Andernice dos Santos Zanetti

**DIVERSIDADE, RELAÇÕES FILOGENÉTICAS
E TAXONOMIA DE *PHYTOMONAS* SPP.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno–Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

Andernice dos Santos Zanetti

**DIVERSIDADE, RELAÇÕES FILOGENÉTICAS
E TAXONOMIA DE *PHYTOMONAS* SPP.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Gerales Teixeira

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Zanetti, Andernice dos Santos.

Diversidade, relações filogenéticas e taxonomia de *Phytomonas* spp
/ Andernice dos Santos Zanetti. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Marta Maria Geraldês Teixeira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Taxonomia e filogenia molecular de tripanossomatídeos.

Versão do título para o inglês: Diversity, phylogenetic relationships and taxonomy of *Phytomonas* spp.

1. *Phytomonas* 2. Filogenia 3. V7V8SSUrDNA 4. gGAPDH 5. ITSrDNA 6. Polimorfismo genético I. Teixeira, Profa. Dra. Marta Maria Geraldês II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB027/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): **Andernice dos Santos Zanetti**

Título da Dissertação: Diversidade, relações filogenéticas e taxonomia de *Phytomonas* spp.

Orientador (a): **Profa. Dra. Marta Maria Gerales Teixeira.**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada/...../....., considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 560/12 referente ao projeto intitulado: “*Diversidade, relações filogenéticas e biogeografia de Phytomonas spp*” sob a responsabilidade de **Andernice dos Santos Zanetti**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 10 de outubro de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais, primeiros “professores” que tive em minha vida, e a todos os demais, responsáveis pela minha formação profissional, intelectual e pessoal, que me incentivaram a questionar a realidade e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

A todos vocês, meus queridos professores, meu muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

À Professora. Dra Marta Maria Geraldtes Teixeira, pela confiança oferecida na realização do meu mestrado, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, e pela orientação durante a condução desta dissertação.

Ao Professor Dr. Erney Plessmann de Camargo, pela disponibilidade e dedicação à pesquisa, e principalmente à sua valiosa colaboração na conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Robson Ferreira por seus ensinamentos, paciência e apoio ao longo das supervisões das minhas atividades. Foi um prazer conhecê-lo, verdadeiro companheiro de pesquisa, sempre gentil, alegre e presente.

À Professora Dra Silvia Alfieri, pela certeza de uma revisão ímpar.

À Marta Campaner, pelo profissionalismo, pela inestimável colaboração e por estar sempre pronta a me ouvir e esclarecer minhas dúvidas neste meu caminhar.

À Carmen Takata e Tânia Matsumoto, por todo apoio técnico objetivo, indispensável no cotidiano laboratorial.

À toda equipe do laboratório, André, Bruno, Carla, Gladys, Herakles, Jennifer, Juliana, Luciana, Lyslaine, Omar, Oneida, Paola, Robson, Tania, Tarcilla e Zuleima, pela amizade, companheirismo e incentivo dedicados, e também às gargalhadas, sempre garantidas, em nossos momentos de descontração.

À Luciana, Carmen, Oneida e Paola pela importante colaboração e horas dedicadas, com muita paciência e otimismo, na finalização deste trabalho.

Ao Omar, sempre um porto.

Ao Professor Dr. Antonio Malheiros, exemplo de profissional e de pessoa. Obrigada pelas oportunidades, amizade e carinho dedicados por todos esses anos de vida acadêmica.

À todos do Departamento de Parasitologia, pessoas com quem convivi nesses espaços ao longo desses anos de experiência compartilhada, fundamental à minha formação acadêmica. Em especial a Danielle, pela amizade.

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao Departamento de Parasitologia.

À minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Eternamente grata pelo amor incondicional.

A persistência é o caminho do êxito.

Charles Chaplin

Este trabalho contou com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

Zanetti AS. Diversidade, relações filogenéticas e taxonomia de *Phytomonas* spp. [dissertação (Mestrado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Os tripanossomatídeos do gênero *Phytomonas* compreendem parasitas de frutas e plantas transmitidos por hemípteros fitófagos. O gênero inclui vários grupos de parasitas de plantas, alguns patogênicos e outros comensais. Até o momento, estudos moleculares definiram de seis a 11 grupos de isolados de *Phytomonas*. Entretanto, não há estudos filogenéticos abrangentes que confirmem a monofilia dos grupos, analisem seus relacionamentos ou a diversidade genética e riqueza de espécies. Há muitos trabalhos recentes sobre a taxonomia de vários gêneros de tripanossomatídeos, mas nenhum aborda o gênero *Phytomonas*. Até o momento, apenas duas espécies nominais foram validadas filogeneticamente: *P. serpens* e *P. françai*.

O objetivo principal deste estudo foi caracterizar um grande número de isolados de *Phytomonas*. Culturas de tripanossomatídeos de plantas (frutas, látex, floema) e hemípteros fitófagos foram previamente analisadas quanto à presença de *Phytomonas*, empregando-se um ensaio de PCR gênero específico. Sequências de SSU rRNA, gGAPDH e ITS rDNA foram produzidas e alinhadas com sequências disponíveis (GenBank) de *Phytomonas* e outros gêneros de tripanossomatídeos para produção de inferências filogenéticas.

Inferências filogenéticas baseadas em alinhamentos de SSU rRNA e gGAPDH corroboraram a monofilia do gênero *Phytomonas* e sua subdivisão em sete clados bem suportados correspondendo aos grupos também suportados por sequências de ITS rDNA. Todos esses clados foram corroborados mesmo com a inclusão de vários isolados novos, incluindo dois muito divergentes daqueles aninhados em cada grupo. Embora resultados anteriores tenham sugerido certa associação entre clados, hospedeiros vegetais e região geográfica, nossos resultados demonstraram que alguns grupos albergam isolados de plantas e insetos de regiões geográficas diferentes e mesmo de diferentes continentes. No entanto, muitos clados parecem ser associados ao tecido da planta hospedeira (fruta, látex ou floema). O grupo A compreende isolados de frutas e quase todas as culturas disponíveis de *Phytomonas* originárias de insetos fitófagos da América do Sul e da África. O grupo B é formado principalmente por parasitas da Europa e dois isolados de insetos. O grupo C possui isolados da Espanha obtidos de frutas das famílias Anonaceae, Fabaceae e Solanaceae. O grupo D possui parasitas de *Euphorbia* spp., da França, Índia, Senegal e Brasil. O grupo E alberga principalmente isolados de *Solanaceae* spp. e um isolado de Hemiptera, todos do Brasil. O grupo F inclui parasitas da espécie *P. françai*. Esse grupo possui apenas parasitas brasileiros e de mandioca com uma amostra da Amazônia. O grupo H foi formado apenas por isolados de floema de palmeiras produtoras de óleo e coqueiros da América do Sul. Além de corroborar a monofilia do gênero *Phytomonas* assim como de suas linhagens, os resultados permitiram identificar ao menos 10 isolados como candidatos a novas espécies. A caracterização morfológica de representantes de cada clado mostrou que os diferentes grupos de *Phytomonas* compartilham características gerais assim como características únicas, importantes para complementar a descrição de espécies, que deve ser sempre suportada por inferências filogenéticas.

Palavras-chave: *Phytomonas*. Filogenia. V7V8SSUrDNA. gGAPDH. ITSrDNA. Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Zanetti AS. Diversity, phylogenetic relationships and taxonomy of *Phytomonas* spp. [dissertation (Master of Science)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; 2015.

The trypanosomatid genus *Phytomonas* comprises cosmopolitan parasites of fruit and plants transmitted by phytophagous hemipterans. This genus includes diverse groups of plant parasites exhibiting both pathogenic and commensal lifestyles. To date, molecular studies defined 6-11 groups of isolates within *Phytomonas*. Although several molecular studies addressed the groups within *Phytomonas*, there are no comprehensive phylogenetic studies aiming to confirm the monophyly and to assess the relationships among these groups, as well as the genetic diversity and species richness within each group. There are many recent studies on the taxonomy of several genera of trypanosomatids, but not of *Phytomonas*. To date, only two nominal species were phylogenetically validated: *P. serpens* from tomato and *P. francai* from cassava.

The main purposes of this study were to characterize a large sampling of isolates of *Phytomonas*. Cultures of trypanosomatids from plants and phytophagous insects were previously surveyed for *Phytomonas* using a genus-specific PCR assay. Flagellates of *Phytomonas* characterized in this work were from fruits, latex, phloem and from diverse species of hemipterans. Sequences from SSU rRNA (Small Subunit of ribosomal RNA), gGAPDH (glycosomal Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase) and ITS rDNA (Internal Transcribed Spacer of ribosomal DNA) sequences were determined and aligned with available (GenBank) sequences from *Phytomonas* and other trypanosomatid genera for phylogenetic inferences.

