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

**Identificação molecular de distintos fitoplasmas pertencentes ao
grupo 16Srl associados à filodia do gergelim
(*Sesamum indicum* L.).**

Evandro de Jesus Ganem Junior

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

**Piracicaba
2012**

Evandro de Jesus Ganem Junior
Engenheiro Agrônomo

**Identificação molecular de distintos fitoplasmas pertencentes ao grupo 16Srl
associados à filodia do gergelim (*Sesamum indicum* L.).**

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

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

**Piracicaba
2012**

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

Ganem Junior, Evandro de Jesus

Identificação molecular de distintos fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrI associados à filodia do gergelim (*Sesamum indicum* L.). / Evandro de Jesus Ganem Junior. - Piracicaba, 2012.

67 p: il.

Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Doenças de plantas 2. Filodia 3. Fitoplasmas 4. Gergelim 5. Mollicutes
I. Título

CDD 633.85
G196i

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

*A Deus pela Vida,
Aos meus pais Evandro e Paula
por todo o amor, confiança e incentivo, **DEDICO.***

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

*À minha namorada Mariana e aos meus tios João e Rose
pelo apoio, amor e alegria, **OFEREÇO.***

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade concedida.

Ao Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo pela oportunidade de realizar o mestrado sob sua orientação, pela confiança, compreensão, colaboração para minha formação, se mostrando pronto para ajudar em todos os momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Professor Dr. Elliot Watanabe Kitajima pelo envio das amostras e pelas fotos cedidas neste trabalho.

Aos professores que contribuíram para a minha formação, dedicando-se em fornecer seus conhecimentos, principalmente ao Professor Dr. Alfredo Seiiti Urashima por ter me despertado o gosto pela Fitopatologia.

Aos amigos da República Bico do Corvo e Adatupanos da Universidade Federal de São Carlos (CCA - Araras) (Kova, Berne, Ramela, Berruga, Salame, Ki-Medo, Butina, Dú, Meligeni, Danilo, Quasi, Fernando, Coxão Mole, Bikudo, Zé e Marcão), pela amizade, companheirismo, churrascos e festas que transformaram os cinco anos de faculdade nos melhores da minha vida.

À todos os amigos da Universidade Federal de São Carlos (CCA - Araras) e do Laboratório de Genética Molecular (LAGEM) que tiveram grande participação em momentos felizes da minha vida (Mariane, Fernanda (Viginotti), Luana, Kmundongo, Paia, Mingau, Batatais, Nervoso, Kbelo, Leitão, Pakinha, Dayane dos Santos, Cema e Catiana).

Aos amigos do laboratório de Procariotos Fitopatogênicos e Virologia, Ana Paula, Bárbara, Carla, Davi, Elizeu, Júlio, Maria Cristina, Patrícia, Pedro, Rafaela (Benites) pelos momentos agradáveis e pela ajuda.

Agradeço em especial à Daniela Flôres e Thays Benites pelo companheirismo, amizade, pelos passeios, risadas, pelas discussões e por tudo mais que uma boa amizade tem.

A todos os amigos que fiz no Departamento de Fitopatologia e no Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

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

A Murilo e Rafael pela amizade, convivência, paciência e pelos bons momentos que tivemos nesses dois anos do mestrado e que espero que se repitam para o resto de nossas vidas.

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 DESENVOLVIMENTO	19
2.1 Revisão Bibliográfica	19
2.1.1 A cultura do gergelim.....	19
2.1.2 Importância da cultura.....	20
2.1.3 Doenças do gergelim.....	21
2.1.4 Fitoplasmas	22
2.1.5 A filodia do gergelim associada a fitoplasmas.....	24
2.2 Material e Métodos	26
2.2.1 Amostras	26
2.2.2 Extração de DNA total das amostras	27
2.2.2.1 Extração com Kit Comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).....	28
2.2.2.2 Extração rápida	28
2.2.3 Detecção de fitoplasmas por duplo PCR.....	29
2.2.4 Detecção por microscopia eletrônica.....	30
2.2.5 Identificação de Fitoplasmas por duplo PCR.....	31
2.2.6 Purificação do 16S rDNA.....	32
2.2.7 Clonagem do 16S rDNA do fitoplasma.....	32
2.2.8 Sequenciamento e análise das sequências do 16S rDNA do fitoplasma	33
2.2.9 Análise de RFLP in silico.....	34
2.2.10 Análise filogenética	34
2.3 Resultados e Discussão	37
2.3.1 Detecção de fitoplasmas por PCR	37
2.3.2 Detecção por Microscopia Eletrônica	38
2.3.3 Identificação de fitoplasmas por PCR.....	39
2.3.4 Análise das sequências nucleotídicas do 16S rDNA do fitoplasma.....	41
2.3.4.1 Análise de RFLP in silico.....	41
2.3.4.2 Análise filogenética.....	45
3 CONCLUSÕES	49

REFERÊNCIAS	51
APÊNDICE	63

RESUMO

Identificação molecular de distintos fitoplasmas pertencentes ao grupo 16Srl associados à filodia do gergelim (*Sesamum indicum* L.).

Sintomas típicos de infecção por fitoplasmas foram encontrados em plantas de gergelim cultivadas comercialmente. Estes sintomas se caracterizavam pela intensa proliferação de ramos, presença abundante de folhas levemente cloróticas e de tamanho menor que as normais, além de pétalas de coloração verde. A partir de plantas afetadas foi extraído o DNA total, o qual foi usado em reações de duplo PCR, visando detectar fitoplasmas nos tecidos vegetais. Fragmentos genômicos de 1,2 Kb da região do 16S rDNA foram amplificados demonstrando a constante associação entre fitoplasmas e plantas doentes. Através de duplo PCR usando *primers* específicos, foi identificado um fitoplasma pertencente ao grupo 16Srl em todas as amostras sintomáticas analisadas. Com base no sequenciamento desta região genômica e na digestão *in silico*, as análises virtuais de RFLP revelaram que um dos fitoplasmas presentes nas amostras de gergelim era afiliado ao subgrupo 16Srl-B. No entanto, os padrões de restrição apresentados pelo outro fitoplasma mostraram que o mesmo era distinto dos demais representantes dos subgrupos que constituem o grupo 16Srl. Os valores calculados de coeficientes de similaridade e os mapas putativos de restrição confirmaram os resultados da análise de RFLP, indicando que este fitoplasma era representante de um novo subgrupo. A árvore filogenética, construída a partir das sequências nucleotídicas do 16S rDNA de diversos fitoplasmas evidenciou que este novo fitoplasma emergia de um ramo distinto, considerando as ramificações dentro do grupo 16Srl. A filodia do gergelim foi anteriormente relatada em vários países, sendo associada com fitoplasmas dos grupos 16Srl, 16SrlI e 16SrlVI. O presente trabalho revelou a ocorrência de dois fitoplasmas associados à filodia, sendo um deles pertencente ao subgrupo 16Srl-B e outro caracterizado como representante de um novo subgrupo, aqui denominado 16Srl-X.

Palavras-chave: Gergelim; Filodia; Fitoplasmas; Mollicutes; Amarelos

ABSTRACT

Molecular identification of distinct phytoplasmas belonging to 16Srl group associated with sesame (*Sesamum indicum* L.) phyllody.

Typical symptoms commonly induced by phytoplasmas were found in sesame plants grown in commercial fields. These symptoms were characterized by shoot proliferation, leaves of reduced size exhibiting light chlorosis, and green petals. Total DNA extracts were obtained from diseased plants and used as template in nested PCR, in order to detect phytoplasmas in the tissues of the hosts. Genomic fragments of 1.2 kb corresponding to the 16S rDNA region were amplified demonstrating the association of phytoplasmas and diseased plants. Using nested PCR with specific primers, a phytoplasma belonging to group 16Srl was identified in all symptomatic samples. Based on the sequencing of 16S rDNA and *in silico* digestion, the virtual RFLP analysis allowed identify the presence of a phytoplasma affiliated with the subgroup 16Srl-B. This analysis also revealed a second phytoplasma distinct of all representatives of the subgroups within the group 16Srl. Similarity coefficients values and analysis of putative restriction sites confirmed the results obtained from virtual RFLP analysis indicating that this phytoplasma was representative of a new subgroup. A phylogenetic tree generated by the 16S rDNA sequences belonging to diverse phytoplasmas evidenced that this new phytoplasma emerged from a distinct branch, within of the 16Srl group. The sesame phyllody was previously reported in various countries in association with phytoplasmas belonging to 16Srl, 16SrII, and 16SrVI groups. The present study revealed the association of the phyllody with a phytoplasma affiliated with 16Srl-B and a phytoplasma representative of a new subgroup here named 16Srl-X.

Keywords: Sesame; Phyllody; Phytoplasmas; Mollicutes; Yellow

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estruturas vegetativas e reprodutivas de uma planta de gergelim. A: Flores. B e C: Frutos e sementes. Figura A: (Fonte: http://www.taliaessenze.com/asp/prodotti15B_7_pt.asp); Figuras B e C: (Fonte: Annette Gockele: http://www.westafricanplants.senckenberg.de/root/index.php?id=1429&page_id=14).22
- Figura 2 - Filodia do gergelim. A: Superbrotamento de ramos B: planta sintomática e assintomática; C: virescência em pétalas; D: proliferação de pequenas folhas.29
- Figura 3 - Detecção de fitoplasmas em amostras sintomáticas de gergelim por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 Kb, em reações de duplo PCR conduzidas com os *primers* SN910601/SN011119 e R16F2n/R2. M = Marcador (1 Kb Ladder); 1 a 12 = amostras de DNA extraído de plantas sintomáticas de gergelim, usado em diferentes diluições. Ps = planta assintomática de gergelim; Mi = padrão positivo (milho); H: padrão negativo (água).40
- Figura 4 - Corpúsculos pleomórficos, observados ao microscópio eletrônico de transmissão, de fitoplasmas em elementos de vasos do floema de planta de gergelim apresentando sintomas de filodia. (Foto gentilmente cedida pelo Professor Dr. E.W. Kitajima)41
- Figura 5 - Identificação de fitoplasma pertencente ao grupo 16Sr I em plantas sintomáticas de gergelim por meio da amplificação de fragmentos do 16S rDNA de 1,1 Kb em reações de duplo PCR conduzidas com os *primers* SN910601/SN011119 e R16(I)F1/R16(I)R1. M = Marcador (1 Kb Ladder); 1 a 5 = amostras de DNA extraídas de plantas sintomáticas de gergelim; Mi = padrão positivo (Milho); H = padrão negativo (água).42

Figura 6 - Padrões virtuais e mapas de restrição putativos gerados pelo uso de 17 enzimas preconizadas para a classificação de fitoplasmas (WEI et al., 2007). Identificações: SP-Br01: fitoplasma encontrado em gergelim identificado como pertencente ao subgrupo 16Srl-B; SP-Br02: uma linhagem do novo fitoplasma do grupo 16Srl-X identificado no presente trabalho; SP-Br03: fitoplasma representante do novo subgrupo 16Srl-X, caracterizado no presente estudo, associado à filodia do gergelim.44

Figura 7 - Árvore filogenética gerada pelas sequências do 16Sr rDNA de fitoplasmas pertencentes a diversos grupos, representantes de subgrupos do grupo 16Srl e aqueles identificados em associação com a filodia do gergelim (SP-Br01, SP-Br02 e SP-Br03). Os números colocados nos ramos são os valores de confiança baseados no "bootstrapping".48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA de fitoplasmas representantes dos grupos e subgrupos 16Srl e dos grupos 16SrlI até 16SrXXXI depositadas no GenBank e usadas para construção da árvore filogenética.38
- Tabela 2 - Detecção de fitoplasmas em diferentes diluições de DNA total extraído de plantas sintomáticas de gergelim por meio de duplo PCR usando os *primers* SN910601/SN011119 e R16F2n/R2.40
- Tabela 3 - Coeficientes de similaridade (F) calculados entre pares de fitoplasmas representantes de diversos subgrupos do grupo 16Srl e os fitoplasmas identificados em plantas de gergelim com sintomas de filodia (SP-Br01, SP-Br02 e SP-Br03).47

1 INTRODUÇÃO

O gergelim é considerado uma das espécies oleaginosas mais antigas cultivadas pelo homem. É utilizada na alimentação humana e animal, sendo plantada principalmente em países asiáticos e africanos. Apresenta-se bem adaptada à diversidade de solos e condições climáticas, sendo referida como uma espécie de fácil cultivo.

