de similaridade é realizado pela fórmula descrita por Nei e Li (1979), $F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$, onde N_x e N_y representam o número total de fragmentos no perfil de cada fitoplasma resultantes da digestão virtual com 17 enzimas e N_{xy} é o número de fragmentos compartilhadas pelos dois fitoplasmas (considerando os fragmentos de até 50 pb para os cálculos).

3.3.5 Análise filogenética

A árvore filogenética foi gerada pelo programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), versão 7 (TAMURA et al., 2007), a partir das sequências nucleotídicas selecionadas para representar os fitoplasmas encontrados nas plantas de mostarda-do-campo e sequências dos fitoplasmas afiliados aos diversos subgrupos dentro dos grupos 16SrIII e 16SrVII. Assim, foram definidas 18 sequências para fitoplasmas do grupo 16SrIII, 4 sequências para fitoplasmas membros do grupo 16SrVII, todas depositadas no GenBank. A sequência do mollicute *Acholeplasma laidlawii* foi utilizada como raiz para a construção das árvores. As sequências foram alinhadas pelo CLUSTAL-W e a árvore filogenética foi construída pelo método 'Neighbour-joining', sendo o 'bootstrapping' processado por 1000 vezes.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Detecção de fitoplasmas nas amostras de mostarda-do-campo

A ocorrência de fitoplasmas nas amostras analisadas por duplo PCR foi de 63%, revelando 12 amostras positivas para o patógeno, das 19 plantas de mostarda-do-campo, entre elas plantas apresentando típicos sintomas da doença como superbrotamento e redução do tamanho das folhas, bem como plantas assintomáticas.

A amplificação dos fragmentos genômicos de aproximadamente 1,2kb, obtidos através de reações conduzidas com os iniciadores R16mF2/mR1 e/ou SN910601/SN011119, seguidas das reações utilizando-se os iniciadores universais R16F2n/R2, foram visualizadas em gel de agarose 1%, utilizando-se transiluminador após eletroforese das amostras (Figura 9 e Figura 10). As reações de PCR foram conduzidas com o extrato de plantas de vinca, portadoras de fitoplasmas, como controle positivo, bem como uma planta sadia como controle negativo.

Considerando que 63% das amostras analisadas indicaram presença de fitoplasmas nas plantas de mostarda, é possível afirmar que há uma consistente associação entre a presença do patógeno e dos sintomas de alteração no porte das plantas, observados como superbrotamento de ramos e da redução no tamanho de folhas e flores.

Figura 9 Detecção de fitoplasmas em plantas de mostarda-do-campo. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16F2n/R2 na segunda reação. Colunas de 1-10: amostras de plantas analisadas; M: marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo sadia; (+) controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma do grupo 16SrIII.

Figura 10 Detecção de fitoplasmas em plantas de mostarda-do-campo. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16F2n/R2 na segunda reação. Colunas de 11-19: amostras de plantas analisadas; M: marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo sadia; (+) controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma do grupo 16SrIII.

Algumas plantas aparentemente sadias, por não possuírem os sintomas descritos anteriormente, foram apontadas como portadoras de fitoplasmas após análise de duplos PCR, essa informação é relevante ser mencionada, uma vez que achados desta natureza não são raros e foram relatados para outras espécies. Como exemplo, podemos citar a família das brassicas, com as doenças associadas a fitoplasmas como amarelo em repolho, brócolis e nabo (WANG; HIRUKI, 2011) e em plantas de canola (OLIVIER; GALK; SEGUIN-SWARTZ, 2010).

Considerando a mesma área geográfica que as amostras do presente estudo foram coletadas, já houve anteriormente a obtenção de dados relacionando a ausência de sintomas e a presença de fitoplasmas do grupo 16SrIII, detectados através de análise de duplo PCR, em associação com plantas de couve-flor (RAPPUSSI et al., 2012).

A técnica de PCR é conhecida pela alta sensibilidade na detecção dos fragmentos genômicos alvo, contudo a baixa concentração deste procarioto e a sua distribuição irregular nos tecidos vegetais pode justificar a ausência de resultados positivos para as análises nas amostras sintomáticas. Eventos como a heterogeneidade da distribuição dos patógenos na planta são descritos com frequência na literatura; como exemplo, a associação fitoplasmas-hospedeiros em batata inglesa associada ao fitoplasma da doença conhecida como topo roxo (SANTOS-CERVANTES et al., 2010), fitoplasmas relacionados aos amarelos da cenoura, repolho e cebola (LEE

et al., 2003) e plantas de couve-flor portadoras do fitoplasma associado ao enfezamento (RAPPUSSI et al., 2012).