Phylogenetic analysis based on SSU rRNA and gGAPDH confirmed the monophyly of the genus *Phytomonas* and its subdivision in 7 well-supported clades that correspond to groups also supported by ITS rDNA sequences, all corroborated herein with the inclusion of several new isolates, including two highly divergent from those nested into all clades. Previous results suggested some association between the clades and plant and geographic origin. However, our findings demonstrated that some groups comprise isolates from plants and insects from distant collecting sites, even from different continents. Nevertheless, most clades appear to be associated to fruits, latex or phloem isolates. Group A comprises mostly isolates from fruits and almost all available cultures of *Phytomonas* from phytophagous insects; flagellates nested into this clade came from South America and Africa. Group B was formed mainly by latex parasites from Europe and two isolates from insects. Group C comprises fruit isolates from distinct plant families, Anonaceae, Fabaceae and Solanaceae, all from Spain. Group D was restricted to *Euphorbia* spp., and was found in France, India, Senegal and Brazil. Group E comprises mainly isolates of several Solanaceae spp. and one isolate from hemipteran, all from Brazil. Group F remained restricted to *P. francai* from Brazilian cassava now including a sample from Amazonia. Group H was formed only by isolates from phloem of South American coconut and oil palms. In addition to phylogenetic support for the genus and phylogenetic lineages of *Phytomonas*, results from this study allowed to identify up to 10 isolates candidates to new species of *Phytomonas*. Morphological characterization of representatives of each clade showed that cultures of *Phytomonas* from different groups share general morphological features, but exhibited unique features, valuable to complement the species description that must be always supported by phylogenetic inferences.

Keywords: *Phytomonas*. Phylogeny. V7V8SSUrDNA. gGAPDH. ITSrDNA. Genetic polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Formas celulares dos cinetoplastídeos	20
Figura 02 - Ciclo biológico de <i>Phytomonas</i>	23
Figura 03 - Aspectos morfológicos do aparelho bucal de hemípteros, com destaque em fitófagos e representantes de 3 famílias hospedeiras de <i>Phytomonas</i>	25
Figura 04 - Representação esquemática do gene "Spliced Leader"	32
Figura 05 - Esquema dos genes ribossômicos.	34
Figura 06 - Esquema dos genes de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.	35
Figura 07 - "Barcoding" de trypanossomatídeos do gênero <i>Phytomonas</i>	55
Figura 08 - Árvore filogenética de trypanossomatídeos do gênero <i>Phytomonas</i> isolados de hospedeiros vegetais e insetos fitófagos	58
Figura 09 - Posicionamento filogenético de isolados de plantas e hemípteros fitófagos pertencentes ao gênero	59
Figura 10 - Análise de Máxima Parcimônia baseado em sequências do gene ITS rDNA do gênero <i>Phytomonas</i> de plantas e insetos fitófagos	61
Figura 11 - Diversidade e distribuição geográfica dos isolados do caldo A	63
Figura 12 - Dendograma dos isolados do clado A	64
Figura 13 - Diversidade e distribuição geográfica dos isolados do caldo B	66
Figura 14 - Diversidade e distribuição geográfica dos isolados do caldo C	67
Figura 15 - Diversidade e distribuição geográfica dos isolados do caldo D	68
Figura 16 - Diversidade e distribuição geográfica dos isolados do caldo E	69
Figura 17 - Diversidade e distribuição geográfica dos isolados do caldo F	70
Figura 18 - Diversidade e distribuição geográfica dos isolados do caldo H	71
Figura 19 - Formas promastigotas de cultura de isolados do clado A	73
Figura 20 - Formas promastigotas de cultura de isolados do clado B	75
Figura 21 - Formas promastigotas de cultura de isolados do clado D	76
Figura 22 - Formas promastigotas de cultura de isolados do clado E	77
Figura 23 - Formas promastigotas de cultura do isolado TCC2427	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados e amostras diretas de tripanossomatídeos do gênero <i>Phytomonas</i> de plantas e hemípteros fitófagos utilizados nesse estudo	40
Tabela 2 - Meios de cultura utilizados neste estudo para o cultivo de <i>Phytomonas</i> sp.	44
Tabela 3 - Soluções para obtenção de DNA dos tripanossomatídeos	46
Tabela 4 - Ciclos de amplificação e temperaturas utilizadas nas diferentes reações de PCR	47
Tabela 5 - Sequências obtidas do GenBank, dos genes SSUrDNA, ITS e gGAPDH de <i>Phytomonas</i> sp, e sequências de gGAPDH de outros gêneros de tripanosomatídeos determinados como grupo externo	49
Tabela 6 - Isolados de tripanossomatídeos, amostras de tubos digestivos de insetos fitófagos e látex e floema de plantas, analisados nesse estudo para identificação de <i>Phytomonas</i> sp.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
B	Análise Bayesiana
BAB	Meio agar sangue ("Blood Agar Base")
BSA	Albumina bovina sérica ("Bovine Serum Albumin")
BR	Brasil
°C	Grau Celsius
CA	Canadá
cGAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase citosólico
CHCl ₃	Clorofórmio
CO	Colômbia
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ES	Espanha
FR	França
GB	Grã-Bretanha (Reino Unido)
GenBank	Banco de dados de Nucleotídeos do NLM/NCBI
GF	Guiana Francesa
gGAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossomal
GH	Gana
H ₂ O	Água
HCl	Ácido Clorídrico
HI 5	Célula isolada de <i>Trichoplusia ni</i>
ICB USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
iDPH	Isopropanol-desidrogenase
IN	Índia
ISC	Insect Sample Collection
KCl	Cloreto de Potássio
LIT	Liver Infusion Tryptose
M	Molar
mg	Miligrama
MgCl	Cloreto de Magnésio
min	Minutos
ml	Mililitro
ML	Máxima Verossimilhança
MLEE	Multilocus enzyme electrophoresis
mM	Milimolar
MP	Máxima Parcimônia
mRNA	RNA mensageiro
MZ	Moçambique

N ₂	Nitrogênio Líquido
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de Sódio
ng	Nanograma
PAUP	Phylogenetic Analysis Using Parsimony*
PBS	Salina em tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Peru
pH	Potencial de Hidrogênio
Phy-SLPCR	Reação em cadeia de amplificação do gene SL, específico de <i>Phytomonas</i>
PSC	Plant Sample Collection
RAPD	Randon amplification of polimorphic DNA
rDNA	Ácido desoxiribonucleico ribossômico
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
Sarkosil	Lauril sarcosinato de sódio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SE	Solução salina Tris-EDTA
SFB	Soro fetal bovino
SL	Spliced Leader
SN	Senegal
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
SR	Suriname
SSUrDNA	Subunidade menor do gene do DNA ribossômico
TAE	Tampão Tris acetato-EDTA
TCC	Trypanosomatid Culture Colection
TE	Tampão tris-EDTA
U1-U8	Regiões universalmente conservadas do gene SSUrDNA
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
US	Estados Unidos
UV	Radiação ultravioleta
µL	Microlitro
µg	Micrograma
V1-V9	Regiões variáveis do gene SSUrDNA
VE	Venezuela

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 A família Trypanosomatidae	18
1.2 O gênero <i>Phytomonas</i>	20
1.3 Morfologia	22
1.4 Ciclo biológico	22
1.5 Hospedeiros invertebrados	23
1.6 Hospedeiro vegetal e patogenicidade de <i>Phytomonas</i> sp.	26
1.6.1 Patologias em Cafeeiros	26
1.6.2 Patologias em plantações de mandiocas	27
1.6.3 Patologias em palmeiras	27
1.7 Distribuição geográfica	28
1.8 Critérios taxonômicos para identificação de <i>Phytomonas</i>	28
1.8.1 Métodos baseados em marcadores bioquímicos	28
1.8.1.1 <u>Anticorpos monoclonais</u>	28
1.8.1.2 <u>Enzimas do metabolismo arginina-ornitina</u>	29
1.8.1.3 <u>Isopropanol-desidrogenase (iDPH)</u>	29
1.8.1.4 <u>Padrões de isoenzimas (MLEE: multilocus enzyme electrophoresis)</u>	29
1.8.2 Métodos baseados em sequências de ácidos nucleicos	30
1.8.2.1 <u>Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)</u>	30
1.8.2.2 <u>DNA do cinetoplasto – kDNA</u>	30
1.8.2.3 <u>Gene “spliced leader” (SL) ou mini-exon</u>	31
1.8.2.4 <u>Genes ribossômicos</u>	32
1.8.2.4.1 <u>SSUrDNA</u>	33
1.8.2.4.2 <u>ITS</u>	33
1.8.2.5 <u>GAPDH</u>	34
1.9 Filogenia de <i>Phytomonas</i>	35
1.10 Diversidade de isolados de <i>Phytomonas</i> (grupos e genótipos)	36
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	38
2.1 Justificativa	38
2.2 Objetivos	39
2.2.1 Objetivo Geral	39
2.2.2 Objetivos Específicos	39