A filodia do gergelim é conhecida desde a primeira década de 1900. Essa doença chegou a ser creditada aos vírus, porém após a década de setenta, a mesma passou a ser associada aos fitoplasmas, os quais haviam sido recém-descobertos naquela época. Fitoplasmas são organismos procariotos, desprovidos de parede celular, que apresentam polimorfismo celular e não são cultiváveis em meios de cultura. Nas plantas, habitam os vasos de floema, sendo disseminados na natureza por insetos vetores, principalmente aqueles pertencentes ao grupo das cigarrinhas. A filodia é reconhecida como uma das mais importantes doenças da cultura do gergelim, sendo considerada como um fator restritivo à produção das plantas, por causar perdas significativas no rendimento de grãos. A doença tem sido registrada em todas as regiões produtoras, ocorrendo de modo frequente com intensidades variáveis.

Plantas com sintomas de filodia foram observadas em plantios de gergelim conduzidos no Paraguai, na região conhecida como Boqueron. Apesar da baixa incidência da doença, em torno de 1 %, as plantas chamaram a atenção de técnicos vinculados à produção. A suspeita inicial, baseada nos sintomas exibidos pelas plantas, indicava que os mesmos estariam associados à presença de fitoplasmas nos tecidos vegetais.

Assim, visando confirmar a diagnose baseada nos sintomas, foi desenvolvida a presente investigação. Para isto, plantas sintomáticas foram amostradas e submetidas a análises de laboratório, as quais são comumente utilizadas para a detecção e identificação molecular de fitoplasmas. Os objetivos do estudo, portanto, foram demonstrar a associação de fitoplasmas com a doença, bem como determinar a identidade molecular dos fitoplasmas envolvidos na interação com plantas doentes de gergelim.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 A cultura do gergelim

O gergelim (*Sesamum indicum* L.) é uma das oleaginosas mais antigas ainda consumidas pela humanidade, havendo registros de seu cultivo há mais de 4.300 anos antes da era cristã, nos países do Oriente Médio, Índia e China (WEISS, 1983). Essa espécie é classificada dentro da botânica sistemática como sendo pertencente ao Reino Plantae, Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Ordem Tubiflorae, Subordem Solamineae, Família Pedaliaceae, Tribo Sesameae, Gênero *Sesamum*, Espécie *Sesamum indicum*.

A origem dessa espécie ainda é muito incerta. Enquanto alguns autores relatam que ela seja de origem africana, outros estudiosos acreditam que a mesma se originou na Ásia (KOURI; ARRIEL, 2009). Segundo estes autores, a origem asiática pode ser justificada pela riqueza de variedades que ali se encontra, apesar de investigações terem apontado que o centro primário do gergelim é a África, devido à ocorrência dos tipos primitivos dessa espécie botânica. Em outros registros, é mencionado que a espécie pode ter sido originária da Etiópia e Índia independentemente, pois essas regiões possuem em comum numerosos gêneros e espécies. Aqui no Brasil o gergelim foi introduzido por navegantes portugueses no século XVI, alguns anos depois da colonização, a partir de colônias indianas, quando recebeu a denominação inicial de *gergelly* (KOURI; ARRIEL, 2009).

Atualmente, segundo a Food and Agriculture Organization (FAO, 2010), o gergelim é cultivado em mais de 70 países, especialmente na Ásia e África, sendo a nona oleaginosa mais cultivada no mundo. A produção mundial está estimada em 3,9 milhões de toneladas, obtidas em 8 milhões de hectares, com produtividade média de 487,5 kg/ha. Mianmar e Índia são responsáveis por cerca de 35 % da produção mundial. Já o Brasil se caracteriza como pequeno produtor de gergelim com 16 mil toneladas, produzidas numa área de 25 mil hectares e rendimento em torno de 640,0 kg/ha (FAO, 2010).

O gergelim é uma planta anual, herbácea ou semi-arbustiva, de ciclo variável de três a seis meses, dependendo do modo de cultivo, e que pode atingir até dois

metros de altura, quando plantada em solos férteis (ASSUMPÇÃO, 2008). As folhas são alternadas e mostram formatos diferentes, sendo as folhas lanceoladas presentes na parte superior da planta, enquanto folhas longas com contorno dentado ou lobulado são encontradas na parte inferior da planta. As flores são completas, ou seja, hermafroditas, podendo apresentar coloração branca, rósea ou violeta. Os frutos são cápsulas pilosas, com duas a quatro divisões contendo, cada uma, numerosas sementes de coloração variável entre branco, acinzentado e preto. A Figura 1 ilustra algumas estruturas componentes de uma planta normal de gergelim.

Figura 1 - Estruturas vegetativas e reprodutivas de uma planta de gergelim. A: Flores. B e C: Frutos e sementes. Figura A: (Fonte: http://www.taliaessenze.com/asp/prodotti15B_7_pt.asp); Figuras B e C: (Fonte: Annette Gockele: http://www.westafricanplants.senckenberg.de/root/index.php?id=1429&page_id=14)

2.1.2 Importância da cultura

No Brasil, o sistema de produção do gergelim é feito em pequena escala, utiliza mão de obra familiar e, normalmente, está associado ao cultivo de milho, feijão ou caupi (EMBRAPA, 2006). A cultura serve como fonte de renda alternativa. A exploração do gergelim representa uma excelente opção por ser uma cultura que exige práticas agrícolas simples e de fácil assimilação pelo produtor. Se os atuais níveis de produtividade regional forem mantidos e houver expansão da área de cultivo, há grande possibilidade de se conquistar parte do mercado externo com o excedente da produção. Além do papel social, o produto alcança alta cotação no mercado internacional de oleaginosas, podendo se constituir em fonte de renda tanto para as atuais regiões produtoras como para novas áreas que venham a ser implantadas, principalmente no nordeste brasileiro.

O gergelim apresenta grande adaptabilidade às condições edafoclimáticas, ao clima quente, com bom nível de resistência à seca e facilidade de cultivo. Essas características o transformam em uma ótima opção para diversificação agrícola, com grande potencial econômico, devido à qualidade de seu óleo que encontra aplicações nas indústrias alimentícias e óleo-química (BARROS et al., 2001).

Os grãos inteiros apenas descortçados (despeliculados) e polidos são, atualmente, muito utilizados e valorizados, sobretudo na indústria de panificação. A adição dos grãos de gergelim em uma alimentação com alta concentração de lisina de soja produz uma dieta bem equilibrada e de alto valor nutricional (JIN et al., 2001). É também excelente fonte de óleo comestível, de grande estabilidade e resistente à rancificação (GODOY et al., 1985; SAVY FILHO et al., 1988). Além de disso, é considerado um dos mais finos azeites no mercado, sendo comumente usado na indústria alimentícia. Este óleo é rico em ácidos graxos insaturados, contendo aproximadamente 47 % de ácido oléico e 39 % de ácido linoléico, os quais representam de 44 a 58 % do seu peso e as proteínas oscilam entre 17 e 29 % (MAZZANI; LAYRISSE, 1998). A torta originária do prensado dos grãos contém entre 40 e 70 % de proteínas e 12 % de óleo, o que é um excelente alimento tanto para o ser humano quanto para os animais (QUEIROGA et al., 2007).

2.1.3 Doenças do Gergelim

A cultura do gergelim apresenta suscetibilidade a várias doenças provocadas por fungos e bactérias que afetam as folhas, ramos, flores, frutos e raízes, algumas das quais podem ocasionar danos nas plantas, com efeito negativo na produtividade e perdas na rentabilidade da produção (LIMA et al., 2001).

As principais doenças do gergelim são causadas por fungos. A Cercosporiose (*Cercospora sesami* Zimm) é considerada a principal doença do gergelim nas regiões produtoras brasileiras (CANECCIO FILHO; TELLA, 1957). Além da Cercosporiose, merecem destaque a Mancha Angular (*Cylindrosporium sesami* Hansford), a Podridão Negra do Caule (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid) e a Murcha de Fusarium (*Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami* Cast.).

A Cercosporiose também é relatada como a doença mais preocupante para grande parte das áreas africanas produtoras de gergelim, destacando-se a Nigéria (UWALA, 1998). Doenças de menor expressão também têm sido assinaladas, entre

elas o Crestamento Foliar Bacteriano, a Queima Bacteriana, a Mancha Foliar de Alternária e as Queimas causadas por fungos dos gêneros *Corynespora* e *Phytophthora*. Em algumas regiões da Ásia, como na Índia, há relatos de que uma doença conhecida como Filodia seria a mais destrutiva (MAITI et al., 1985). Essa doença esta associada aos fitoplasmas e, atualmente, está disseminada por todas as regiões produtoras.

2.1.4 Fitoplasmas

Fitoplasmas são procariotos fitopatogênicos desprovidos de parede celular, sendo a célula circundada somente por uma membrana plasmática, resultando em um alto grau de pleomorfismo da célula (BEDENDO, 1999, 2011; BERTACCINI, 2007). Esses procariotos habitam e se multiplicam nos vasos de floema das plantas e na hemolinfa de insetos da ordem Hemiptera. Na natureza, os fitoplasmas são disseminados principalmente por insetos (HOGENHOUT et al., 2008).

A descoberta dos fitoplasmas como agentes de doenças em plantas é relativamente recente. A demonstração de que as doenças de plantas conhecidas como “amarelos” estavam associadas aos organismos do tipo micoplasma (MLO's), já conhecidos como patógenos de animais, foi feita no final da década de sessenta por um grupo de pesquisadores japoneses (DOI et al., 1967). Através de observações ao microscópio eletrônico, estes procariotos foram encontrados nos vasos de floema de plantas de batata, amora, quiri e rainha margarida que apresentavam típicos sintomas de “amarelos”. Investigações posteriores comprovaram a importância desses microrganismos como patógenos de plantas, sendo que no final da década de oitenta, centenas de doenças já eram creditadas a esses agentes (McCOY et al., 1989). Apenas em 1994, no 10º *Congress of the International Organization of Mycoplasmaology*, foi proposto o termo fitoplasma para designar os MLOs associados às doenças de plantas (SEARS; KIRKPATRICK, 1994).

Os fitoplasmas são classificados dentro do Domínio Bacteria, Filo Tenericutes, Classe Mollicutes, Ordem Acholeplasmataceae e Gênero *Phytoplasma* (*Candidatus*). A nomenclatura binomial latina ao nível de gênero e espécie, a qual é aceita para a grande maioria dos seres vivos, não se aplica aos fitoplasmas. Isto porque, para se enquadrar nesta nomenclatura, a denominação de espécie requer uma descrição

das características fenotípicas do microrganismo quando isolado em cultura pura e, até o momento, isto não é possível, pois não são cultiváveis. Dessa forma, a designação de *Candidatus* ao nível de espécie tem sido atribuída de forma provisória, com base nas análises das sequências de bases nucleotídicas do gene 16S rRNA (BEDENDO, 2011).