3.4.2 Identificação do fitoplasma associado a plantas de mostarda-do-campo

As 19 amostras de plantas analisadas anteriormente, foram submetidas a novos testes de duplo PCR, mas dessa vez utilizando-se os iniciadores específicos R16(III)F2/R16(III)R1 na segunda reação. Um total de 10 amostras, das 19 analisadas, foram detectados fitoplasmas do grupo 16SrIII (Figura 11 e Figura 12). Os resultados foram concluídos após a visualização de fragmentos genômicos de 0,8kb em gel de agarose 1%, após eletroforese, os quais eram esperados pelas amplificações do gene 16S rRNA de fitoplasmas correspondentes aos isolados pertencentes ao grupo 16SrIII.

Figura 11. Identificação de fitoplasmas em plantas de mostarda-do-campo, com o uso dos iniciadores específicos para representantes do grupo 16SrIII. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16(III)F2/R16(III)R na segunda reação. Colunas de 1-10: amostras de plantas analisadas; (M): marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo sadia; (+): controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma de grupo 16SrIII.

Figura 12 Identificação de fitoplasmas em plantas de mostarda-do-campo, com o uso dos iniciadores específicos para representantes do grupo 16SrIII,. As amplificações foram obtidas através de duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 ou SN910601/SN011119 na primeira reação e R16(III)F2/R16(III)R na segunda reação. Colunas de 11-19: amostras de plantas analisadas;(M): marcador molecular 1kb Ladder; (-) controle negativo representado por planta de mostarda-do-campo assintomática; (+): controle positivo representado por planta de vinca infectada por fitoplasma de grupo 16SrIII

Através dessa análise de duplo PCR, foi possível observar a ausência de fitoplasmas do grupo 16SrIII em 2 das 12 amostras sabidamente portadoras de fitoplasmas, analisadas anteriormente com os iniciadores universais. Uma vez que não amplificou fragmentos do genoma correspondentes ao grupo 16SrIII, essa informação indica claramente a presença de um fitoplasma diferente desse grupo em associação com essas plantas analisadas de mostarda-do-campo.

Outro resultado interessante obtido pela segunda análise, com duplo PCR utilizando-se iniciadores específicos, foi a amplificação de fragmento do genoma correspondente ao grupo 16SrIII em uma amostra que havia sido classificada negativa como portadora do procarioto ao usar iniciadores universais na segunda reação (R16F2n/R2), constituindo mais uma amostra positiva para a presença de fitoplasma, além daquelas 12 inicialmente amplificadas pelos iniciadores universais R16F2n/R2.

Somando-se esse ultimo resultado, então a taxa de frequência de amostras portando o fitopatógeno sobe para 68%, em que 13, das 19 amostras analisadas, são positivas em relação a presença de fitoplasma em seu tecido. Dessa forma, a associação entre as plantas assintomáticas e a doença causada por fitoplasmas fica mais evidente, podendo-se também afirmar que há ao menos dois grupos distintos de fitoplasmas nas amostras analisadas.

Fragmentos genômicos de 0,8 kb também foram gerados nas reações de PCR contendo DNA de plantas de vinca, e resultados negativos foram observados para reações contendo DNA de plantas sadias de mostarda-do-campo, usadas como controle negativo, confirmando a eficiência da reação.

3.4.3 Análise das sequências do fragmento 16S rDNA de fitoplasmas

Com base na análise das sequências nucleotídicas do gene 16S rRNA, uma sequência consenso foi selecionada para cada fitoplasma encontrado em cada amostra positiva de mostarda-do-campo. Cada sequência consenso foi selecionada a partir dos três clones sequenciados para cada fitoplasma presente em cada amostra sintomática. As sequências consenso foram previamente identificadas e classificadas com o emprego da ferramenta on-line *iPhyClassifier*. Com base nesta ferramenta, os fitoplasmas foram identificados como pertencentes a quatro subgrupos, distintos: 16SrIII-B, 16SrIII-J, 16SrIII-U e 16SrVII-B. Os fitoplasmas aqui classificados mostraram identidade total com os fitoplasmas de referência de cada um destes grupos/subgrupos, sendo o coeficiente de similaridade igual a 1, quando contrastados entre si. Os padrões de RFLP *in silico* produzidos pela digestão com 17 enzimas de restrição, de acordo com Wei et al. (2007), também confirmaram que os isolados selecionados de mostarda-do-campo eram pertencentes aos subgrupos 16SrIII-B, 16SrIII-J e 16SrIII-U e 16SrVII-B.