3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Organismos	40
3.2 Captura e Isolamento	42
3.2.1 Coleta de hemípteros fitófagos	42
3.2.2 Identificação dos Hemípteros	42
3.2.3 Dissecção dos Hemípteros	42
3.2.4 Isolamento dos tripanossomatídeos de hemípteros fitófagos.	43
3.2.5 Coleta e isolamento de tripanossomatídeos de plantas.	43
3.3 Manutenção e Cultivo	44
3.4 Criopreservação dos parasitas	45
3.5 Microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV)	45
3.6 Extração de DNA dos parasitas	45
3.6.1 Obtenção de DNA genômico de culturas	45
3.6.2 Obtenção de DNA genômico de material direto (hemípteros e plantas).	46
3.7 Amplificação de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction).	46
3.7.1 Phy-SLPCR.	46
3.7.2 Reações de PCR (V7V8 SSUrDNA, gGAPDH e ITS rDNA)	47
3.7.3 Reações de Nested-PCR	47
3.8 Eletroforese e purificação dos fragmentos de DNA amplificados por PCR	48
3.9 Clonagem de fragmentos de DNA amplificados por PCR	48
3.10 Sequenciamento de DNA	48
3.11 Alinhamento das sequências	49
3.12 Matriz de distância.	49
3.13 Análises filogenéticas.	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Diagnóstico de <i>Phytomonas</i> em culturas de tripanossomatídeos obtidas de plantas e hemípteros fitófagos com o método Phy-SLPCR	51
4.2 “Barcoding” e relacionamento filogenético entre isolados de <i>Phytomonas</i> de hemípteros fitófagos e plantas baseados em sequências da região V7V8 do gene SSU rRNA	53
4.3 Análises filogenéticas baseadas nos genes de gGAPDH de tripanossomatídeos do gênero <i>Phytomonas</i>	56
4.4 Análises filogenéticas baseadas em sequências combinadas dos genes SSUrDNA e gGAPDH de tripanossomatídeos do gênero <i>Phytomonas</i>	57
4.5 Diversidade genética baseada em sequências de ITS rDNA de isolados do gênero <i>Phytomonas</i>	60

4.6 Grupos de <i>Phytomonas</i> definidos com sequências de SSUrDNA, gGAPDH e ITSrDNA	62
4.6.1 Clado A de <i>Phytomonas</i>	62
4.6.2 Clado B de <i>Phytomonas</i>	65
4.6.3 Clado C de <i>Phytomonas</i>	66
4.6.4 Clado D de <i>Phytomonas</i>	67
4.6.5 Clado E de <i>Phytomonas</i>	68
4.6.6. Clado F de <i>Phytomonas</i>	69
4.6.7 Clado H de <i>Phytomonas</i>	70
4.6.8 Isolados de <i>Phytomonas</i> não agrupados nos clados A-H	71
4. 7 Identificação de isolados candidatos a novas espécies de <i>Phytomonas</i>	72
4. 8 Comportamento em cultura e caracterização morfológica de <i>Phytomonas</i> spp. de hemípteros fitófagos e plantas	72
5 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 A família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae é constituída por protozoários uniflagelados que pertencem ao reino Excavata, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea (Honigberg, 1963; Cavalier-Smith, 1998, 2004). A classe Kinetoplastea alberga organismos cuja principal característica é a presença do cinetoplasto, uma região especializada da única mitocôndria desses organismos, situada na base flagelar, que é constituída por moléculas circulares de DNA (kDNA) concatenadas e que contém o DNA mitocondrial (Simpson et al., 2006; Stevens, 2008). Essa classe subdivide-se em duas subclasses, a Prokinetoplastina, representada apenas pela ordem Prokinetoplastida e, a subclasse Metakinetoplastina, dividida em 4 ordens: Eubodonida, Parabodonida, Neobodonida e Trypanosomatida (Moreira et al., 2004; Stevens, 2014; Vickerman, 1976). Recentemente estudos sugeriram o aparecimento tardio de tripanossomatídeos, apontando-os como um grupo-irmão de Eubodonida (Deschamps et al., 2011).

Trypanosomatidae é a única família da ordem Trypanosomatida e, os cinetoplastídeos que a constituem são todos endoparasitas obrigatórios que apresentam uma grande diversidade de hospedeiros, parasitam plantas e animais invertebrados e vertebrados de praticamente todas as ordens, com ampla distribuição em todos os continentes não polares (Vickerman, 1994; Stevens et al., 2001; Simpson et al., 2006). A maioria dos representantes dessa família não são patogênicos para seus hospedeiros, embora, alguns sejam importantes agentes etiológicos de doenças humanas, de animais domésticos e de plantas (Hoare & Wallace, 1966; Simpson, et al., 2006; Vickerman, 1976; Camargo, 1999).

A taxonomia da família Trypanosomatidae é tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos e diferenças nos ciclos de vida (Hoare & Wallace, 1966). No entanto, como demonstram os métodos moleculares, essas características são insuficientes para a classificação da família (Borghesan et al., 2013; Votýpka et al., 2010, 2012; Yurchenko et al., 2006, 2008; Merzlyak et al., 2001; Camargo, 1999).

Os flagelados da família Trypanosomatidae estão, atualmente, agrupados em 15 gêneros definidos de acordo com parâmetros taxonômicos clássicos (morfologia, hospedeiro de origem e ciclo de vida) e moleculares. Os gêneros *Endotrypanum*, *Leishmania* e *Trypanosoma* parasitam invertebrados e vertebrados, e o gênero *Phytomonas* alberga parasitas de plantas e insetos fitófagos. Esses quatro gêneros compreendem espécies heteroxênicas, isto é, que alternam seus ciclos de vida

entre dois hospedeiros (invertebrado e vertebrado ou vegetal), diferindo assim, dos gêneros monoxênicos: *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Wallacemonas*, *Angomonas*, *Strigomonas* e *Sergeia* que parasitam apenas invertebrados (Wallace, 1966; Vickerman, 1976; Merzlyac et al., 2001; Svobodová et al., 2007; Teixeira et al., 2011; Borghesan et al., 2013). Recentemente, foram descritos mais três gêneros considerados monoxênicos: o gênero *Blechomonas* presente na subfamília Blechomonadinae (Votýpka et al., 2013), descrito em pulgas; o gênero *Paratrypanosoma* com a espécie única *Paratrypanosoma confusum* (Flegontov et al., 2013), isolada de mosquito Culicidae, sendo esta a espécie mais basal da família; e, o gênero *Kentomonas* com a espécie *Kentomonas sorsogonicus*, isolados de moscas e alojados em uma nova subfamília, a Strigomonadinae (Votýpka et al., 2014). A subfamília Strigomonadinae foi proposta para unir todos os tripanossomatídeos portadores de endossimbiontes, como os gêneros *Kentomonas*, *Angomonas* e *Strigomonas* (Teixeira et al., 2011; Votýpka et al., 2014).

Morfologicamente, os tripanossomatídeos exibem acentuadas diferenças quanto à forma, comprimento do corpo, espessura, comprimento do flagelo, tamanho e posição do núcleo e do cinetoplasto, etc. A localização do cinetoplasto em relação ao núcleo e, a presença ou não de membrana ondulante e flagelo livre, são as características determinantes das diferentes formas apresentadas por estes flagelados durante seus ciclos de vida (Figura 1): tripomastigota, promastigota, amastigota, opistomastigota, epimastigota e coanomastigota (Wallace et al., 1983; Wallace, 1966).

A evolução dos tripanossomatídeos tem sido foco de estudos filogenéticos que, baseados em marcadores moleculares e dados biogeográficos e paleontológicos, buscam entender eventos importantes como a origem do parasitismo e do modo de vida heteroxênico. Atualmente, a hipótese mais suportada em vários estudos sugere que a adoção dos ciclos de vida heteroxênicos ocorreu de forma independente e várias vezes ao longo da evolução dessa família e que o ancestral dos tripanossomatídeos deve ter divergido de cinetoplastídeos de vida livre (Moreira et al., 2004; Simpson et al., 2006; Hamilton et al., 2004, 2007; Deschamps et al., 2010).

Figura 1. Formas celulares dos cinetoplastídeos encontradas nos diferentes estágios de desenvolvimento da família Trypanosomatidae (modificada: De Souza W, 2002).

1.2 O gênero *Phytomonas*

Phytomonas é um gênero de tripanossomatídeos que compreende parasitas de uma ampla variedade de plantas e insetos fitófagos. Enquanto certas espécies são responsáveis por fitopatologias importantes que já causaram grandes perdas econômicas, outras não são, aparentemente, patogênicas para as plantas hospedeiras (Stahel, 1931a,b; Pathasarthi et al., 1976; Kitajima et al., 1986; Dollet, 1984; Camargo et al., 1990).

Os tripanossomatídeos são conhecidos agentes causadores de doenças no homem e em animais, mas apenas em 1909, Alexandre Lafont descobriu um tripanossomatídeo parasitando plantas. Este encontrado na planta laticífera *Euphorbia pilulifera*, foi denominado *Leptomonas davidi*. Na sequência, Donovan (1909) propôs o gênero *Phytomonas* para agrupar os tripanossomatídeos isolados de plantas; essa denominação demorou mais de 7 décadas para ser aceita (Jankevicius et al., 1988; Camargo, 1999).

Estudos posteriores demonstraram que nem todos os flagelados encontrados em plantas são do gênero *Phytomonas*, pois tripanossomatídeos de outros gêneros (*Leptomonas*, *Herpetomonas* e *Crithidia*) podem infectar plantas, aparentemente, de forma transitória. Desse modo, utilizar hospedeiro de origem e morfologia como critérios para a identificação de parasitas do gênero *Phytomonas* é equivocado e insuficiente (Camargo, 1999; Serrano et al., 1999a; Conchon et al., 1989; Teixeira et al., 1996).