Os hospedeiros infectados por fitoplasmas apresentam sintomas bastante variáveis, sugerindo desequilíbrios no balanço hormonal da planta (DAVIS; LEE, 1991). A severidade dos danos provocados pela presença do patógeno pode estar relacionada com o genótipo da planta suscetível, a estirpe do patógeno e as condições do ambiente, podendo a doença, em alguns casos, ter um efeito devastador sobre a cultura (DAVIS, 1995). Os sintomas típicos podem incluir clorose foliar; enfezamento generalizado da planta, envolvendo flores, folhas e internódios; superbrotamento de ramos, originando o sintoma conhecido por 'vassoura de bruxa'; estiolamento de ramos; deformação de folhas; virescência, caracterizada pelo aparecimento de pétalas verdes devido ao desenvolvimento de clorofila; filodia, evidenciada pela formação de folhas no lugar das pétalas; esterilidade de flores; necrose do floema; avermelhamento foliar não sazonal; e declínio generalizado da planta, caracterizado pela morte descendente do ponteiro dos ramos (DAVIS, 1995).

Várias doenças associadas aos fitoplasmas têm se mostrado bastante destrutivas, causando perdas relevantes em espécies de importância econômica, tanto alimentícias como florestais e ornamentais. No contexto mundial, podem ser citados o enfezamento do milho, o superbrotamento de ramos da macieira, a flavescência dourada e os amarelos da videira, o amarelecimento ou declínio do cinamomo, o declínio da pereira, o nanismo amarelo do arroz, o amarelo do pessegueiro, o amarelecimento letal do coqueiro, os superbrotamentos em citros, batata, batata doce, quiri, olmo, entre muitas outras (DAVIS, 1995; GUMPF, 1988; LEE et al., 2004; SCOTT; ROSENKRANZ; NELSON, 1977; BEDENDO, 2011).

No Brasil, algumas doenças associadas aos fitoplasmas têm sido registradas como o enfezamento do milho (BEDENDO, 2000), o superbrotamento do maracujazeiro (RIBEIRO, 2008) e da mandioca (FLORES, 2009), o irisado do chuchuzeiro (MONTANO et al., 2011), o cálice gigante do tomateiro (AMARAL-MELLO et al., 2006; KITAJIMA, 1995), o enfezamento da berinjela (BARROS, 2002; AMARAL-MELLO et al., 2007), o lenho mole da macieira (RIBEIRO; BEDENDO; SANHUEZA, 2007), o superbrotamento da crotalária (AMARAL-MELLO et al., 2004),

o superbrotamento do hibisco (KITAJIMA, 1995; MONTANO et al., 2001), a síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (SILVA, 2008; SILVA et al., 2009), o enfezamento do repolho (AMARAL-MELLO, 2007), o enfezamento da couve-flor (RAPUSSI; BEDENDO, 2008), o enfezamento do brócolis (ECKSTEIN, 2008). Além das cultivadas, destaca-se a ocorrência de fitoplasmas em diversas plantas silvestres e daninhas, o que pode ter implicações com a epidemiologia de diversas doenças (KITAJIMA, 1995; MONTANO, 2011).

A transmissão dos fitoplasmas tem como principais agentes os insetos conhecidos como cigarrinhas, pertencentes às famílias Cicadellidea e Fulgoridea, embora algumas espécies de psíldeos também possam transmitir estes patógenos (BEDENDO, 2011). A relação vetor – fitoplasmas é do tipo persistente propagativo, pois o patógeno, uma vez adquirido pelo vetor, passa a ser transmitido pelo inseto por toda sua vida. Para fins de pesquisa, os fitoplasmas têm sido transmitidos por vetores infectivos, por enxertia e plantas parasitas pertencentes ao gênero *Cuscuta* (BEDENDO, 2011).

Medidas preventivas visando dificultar ou impedir a entrada do patógeno em áreas de plantio têm um papel importante no controle de doenças associadas aos fitoplasmas. Dessa forma, deve-se utilizar material propagativo (bulbos, tubérculos, mudas, toletes, sementes, etc.) com boa qualidade fitossanitária para que não haja a introdução do patógeno em áreas isentas. Outra medida que tem grande impacto no controle de fitoplasmas é o plantio de variedades resistentes ou tolerantes, quando disponível, para inibir ou minimizar os danos causados (BEDENDO, 2011).

A utilização de tratamentos químicos através da aplicação do antibiótico tetraciclina, como forma de proteção ao ataque do patógeno, ainda é pouco difundida, em função dos altos custos do tratamento, dos riscos a saúde humana e da baixa eficiência de controle. No entanto, quando a doença já foi constatada no campo, a prática da erradicação (*roguing*) das plantas doentes é a medida mais eficaz para se evitar a sobrevivência do patógeno e a ocorrência de fonte de inóculo para outras infecções (BEDENDO, 2011).

2.1.5 A filodia do gergelim associada a fitoplasmas

A filodia do gergelim, que erroneamente é chamada por alguns de enrolamento das folhas, foi registrada pela primeira vez no subcontinente Indo-

Paquistão em Mirpus Khas (província do Paquistão) em 1908 (VASUDEVA; SAHAMBI, 1955; VASUDEVA, 1961). Atualmente já foi relatada em muitos países produtores da cultura como Índia, Iran, Iraque, Mianmar, Israel, Sudão, Nigéria, Tanzânia, Paquistão, Etiópia, Tailândia, Turquia, Uganda, Burkina Faso, México e Brasil (AKHTAR et al., 2009; VEIGA et al., 1985).

Segundo Salehi e Izadpanah (1992), a filodia do gergelim está entre as maiores restrições na produção da cultura, por ser uma doença que ocorre com alta severidade e causa grandes danos em todas as principais regiões produtoras, especialmente nas áreas de clima quente.

A filodia passou muitos anos sem ter seu agente etiológico conhecido. Pelo fato da sintomatologia ser semelhante às doenças de natureza virótica, esta doença foi inicialmente atribuída aos vírus (WEISS et al., 1983; TURKMENOGLU; ARI, 1959). Porém, recentes estudos têm demonstrado a presença de fitoplasmas em plantas de gergelim sintomáticas, em diversas regiões produtoras do mundo, sendo relatados em Oman (AL-SAKEITI et al., 2005), Índia (KHAN et al., 2007), Paquistão (AKHTAR et al., 2008), Tailândia (NAKASHIMA et al., 1995), Turquia (BASPINAR et al., 1993), Iran (SALEHI; IZADPANA, 1992) e Mianmar (WIN et al., 2010).

Associado ao sintoma de filodia pode ocorrer grande variedade de sintomas como, por exemplo, superbrotamento de ramos, virescência em pétalas, amarelecimento foliar, encurtamento de entrenós, proliferação abundante de folhas com tamanho reduzido, deformação de órgãos florais, enfezamento generalizado, necrose do floema e declínio da planta (AKHTAR et al., 2009; ARRIEL et al., 2009; ESMAILZADEH-HOSSEINI, 2007). Essa diferenciação ocorre de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta, época em que ocorreu a infecção e da variedade de gergelim cultivada (AKHTAR et al., 2009; KHAN et al., 2007).

Em experimentos conduzidos por Akhtar et al. (2009), as plantas infectadas antes do estágio de floração mostraram sintomas severos, enquanto aquelas infectadas durante o período de floração exibiram sintomas severos apenas na parte superior da planta, ocasionalmente seguidos por algumas flores rudimentares que resultaram em pequenas cápsulas com sementes degeneradas (AKHTAR et al., 2009).

O fitoplasma causador da filodia é transmitido naturalmente por cigarrinhas. Diferentes espécies já foram relatadas como transmissoras. Na Turquia e no Iran, (SALEHI; IZADPANA, 1992; KERSTING, 1993) relataram a transmissão por

Circulifer haematocephus; na Índia, Iran, Tailândia, Burkina Faso e Paquistão, *Orosius albicinctus* foi o principal vetor (AKHTAR et al., 2009; ESMAILZADEH-HOSSEINI, 2007) e em Israel e no leste do Mediterrâneo, a espécie *Orosius orientalis* foi relatada como o vetor potencial do agente patogênico (KLEIN et al., 2001). Experimentalmente o fitoplasma foi transmitido pela planta parasita do gênero *Cuscuta* e por união de tecido através de enxertia (AKHTAR et al., 2009).

A utilização de produtos químicos como forma de recuperação das plantas afetadas é uma medida de controle recomendada, no entanto, Akhtar et al. (2009), demonstraram que o tratamento químico através da pulverização das plantas infectadas de gergelim com tetraciclina-HCl não se mostrou eficaz no controle da doença, pois as plantas tiveram uma recuperação parcial entre os 20-25 dias de tratamento, porém após os 45 dias, todos os sintomas da doença reapareceram em novos ramos.

O controle dos insetos presentes na área é a medida mais eficiente, uma vez que não se dispõe de cultivares de gergelim resistentes a essa doença. Entretanto, o tratamento com inseticidas deve ser feito com restrição, para evitar a eliminação dos inimigos naturais (ARRIEL et al., 2009).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Amostras

Amostras de folhas foram coletadas de plantas naturalmente infectadas, cultivadas em campos comerciais da cidade de Filadelfia, Departamento de Boqueron, região localizada ao norte do Paraguai. Cinco plantas sintomáticas e duas livres de sintomas foram amostradas para posterior análise. Os sintomas mais comumente observados eram do tipo clorose foliar leve, evidenciada pela coloração esmaecida do verde normal; intenso superbrotamento das hastes; presença abundante de folhas deformadas de tamanho menor que aquelas normais (Figura 2). Eventualmente, as plantas exibiam virescência floral (Figura 2), manifestada pela formação de pétalas verdes e o sintoma de filodia, caracterizado pelo aparecimento de folhas em lugar de pétalas.

Figura 2 - Filodia do gergelim. A: Superbrotamento de ramos B: planta sintomática e assintomática; C: virescência em pétalas; D: proliferação de pequenas folhas

2.2.2 Extração de DNA total das amostras

O DNA total foi extraído para ser utilizado nas reações de PCR, visando à detecção e identificação molecular dos fitoplasmas associados às plantas doentes. O DNA foi obtido através de dois distintos métodos de extração. Para ambos os métodos, foi usado, aproximadamente, 1 g de tecido retirado de folhas e pequenos ramos, o qual foi macerado em nitrogênio líquido. Extrações foram conduzidas utilizando-se um conjunto de reagentes comerciais identificados por “Dneasy Plant Mini-Kit” produzido pela empresa Qiagen Inc. (Mississauga, ON), e um protocolo denominado de “Extração Rápida”, desenvolvido por Doyle e Doyle (1990) e referido por Ahrens e Seemüller (1992), com modificações.

2.2.2.1 Extração com Kit Comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

Nessa metodologia, o DNA foi extraído de acordo com as instruções do fabricante. Após a trituração do tecido vegetal em nitrogênio líquido, esse extrato foi colocado em um microtubo de 1,5 mL e adicionados 400 µL do tampão AP1 (Qiagen) e 4 µL de RNase. Os tubos permaneceram em “banho-maria” a 65 °C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 130 µL do tampão AP2 (Qiagen) e as amostras foram incubadas a -20 °C por 5 minutos. Essa mistura foi aplicada em uma coluna montada sobre tubo coletor e centrifugada por 5 minutos a 13.000 rpm. O líquido que passou pela coluna foi coletado e transferido para um novo microtubo, ao qual foi adicionado 675 µL do tampão AP3 (Qiagen). Uma alíquota de 650 µL dessa mistura foi aplicada em nova coluna e centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a coluna que reteve o DNA foi transferida para um novo microtubo. Para a lavagem do DNA foram adicionados 500 µL do tampão AW (Qiagen) no centro da coluna e a amostra passou por nova centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos. A coluna foi transferida para um novo microtubo para eluição do DNA com 100 µL de tampão AE (Qiagen). O DNA extraído foi armazenado a -20 °C.