As cinco sequências selecionadas para representar os fitoplasmas classificados nesse trabalho foram designadas como SM-Br01 (1250 pb) e SM-Br02 (1250 pb), representantes do subgrupo 16SrVII-B; SM-Br03 (1247 pb), representante do subgrupo 16SrIII-B; SM-Br04 (1247 pb), representante do subgrupo 16SrIII-J; e SM-Br05 (1247 pb), representante do subgrupo 16SrIII-U.

Os cálculos de coeficientes de similaridade baseados na fórmula de Nei e Li (1979) apontaram a presença de fitoplasmas representantes dos subgrupos 16SrIII-B, 16SrIII-J, 16SrIII-U e 16SrVII-B (Quadro 4 e Quadro 5), confirmando os resultados obtidos com o uso da ferramenta *iPhyClassifier*. Segundo Wei et al. (2007), para que dois fitoplasmas sejam considerados do mesmo subgrupo, o coeficiente de similaridade entre eles deve ser maior que 0,97. Dessa forma, ficou demonstrado que os fitoplasmas identificados por SM-Br01 e SM-Br02 são pertencentes ao grupo 16SrVII, subgrupo B, o qual tem como referência o fitoplasma do superbrotamento do erigeron ou buva (*Erigeron witches'-broom phytoplasma* - GenBank AY034608). Os fitoplasmas SM-Br03, SM-Br04, SM-Br05 foram identificados como membros dos subgrupos 16SrIII-B, 16SrIII-J e 16SrIII-U, respectivamente. Nestes casos, os isolados de referência são os fitoplasmas associados ao superbrotamento da mandioca (*'Manihot Esculenta' Witches'-Broom Phytoplasma* – GenBank GU193977), ao enfezamento do

repolho (*Cabbage Stunt Phytoplasma* – GenBank JQ766307) e ao cálice gigante da berinjela (*Eggplant Giant Calyx phytoplasma* – GenBank HM589213). Os padrões de restrição, gerados pelas 17 endonucleases propostas no trabalho de Wei et al., 2007, foram indistinguíveis entre si, considerando-se os fitoplasmas de referência de cada subgrupo e os respectivos fitoplasmas encontrados nas plantas de mostarda-do campo (Figuras 14, 16, 18 e 20).

.As sequências do fragmento 16S rDNA dos fitoplasmas SM-Br01 e SM-Br02, fitoplasmas SM-Br03, SM-Br04, SM-Br05 foram submetidas à análise dos sítios putativos de restrição e apresentaram os mesmos sítios para todas as enzimas selecionadas para a análise, quando em comparação com o perfil da sequência de fitoplasma representante dos subgrupos 16SrVII-B: *Erigeron witches'-broom phytoplasma* (AY034608), 16SrIII-B: '*Manihot Esculenta*' *Witches'-Broom Phytoplasma* (GU193977), 16SrIII-J: *Cabbage Stunt Phytoplasma* (JQ766307) e 16SrIII-U: *Eggplant Giant Calyx phytoplasma* (HM589213) (Figuras 13, 15,17 e 19).

Quadro 4 Comparação dos coeficientes de similaridade calculados para os fitoplasmas detectados nas amostras SM-Br01 e SM-Br02 de mostarda-do-campo, respectivamente, com outros fitoplasmas pertencentes a subgrupos do grupo 16SVII

Subgrupos	16SrVII-A	16SrVII-B	16SrVII-C	16SrVII-D	SM-Br01	SM-Br02
16SrVII-A	1,00					
16SrVII-B	0,92	1,00				
16SrVII-C	0,86	0,89	1,00			
16SrVII-D	0,87	0,94	0,83	1,00		
SM-Br01	0,93	1,00	0,89	0,95	1,00	
SM-Br02	0,93	1,00	0,89	0,97	1,00	1,00

Quadro 5 Comparação dos coeficientes de similaridade calculados para os fitoplasmas detectados nas amostras SM-Br03, SM-Br04 e SM-Br05, de mostarda-do-campo, com outros fitoplasmas pertencentes a subgrupos do grupo 16SrIII