Devido à variedade de hospedeiros vegetais que os tripanossomatídeos colonizam e as sintomatologias que apresentam, estes foram divididos em quatro grupos de acordo com o tecido parasitado: a) frutícolas, que são os flagelados encontrados na polpa e semente de frutos, tais como tomate, uva, amora, laranja, e também em legumes como o feijão, milho e soja (Gibbs, 1957; Podlipaev, 1986; Jankevicius et al., 1989, 1993; Camargo et al., 1990; Teixeira et al., 1997); b) lactícolas, que são flagelados encontrados no látex de diversas plantas, com destaque para as Euphorbiaceae (Dollet, 1984; Camargo et al., 1990; Kitajima et al., 1986); c) floemícolas, que parasitam o floema de plantas como cafeeiros, coqueiros e palmáceas, e que promovem patogênese (Dollet, 1984; Vickerman, 1994; Camargo, 1999); d) floricolas, que são encontrados no néctar de flores e inflorescências (Camargo, 1999).

Os flagelados frutícolas, aparentemente, são restritos à fruta, pois estes nunca foram relatados em outras partes da planta. Até o momento, apenas dois flagelados frutícolas receberam denominações específicas, *Phytomonas serpens* (Gibbs, 1957; Podlipaev, 1986; Jankevicius et al., 1989) isolada de tomates e *Phytomonas macgheeii* (Jankevicius et al., 1993; Teixeira et al., 1997) isolada de milho.

Flagelados lactícolas, descritos na mandioca, foram nomeados *Phytomonas françai* (Aragão, 1931), e em 1986, Kitajima e colaboradores descobriram esses flagelados no látex de plantas doentes no Espírito Santo/Brasil, sendo este o primeiro relato da patogenicidade de *P. françai*.

Com base no critério hospedeiro de origem, outras espécies foram descritas em plantas laticíferas: *Phytomonas tirucalli*, *Phytomonas elmassiani*, *Phytomonas bordasi*, *Phytomonas ficuum*, *Phytomonas ganorae*, *Phytomonas bancrofti* e *Phytomonas tortuosa* (Wallace et al., 1992).

Os flagelados floemícolas, associados a patologias de plantas economicamente importantes, receberam especial atenção e, de acordo com a planta afetada, foram nomeados: *Phytomonas leptovisorum* (Stahel, 1931a) associada à doença do cafeeiro e *Phytomonas staheli*, associada às doenças de palmeiras produtoras de óleo (Parthasarathy et al., 1976; Dollet et al., 1977).

O emprego de marcadores tradicionais na taxonomia de tripanossomatídeos tem levado ao reconhecimento arbitrário de diversas espécies gerando uma taxonomia confusa que vem sendo disputada com ampla utilização de métodos baseados em marcadores moleculares. No gênero *Phytomonas*, o reconhecimento de que flagelados de diferentes hospedeiros devem ser considerados como espécies distintas tem se mostrado inadequado (Wallace et al., 1983), dado que flagelados distintos podem ser isolados a partir das mesmas espécies hospedeiras (Marín et al., 2007; Conchon et al., 1989; Jankevicius et al., 1993; Catarino et al., 2001). Por outro lado, uma mesma espécie de flagelado pode colonizar hospedeiros distintos (Campaner et al., 1996). Desse modo, atualmente, a

taxonomia dos tripanossomatídeos vem abrangendo uma gama mais complexa de ferramentas, incluindo parâmetros clássicos e moleculares.

1.3 Morfologia

Os membros do gênero *Phytomonas* apresentam exclusivamente a forma promastigota durante seu desenvolvimento nas plantas e insetos, porém, outra característica bastante prevalente entre as espécies desse gênero é seu acentuado polimorfismo morfológico, dependendo do sítio de crescimento: planta, inseto, ou meio de cultura (Camargo, 1999; Jankevicius et al., 1989; Catarino et al., 2001). Camargo (1999) considera um aspecto importante sobre o alto polimorfismo do gênero, que pode corresponder a estágios de ciclo de vida, ainda indefinidos.

Estudos de microscopia de luz e eletrônica, demonstram que promastigotas do gênero *Phytomonas* exibem a estrutura típica da família Trypanosomatidae: um núcleo, um cinetoplasto, um corpo celular alongado e um flagelo. O corpo celular pode conter muitas torções ao longo do eixo longitudinal, uma característica que apesar de comum em flagelados de plantas, não é exclusiva do gênero já que pode ser também observada em promastigotas do gênero *Herpetomonas*. Portanto, a morfologia não permite distinguir os tripanossomatídeos de plantas dos parasitas monoxênicos de insetos (Camargo, 1999; Borghesan et al., 2013).

Uma característica observada na ultraestrutura dos flagelados de plantas, que pode ser típica do gênero *Phytomonas*, é a quantidade acentuada de glicossomos (De Souza, 2009) que pode estar relacionada à ausência de um ciclo de Krebs funcional nas mitocôndrias e, portanto, à produção de ATP (Adenosina Trifosfato) pela via glicolítica dos glicossomos (Chaumont et al., 1994).

1.4 Ciclo biológico

O ciclo de vida dos tripanossomatídeos do gênero *Phytomonas* é heteroxênico, envolvendo insetos fitófagos que agem como vetores na transmissão das formas promastigotas para os variados hospedeiros vegetais, (Jankevicius et al., 1989; Sbravate et al., 1989; Camargo et al., 1990). Isso demonstra que a associação inseto/planta é um elo vital na biologia dos flagelados (Gullan & Cranston, 2005).

A transmissão de tripanossomatídeos de plantas para os insetos fitófagos ocorre pela ingestão de fluidos da planta infectada, como a seiva e o látex, onde se encontram os flagelados (Jankevicius et al., 1988; 1989; Kastelein & Camargo, 1990). Nos insetos, os tripanossomatídeos do gênero

Phytomonas chegam ao intestino, colonizando-o, atravessam a parede intestinal alcançando a hemolinfa e migram até as glândulas salivares (Jankevicius, 1992; McGhee & Hanson, 1971). Com as glândulas salivares infectadas, o inseto fitófago transmite os flagelados para os vegetais quando se alimenta em outras plantas (Camargo & Wallace, 1994; Jankevicius et al., 1989; Jankevicius, 1992) dando continuidade ao ciclo biológico e de transmissão (Figura 2).

Figura 2 - Ciclo biológico de *Phytomonas*. Ao alimentar-se em uma planta infectada, o inseto fitófago ingere formas promastigotas, que atravessam a parede intestinal (IN), alcançam a hemolinfa (HE) e migram para as glândulas salivares (GS), tornando o inseto apto a infectar novas plantas através da picada.

1.5 Hospedeiros invertebrados

De acordo com as especificidades alimentares, é possível dividir os insetos em quatro grandes grupos: parasitas que se alimentam de animais; herbívoros, os que se alimentam de plantas (fitófagos) ou fungos (micetófagos); predadores, que se alimentam de outros insetos; e saprófitos, que se alimentam de matéria em decomposição. Os insetos são mundialmente distribuídos, possuindo representantes adaptados a qualquer tipo de ambiente, desde regiões de clima tropical até áreas de deserto e pólos (Gullan & Cranston, 2005).

Aproximadamente 200 espécies da classe Insecta foram relatadas com infecções por tripanossomatídeos (mais de 300 citações em todo o mundo) e espera-se que milhares serão ainda

descritas (Sbravate et al., 1989; Teixeira et al., 1997; Serrano et al., 1999a,b,c; Camargo et al., 1992; Camargo, 1999; Podlipaev et al., 2004a,b; Simpson et al., 2006; Maslov et al., 2007).

Nem todos os insetos são aptos à colonização de parasitas flagelados mas é provável que seja muito grande a diversidade de hospedeiros de tripanossomatídeos, embora concentrada em duas ordens, Hemiptera e Díptera (80% dos casos descritos), fato muito provavelmente relacionado aos hábitos alimentares dos representantes das duas ordens (Maslov et al., 2012).

Sbravate e colaboradores (1989) avaliaram a prevalência de flagelados em insetos, observando as seguintes taxas: insetos da família Pyrrhocoridae, 44%; Coreidae, 40%, Lygaeidae, 19% e Pentatomidae, 18%, com uma prevalência geral em hemípteros fitófagos de 35%. Foi ainda observado que os tripanossomatídeos poderiam ser encontrados no tubo digestivo, na hemocele (raramente) e nas glândulas salivares, onde, 68,4% apresentaram flagelados exclusivamente no trato digestivo, e 31,6% que abrigavam flagelados também em suas glândulas salivares.

Aders (1909) foi o primeiro a relatar no trato digestivo e glândulas salivares de um hemíptero fitófago (*Aspongopi vidautus*) a presença de numerosos flagelados de diferentes formas e tamanhos, que foram classificados como *Herpetomonas aspongopi*.

A ordem Hemiptera agrupa insetos predadores, hematófagos e fitófagos (Figura 3) (Meneguetti & Trevisan, 2010).