2.2.2.2 Extração rápida

Depois de macerado em nitrogênio líquido, o material foi transferido para microtubo de 1,5 mL, sendo adicionados 800 µL de tampão de extração 2X CTAB (2 g CTAB; 8,18 g NaCl; 0,74g EDTA; 1,57 g Tris-HCl; 100 mL água destilada; pH 8,0) a 60 °C e 2,0 µL de mercaptoetanol. Essa suspensão foi mantida em “banho-maria” a 65 °C por 60 minutos, sendo agitada a cada 10 minutos, visando à homogeneização. Após esta etapa, foram adicionados 600 µL de CIA (clorofórmio/álcool isoamílico 24:1) e misturados até a obtenção de uma emulsão homogênea. Essa emulsão foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram retirados da centrífuga tentando-se evitar a perturbação da interface formada. Cerca de 540 µL da fase superior (aquosa) resultante da centrifugação foi retirada e transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. A seguir, foi adicionada a mesma quantidade de isopropanol gelado (-20 °C), sendo a mistura mantida por uma noite a -20 °C para precipitação do ácido nucléico. Após esta etapa, os tubos foram retirados do congelador e o material foi submetido à centrifugação por 14.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, foi descartado o

sobrenadante, tomando-se o cuidado de não danificar o precipitado formado. Adicionou-se 1 mL de etanol 80 % ao precipitado e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Descartou-se o álcool e repetiu-se o processo. Foram adicionados 500 µL de NaCl 1M e o precipitado dissolvido com o auxílio de uma pipeta plástica. Em seguida, as amostras foram incubadas a 4°C por 60 minutos. Nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos foi realizada. O processo de lavagem com 1 mL de etanol 80 % foi repetido por duas vezes. Para completa evaporação do etanol, os tubos foram mantidos abertos e invertidos sobre folha de papel toalha em temperatura ambiente. Após a secagem, o precipitado foi ressuspensionado em água deionizada esterilizada e armazenado a -20 °C.

2.2.3 Detecção de fitoplasmas por duplo PCR

As reações, usando-se o DNA total como molde visando a amplificação do 16S rRNA de fitoplasmas, foram conduzidas através de duplo (“nested”) PCR. Na primeira reação, foram usados os pares de “*primers*” (iniciadores) P1/Tint (DENG; HIRUKI, 1991; SMART et al.,1996); P1/P7 (DENG; HIRUKI, 1991; SMART et al.,1996); mF2/mR1 (GUNDERSEN; LEE, 1996), SN910601/SN011119 (NAMBA et al., 1993; JUNG et al., 2003) e, na segunda reação, o par R16F2n/R2 (GUNDERSEN; LEE,1996), que amplifica um fragmento de DNA de aproximadamente 1,2 kb.

As sequências dos iniciadores que foram utilizados são:

R16 P1- 5'AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T 3' (DENG; HIRUKI, 1991);

R16 Tint- 5'TCA GGC GTG TGC TCT AAC CAG C3' (SMART et.al., 1996);

R16 P7-5'CGT CCT TCA TCG GCT CTT 3' (SMART et. al., 1996);

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

R16 mR1-5' CTT AAC CCC AAT CAT CGA C 3' P1 (GUNDERSEN; LEE, 1996);

R16 SN910601-5' GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATT 3' (NAMBA et al., 1993);

R16 SN011119-5' TCG CCG TTA ATT GCG TCC TT 3' (JUNG et al., 2003);

R16 F2n- 5'GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG3' (GUNDERSEN; LEE, 1996);

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

O controle positivo foi representado pelo DNA extraído de plantas de milho infectadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho. Como controles negativos

foram usados água mili-Q esterilizada e DNA obtido de plantas assintomáticas de gergelim.

Cada reação foi processada em um volume final de 25 µL, contendo: 1 µL do extrato do DNA diluído ou puro; 18,7 µL de água mili-Q; 0,5 µL de cada *primer* (na concentração de 20 pmol/ µL); 2µL de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo); 2 µL de solução tampão 10 X PCR e 0,17 µL de Amplitaq 5 U/ µL. Para o par de *primers* P1/Tint, o termociclador foi programado para um total de 30 ciclos, compreendendo as etapas de desnaturação por 1 minuto a 94 °C, anelamento por 1 minuto a 56 °C e extensão por 2 minutos a 72 °C. Para as reações com os pares de “primers” P1/P7, mF2/mR1, SN910601/SN011119 e R16F2n/R2, o aparelho foi programado para 35 ciclos, com desnaturação por 1 minuto a 94°C, anelamento por 2 minutos a 50°C, extensão por 3 minutos a 72°C e uma única etapa inicial de 1 minuto A 94° C e uma final de 7 minutos a 72° C.

Os produtos gerados pelo duplo PCR foram analisados por eletroforese, em gel de agarose 1 % e tampão TBE 0,5X. Uma alíquota de 5 µL de cada produto de reação foi aplicada no gel, juntamente com 3 µL de tampão de corrida. A eletroforese foi conduzida com voltagem constante de 65 V por 60 minutos. A coloração dos produtos amplificados foi realizada com Sybr safe® (1%) (Life Technologies) e a visualização destes produtos foi feita em transiluminador de luz ultravioleta. Como marcador molecular foi utilizado o 1 Kb Ladder (Life Technologies).

2.2.4 Detecção por microscopia eletrônica

As amostras de tecidos de plantas doentes foram preparadas e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão, junto ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária – NAP/MEPA da ESALQ/USP, de acordo com a metodologia descrita por Kitajima (1998). Fragmentos dos tecidos retirados da região de floema das hastes foram pré-fixados em fixador Karnovsky modificado (2,5 % glutaraldeído + 2,5 % paraformaldeído em tampão cacodilato 0,05 M; pH 7,2 + CaCl₂ 0,001 M) por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem em tampão cacodilato 0,05 M por três vezes, por 10 minutos cada, o material foi pós-fixado com tetróxido de ósmio 1 % em tampão cacodilato 0,05 M por

1-2 horas. Em seguida, os fragmentos foram lavados com água destilada e fixados com acetato de uranila 0,5 % *en bloc* durante uma noite. Os fragmentos amostrados foram desidratados em série de acetona 30, 50, 70, 90 %, uma vez, por 10 minutos cada e 100 %, por três vezes, por 10 minutos cada. Posteriormente, foram infiltrados com uma mistura 1:1 v/v de acetona/resina de Spurr por 3-4 horas e com resina pura por uma noite. Em seguida, os fragmentos foram emblocados em resina pura, em fôrmas de silicone devidamente identificadas, a 70 °C por 48 horas. Os blocos foram aparados com o auxílio do aparelho Leica EM Trim, e seccionados em ultramicrotomo Leica ultracut UCT. As secções prateadas (70-80 nm) foram coletadas em telinhas de cobre, previamente recobertas por película de formvar. Esse material foi contrastado com solução aquosa de acetato de uranila 1 % e citrato de chumbo de Reynolds (1,76 g de citrato de sódio + 1,33 g de nitrato de chumbo + 50 mL água destilada; pH 12) e visualizado em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900.

2.2.5 Identificação de fitoplasmas por duplo PCR

Para a identificação de fitoplasmas através de PCR, os produtos amplificados na primeira reação pelos pares de *primers* referidos no item anterior foram usados na segunda reação, a qual foi conduzida com os *primers* específicos para identificação de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16Srl e 16SrIII (LEE et al., 1994). As reações de PCR e a eletroforese foram processadas de maneira idêntica àquela descrita para a detecção de fitoplasmas, com termociclador programado para 35 ciclos.

Como padrão positivo foi utilizado DNA extraído de plantas de milho infectadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho, pertencente ao grupo 16Srl e DNA extraído de plantas de chuchu infectadas com o fitoplasma agente do superbrotamento, pertencente ao grupo 16SrIII.

As sequências dos *primers* específicos de grupo utilizados são (LEE et al., 1994):

R16(I)F1 - 5' TAA AAG ACC TAG CAA TAG G 3'

R16(I)R1 - 5' CAA TCC GAA CTG AGA CTG T 3'

R16(III)F2 - 5' AAG AGT GGA AAA ACT CCC 3'

R16(III)R1 - 5' TCC GAA CTG AGA TTG A 3'

2.2.6 Purificação do 16S rDNA

A purificação do 16S rDNA amplificado nas reações de duplo PCR foi feita com o conjunto de reagentes componentes do PureLink™ Kit (Invitrogen), seguindo o protocolo especificado pelo fabricante. Em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 300 µL do tampão de captura (binding buffer) e 75 µL do produto obtido no PCR com R16F2n/R2. A mistura foi colocada em uma coluna com filtro acoplado ao tubo coletor e foi processada a centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. A solução que passou pela coluna foi recolocada no tubo coletor e adicionou-se 650 µL do tampão de lavagem (Wash buffer). Realizou-se uma nova centrifugação de 8.000 rpm por 1 minuto. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e a coluna recolocada no tubo coletor, sendo o conjunto submetido a uma nova centrifugação por 3 minutos a 13.000 rpm, para que os resíduos fossem removidos do tampão de lavagem. Após a centrifugação, a coluna foi colocada em um novo tubo coletor, sendo adicionados 50 µL de tampão de eluição. Nova centrifugação foi feita a 14.000 rpm por 2 minutos. Após a centrifugação a coluna foi descartada e o sobrenadante armazenado. As amostras purificadas foram armazenadas à temperatura de -20 °C. A concentração do DNA foi estimada por comparação visual das bandas do DNA purificado com aquelas do marcador Lambda DNA.

2.2.7 Clonagem do 16S rDNA do fitoplasma

Na realização da clonagem, os fragmentos purificados de DNA de 1,2 Kb resultantes de duplo PCR foram inseridos no vetor pGEM®- T Easy Vector System I (Promega) e clonados em *Escherichia coli* da estirpe DH5α. Neste processo, denominado ligação, foram utilizados 3 µL do DNA purificado, 1 µL do vetor (25 ng. µL⁻¹), 5 µL de tampão ligase 2X e 1 µL de T4DNA ligase (3 U. µL⁻¹), formando uma mistura de 10 µL que foi colocada em um microtubo e armazenada por 12 horas a 4 °C. Após esse período, a ligação estava pronta para ser transferida às células competentes da bactéria *E. coli*.

Em seguida, iniciou-se o processo de transformação, no qual o vetor contendo o fragmento de DNA é inserido nas células competentes de *E. coli*. Essa preparação foi feita de acordo com Hanahan (1983), onde em um microtubo adicionou-se 2 µL do produto da ligação em 50 µL de células competentes e incubou-se no gelo por 30 minutos. Essa mistura foi submetida a um choque térmico,

por incubação a 42 °C por 50 segundos, e, imediatamente, imersão em gelo durante 2 minutos. Após o choque, 450 µL de meio de cultura SOC (1 % de triptona, 0,5 % extrato de levedura, 8,5 mM NaCl, 2,5 mM de KCl, 0,001 mM MgCl, 0,02 mM de glicose e água até completar o volume de 1000 mL; pré-aquecido a 37 °C) foi adicionado às células transformadas. Os microtubos permaneceram por 2 horas a 37 °C em agitador para promover o crescimento das células transformadas. Após o período de crescimento, foram plaqueados 80 µL de uma 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 de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D galactopiranosida) na concentração de 50 ng/ml e 20 µL IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosida) concentração de 50 mg.mL⁻¹. Em seguida, as colônias foram incubadas por 12 horas a 37 °C. Esse período de incubação permitiu fazer a diferenciação entre as células transformadas daquelas não transformadas, através da coloração. As células transformadas ficaram com a coloração branca e aquelas não transformadas apresentam coloração azul, devido aos produtos X-gal e IPTG que avaliam a atividade de β-galactosidae nos transformantes. As células brancas (clones) foram transferidas, com o auxílio de ponteyras, para tubos do tipo Falcon contendo meio líquido LB e incubadas a 37 °C por 12 horas, sob agitação constante de 200 rpm para promover o crescimento de bactérias.