Subgrupos	16SrIII-A	16SrIII-B	16SrIII-C	16SrIII-D	16SrIII-F	16SrIII-G	16SrIII-J	16SrIII-L	16SrIII-M	16SrIII-N	16SrIII-P	16SrIII-Q	16SrIII-S	16SrIII-U	16SrIII-V	16SrIII-W	16SrIII-X	16SrIII-Y	SM-Br03	SM-Br04	SM-Br05
16SrIII-A	1,00																				
16SrIII-B	0,93	1,00																			
16SrIII-C	0,86	0,93	1,00																		
16SrIII-D	0,85	0,92	0,93	1,00																	
16SrIII-F	0,88	0,95	0,98	0,95	1,00																
16SrIII-G	0,95	0,94	0,85	0,89	0,87	1,00															
16SrIII-J	0,90	0,97	0,96	0,95	0,98	0,89	1,00														
16SrIII-L	0,96	0,91	0,83	0,82	0,85	0,95	0,88	1,00													
16SrIII-M	0,85	0,92	0,97	0,94	0,97	0,84	0,95	0,82	1,00												
16SrIII-N	0,80	0,87	0,90	0,87	0,92	0,78	0,90	0,79	0,89	1,00											
16SrIII-P	0,87	0,94	0,93	0,92	0,95	0,85	0,97	0,84	0,92	0,87	1,00										
16SrIII-Q	0,87	0,94	0,93	0,92	0,95	0,88	0,97	0,84	0,92	0,87	0,94	1,00									
16SrIII-S	0,97	0,90	0,82	0,82	0,85	0,94	0,87	0,93	0,82	0,76	0,90	0,83	1,00								
16SrIII-U	0,94	0,97	0,92	0,91	0,94	0,88	0,94	0,87	0,91	0,85	0,90	0,90	0,86	1,00							
16SrIII-V	0,86	0,93	0,88	0,87	0,90	0,87	0,90	0,84	0,87	0,82	0,87	0,83	96,00	1,00							
16SrIII-W	0,86	0,93	0,86	0,85	0,88	0,85	0,90	0,84	0,85	0,80	0,87	0,89	0,83	0,90	0,87	1,00					
16SrIII-X	0,89	0,96	0,89	0,88	0,91	0,88	0,93	0,87	0,88	0,83	0,90	0,92	0,86	0,93	0,90	0,96	1,00				
16SrIII-Y	0,84	0,90	0,88	0,87	0,90	0,82	0,92	0,81	0,87	0,82	0,88	0,86	0,80	0,89	0,86	0,84	0,87	1,00			
SM-Br03	0,89	1,00	0,95	0,94	0,95	0,94	0,97	0,91	0,94	0,89	0,94	0,94	0,90	0,95	0,94	0,95	0,96	0,93	1,00		
SM-Br04	0,92	0,97	0,96	0,95	0,98	0,97	1,00	0,85	0,95	0,92	0,95	0,97	0,85	0,94	0,91	0,92	0,91	0,94	0,97	1,00	
SM-Br05	0,90	0,97	0,94	0,91	0,94	0,91	0,94	0,87	0,89	0,85	0,86	0,93	0,88	1,00	0,93	0,94	0,95	0,92	0,97	0,94	1,00

Figura 13 Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição com 17 endonucleases (Wei et al., 2007). SM-Br01 e SM-Br02: fitoplasmas encontrados em plantas de mostarda-do-campo; subgrupo de referência 16SrVII-B: *Erigeron witches'-broom phytoplasma* (AY034608)

Figura 14 Sítios putativos de restrição do fragmento 16S rDNA de fitoplasma do subgrupo 16SrVII-B, identificado nas amostras SM-Br01 e SM-Br02 (Mapas de restrição F e G) e do *Erigeron witches'-broom phytoplasma*, cuja sequência está depositada no GenBank (AY034608) (Mapa de restrição H)

Figura 17 Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição com 17 endonucleases (Wei et al., 2007). SM-Br04: fitoplasma encontrado em plantas de mostarda-do-campo; subgrupo referência 16SrIII-J: *Cabbage stunt phytoplasma* - JQ766307