Os insetos fitófagos, além de polinizadores, podem também agir como pragas e vetores disseminadores de doenças, dentre elas, as causadas por *Phytomonas* (Dollet, 1984; Camargo, 1999). Até o momento, todos os insetos descritos como hospedeiros de *Phytomonas* pertencem à ordem Hemiptera e se distribuem nas famílias Coreidae, Pentatomidae e Lygaeidae (ver Figura 3) (Wallace, 1966; Wallace et al., 1992; Camargo & Wallace, 1994; Camargo, 1999; Votypka et al., 2010), todas da subordem Heteroptera, que é o maior clado da ordem, com mais de 80 famílias (Schuh & Slater, 1995; Gullan & Cranston, 2005).

Foi demonstrado que o inseto Coreidae *Phthias picta* é o vetor de *Phytomonas serpens* de tomates (*Lycopersicon esculentum*), embora *P. serpens* possa ser encontrada no trato digestivo de outras espécies de Coreidae (Jankevicius et al., 1989; Camargo, 1999).

O pentatomídeo *Arvelius albopunctatus* é sempre encontrado em frutos de várias espécies de solanáceas, o que o torna forte candidato a vetor de *Phytomonas* (Kastelein & Camargo, 1990).

Jankevicius e colaboradores (1993) relataram que *Phytomonas macghee* poderia ser transmitida por um coreídeo do gênero *Leptoglossus* devido à observação de flagelados presentes no intestino e glândulas salivares.

Os estudos sobre os modos de transmissão de flagelados floemícolos são inconclusivos, não se conhecendo ainda os insetos que atuam como hospedeiros desses parasitas (Vermeulen, 1963; 1968; Dollet et al., 1997).

Nenhum efeito patológico decorrente a infecção por *Phytomonas* tem sido observado nos insetos, cuja sobrevivência parece não ser afetada; contudo, podem ocorrer transtornos, como dificuldades na alimentação, reprodução e adaptação ao meio, correlacionados à carga parasitária somada a alguma condição climática adversa (Shaub, 1994).

Figura 3 – Aspectos morfológicos do aparelho bucal de hemípteros, com destaque em fitófagos e representantes de 3 famílias hospedeiras de *Phytomonas*. Os hemípteros predadores (A) apresentam aparelho bucal curto, curvo e que não ultrapassa o primeiro par de patas. Os hematófagos (B) apresentam aparelho bucal reto, não ultrapassando o primeiro par de patas. Nos hemípteros fitófagos (C) o aparelho bucal é reto, longo e ultrapassa o primeiro par de patas do inseto. O aparelho bucal dos hemípteros fitófagos (D) possui uma lâmina em forma de agulha para penetrar na parede da célula vegetal. Três famílias de hemípteros, até o momento, foram descritas como hospedeiras de *Phytomonas*, Pentatomidae (E), Lygaeidae (F) e Coreidae (G). (Adaptado de Brener et al., 2000; Gullan & Cranston, 2005; Schuh & Slater, 1995)

1.6 Hospedeiro vegetal e patogenicidade de *Phytomonas* sp.

Tripanossomatídeos do gênero *Phytomonas* são conhecidos desde o início do século passado, porém, somente a partir de 1970, quando associados a patologias em palmeiras nas Américas do Sul e Central, iniciaram-se as pesquisas de vários aspectos dos tripanossomatídeos de plantas (Dollet, 1984; Camargo, 1999).

A infecção de plantas por *Phytomonas* pode ser sistemática embora, na maioria das vezes, os flagelados permaneçam concentrados perto do ponto de inoculação, como indicado pelas observações de frutos e plantas laticíferas (França, 1920; Dollet, 1984; Jankevicius et al., 1989). Em contraste, quando os flagelados infectam o floema, a infecção pode disseminar por todo feixe vascular (Dollet, 1984).

Há poucos dados sobre a patogenicidade dos tripanossomatídeos para frutos, grãos e grande parte de plantas laticíferas já estudadas, sendo considerada uma infecção aparentemente não prejudicial. Já a infecção do floema é, geralmente, associada com patologias, como observado em muitas plantas economicamente importantes como café, palmeiras, coqueiros e mandioca, encontradas na América do Sul (Camargo, 1999; Dollet, 1984; Stahel, 1931a,b; Aragão, 1931; Kitajima et al., 1986).

1.6.1 Patologias em Cafeeiros

Flagelados do gênero *Phytomonas* observados nos tubos de seiva de cafeeiros no Suriname em 1930 foram denominados *Phytomonas leptovasorum* (Stahel, 1931a) devido seu habitat, sendo considerados os responsáveis pela necrose do floema em *Coffea liberica* e outras espécies.

Os sintomas característicos dessa doença, que atingiu grandes proporções, são o amarelecimento e queda das folhas, deixando os ramos completamente nus, os tubos de seiva com múltiplas perfurações e, a necrose do floema, que ocasionavam morte inevitável (Camargo et al., 1990; Stahel, 1931).

Apesar de relatos da doença em plantações no nordeste do Brasil, região produtora de café de grande destaque, a doença não se tornou importante no país (Stahel, 1931b).

Em estudos posteriores, em novos surtos da doença no Suriname, Vermeulen (1963; 1968) confirmou a presença de *P. leptovasorum* em cafeeiros doentes, porém não conseguiu estabelecer a relação dos parasitas com nenhum suspeito vetor.

1.6.2 Patologias em plantações de mandiocas

A mandioca (*Manihot esculenta*) é uma Euphorbiaceae muito importante porque suas raízes são fontes de alimento. São originárias das Américas e cultivadas em muitos países tropicais. Aragão (1931) foi o primeiro a relatar a presença de flagelados no látex de mandioca, nomeando-os *Phytomonas françai*, sem contudo citar sintomas indicativos de doenças nas plantas infectadas.

Em estudos posteriores, Kitajima e colaboradores (1986) observaram a presença de *P. françai* em plantas doentes no Espírito Santo/Brasil e análises realizadas por microscopia eletrônica confirmaram a associação destes tripanossomatídeos com uma patologia dos vasos laticíferos da mandioca.

Essa doença observada no Brasil, conhecida como “chochamento das raízes”, que se caracteriza por clorose das partes aéreas da planta e atrofia das raízes, acarretou grandes perdas econômicas devido a vulnerabilidade das plantações à doença (Kitajima et al., 1986). Após esses estudos não houve mais nenhum relato de ocorrência da doença, e portanto, nenhuma informação é conhecida sobre os seus vetores.

1.6.3 Patologias em palmeiras

Palmeiras e coqueiros infectados por *Phytomonas staheli* apresentam patologias conhecidas como “marchitez sorpressiva” e “hartrot”, respectivamente. Nas plantas hospedeiras, atingindo preferencialmente árvores adultas, os flagelados são observados em grande número nos tubos de seiva, ocasionando o bloqueio e impedindo a circulação, causando assim, clorose progressiva das folhas, necrose das inflorescências e apodrecimento dos frutos e sementes (Parthasarathy et al., 1976; Dollet et al., 1977).

Estes parasitas de floema estão associados com a degeneração de palmeiras e coqueiros nas Américas Central e do Sul (Parthasarathy et al., 1976; Dollet et al., 1977; Dollet, 1984, 1994).

No Brasil, “hartrot” foi diagnosticada em palmeira real (*Roystonea regia*) na Bahia (Attias et al., 1989; Santos et al., 2006) e, em coqueiros (*Cocos nucifera*) no Mato Grosso (Souza, 2005). As palmeiras diagnosticadas com *Phytomonas* na Bahia foram avaliadas através da raiz, e as quatorze palmeiras usadas no arranjo paisagístico da praça de Vitória da Conquista/BA já estavam em estágio final de infecção (Santos et al., 2006). No Estado de Mato Grosso o plantio de coqueiros apresentou um aumento na área de produção para atender a demanda interna e com isso, foi diagnosticado o primeiro foco da doença hartrot em culturas no norte do Estado (Souza, 2005).

A transmissão dos flagelados de palmeiras, com indicações de que o vetor pode ser um hemíptero Pentatomidae, ainda permanece inconclusiva. (Dollet et al., 1997).

1.7 Distribuição geográfica

Há descrições do gênero *Phytomonas* em todos continentes, exceto Antártico, sendo predominantemente tropical e subtropical (Wallace et al., 1992).

Estudos sobre a distribuição geográfica do gênero ainda são inconclusivos e, até o momento sugere-se que ele é endêmico na América do Sul, com um expressivo número de espécies isoladas no Brasil (Tabelas 1 e 5) Também há descrições de isolados em alguns países europeus (Espanha e França), asiáticos (Índia e China) e África (Marché et al., 1995; Hollar et al., 1997; Camargo, 1999; Serrano et al., 1999a; Sturn et al., 2007; Votýpka et al., 2010, 2012; Dollet et al., 2012).

Essas descrições apontam que o gênero *Phytomonas* pode estar globalmente disperso e, devido a facilidade com que são encontrados em frutos no Brasil, sugerem que nos próximos anos cepas de muitos outros países do mundo podem ser isoladas (Camargo, 1999; Lopes et al., 2010).

1.8 Critérios taxonômicos para identificação de *Phytomonas*

Os tripanossomatídeos têm sido tradicionalmente identificados e classificados com base no hospedeiro de origem e na morfologia. Todavia, esses parâmetros tem se mostrado pouco úteis na identificação de parasitas do gênero *Phytomonas*, pois o emprego dessas ferramentas clássicas de identificação levou a equívocos na taxonomia de diversas espécies que, com a utilização de marcadores moleculares, foram reclassificadas em outros gêneros (Teixeira et al., 2011).