A partir das bactérias clonadas, foi realizada a extração do plasmídeo de três clones para cada uma das amostras, contendo o fragmento de DNA do fitoplasma. A extração foi realizada com o conjunto de reagentes componentes do Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Para confirmação da presença do fitoplasma no plasmídeo, foi realizada uma reação de PCR com o par de *primers* SP6/T7 e uma digestão com a enzima de restrição EcoRI.

2.2.8 Sequenciamento e análise das sequências do 16S rDNA do fitoplasma

Após a clonagem do 16S rDNA dos fitoplasmas, os plasmídeos contendo os clones foram enviados para a empresa *Macrogen* (Seul, Coréia do Sul), para que fossem sequenciados. O resultado do sequenciamento foi analisado e interpretado através da utilização dos programas computacionais de construção Bio Edit

V.7.0.9.0 (HALL, 1999) e análise de sequências (Multiple Sequence Alignment - CLUSTALW).

2.2.9 Análise de RFLP *in silico*

Para a análise de RFLP *in silico*, utilizou-se o programa pDraw32 V.1.1.110 (AcaClone Software) para o estudo dos mapas de sítios putativos de restrição das sequências do 16S rDNA do fitoplasma encontrado nas plantas sintomáticas de gergelim. As sequências nucleotídicas correspondentes ao 16S rDNA dos fitoplasmas obtidos neste estudo e as sequências dos fitoplasmas representantes do grupo 16Srl depositadas no GenBank foram clivadas e alinhadas no programa Bio Edit V.7.0.9.0. No programa pDraw32 V.1.1.110 foi realizada uma digestão simulada por computador com as 17 enzimas propostas por Wei et al. (2007). Estas enzimas foram *Alul*, *BamHI*, *Bfal*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*. Essa digestão *in silico* gerou uma imagem simulada de eletroforese em gel de agarose 3 %. Essa imagem revelou os padrões correspondentes aos fitoplasmas encontrados neste estudo, os quais foram comparados com aqueles dos representantes do subgrupo 16Srl, sendo então calculado os coeficientes de similaridade (F).

Os padrões virtuais de RFLP foram comparados e um coeficiente de similaridade (F) foi calculado para cada par de isolados de fitoplasma de acordo com a fórmula $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, onde N_x e N_y são os números totais de bandas no perfil de cada isolado e N_{xy} é o número de bandas em comum entre os mesmos (Lee et al., 1998). Apenas as bandas de até 50 pb foram consideradas para o cálculo.

2.2.10 Análise filogenética

Para a realização da análise filogenética dos fitoplasmas encontrados neste estudo, uma árvore filogenética foi construída usando-se as sequências nucleotídicas componentes da região do 16S rDNA, de representantes dos fitoplasmas pertencentes aos subgrupos do grupo 16Srl e dos representantes de fitoplasmas do grupo 16SrlI até o grupo 16SrXXXI, além da sequência do procarioto *Acholeplasma laidlawii*, que é utilizado como raiz da árvore (ancestral comum). Na construção da árvore, a ferramenta computacional utilizada foi o MEGA 5.0

(TAMURA et al., 2011), com o método de agrupamento Neighbour-joining e teste Bootstrapping de 1.000 vezes, para garantir a confiabilidade da posição dos ramos.

As sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA dos fitoplasmas e seus respectivos grupos, número de acesso no GenBank e as referências consultadas para a construção da árvore estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA de fitoplasmas representantes dos grupos e subgrupos 16Srl e dos grupos 16SrlI até 16SrXXXI depositadas no GenBank e usadas para construção da árvore filogenética

Nome da doença	Fitoplasma	Acesso GenBank	Referência
Sesame Phyllody (SP)	SP-Br01	*	Presente estudo
Sesame Phyllody (SP)	SP-Br02	*	Presente estudo
Sesame Phyllody (SP)	SP-Br03	*	Presente estudo
Tomato Big Bud (BB)	16Srl-A	AF222064	Wei et al., 2007
Maize Bushy Stunt (MBS)	16Srl-B	AY265208	Lee et al., 2004
Clover Phyllody (CPh)	16Srl-C	AF222065	Wei et al., 2007
Paulownia Witches' Broom (PaWB)	16Srl-D	AY265206	Wei et al., 2007
Blueberry Stunt (BBS3)	16Srl-E	AY265213	Wei et al., 2007
Apricot Chlorotic Leaf Roll (ACLR-AY)	16Srl-F	AY265211	Wei et al., 2007
Strawberry Multiplier (STRAWB2)	16Srl-K	U96616	Wei et al., 2007
Onion Proliferation (OnP2)	16Srl-L	GU223209	Wei et al., 2007
Valeriana Yellows (ValY)	16Srl-M	AY102273	Jomantiene et al., 2010
Ipomoea Obscura Witches' Broom (IOWB)	16Srl-N	AY265205	Wei et al., 2007
Soybean Aster Yellows (SoyAY)	16Srl-O	AF268405	Wei et al., 2007
Aster Yellows (AYIP)	16Srl-P	AF503568	Wei et al., 2007
Cherry Little Leaf (CherLL)	16Srl-Q	AY034089	Wei et al., 2007
Cherry Bunchy Leaf (ChBL)	16Srl-R	HM067754	Jomantiene et al., 2010
Lilac Little Leaf (LcLL)	16Srl-S	HM067755	Jomantiene et al., 2010
Azalea Little Leaf (AzLL)	16Srl-T	HQ285917	Wei et al., 2007
Mexican Potato Purple Top (PPT-JAL6)	16Srl-U	FJ914650	Santos-Cervantes et al., 2010
Potato Purple Top (PPT-SON18)	16Srl-V	FJ914642	Santos-Cervantes et al., 2010
Peanut Witches' Broom (PnWB)	16SrlI-A	L33765	Gundersen et al., 1994
Canadian Peach X-Disease (CX)	16SrlII-A	L33733	Gundersen et al., 1994
Coconut Lethal Yellows (CLY)	16SrlV-A	AF498307	Wei et al., 2007
Elm Yellows (EY)	16SrlV-A	AY197655	Wei et al., 2007
Clover Proliferation (CP)	16SrlVI-A	AY390261	Wei et al., 2007
Ash Yellows (AY)	16SrlVII-A	AF092209	Wei et al., 2007
Loofah Witches' Broom (LWB)	16SrlVIII-A	AF086621	Wei et al., 2007
Pigeon Pea Witches' Broom (PPWB)	16SrlIX-A	AF248957	Wei et al., 2007
Apple Proliferation (AP)	16SrlX-A	AJ542541	Seemüller et al., 2004
Rice Yellow Dwarf (RYD)	16SrlXI-A	AB052873	Wei et al., 2007
Stolbur Phytoplasma (STOL)	16SrlXII-B	L76865	Davis et al. (1997)
Mexican Periwinkle Virescence (MPVir)	16SrlXIII-A	AF248960	Wei et al., 2007
Bermudagrass White Leaf (BGWL)	16SrlXIV-A	AJ550984	Wei et al., 2007
Hibiscus Witches' Broom (HibWB)	16SrlXV-A	AF147708	Montano et al., 2001
Sugarcane Yellow Leaf Syndrome (SYL)	16SrlXVI-A	AY725228	Wei et al., 2007
Papaya Bunchy Top (PBT)	16SrlXVII-A	AY725234	Wei et al., 2007
American Potato Purple Top Wilt (APPTW)	16SrlXVIII-A	DQ174122	Wei et al., 2007
Japanese Chestnut Witches' Broom (JCWB)	16SrlXIX-A	AB054986	Jung et al., 2002
Buckthorn Witches' Broom (BWB)	16SrlXX-A	X76431	Marcone et al., 2004
Pine Shoot Proliferation (PSP)	16SrlXXI-A	AJ632155	Schneider et al., 2005
Nigerian Coconut Lethal Decline (NCLD)	16SrlXXII-A	Y14175	Wei et al., 2007
Buckland Valley Grapevine Yellows (BVGY)	16SrlXXIII-A	AY083605	Constable et al., 2002
Sorghum Bunchy Shoot (SBS)	16SrlXXIV-A	AF509322	Blanche et al., 2003
Weeping Tea Witches' Broom (WTWB)	16SrlXXV-A	AF521672	Wei et al., 2007
Sugarcane Yellows Phytoplasma D3T1	16SrlXXVI-A	AJ539179	Wei et al., 2007
Sugarcane Yellows Phytoplasma D3T2	16SrlXXVII-A	AJ539180	Wei et al., 2007
Derbid Phytoplasma (DP)	16SrlXXVIII-A	AY744945	Wei et al., 2007
Cassia italica Witches' Broom (CiWB)	16SrlXXIX-A	EF666051	Al-Saady et al., 2008
Salt Cedar Witches' Broom (ScWB1)	16SrlXXX-A	FJ432664	Zhao et al., 2009
Soybean stunt phytoplasma (SoyST1c1)	16SrlXXXI-A	HQ225630	Lee et al., 2011
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	M23932	Weisburg et al., 1989

* As sequências não foram depositadas no GenBank. Estas sequências estão apresentadas no Apêndice deste trabalho.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Detecção de fitoplasmas por PCR

Os resultados obtidos nos testes de duplo PCR conduzidos com os pares de primers SN910601/SN011119 e R16F2n/R2 revelaram a presença de fitoplasmas nos tecidos de todas as cinco plantas sintomáticas de gergelim.

Esta constatação foi feita pela amplificação de fragmentos de DNA de aproximadamente 1,2 Kb, observados na forma de bandas em géis de agarose visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Amplificações deste mesmo tipo foram também reveladas pelas reações de duplo PCR contendo DNA de plantas de milho infectadas por fitoplasma, utilizadas como padrões positivos. Contrariamente, nenhuma amplificação ocorreu quando DNA total de plantas assintomáticas de gergelim e água foram usadas nas reações de duplo PCR. Os resultados positivos foram constatados em diferentes diluições do extrato original de DNA total obtido de cada planta doente analisada, como mostrado na Tabela 2 e ilustrado na Figura 3.

Os sintomas observados nas plantas de gergelim foram similares àqueles descritos em outros países. Fitoplasmas foram associados com plantas de gergelim mostrando proliferação de ramos, amarelecimento e virescência em campos instalados no Paquistão (AKHTAR et al., 2008, 2009). Em Mianmar, foram relatados sintomas de virescência em plantas naturalmente infectadas por fitoplasmas (WIN et al., 2010). Fitoplasmas também foram detectados em plantas cultivadas no Sultanato de Oman, que exibiam sintomas de superbrotamento, virescência e filodia (AKHTAR et al., 2007). Esta sintomatologia associada à presença de fitoplasmas tem sido encontrada em plantas desta espécie distribuídas em outros países produtores, nos quais a doença tem sido constatada, tais como a Turquia (Sertkaya et al., 2007), a Tailândia (MARTINI et al., 2007), o Iran (HOSSEINI et al., 2007) e a Índia (KHAN et al., 2007).