SM-Br04 Mapa K

Cabbage stunt phytoplasma Mapa L

Figura 18 Sítios putativos de restrição do fragmento 16S rDNA de fitoplasma do subgrupo 16SrIII-J, identificado na amostra SM-Br04 (Mapas de restrição K) e do *Cabbage Stunt Phytoplasma*, cuja sequência está depositada no GenBank (JQ766307) (Mapa de restrição E)

Figura 19 Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição com 17 endonucleases (Wei et al., 2007). SM-Br05: fitoplasma encontrado em plantas de mostarda-do-campo; subgrupo referência 16SrIII-U: *Eggplant Giant Calyx phytoplasma* - HM589213

SM-Br05 Mapa M

Eggplant Giant Calyx phytoplasma Mapa N

Figura 20 Sítios putativos de restrição do fragmento 16S rDNA de fitoplasma do subgrupo 16SrIII-J, identificado na amostra SM-Br05 (Mapas de restrição M) e do *Eggplant Giant Calyx phytoplasma*, cuja sequência está depositada no GenBank (HM589213) (Mapa de restrição N)

3.4.4 Análise filogenética das sequências do fragmento 16S rDNA de fitoplasmas

As árvores filogenéticas, foram construídas a partir das sequências consenso selecionadas para representar os subgrupos revelados nesse trabalho e os fitoplasmas representativos dos grupos 16SrIII e 16SrVII. Foram usadas 18 sequências representantes de cada subgrupo do grupo 16SrIII e 4 sequências representantes de cada subgrupo do grupo 16SrVII, além da sequência de *Acholeplasma laidlawii*, todas oriundas do Genbank (Figura 21).

Os números nos ramos representam os valores de confiança no 'bootstrapping'. A sequência nucleotídica determinada para o fitoplasma presente na amostra SM-Br01, SM-Br02 ficaram agregadas no mesmo clado que o *Erigeron witches'-broom phytoplasma* (16SrVII-B); SM-Br03 com '*Manihot esculenta*' *witches* (16SrIII-B:); SM-Br04 com *Cabbage Stunt Phytoplasma* (16SrIII-J) e SM-Br05 junto com *Eggplant Giant Calyx phytoplasma* (16SrIII-U), confirmando os resultados obtidos através das análises on line, análise de padrões virtuais de RFLP, bem como análises dos mapas de restrição.

Figura 21 Árvore filogenética construída pelo método 'Neighbor-Joining', com representantes de 4 diferentes subgrupos de fitoplasmas representantes do grupo 16SrVII, 18 subgrupos de fitoplasmas representantes do subgrupo 16SrIII, o procarioto *Acholeplasma laidlawii* e os fitoplasmas detectados nesse trabalho (SM-Br01, SM-Br02, SM-Br03, SM-Br04 e SM-Br05 oriundos de amostras de mostarda-do-campo. Os números nos ramos representam valores de confiança no *bootstrapping*

3.5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentado neste trabalho, foi possível associar a ocorrência de fitoplasmas com plantas de mostarda-do-campo com sintomas de superbrotamento, identificando e classificando fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrIII-B, 16SrIII-J, 16SrIII-U e 16SrVII-B.

REFERÊNCIAS

- CANALE, M.C.; BEDENDO, I.P. 'Candidatus Phytoplasma brasiliense' (16SrXVA Subgroup) Associated with Cauliflower Displaying Stunt Symptoms in Brazil. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 97, n. 3, p. 419, 2013.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, Ithaca, v.12, p.13-15, 1990.
- ECKSTEIN, B. Enfezamento o brócolis: identificação molecular de fitoplasmas, potenciais insetos vetores e hospedeiros alternativos, e análise epidemiológica da doença. 2010. 103p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.-M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathology Mediterranean*, 35: 144-151, 1996.
- JUNG, H.Y.; HHAM, Y.I.; LEE, JT; HIBI, T.; NAMBA, S. Characterization of a phytoplasma associated with potato witches'broom disease in Korea. *Journal of General Plant Pathology*, Reading, v .69, p. 87-89, 2003.
- LEE, I.M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; HAMMOND, R.W; DAVIS, R.E. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested PCR assay to detect mixed MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 84: 559-566, 1994.
- LEE, I.M.; MARTINI, M.; BOTTNER, K.D; DANE, R.A.; BLACK, M.C.; TROXCLAIR, N. Ecological Implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in anaster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology*, Saint Paul, v.93, p. 1368-1377, 2003.
- MARINGONI, A.C. Doenças das crucíferas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). *Manual de Fitopatologia*. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 285-292, 2005.
- NAMBA, S.; KATO,S.; IWANAMIS, S.; OYAIKU, H.; SHIOZAWA,H.; TSUCHIZAKI, T. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organism using polymerase chain reaction. *Phytopathology*, Saint Paul, v.83, p. 786-791, 1993.
- NEI, M.; LI W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76(10):5269-5273, 1979.
- OLIVIER, C.Y.; GALKA, B.; SEGUIN- SWARTZ,G. Detection of aster yellows phytoplasma DNA in seed and seedlings of canola (*Brassica napus* and *B. rapa*) and AY strain identification. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ontario, v. 32, p. 298-305, 2010.