Dessa forma, critérios moleculares são necessários para diferenciar tripanossomatídeos de plantas do gênero *Phytomonas* de espécies pertencentes a outros gêneros, parasitas aparentemente acidentais ou oportunistas transientes (Teixeira & Camargo, 1989; Camargo et al., 1992; Marché et al., 1995; Teixeira et al., 1996; Hollar & Maslov, 1997; Uttaro et al., 1997; Serrano et al., 1999a,b,c; Dollet et al., 2001; Godoi et al., 2002; Sturn et al., 2007).

1.8.1 Métodos baseados em marcadores bioquímicos

1.8.1.1 Anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais foram produzidos contra espécies de *Phytomonas* com o objetivo de diferenciar representantes desse gênero de outros tripanossomatídeos (Petry et al., 1989; Teixeira & Camargo, 1989; Teixeira et al., 1995; Marché et al., 1995). Esses anticorpos demonstraram alta especificidade para representantes do gênero *Phytomonas*, mostrando-se uma ferramenta eficaz na identificação desses parasitas em amostras de insetos (Sbravate et al., 1989; Teixeira & Camargo, 1989; Teixeira et al., 1995) e plantas (Petry et al., 1989).

1.8.1.2 Enzimas do metabolismo arginina-ornitina

Dentre os vários aspectos do metabolismo de tripanossomatídeos, aqueles relacionados ao catabolismo de arginina e ornitina são de importância taxonômica porque as diferentes enzimas relacionadas a essas vias apresentam uma distribuição gênero específica (Camargo et al., 1987). *Leishmania*, *Leptomonas* e *Crithidia* possuem arginase e citrulina hidrolase enquanto *Phytomonas* e *Herpetomonas* possuem arginina desaminase no lugar de arginase (Camargo et al., 1992).

1.8.1.3 Isopropanol-desidrogenase (iDPH)

A enzima iDPH (isopropanol-desidrogenase) exerce funções fisiológicas importantes relacionadas à glicólise ou ao catabolismo de aminoácidos (Molinas et al., 2003). A atividade de iDPH foi detectada em todos os representantes do gênero *Phytomonas* até o momento analisados. Espécies dos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, e *Herpetomonas* não apresentaram atividade detectável para essa enzima, sugerindo que a iDPH possa ser um marcador específico para o gênero *Phytomonas* (Uttaro et al., 1997).

1.8.1.4 Padrões de isoenzimas (MLEE: multilocus enzyme electrophoresis)

A técnica de MLEE (Zimodema) foi bastante utilizada nos primeiros estudos de identificação e caracterização de tripanossomatídeos em geral. O estudo de padrões de isoenzimas de representantes do gênero *Phytomonas* revelou grande variabilidade nesse grupo (Vainstein et al., 1987; Guerrini et al., 1992; Muller et al., 1994, 1997; Sánchez-Moreno et al., 1998).

1.8.2 Métodos baseados em sequências de ácidos nucleicos

1.8.2.1 Random Amplification of Polymorphic DNA – RAPD

A amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) é uma técnica sensível para distinguir organismos estreitamente relacionados. É um indicador preciso de distâncias genéticas porque esse método, através de marcadores não específicos, amplifica aleatoriamente regiões polimórficas de sequências distribuídas ao longo do genoma, permitindo o exame de um grande número de loci genéticos (Serrano et al., 1999a).

O método de RAPD foi o primeiro a ser utilizado em análises da diversidade genética de *Phytomonas* (Muller et al., 1997; Serrano et al., 1999a).

Esse método permite o estudo de variabilidade genética, analisando polimorfismos inter e intra-específicos. A análise por RAPD de 48 isolados de *Phytomonas* de diferentes hospedeiros e regiões geográficas revelou grande polimorfismo genético no gênero (Serrano et al., 1999a). Os oligonucleotídeos empregados geraram padrões com diferentes níveis de resolução, sendo que os mais variáveis permitiram identificar 27 genótipos distintos e os mais conservados agruparam os isolados em cinco grupos principais (A-E).

1.8.2.2 DNA do cinetoplasto – kDNA

Os tripanossomatídeos apresentam uma única mitocôndria que contém uma região rica em DNA (kDNA) denominada cinetoplasto. O cinetoplasto é composto de moléculas dupla-fita circulares, podendo conter de 5.000-10.000 minicírculos e de 40-50 maxicírculos, concatenados em uma única rede. Os maxicírculos codificam as proteínas necessárias para a atividade mitocondrial e os minicírculos codificam as moléculas de RNAs-guias utilizadas na edição de transcritos de maxicírculos (Simpson, 1986; Stuart & Feagin, 1992).

Interespecificamente, os minicírculos diferem em tamanho e sequência, mas são, em geral, homogêneos em tamanho e hibridizam cruzadamente.

No gênero *Phytomonas* os padrões de digestão do kDNA foram usados para diferenciar isolados da Espanha revelando grande heterogeneidade entre os parasitas analisados (Sánchez-Moreno et al., 1998). Sequências de minicírculos de *Phytomonas* sp. (isolado Hart 1) permitiram o desenvolvimento de primers específicos para parasitas de palmeiras (Dollet et. al., 2001; Sturn et. al., 2007).

1.8.2.3 Gene "spliced leader" (SL) ou mini-exon

Genes de "Spliced Leader" - SL (mini-exon) participam de um mecanismo pós-transcricional chamado "*trans-splicing*" que dá origem às moléculas maduras dos mRNAs. Nos tripanossomatídeos, nesse mecanismo, a extremidade 5' de cada mRNA maduro possui uma sequência de 39 nucleotídeos denominada "Spliced Leader" RNA (SLRNA) que corresponde ao exon do gene SL, também conhecido como mini-exon (Agabian, 1990; Campbell et al., 2000; 2003; Hury et al., 2009; Liang et al., 2003).

Nos genes de SL é possível a distinção de três regiões com diferentes graus de conservação: um exon com 39 nucleotídeos, altamente conservado; um íntron moderadamente conservado, que varia de 50-150 nucleotídeos e uma região espaçadora intergênica (SL IR), que apresenta variações de tamanho e de sequências nas diferentes espécies de tripanossomatídeos. Algumas espécies também apresentam o rRNA 5S, inserido na região intergênica do gene SL e composto de sequências altamente conservadas (Figura 4) (Gibson et al., 2000). Essas características e o fato de que este gene se repete (100-200 vezes) "*in tandem*" no genoma dos tripanossomatídeos, o torna um excelente marcador genético taxonômico e para diagnóstico.

O gene SL foi utilizado para analisar o polimorfismo genético em vários gêneros de tripanossomatídeos, incluindo *Trypanosoma* (Ventura et al., 2001; Maia da Silva et al., 2007; Rodrigues et al., 2010), *Crithidia* (Fernandes et al., 1997; Yurchenko et al., 2008), *Endotrypanum* (Fernandes et al., 1993), *Leishmania* (Fernandes et al., 1994; Paiva et al., 2006; Serin et al., 2007), *Leptomonas* e *Herpetomonas* (Podlipaev et al., 2004a; Westenberger et al., 2004; Yurchenko et al., 2006) e *Phytomonas* (Godoi et al., 2002; Nunes et al., 1995; Teixeira et al., 1996; Serrano et al., 1999b,c; Dollet et al., 2000, 2001; Dollet, 2001).

Comparações de sequências do gene de "spliced-leader" (SL) de isolados do gênero *Phytomonas* (Nunes et al., 1995; Sturm et al., 1995) e seu alinhamento com sequências de tripanossomatídeos de outros gêneros permitiram identificar uma sequência gênero-específica de 19 nucleotídeos, denominada SL3', complementar a região +40 a +59 do íntron do SL RNA. Vários estudos demonstraram a eficiência de uma sonda baseada na sequência SL3' na identificação de *Phytomonas* de fontes diversas, como culturas, insetos hemípteros e plantas (Teixeira et al., 1996; Batistoti et al., 2001; Catarino et al., 2001; Godoi et al., 2002).

Foi desenvolvido um método de detecção de *Phytomonas* por PCR (SLPCR) (Serrano et al., 1999b, c) que utiliza como *primers* oligonucleotídeos (PSL1 e PSL2) que flanqueiam a sequência SL3' desenhados para amplificar uma região de ~100pb. Este método mostrou-se tão eficaz quanto o de hibridização com a sonda SL3', sendo capaz de detectar *Phytomonas* em amostras diretas de tubos digestivos de insetos e de plantas (Serrano et al., 1999b,c; Godoi et al., 2002).

Sequências do gene SL e da região 5S apontaram uma variabilidade dentro do gênero *Phytomonas*, bem como do grupo restrito ao floema, possibilitando a divisão em grupos e subgrupos, e demonstrando a sensibilidade do gene SL para examinar o polimorfismo genético intra-grupos (Dollet et al., 2000, 2001).