Tabela 2 - Detecção de fitoplasmas em diferentes diluições de DNA total extraído de plantas sintomáticas de gergelim por meio de duplo PCR usando os *primers* SN910601/SN011119 e R16F2n/R2

AMOSTRA		DILUIÇÃO	RESULTADO
1	G1	1:30	+
2	G2	1:30	+
3	G3	1:30	+
4	GER3	1:30	+
5	GER4	1:30	+
6	G1	1:10	+
7	G2	1:10	+
8	G3	1:10	+
9	GER3	1:10	+
10	GER4	1:10	+
11	GER3	1:5	+
12	GER4	1:5	+

Figura 3 – Detecção de fitoplasmas em amostras sintomáticas de gergelim por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 Kb, em reações de duplo PCR conduzidas com os *primers* SN910601/SN011119 e R16F2n/R2. M = Marcador (1 Kb Ladder); 1 a 12 = amostras de DNA extraído de plantas sintomáticas de gergelim, usado em diferentes diluições. Ps = planta assintomática de gergelim; Mi = padrão positivo (milho); H: padrão negativo (água)

2.3.2 Detecção por microscopia eletrônica

Fitoplasmas foram observados no lúmen dos elementos de vasos do floema de tecidos obtidos de plantas sintomáticas, evidenciados pela visualização de típicos corpúsculos pleomórficos (Figura 4). O emprego de microscopia eletrônica de

transmissão confirmou a ocorrência de fitoplasmas nos tecidos de plantas afetadas, a qual havia sido previamente revelada pela técnica molecular de PCR. Assim, ficou claramente demonstrada a associação entre os sintomas característicos da doença e a presença de fitoplasmas. Ao longo do tempo, a microscopia eletrônica tem contribuído destacadamente para os estudos dos fitoplasmas, tendo precedido as metodologias sorológicas e moleculares. Contudo, em razão da ausência de diferenciação morfológica entre as células de fitoplasmas, sua contribuição tem sido limitada à detecção destes agentes de doença. No entanto, seu uso tem permitido maior segurança nas diagnoses feitas com base na sintomatologia exibida pela planta doente. Especificamente para o caso da filodia que ocorre em plantas de gergelim, no Iran e no Paquistão, corpúsculos pleomórficos também foram observados no floema de plantas que exibiam sintomas típicos da doença, possibilitando associar plantas afetadas com a presença de fitoplasmas (SALEHI; IZADPANAHI, 1992; AKHTAR et al., 2009).

Figura 4 - Corpúsculos pleomórficos, observados ao microscópio eletrônico de transmissão, de fitoplasmas em elementos de vasos do floema de planta de gergelim apresentando sintomas de filodia. (Foto gentilmente cedida pelo Professor Dr. E.W. Kitajima)

2.3.3 Identificação de fitoplasmas por PCR

Fitoplasmas do grupo 16SrI foram identificados em todas as plantas sintomáticas, quando fragmentos de DNA gerados em PCR pelos *primers* SN910601/SN011119 foram reamplificados pelo par de *primers* R16(I)F1/R16(I)R1. O DNA das amostras analisadas produziram fragmentos genômicos de aproximadamente 1,1 Kb, típicos de fitoplasmas do grupo 16SrI (Figura 5). Extrato

de DNA proveniente de plantas de milho sabidamente infectadas pelo agente do enfezamento vermelho e usadas como padrão positivo também gerou fragmentos de 1,1 Kb, os quais são esperados quando se utiliza os *primers* específicos para fitoplasmas do grupo 16SrI. Não ocorreu amplificação para a amostra usada como padrão negativo, representada pela água, nas reações de PCR.

Figura 5 – Identificação de fitoplasma pertencente ao grupo 16SrI em plantas sintomáticas de gergelim por meio da amplificação de fragmentos do 16S rDNA de 1,1 Kb em reações de duplo PCR conduzidas com os *primers* SN910601/SN011119 e R16(I)F1/R16(I)R1. M = Marcador (1 Kb Ladder); 1 a 5 = amostras de DNA extraídas de plantas sintomáticas de gergelim; Mi = padrão positivo (Milho); H = padrão negativo (água)

A identificação de um representante do grupo 16SrI (“Aster yellows group”) em associação com plantas de gergelim cultivadas no Paraguai acrescenta mais um local de ocorrência de um fitoplasma deste grupo, o qual é reconhecido como um dos grupos de fitoplasmas mais atuantes em diferentes partes do mundo (ZHAO et al., 2010). No país de origem das plantas investigadas no presente estudo não foram encontrados relatos anteriores sobre a ocorrência de representantes deste grupo, embora fitoplasmas do grupo 16SrIII e 16SrXIII tenham sido identificados em árvores de cinamomo exibindo sintomas de declínio (ARNEODO et al., 2005). No Brasil, fitoplasmas deste grupo estão relacionados com diversas doenças que ocorrem em espécies cultivadas de grande expressão econômica, com destaque especial para o milho e a cana-de-açúcar, nas quais causam as doenças conhecidas como

enfezamento vermelho (BEDENDO et al., 2000) e síndrome do amarelecimento foliar (SILVA et al., 2009), respectivamente

2.3.4 Análise das sequências nucleotídicas do 16S rDNA do fitoplasma

2.3.4.1 Análise de RFLP *in silico*

Com base na ausência de polimorfismo entre as três sequências do 16S rDNA analisadas para cada um dos isolados encontrados nas plantas de gergelim, uma sequência consenso foi selecionada como representativa de cada um destes isolados, totalizando cinco sequências consenso. Após a seleção, cada uma das sequências foi submetida à digestão *in silico*, usando-se 17 enzimas de restrição previamente estabelecidas. Os padrões de restrição gerados permitiram a análise virtual de RFLP, a qual permitiu analisar a ocorrência de polimorfismos entre os fragmentos do 16S rDNA sequenciados.

A análise virtual de RFLP revelou três padrões de restrição (Figura 6) identificados por SP-Br (Sesame Phyllody-Brazil). O primeiro padrão de restrição foi produzido pelo isolado da amostra GER4, sendo este isolado denominado de SP-Br01. O segundo padrão foi gerado pelo isolado encontrado na amostra GER3, sendo este isolado identificado por SP-Br02. Os isolados presentes nas amostras G1, G2 e G3 revelaram idênticos padrões de restrição, uma vez que as sequências não apresentaram polimorfismos entre si. Assim, o representante destes isolados foi identificado por SP-Br03. As sequências representativas destes três isolados presentes nas plantas de gergelim estão apresentadas no Apêndice deste trabalho.

A análise das sequências apontou que os isolados presentes em gergelim podem representar dois distintos subgrupos de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16Srl. Os padrões de restrição apresentados pelo isolado SP-Br01 são idênticos àqueles relatados para o fitoplasma agente do amarelo da cebola e do enfezamento vermelho do milho (LEE et al., 2004), representantes do subgrupo 16Srl-B (WEI et al., 2007). Os padrões de restrição derivados da digestão enzimática das sequências de ambos os fitoplasmas estão ilustrados na Figura 6. No entanto, os padrões gerados pelo isolado SP-Br02 mostraram identidade muito estreita com aqueles apresentados pelo isolado SP-Br03, diferindo apenas para o sítio da enzima *AluI*, na posição correspondente à base nucleotídica 1172 da sequência de SP-Br02 (Figura

6). Os padrões de restrição apresentados por ambos os isolados são diferentes de todos os padrões descritos até o momento para os diferentes fitoplasmas representantes dos subgrupos que compõem o grupo 16Srl, atualmente disponíveis no GenBank. Os padrões mais próximos são aqueles descritos para o fitoplasma representante do subgrupo 16Srl-B (Figura 6). Quando se confrontam os padrões de SP-Br02 e SP-Br03 com aqueles de 16Srl-B, surgem como diferentes os sítios das enzimas *HaeIII* (119) e *RsaI* (122 e 278). Estes sítios distintos de restrição podem ser observados nos mapas de sítios putativos de restrição para as referidas enzimas, os quais estão representados na Figura 6.

Figura 6 - Padrões virtuais e mapas putativos de restrição gerados pelo uso de 17 enzimas preconizadas para a classificação de fitoplasmas (WEI et al., 2007). Identificações: SP-Br01: fitoplasma encontrado em gergelim identificado como pertencente ao subgrupo 16Srl-B; SP-Br02: uma linhagem do novo fitoplasma do grupo 16Srl-X identificado no presente trabalho; SP-Br03: fitoplasma representante do novo subgrupo 16Srl-X, caracterizado no presente estudo, associado à filodia do gergelim

As sequências nucleotídicas do 16S rDNA evidenciadas nos isolados presentes em gergelim apresentaram 99 % de similaridade com as sequências de

diversos fitoplasmas afiliados a este grupo e encontradas no GenBank. Um coeficiente de similaridade (F) igual a um foi calculado entre o fitoplasma representante do subgrupo 16Srl-B e o isolado SP-Br01 (Tabela 3), demonstrando que este isolado é pertencente a este subgrupo. Para o isolado SP-Br02, os valores de coeficientes de similaridade variaram de 0,816 a 0,942 em relação aos demais fitoplasmas afiliados aos diversos subgrupos do grupo 16Srl (Tabela 3). Para SP-Br03 os valores do coeficiente de similaridade variaram entre 0,788 a 0,914 (Tabela 3). Ressalta-se que o valor de F calculado para o isolado SP-Br02 e SP-Br03 foi de 0,971 (Tabela 3).

Como relatado por Wei e colaboradores (2007), um fitoplasma é reconhecido como representante de um novo subgrupo dentro de um determinado grupo, quando o valor do coeficiente de similaridade (F) for igual ou menor que 0,97, em relação a todos os demais representantes dos subgrupos componentes deste grupo. Assim, o isolado SP-Br01 é um membro do subgrupo 16Srl-B, pois seu coeficiente de similaridade em relação ao representante deste subgrupo foi igual a um. No entanto, desde que os isolados SP-Br02 e SP-Br03 mostraram valores abaixo de 0,97 quando comparados com os fitoplasmas representantes dos diferentes subgrupos encontrados no grupo 16Srl, estes isolados podem representar um novo subgrupo. Portanto, está sendo proposto que estes isolados sejam representantes do novo subgrupo 16Srl-X. É interessante ressaltar que o coeficiente de similaridade calculado para estes isolados foi de 0,971, demonstrando que são pertencentes ao mesmo subgrupo. Em razão do coeficiente de similaridade ser diferente de 1, pode-se propor que o isolado SP-Br02 seja uma linhagem distinta do isolado SP-Br03, onde *AluI* é a enzima chave para a distinção entre os mesmos.

Tabela 3 - Coeficientes de similaridade (F) calculados entre pares de fitoplasmas representantes de diversos subgrupos do grupo 16Srl e os fitoplasmas identificados em plantas de gergelim com sintomas de filodia (SP-Br01, SP-Br02 e SP-Br03)

SUBGRUPO	A	B	C	D	E	F	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	SP-Br01	SP-Br02	SP-Br03
BB (16Srl-A)	1																				
MBS (16Srl-B)	0,922	1																			
CPh (16Srl-C)	0,911	0,951	1																		
PaWB (16Srl-D)	0,931	0,971	0,902	1																	
BBS3 (16Srl-E)	0,922	0,942	0,951	0,913	1																
ACLR-AY (16Srl-F)	0,857	0,880	0,869	0,848	0,840	1															
STRAWB2 (16Srl-K)	0,900	0,922	0,911	0,891	0,902	0,918	1														
OnP2 (16Srl-L)	0,891	0,971	0,902	0,941	0,893	0,848	0,891	1													
ValY (16Srl-M)	0,874	0,933	0,923	0,923	0,876	0,851	0,874	0,923	1												
IOWB (16Srl-N)	0,922	1	0,932	0,971	0,923	0,880	0,922	0,971	0,933	1											
SoyAY (16Srl-O)	0,871	0,874	0,784	0,863	0,835	0,747	0,812	0,843	0,827	0,874	1										
AYIP (16Srl-P)	0,920	0,941	0,931	0,911	0,922	0,939	0,980	0,911	0,893	0,941	0,812	1									
CherLL (16Srl-Q)	0,840	0,922	0,891	0,891	0,843	0,878	0,840	0,891	0,913	0,922	0,812	0,900	1								
ChBL (16Srl-R)	0,911	0,951	1	0,902	0,913	0,869	0,911	0,902	0,923	0,951	0,804	0,931	0,891	1							
LcLL (16Srl-S)	0,900	0,922	0,931	0,891	0,902	0,878	0,920	0,891	0,874	0,922	0,812	0,940	0,840	0,931	1						
AzLL (16Srl-T)	0,843	0,923	0,854	0,893	0,846	0,800	0,843	0,893	0,895	0,923	0,816	0,863	0,902	0,854	0,843	1					
PPT-JAL6 (16Srl-U)	0,874	0,933	0,885	0,904	0,857	0,812	0,854	0,904	0,887	0,933	0,846	0,874	0,874	0,885	0,874	0,876	1				
PPT-SON18 (16Srl-V)	0,854	0,933	0,865	0,885	0,857	0,792	0,854	0,865	0,868	0,933	0,827	0,874	0,913	0,885	0,854	0,876	0,943	1			
SP-Br01	0,902	1	0,932	0,971	0,942	0,880	0,922	0,971	0,952	1	0,874	0,941	0,922	0,932	0,922	0,923	0,933	0,933	1		
SP-Br02	0,863	0,942	0,913	0,913	0,885	0,860	0,863	0,913	0,933	0,942	0,816	0,882	0,941	0,913	0,863	0,866	0,877	0,877	0,962	1	
SP-Br03	0,835	0,914	0,885	0,885	0,838	0,832	0,854	0,885	0,906	0,914	0,788	0,854	0,913	0,904	0,835	0,838	0,849	0,849	0,914	0,971	1