- RAPUSSI, M.C.C.; ECKSTEIN, B; FLORES, D; HAAS, I.C.R.; AMORIM, L.; BEDENDO, I.P. Cauliflower stunt associated with a phytoplasma of subgroup 16SrIII-J and the spatial pattern of disease. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 133, p. 829-830, 2012.
- RAPUSSI-DA-SILVA, M.C.C. Enfezamento da couve-flor: identificação molecular de fitoplasma, 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.
- SANTOS-CERVANTES M. E.; CHÁVEZ-MEDINA J. A.; ACOSTA-PARDINI J.; FLORES-ZAMORA G. L.; MÉNDEZ-LOZANO J.; LEYVA-LÓPEZ N. E. Genetic diversity and geographical distribution of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Mexico. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 94, p. 388-395, 2010.
- WANG, K.; HIRUKI, C. Molecular characterization and classification of phytoplasmas associated with canola yellows and a new phytoplasma strain associated with dandelions. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 85, p. 76-79, 2001.
- WEI, W.; DAVIS, R.E.; LEE, I-M.; ZHAO, Y. Computer simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v.57, p.1855-1867, 2007.
- 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*, 59(Pt 10), 2582–2593, 2009.

APÊNDICES

>SM-Br01

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAACAGAAAGGCATCTTTTTGTTTTTAAAAG
 ACCTTTTTTCGGAAGGTATGCTTAAAGATGGGCTTGCGCCACATTAGTTAGTTGGTA
 GGGTAATGGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTCGAACAGCC
 ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTT
 TCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTC
 GGTATGTAAAGTTCTTTTTATTGAAGAAGAAAAAATAGTGGAAGAACTATCTTGACGT
 TATTCAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGG
 GGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAGGAAA
 GTCTATAATTTAATTTTCAGTGCTTAACGCTGTCTCGTTATAGAACTACCTTGACTA
 GAGTTAGATAGAGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGTGTAAATATAT
 GGAGGAACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTGACTGACGCTGAGGCA
 CGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
 ATGAGTACTAAGTGTCGGGGTAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTC
 CGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGC
 ACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGTC
 TTGACATGCTTTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGACACAGGTG
 GTGCATGGTTGTCTGTCAGTTCGTGTCTGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAG
 CGCAACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCGGAGACTG
 CCAATTAATAAATTGGAGGAAGGTGAGGATTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA
 TCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGAGTAGCTGAAGCGCGAGTT
 TTTGGCAAATCTCAAAAAAGCAGTCTCAGTTCCGATTGAAGTCTGTAACCTCGACTTC
 ATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCTGCGGTGAATACGTTCCG
 GGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA

>SM-Br02

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAACAGAAAGGCATCTTTTTGTTTTTAAAAG
 ACCTTTTTTCGGAAGGTATGCTTAAAGATGGGCTTGCGCCACATTAGTTAGTTGGTA
 GGGTAATGGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTCGAACAGCC
 ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTT
 TCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTC
 GGTATGTAAAGTTCTTTTTATTGAAGAAGAAAAAATAGTGGAAGAACTATCTTGACGT
 TATTCAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGG
 GGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAGGAAA
 GTCTATAATTTAATTTTCAGTGCTTAACGCTGTCTTGTTATAGAACTACCTTGACTAG
 AGTTAGATAGAGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGTGTAAATATATG
 GAGGAACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTGACTGACGCTGAGGCAC
 GAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA
 TGAGTACTAAGTGTCGGGGTAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCC
 GCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCA
 CAAGCGGTGGATCACGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGTCT
 TGACATGCTTTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGACACAGGTGG
 TGCATGGTTGTCTGTCGTTAATTCGTGTCTGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGC
 GCAACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCGGAGACTGC
 CAATTAATAAATTGGAGGAAGGTGAGGATTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAT
 CTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGAGTAGCTGAAGCGCGAGTTT
 TTGGCAAATCTCAAAAAAGCAGTCTCAGTTCCGATTGAAGTCTGTAACCTCGACTTC

ATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTTCGG
GGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA

>SM-Br03

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAAAGTAAAGGCATCTTTACTTTTTTAAAAGA
CCTTCTTTGAAGGTATGCTTAAGGAGGGGCTTGCGACACATTAGTTAGTTGGCAGG
GTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCAC
ATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTC
GGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTACCTCG
GTATGTAAAGTTCTTTTATTAAGGAAGAAAAAAGAGTGGA AAAA ACTCCCTTGACGGT
ACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAAGG
GGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTTAATAAG
TCTATAGTTTAAATTTAGTGCTTAACGCTGTTGTGCTATAGAACTGTTTTACTAGA
GTGAGTTAGAGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGG
AGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTTGCTGGGACTTTACTGACGCTGAGGCACG
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GAGTACTAAGTGTCGGGTAAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCC
TGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAGACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAA
GCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTGA
CATTTTCTTGCGAAGTTATAGAAATATAATGGAGGTTATCAGGAAAACAGGTGGTG
CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTAGGTAAAGTCCTAAAACGAGCGC
AACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCATGTAATGATGGGGACTTTAACGAGACTGCCAA
TGAAAAATTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTG
GGCTACAAACGTGATACAATGGTTGATACAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTCTTA
GCCAATCTCACAAAATCAATCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATG
AAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGG
GGTTTGTACACACCGCCCGTCA

>SM-Br04

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAAAGTAAAGGGCATCTTTACTTTTTTAAAAG
ACCTTCTTTGAAGGTATGCTTAAGGAGGGGCTTGCGACACATTAGTTAGTTGGCAG
GGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCA
CATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTT
CGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTACCTC
GGTATGTAAAGTTCTTTTATTAAGGAAGAAAAAAGAGTGGA AAAA ACTCCCTTGACG
GTACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGCAATACATAA
GGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTTAATA
AGTCTATAGTTTAAATTTAGCGCTTAACGCCGTTGTGCTATAGAACTGTTTTACTA
GAGTGAGTTAGAGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATAT
GGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTTGCTGGGACTTTACTGACGCTGAGGCA
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
ATGAGTACTAAGTGTCGGGTAAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCG
CCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACA
AGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTG
ACATTTTCTTGCGAAGTTATAGAAATATAATGAAGGTTATCAGGAAAACAGGTGGTG
CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTAGGTAAAGTTCTAAAACGAGCGC
AACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCATGTAATGATGGGGACTTTAACGAGACTGCCAA
TGAAAAATTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTG
GGCTACAAACGTGATACAATGGTTGATACAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTCTTA
GCCAATCTCACAAAATCAATCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATG

AAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGG
GTTTTGTACACACCGCCCGTCA

>SM-Br05

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAAAGTAAAGGCATCTTTACTTTTTTAAAAGA
CCTTCTTTGAAGGTATGCTTAAGGAGGGGCTTGCGACACATTAGTTAGTTGGCAGG
GTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCAC
ATTGAGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAGTTTTTC
GGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTACCTCG
GTATGTAAAGTTCTTTTATTAAGGAAGAAAAAGAGTGGAAGAACTCCCTTGACGGT
ACTTAATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAAGG
GGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTTAATAAG
TCTATAGTTTAAATTTCACTGCTTAACGCTGTTGTGCTATAGAACTGTTTTACTAGA
GTGAGTTAGAGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAGCGATAAAATGCGTAAATATATGG
AGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTTGCTGGGACTTTACTGACGCTGAGGCACG
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GAGTACTAAGTGTCGGGTAAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCC
TGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAG
CGGTGGATCATGTTGTTTTAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTGAC
ATTTTCTTGCGAAGTTATAGAAATATAATGGAGGTTATCAGGAAAACAGGTGGTGC
ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGCA
ACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCATGTAATGATGGGGACTTTAACGAGACTGCCAAT
GAAAAATTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATCTGG
GCTACAAACGTGATACAATGGTTGATACAAAGAGTAGCTGAAACGTGAGTTCTTAG
CCAATCTCACAAAATCAATCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAA
GTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGG
TTTGTACACACCGCCCGTCA