Figura 4 - Representação esquemática do gene "Spliced Leader". No gene SL ou mini-exon é possível observar um **exon** com 39 nucleotídeos altamente conservado, um **íntron** que varia de 50-150 nucleotídeos, moderadamente conservado e, uma região espaçadora intergênica (**SL IR**), que apresenta variações nas diferentes espécies de tripanossomatídeos, sendo que em algumas, incluindo *Phytomonas*, a região **5S** é altamente conservada.

1.8.2.4 Genes ribossômicos

Sequências dos genes que codificam o RNA ribossômico são muito conservadas e, devido à presença e função essencial nos organismos dos diferentes taxa, são consideradas ferramentas poderosas na determinação de relações filogenéticas e história evolutiva de muitos organismos.

O gene ribossômico (Figura 5) é composto por várias unidades de transcrição (cistrons ribossômicos) delimitadas por segmentos intergênicos (IGS) que demarcam cada unidade de repetição já que o rDNA se repete "*in tandem*" mais de 100 vezes no genoma. As etapas de processamento do pré-RNA originam três moléculas maduras de RNA: 18S (SSU ou subunidade menor), 5.8S e 28S (LSU ou subunidade maior). A SSU e LSU (sequências altamente conservadas) são intercaladas por regiões mais polimórficas, os espaçadores externos transcritos (ETS) e espaçadores internos transcritos (ITS) (Hernández et al., 1990; Sogin et al., 1986).

Devido à presença de diversas regiões, transcritas ou não, exibindo diferentes graus de conservação, os genes ribossômicos são excelentes alvos para identificação de gêneros, espécies, linhagens e genótipos (Souto et al., 1996; Zingales et al., 1998; Brisse et al., 2001; Stevens et al., 2001; Maia da Silva et al., 2004; Hamilton et al., 2004, 2007; Rodrigues et al., 2006; Ferreira et al., 2007, 2008; Viola et al., 2008, 2009; Borghesan et al., 2013; Fermino et al., 2013).

1.8.2.4.1 SSUrDNA

Os genes codificantes do RNA presentes na subunidade menor do ribossomo (SSUrDNA) apresentam múltiplas cópias e uma parcela significativa das suas estruturas é conservada em todos os organismos conhecidos (Sogin et al., 1986). Assim, as sequências de SSUrDNA são alvos moleculares amplamente explorados no desenvolvimento de ferramentas para estudos comparativos entre os tripanossomatídeos devido a diversas características, tais como: tamanho (que em tripanossomatídeos pode chegar a ~2200pb); facilidade de amplificação por PCR; e presença de regiões com variados níveis de conservação, facilitando o alinhamento de sequências. Além disso, o gene SSUrDNA é o que tem, até o momento, maior número de sequências de diferentes espécies de tripanossomatídeos disponíveis nos bancos de dados, permitindo comparações com organismos recentemente descobertos.

Diversos estudos demonstram que a subunidade menor (SSU) é formada por oito regiões universalmente conservadas (U1-U8) e nove regiões variáveis (V1-V9). Vários estudos validaram as regiões V7-V8 como DNA *barcoding* dos cinetoplastídeos e evidenciaram sua utilidade em inferências filogenéticas desses organismos (Maia da Silva et al., 2004, Rodrigues et al., 2006; Ferreira et al., 2008; Viola et al., 2009; Lima et al., 2012, 2013; Borghesan et al., 2013; Fermino et al., 2013).

Até o momento, o gene SSUrDNA é o único gene utilizado para inferir relacionamentos filogenéticos entre isolados do gênero *Phytomonas*; análises com apenas sete isolados sugeriram a monofilia do gênero (Marché et al., 1995; Hollar & Maslov, 1997).

1.8.2.4.2 ITS

Os espaçadores intergênicos dos genes ribossômicos (IGS e ITS) são muito menos conservados do que as regiões SSU e LSU, diferindo inter e intraespecificamente, sendo comumente utilizados como alvos para análises de relacionamento de organismos filogeneticamente muito próximos.

O ITS rDNA, localizado entre a subunidade menor e maior do gene ribossômico, é composto por três importantes regiões de grande destaque em estudos de diagnóstico de grupos: ITS1, 5.8S (região altamente conservada e codificadora de rDNA) e ITS2 (Figura 5).

A sequência da região ITS2 evolui rapidamente, assim, em conjunto, as regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 e a subunidade 5.8S do gene rDNA tem sido amplamente utilizadas para análises filogenéticas e taxonômicas, apresentando alto grau de polimorfismo, inclusive entre isolados da

mesma espécie de tripanossomatídeo (Maia da Silva et al., 2004, Rodrigues et al., 2006; Ferreira et al., 2008; Viola et al., 2009; Lima et al., 2012, 2013; Borghesan et al., 2013; Fermino et al., 2013).

O estudo de sequências do espaçador interno transcrito - ITS rDNA - de 20 isolados do gênero *Phytomonas* mostrou que essa região separa grupos intraespecíficos, conforme apresentado por Dollet e colaboradores (2012), que corroborou com os grupos previamente determinados e revelou novos grupos.

Figura 5 - Esquema dos genes ribossômicos. Demonstra a disposição das 3 regiões codificadoras de RNA que são muito conservadas: subunidade menor (SSU), 5.8S e subunidade maior (LSU), intercalados por espaçadores internos transcritos (ITS) e externos transcritos (ETS), delimitados por segmentos intergênicos (IGS) que demarcam cada unidade de repetição já que, o rDNA se repete "*in tandem*" mais de 100 vezes no genoma. As regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 são mais polimórficas e tem sido amplamente utilizadas para determinação de grupos taxonômicos intraespecíficos e estudos filogenéticos.

1.8.2.5 GAPDH

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, enzima-chave da glicólise, está, na maioria das células eucarióticas, localizada no citosol, com exceção dos protistas cinetoplastídeos que, além da atividade citosólica, também apresentam a forma glicossomal, encontrada em organelas especializadas denominadas glicossomos (Fothergill-Gilmore & Michels, 1993).

Além do importante papel no metabolismo nuclear, essa enzima participa em outros processos celulares, podendo interagir com os microtúbulos e com o tRNA, estando também implicada na reparação do DNA (Huitorel & Pantaloni, 1985; Ronai, 1993; Singh & Green, 1993). Há uma forte evidência de que várias linhagens da enzima GAPDH divergiram precocemente na evolução e, diferentes organismos e organelas abrigaram os descendentes das diferentes linhagens (Rozario et al., 1996).

Dois genes que codificam a enzima glicossômica (gGAPDH) e um gene que codifica a enzima citosólica (cGAPDH) foram encontrados nos genomas de duas espécies de *Trypanosoma* (Michels et

al., 1986; Kendall et al., 1990) (Figura 6), sendo que as duas cópias de gGAPDH são praticamente idênticas. Por codificarem proteínas, os genes gGAPDH sofrem diferentes pressões seletivas e taxas de evolução, o que os torna excelentes marcadores para estudos filogenéticos dos tripanossomatídeos; apresentam-se muito conservados dentro de cada espécie, o que permite comparações confiáveis de sequências de organismos geneticamente distantes (Hamilton et al., 2004., 2005a,b, 2007; Stevens, 2008).

Vários estudos apontam topologias congruentes de análises filogenéticas utilizando os genes gGAPDH e SSUrDNA, assim, o uso independente ou combinado desses genes tem sido recomendado na descrição e inferências filogenéticas de gêneros e espécies de tripanossomatídeos (Hamilton et al., 2004, 2005a, 2009; Viola et al., 2009; Maslov et al., 2010; Teixeira et al., 2011; Fermio et al., 2013; Borghesan et al., 2013).

Figura 6 - Esquema dos genes de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase – GAPDH destaca os dois genes que codificam a enzima presente nos glicossomos (gGAPDH) e um gene que codifica a enzima encontrada no citosol (cGAPDH).

1.9 Filogenia de *Phytomonas*

Tripanossomatídeos de diversos gêneros vem sendo analisados com marcadores moleculares a fim de construir árvores filogenéticas cada dia mais abrangentes da família Trypanosomatidae. Nos últimos anos, diversos estudos contribuíram para o conhecimento da história evolutiva dos organismos dessa família, especialmente de espécies dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, mas também de parasitas monoxênicos de diversos gêneros (Hamilton et al., 2007; Teixeira et al., 2011; Borghesan et al., 2013; Maslov et al., 2014; Lukes et al., 2014). Entretanto, poucos estudos foram desenvolvidos para inferências filogenéticas do gênero *Phytomonas* e, antes desse trabalho, o número de espécies/isolados incluídos em inferências filogenéticas era bastante reduzido. A primeira análise filogenética analisou o relacionamento de apenas dois isolados de *Phytomonas*, HART1 (isolado da Guiana Francesa) e E.hi.Se. (de *Euphorbia hirta* do Senegal) com base em sequências de SSU rRNA

(Marché et al., 1995). Esses dois isolados formaram um grupo sugerindo a monofilia de parasitas de plantas do gênero *Phytomonas* de diferentes hospedeiros e regiões geográficas. Nesse mesmo trabalho, a análise filogenética baseada na região V7 SSUrDNA revelou dois grupos: um contendo isolados de floema e relacionados a patologias em seus respectivos hospedeiros e outro grupo de isolados de látex sem associação com patologias aparentes. Nenhuma correlação entre origem geográfica e os grupos foi observada.