Abreviações: BB= Tomato Big Bud; MBS= Maize Bushy Stunt; CPh= Clover Phyllody; PaWB= Paulownia Witches' Broom; BBS3= Blueberry Stunt; ACLR-AY= Apricot Chlorotic Leaf Roll; STRAWB2= Strawberry Multiplier; OnP2= Onion Proliferation; ValY= Valeriana Yellows; IOWB= Ipomoea Obscura Witches' Broom; SoyAY= Soybean Aster Yellows; AYIP= Aster Yellows; CherLL= Cherry Little Leaf; ChBL= Cherry Bunchy Leaf; LcLL= Lilac Little Leaf; AzLL= Azalea Little Leaf; PPT-JAL6= Mexican Potato Purple Top; PPT-SON18= Potato Purple Top.

2.3.4.2 Análise filogenética

A relação filogenética entre os fitoplasmas representantes de diferentes grupos, fitoplasmas representantes de subgrupos do grupo 16Srl e os fitoplasmas associados à filodia do gergelim está apresentada na árvore filogenética construída a partir das respectivas sequências nucleotídicas (Figura 7). A árvore filogenética evidenciou que os isolados dos fitoplasmas associados à filodia são distintos dos fitoplasmas afiliados aos demais grupos. No entanto, os fitoplasmas detectados em gergelim estão presentes nos ramos que reúnem os diferentes fitoplasmas representativos dos subgrupos que compõem o grupo 16Srl, mostrando que pertencem a um grupo monofilético e confirmando os resultados revelados pela análise da similaridade de sequências. A ramificação da árvore filogenética mostrou que os isolados SP-Br02 e SP-Br03 se apresentaram estritamente relacionados, em perfeita concordância com análises virtuais de RFLP conduzidas com os padrões de restrição gerados pelas 17 endonucleases. Além disto, representam um novo subgrupo distinto, aqui denominado 16Srl-X.

Com base na análise das sequências nucleotídicas do 16S rDNA do fitoplasma, conduzidas pela análise de RFLP virtual e análise filogenética, o presente estudo revelou um fitoplasma do grupo 16Srl-B e um representante de um novo subgrupo dentro do grupo 16Srl associados com a filodia do gergelim. Os sintomas mostrados pelas plantas doentes foram idênticos àqueles relatados em outros países para a mesma doença. No entanto, fitoplasmas distintos foram identificados em associação com a filodia do gergelim nos diferentes países em que a doença foi investigada. Assim como neste trabalho, um fitoplasma do grupo 16Srl foi molecularmente caracterizado em plantas afetadas pela doença na Índia (KHAN et al., 2007) e, em um estudo mais refinado, um representante do subgrupo 16Srl-B foi encontrado em plantas portadoras da doença cultivadas em Mianmar (WIN et al., 2010). Um fitoplasma do grupo 16SrII foi evidenciado em plantas naturalmente afetadas pela doença em campos do Paquistão (Akhtar et al., 2008) e do Iran (HOSSEINI et al., 2007), enquanto um fitoplasma deste mesmo grupo, caracterizado como pertencente ao subgrupo 16SrII-D, foi identificado em plantas doentes amostradas em Oman (AKHTAR et al., 2007). Um fitoplasma distinto dos dois grupos anteriores aqui mencionados foi descrito em associação com a filodia do gergelim na Turquia. Trata-se de um fitoplasma afiliado ao grupo 16SrVI, subgrupo 16SrVI-A. Relatos de fitoplasmas diferentes associados a uma mesma doença em um determinado hospedeiro têm sido constatados para outros patossistemas. Um exemplo típico é o caso do cálice gigante do tomateiro, no qual fitoplasmas dos grupos 16Srl, 16SrIII, 16SrV, 16SrVI e 16SrXII foram identificados em associação com a doença, em diversas partes do mundo (AMARAL MELLO et al., 2006). A ocorrência de distintos fitoplasmas numa mesma espécie botânica que exhibe idênticos sintomas quando infectadas por estes agentes, sugere que a relação hospedeiro-patógeno não seja muita específica, como encontrado no presente estudo para a filodia do gergelim.

3 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- fitoplasmas estão associados às plantas de gergelim portadoras de sintomas típicos da doença conhecida como filodia.
- estes fitoplasmas pertencem ao grupo 16Srl, sendo um deles afiliado ao subgrupo 16Sr-B e o outro, um representante de um novo subgrupo, o qual foi designado de 16Srl-X.

REFERÊNCIAS

- AHRENS, U.; SEEMULLER, E. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, n. 8, p. 828-832, 1992.
- AKHTAR, J.K.; BOTTLNER, K.; AL-SAADY, N.; AL-SUBHI, A.M.; LEE, I.M. Identification of phytoplasma associated with witches' broom and virescence diseases of sesame in Oman. **Bulletin of Insectology**: Bologna v. 60, p. 133-134, 2007.
- AKHTAR, K.P.; DICKINSON, M.; SARWAR, G.; JAMIL, F.F.; HAQ, M.A. First report on the association of a 16SrII phytoplasma with sesame phyllody in Pakistan. **Plant Pathology**, London, v. 57, p. 771, 2008.
- AKHTAR, K.P.; SARWAR, G.; DICKINSON, M.; AHMAD, M.; HAQ, M.A.; HAMEED, S.; JAVEED, M. Sesame phyllody disease: symptomatology, etiology and transmission in Pakistan. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 33, p. 477-486, 2009.
- AL-SAADY, N.A.; KHAN, A.J.; CALARI, A.; AL-SUBHI, A.M.; BERTACCINI, A. 'Candidatus Phytoplasma omanense', associated with witches'-broom of *Cassia italica* (Mill.) Spreng. in Oman. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**: Reading, v. 58, p. 461-466, 2008.
- AL-SAKEITI, M.A.; AL-SUBHI, A.M.; AL-SAADY, N.A.; DEADMAN, M.L. First report of witches'-broom disease of sesame (*Sesamum indicum*) in Oman. **Plant Disease**: Saint Paul, v. 89, n. 5, p. 530-530, 2005.
- AMARAL MELLO, A.P.O. **Identificação de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença**. 2007. 64 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- AMARAL MELLO, A.P.O.; RIBEIRO, L.F.C.; MASSOLA JUNIOR, N.S.; BEDENDO, I.P. Um fitoplasma do grupo 16SrV associado ao superbrotamento da crotalária. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.4, p. 432-435, 2004.
- AMARAL MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; KITAJIMA, E.W.; RIBEIRO, L.F.C.; KOBORI, R. Tomato big bud associated with a phytoplasma belonging to group 16SrIII in Brazil. **International Journal of Pest Management**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 233-237, 2006.

ARNEODO, J.D.; GALDEANO, E.; ORREGO, A.; STAUFFER, A.; NOME, S.F.; CONCI, L.R. Identification of two phytoplasmas detected in China-trees with decline symptoms in Paraguay. **Australasian Plant Pathology**, Perth, v. 34, p. 583-585, 2005.

ARRIEL, N.H.C. Doenças. In: ARRIEL, N.H.C.; BELTRAO, N.E.M.; FIRMINO, P.T. (Ed.). **Gergelim**: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. cap. 12, p. 137-151.

ASSUMPÇÃO, B.R. **Gergelim**: a semente da saúde. São Paulo: Alaúde Editorial, 2008. 147 p.

BASPINAR, H.; KORKMAZ, S.; ONELGE, N.; CINAR, A.; UYGUN, N.; KERSTING, U. Studies on citrus stubborn disease pathogen and sesame phyllody in sesame and their related leafhopper vector. **Journal of Turkish Phytopathology**, Bornova, v. 22, p. 1-8, 1993.

BARROS, M.A.L.; SANTOS, R.F.; BENATI, T.; FIRMINO, P.T. Importância econômica e social. In: BELTRÃO, N.E.M.; VIEIRA, D.J. **O agronegócio do gergelim no Brasil**: Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 21-35.

BARROS, T.S.T. **Caracterização molecular de Mollicutes fitopatogênicos no Brasil**. 2002. 105 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2002

BEDENDO, I.P. Fitoplasmas e espiroplasmas. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p. 255-270.

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

_____. Detection and identification of the maize bushy stunt phytoplasma in corn plants in Brazil using PCR and RFLP. **International Journal of Pest Management**: Oxford, v. 46, p. 73-76, 2000.

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

BLANCHE, K.R.; TRAN-NGUYEN, L.T.T.; GIBB, K.S. Detection, identification and significance of phytoplasmas in grasses in northern Australia. **Plant Pathology**: London, v. 52, p. 505–512, 2003.

CANECCHIO FILHO, V.; TELLA, R. **Instruções para a cultura do gergelim**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1957. 6 p. (Instituto Agrônômico. Boletim, 89).

CONSTABLE, F.E.; WHITING, J.R.; GIBB, K.S.; SYMONS, R.H. A new grapevine yellows phytoplasma from the Buckland Valley of Victoria, Australia. **Vitis**, Berlin, v. 41, p. 147–153, 2002.

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

DAVIS, R.E.; LEE, I.M. Mycoplasma-like organisms as plant diseases agents: a review. **ATCC, Quarterly Newsletter**, Rockville, v. 11, p. 1-11, 1991.

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

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

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

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Ithaca, v. 12, p. 13-15, 1990.

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

EMBRAPA ALGODÃO. **Sistema de produção**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Gergelim/CultivadoGergelim/importancia.html>>. Acesso em: 15 fev. 2012.

ESMAILZADEH-HOSSEINI, S.A.; MIRZAIE, A.; JAFARI-NODOOSHAN, A.; RAHIMIAN, H. The first report of transmission of a phytoplasma associated with sesame phyllody by *Orosius albicinctus* in Iran. **Australasian Plant Disease Notes**, Adelaide, v. 2, p. 33–34, 2007.

FAO. **Statistical data**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat>>. Acesso em: 25 jan. 2012.

FLORES, D. **Caracterização molecular e análise filogenética do fitoplasma agente do superbrotamento da mandioca (*Manihot esculenta*) no Estado de São Paulo**. 2009. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GODOY, I.J.; SAVY FILHO, A.; TANGO, J.S.; UNGARO, M.R.G.; MARIOTTO, P.R. **Programa integrado de pesquisa: oleaginosas**. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 1985. 33 p.

GUMPF, D.J. Stubborn disease of citrus caused by *spiroplasma citri*. In: MARAMOROSCH, K.; RAYCHAUDHURI, S.P. **Mycoplasma diseases of crops: basic and applied aspects**. New York: Springer-Verlag, 1988. p. 327-342.

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

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

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

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

HOGENHOUT, S.A.; OSHIMA, K.; AMMAR, E.; KAKIZAWA, S.; KINGDOM, H.N.; NAMBA, S. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 9, n. 4, p. 403-423, 2008.

HOSSEINI, S.A.; MIRZAIE, A.; NODOOSHAN, A.J.; RAHIMIAN, H. The first report of transmission of a phytoplasma associated with sesame phyllody by *Orosius albicinctus* in Iran. **Australasian Plant Disease Notes**, Adelaide, v. 2, p. 33-34, 2007.

JIN, U.H.; LEE, J.W.; CHUNG, Y.S.; LEE, J.H.; YI, Y.B.; KIM, Y.K.; HYUNG, N.I.; PYEE, J.H.; CHUNG, C.H. Characterization and temporal expression of a w-6 fatty acid desaturase cDNA from sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds. **Plant Science**, Limerick, v.161, p. 935-941, 2001.

JOMANTIENE, R.; DAVIS, R.E.; LEE, I.M.; ZHAO, Y.; BOTTLNER-PARKER, K.; VALIUNAS, D.; PETKAUSKAITE, R. Onion is host for two phytoplasma lineages, subgroups 16Srl-A and 16Srl-(B/L) L, in Lithuania: a *HinfI* site revealed a snp marking divergent branches of evolution. **Journal of Plant Pathology**, Reading, v. 92, n. 2, p. 461-470, 2010.

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.

JUNG, H.Y.; SAWAYANAGI, T.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; MIYATA, S.; OSHIMA, K.; UGAKI, M.; LEE, J.T.; HIBI, T.; NAMBA, S. 'Candidatus Phytoplasma castaneae', a novel phytoplasma taxon associated with chestnut witches' broom disease. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, p. 1543–1549, 2002.

KERSTING, U. Symptomatology, etiology and transmission of sesamum phyllody in Turkey. **Journal of Turkish Phytopathology**, Bornova, v. 22, p. 47-54, 1993.

KHAN, A.J.; BOTTLNER, K.; AL-SAADI, N.; AL-SUBHI, A.M.; LEE, I.M. Identification of phytoplasma associated with witches' broom and virescence diseases of sesame in Oman. **Bulletin of Insectology**: Bologna, v. 60, n. 2, p. 133-134, 2007.

KHAN, M.S.; RAJ, S.K.; SNEHI, S.K. First report of 'Candidatus Phytoplasma Asteris' affecting sesame cultivation in India. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 89, n. 2, p. 301-305, 2007.

KLEIN, M.; WEINTRAUB, P.G.; DAVIDOVICH, M.; KUZNETSOVA, L.; ZAHAVI, T.; ASHANOVA, A.; ORENSTEIN, S.; TANNE, E. Monitoring phytoplasma-bearing leafhoppers/planthoppers in vineyards in the Golan Heights, Israel. **Journal of Applied Entomology**, Singapore, v. 125, p. 19-23, 2001.

KITAJIMA, E.W. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1986-1993). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 1-92, 1995.

_____. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de transmissão**. Piracicaba: Núcleo de Apoio à Pesquisa; Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária, 1998. 43 p.

KOURI, J.; ARRIEL, N.H.C. Aspectos econômicos. In: ARRIEL, N.H.C.; BELTRÃO, N.E.M.; FIRMINO P.T. **Gergelim: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. cap. 16, p. 193-209.

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

LEE, I.M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; HAMMOND, R.W.; DAVIS, R.E. Use of micoplasmalike organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested PCR assay to detect mixed MLO infections in a single host plant. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 559-566, 1994.

LEE, I.M.; BOTTNER-PARKER, K.D.; ZHAO, Y.; VILLALOBOS, W.; MOREIRA, L. 'Candidatus Phytoplasma costaricanum' a novel phytoplasma associated with an emerging disease in soybean (*Glycine max*). **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**: Reading, v. 61, p. 2822-2826, 2011.

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

LIMA, E.F.; ARAÚJO, A.E.; BATISTA, F.A.S. Doenças e seu controle. In: BELTRÃO, N.E.M.; VIEIRA, D.J. **O agronegócio do gergelim no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 203-220.

MAITI, S.; RAOOF, M.A.; SASTRY, K.S.; YADAVA, T.P. A review of sesamum diseases in India. **Tropical Pest Management**, London, v. 31, n. 4, p. 317-323, 1985.

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

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

MAZZANI, H.; LAYRISSE, H. Características químicas del grano de cultivares de ajonjolí seleccionados de la colección venezolana de germoplasma. **Agronomía Tropical**, Caracas, v. 48, n.1, p. 5-18, 1998.

McCOY, R.E.; CAUDWELL, A.; CHANG, C.J. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: WHITCOMB, R.F.; TULLY, J.G. **The mycoplasmas**. New York: Academic Press, 1989. v. 5, p. 545-640.

MONTANO, H.G.; CUNHA JUNIOR, J.O.; PIMENTEL, J.P. Phytoplasmas in Brazil: an update. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 64, p. 251-252, 2011. Suplemento.

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

NAKASHIMA, K.; HAYASHI, T.; CHALEEPROM, W.; WONGKAEW, P.; SIRITHORN, P. Detection of DNA of phytoplasmas associated with phyllody disease of sesame in Thailand. **Annual Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 61, p. 519-528, 1995.

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.

QUEIROGA, V.P.; ARRIEL, N.H.C.; BELTRÃO, N.E.M.; SILVA, O.R.R.F.; GONDIM, T.M.S.; FIRMINO, P.T.; CARTAXO, W.V.; SILVA, A.C.; VALE, D.G.; NÓBREGA, D.A. **Cultivo ecológico do gergelim**: alternativa de produção para comunidades de produtores familiares da região semi-árida do Nordeste. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2007. 54 p. (EMBRAPA. CNPA. Documentos, 171).

RAPUSSI, M.C.C.; BEDENDO, I.P. Enfezamento da couve-flor associado ao fitoplasma do grupo 16SrIII. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, p. 91, 2008. Suplemento.

RIBEIRO, L.F.C. **Fitoplasma do superbroomento do maracujazeiro: identificação molecular, análise filogenética e prova de patogenicidade**. 2008. 59 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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

SALEHI, M.; IZADPANAH, K. Etiology and transmission of sesame phyllody in Iran. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 135, p. 37-47, 1992.

SANTOS-CERVANTES, M.E.; CHÁVEZ-MEDINA, J.A.; ACOSTA-PARDINI, J.; FLORESZAMORA, G.L.; MÉNDEZ-LOZANO, J.; LEYVA-LOPEZ, 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.

SAVY FILHO, A.; BANZATTO, N.V. **Descrição morfológica do gergelim (*Sesamum indicum* L.), IAC Ouro**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1988. 12 p. (IAC. Boletim Científico, 13).

SCHNEIDER, B.; TORRES, E.; MARTÍN, M.P.; SCHRODER, M.; BEHNKE, H.D.; SEEMULLER, E. ‘Candidatus Phytoplasma pini’, a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 303–307, 2005.

SCOTT, G.E.; ROSENKRANZ, E.E.; NELSON, L.R. Yield loss of corn due to corn stunt disease complex. **Agronomy Journal**, Madison, v. 69, p. 69-92, 1977.

SEARS, B.B.; KIRKPATRICK, B.C. Uveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. **ASM News**, Michigan, v. 60, p. 307-312, 1994.

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

SERTKAYA, G.; MARTINI, M.; MUSTTI, R.; OSLER, R. Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting sesame and solanaceous crops in Turkey. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, p. 141-142, 2007.

SILVA, E.G. **Identificação de fitoplasma associados á síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar e ao superbrotamento da primavera (*Bougainvillea spectabilis*) no Estado de São Paulo**. 2008. 98 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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

SMART, C.D.; SCHNEIDER, B.; BLOMQUIST, C.L; GUERRA, L.J.; HARRISON, N.A.; AHRENS, U.; LORENZ, K.-H.; SEEMULLER, E.; KIRKPATRICK, B.C. Phytoplasm-specific PCR primer based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2988-2993, 1996.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011. Disponível em: <<http://mbe.oxfordjournals.org/content/early/2011/05/04/molbev.msr121.full.pdf+html>>. Acesso em: 23 mar. 2012.

TURKMENOGLU, Z.; ARI, U. A disease-phyllody virus noted on sesame in the Aegean region. **Plant Protection Bulletin**, Michigan, v. 1, p. 12-17, 1959.

UWALA, A.C. Evaluation of Chlorithalonil, Benlate and Agrimycin 500 on the control of leaf spot disease and their effects on the yield of sesame in Southern Guinea Savannah. In: NATIONAL WORKSHOP ON BENISEED, 1., 1998, Badeggi. **Proceedings...** Badeggi: NCRI, 1998. p. 201-206.

VASUDEVA, R.S. Diseases of sesamum. In: JOSHI, A.B. (Ed.). **Sesamum**. New Delhi: Indian Council Agricultural Research, 1961. p. 92-107.

VASUDEVA, R.S.; SAHAMBI, H.S. Phyllody in sesamum (*Sesamum orientale* L.). **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 8, p. 124-129, 1955.

VEIGA, R.F.A.; SAVY FILHO, A.; BANZATTO, N.V.; MORAES, S.A.; SUGIMORI, M.H.; MORAES, R.M. **Avaliações agronômicas e botânicas de germoplasmas na coleção de gergelim do Instituto Agronômico**. Campinas: Instituto Agronômico, 1985. 38 p. (IAC. Boletim Científico, 3).

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

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

WEISS, E.A. Sesame. In: _____. **Oilseed crops**. London: Longman, 1983. p. 282-340.

WIN, N.K.K.; BACK, C.G.; JUNG, H.Y. Phyllody phytoplasma infecting Sesame (*Sesamum indicum*) in Myanmar. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 310-313, 2010.

ZHAO, Y.; WEI, W.; DAVIS, R.E.; LEE, I.M. Recent advances in 16S rRNA gene-based phytoplasma differentiation, classification and taxonomy. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. **Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors**. London: CABI, 2010. chap. 5, p. 64-92.

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.

APÊNDICE

>Sequência parcial do gene 16S rDNA do fitoplasma presente na amostra GER 4

>SP-Br01

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAA
GACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGT
GGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACG
GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGA
AGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATC
ATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTA
GGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAA
AACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTA
AAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTGCGCAAGGCGGCTTGCTGGGTCT
TACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAAGTGTGAA
GTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAA
GGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTA
CCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAG
TGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA
GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCAC
GTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGG
GACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAAT
GGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACA
GTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAG
TAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCG
CCCGTCA

>Sequência parcial do gene 16S rDNA do fitoplasma presente na amostra GER 3

>SP-Br02

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAA
GACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGT
GGGGTAAAGGCGTACCAAGACTATGATGCGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACG
GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGA
AGTATTTTCGGTGCGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATC
ATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTA
GGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAA
AACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTA
AAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTT
TACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
TAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAG
TTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAG
GAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTAC
CCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGT
GGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA
GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCAC
GTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGG
GACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAAT
GGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACA
GTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGCTGGAATCGCTAG
TAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCG
CCCGTCA

>Sequência parcial do gene 16S rDNA do fitoplasma presente na amostra G1, G2 e G3

>SP-Br03

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAA
GACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGT
GGGGTAAAGGCGTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACG
GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGA
AGTATTTTCGGTGCGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATC
ATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTA
GGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAA
AAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTA
AAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTGCGCAAGGCGGCTTGCTGGGTCT
TACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAAGTGTTGAA
GTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAA
GGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCTGAAGGTA
CCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAG
TGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA
GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCAC
GTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGG
GACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAAT
GGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACA
GTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAG
TAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCG
CCCGTCA