Um trabalho posterior (Hollar, Maslov, 1997) que incluiu sequências de SSUrDNA de 7 isolados de *Phytomonas* corroborou a monofilia do gênero e separou os isolados em clados relacionados com floema, látex ou frutos (tomates). Na árvore filogenética da família Trypanosomatidae, o posicionamento de *Phytomonas* sugeriu uma relação mais próxima com o gênero *Herpetomonas*. Análises filogenéticas do gênero *Herpetomonas*, baseadas em um grande conjunto de taxa de espécies de todos os gêneros de tripanossomatídeos, corroboraram a relação entre esse gênero e *Phytomonas* (Teixeira et al., 2011).

Os genomas inteiros de *Phytomonas* sp Hart e EM1 foram sequenciados e inferências filogenéticas vem sendo realizadas com grande número de genes. Entretanto, apenas os tripanossomatídeos com genomas completos disponíveis foram incluídos, assim, essas análises posicionaram *Leishmania* como o taxon mais filogeneticamente relacionado com *Phytomonas* (Porcel et al., 2014; Jaskowska et al., 2015).

1.10 Diversidade de isolados de *Phytomonas* (grupos e genótipos)

O primeiro estudo que mostrou a diversidade genética do gênero *Phytomonas* (Serrano et al., 1999a) utilizou o método de RAPD - Random Amplification of Polymorphic DNA - para o estudo de variabilidade genética de 48 isolados de diferentes hospedeiros (plantas e insetos fitófagos) e regiões geográficas. Este estudo revelou um relevante polimorfismo genético no gênero, que foi dividido em 6 grupos principais (A-F), e demonstrou que isolados de frutos e de látex são distribuídos em mais de um grupo.

Em estudo posterior, Dollet e colaboradores (2000), com base no gene ribossômico 5S rDNA, analisaram 24 isolados de floema, látex e frutos do gênero *Phytomonas*, corroborando com os seis grupos (A-F) obtidos por Serrano et.al. (1999a) e definindo três novos grupos: grupo G, contendo isolados de látex da Venezuela (Norte da América do Sul); grupo H, isolados restritos a floema de palmáceas da América do Sul e Caribe; grupo I, com apenas um isolado de látex da Venezuela.

Com a análise de sequências de minicírculos de kDNA (Sturn et.al., 2007) pelo menos 8 grupos foram identificados. Três grupos foram totalmente consistentes com os trabalhos anteriores,

grupos A, G, H, porém, dois isolados do grupo B (Serrano et.al., 1999a, Dollet et.al., 2000), ficaram em ramos separados, agrupados com C. Em estudo recente de Dollet e colaboradores (2012) realizado com o objetivo de distinguir tripanossomatídeos isolados de frutos dos de outros tecidos de plantas, baseado em sequências de ITS rDNA de 20 isolados de *Phytomonas*, foi demonstrado que o polimorfismo desses corrobora oito grupos anteriormente definidos (Serrano et al., 1999a; Dollet et al., 2000), revelando um total de 10 grupos distintos, incluindo dois grupos novos, J (isolado de *Euphorbia* da América do Sul) e K (isolado de tomate do sul da Espanha), formados por isolados anteriormente classificados nos grupos B, C e F. Portanto, esses estudos concluem que o número de grupos depende não apenas da amostra analisada, mas também, do grau de polimorfismo do marcador utilizado.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

Os tripanossomatídeos de plantas do gênero *Phytomonas* são conhecidos há mais de 100 anos, porém, apenas com a associação de espécies desse gênero com patologias de plantas economicamente importantes, como palmeiras, coqueiros, cafeeiros e mandioca, houve uma expansão de estudos sobre esse gênero. Grande parte dos estudos iniciais apenas reportou a presença desses parasitas em plantas. O isolamento em cultura, estudos sobre ciclos biológicos, vetores com parasitas desse gênero são relativamente recentes. Ainda mais recente são os estudos filogenéticos, em 2014 foram descritos os primeiros genomas de espécies desse gênero.

Árvores filogenéticas construídas com apenas 7 isolados sugeriram a monofilia do gênero *Phytomonas* e seu posicionamento próximo de *Herpetomonas*, porém, o fato de poucos isolados terem sido posicionados impede uma boa compreensão das relações filogenéticas e evolução desse grupo.

Estudos foram realizados a fim de investigar a diversidade genética de *Phytomonas* utilizando marcadores moleculares baseados em fragmentos de DNA amplificados por RAPD e sequências de minicírculos de kDNA, 5S rRNA e ITS rDNA. Esses marcadores altamente polimórficos indicaram uma grande variabilidade entre isolados desse gênero, que foram distribuídos entre 6 e 11 grupos dependendo dos isolados e marcadores analisados. Entretanto, todos os estudos anteriores foram realizados com conjuntos de isolados que pouco representa a variedade de plantas hospedeiras, vetores e distribuição geográfica do gênero *Phytomonas*. Além disso, os marcadores empregados não podem ser empregados em inferências de árvores filogenéticas a fim de posicionar os isolados de *Phytomonas* na filogenia de Trypanosomatidae. Outro aspecto importante a ser investigado é a existência de associação entre os grupos de *Phytomonas* e vetores (famílias-espécies) e plantas hospedeiras (floema, látex e frutos).

Apesar da variabilidade encontrada, apenas três espécies de *Phytomonas*, todas do Brasil, foram descritas até o momento: *P. serpens* em tomate, *P. françai* em mandioca e *P. mcgheeii* em milho, sendo que essa última espécie originalmente classificada no gênero *Herpetomonas* não foi ainda posicionada em árvores filogenéticas. Nenhum estudo foi realizado até o momento a fim de posicionar isolados de insetos de diferentes famílias, gêneros e espécies de hemípteros fitófagos que podem ser vetores de *Phytomonas*.

Portanto, esse gênero necessita urgentemente de uma revisão taxonômica, assim como de estudos biológicos e filogeográficos. Para uma melhor compreensão da diversidade genética de

Phytomonas spp. de plantas e insetos, posicionamento filogenético e relações filogenéticas entre os grupos de isolados desse gênero, pré-requisitos para uma revisão taxonômica, é necessário que seja analisado um grande número de isolados de plantas e insetos de diferentes espécies/famílias, de diferentes regiões geográficas.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo Geral

Sequenciar diferentes genes de isolados de tripanossomatídeos do gênero *Phytomonas*, provenientes de diferentes origens geográficas e hospedeiros, plantas e insetos fitófagos, a fim de caracterizar a diversidade de espécies desse gênero e inferir relações filogenéticas.

2.2.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar novos isolados do gênero *Phytomonas* com a utilização de método de PCR gênero-específico;
- b) Avaliar o polimorfismo genético dos isolados com a análise de DNA "barcoding" utilizando sequências da região variável V7V8 SSU rRNA, sequências do gene gGAPDH, e sequências de ITS rDNA e comparar com sequências disponíveis em nosso laboratório ou no GenBank;
- c) Inferir relações filogenéticas entre os isolados – definir grupos e genótipos de isolados;
- d) Posicionar os isolados do gênero *Phytomonas* na árvore filogenética da família Trypanosomatidae;
- e) Selecionar isolados representantes da diversidade genética – candidatos a novas espécies - e analisar o comportamento em cultura e características morfológicas por microscopia de luz e eletrônica de varredura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Organismos

Os organismos utilizados neste estudo (Tabela 1) estão criopreservados na coleção de tripanossomatídeos (TCC: Trypanosomatidae Culture Collection) do Departamento de Parasitologia, ICB II - USP. Esses tripanossomatídeos foram isolados de diferentes famílias de plantas e insetos de diferentes biomas brasileiros e de outros países.

Tabela 1 - Isolados e amostras diretas de tripanossomatídeos do gênero *Phytomonas* de plantas e hemípteros fitófagos utilizados nesse estudo.

TCC	Hospedeiro		Origem geográfica	
	Família	espécie	Estado	País
PSC0001 ^{AD}	Aracaceae	<i>Cocos nucifera</i>	Bahia	BR
PSC0002 ^{AD}	Aracaceae	<i>Elaeis guineensis</i>		CO
304E	Fabaceae	<i>Trifolium sp</i>	Granada	ES
311E	Annonaceae	<i>Annona cherimola</i>	Granada	ES
299E	Annonaceae	<i>Annona cherimola</i>	Granada	ES
305E	Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Almeria	ES
167E	Pentatomidae	<i>Podisus sp</i>	Amazonas	BR
418	Scutelleridae	<i>Pachycoris torridus</i>	São Paulo	BR
082E	Apocynaceae	<i>Rhabdadenia biflora</i>	Boskamp	SR
083E	Apocynaceae	<i>Allamanda cathartica</i>	LaPoule	SR
084E	Apocynaceae	<i>Mandevilla scabra</i>	Uitvlucht	SR
085E	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia hirta</i>	LaPoule	SR
086E	Asclepiadaceae	<i>Blepharodon nitidus</i>	Groningen	SR
064E (<i>P. françaí</i>)	Euphorbiaceae	<i>Manihot esculenta</i>	Espírito Santo	BR
PSC0005 ^{AD}	Euphorbiaceae	<i>Manihot esculenta</i>	Rondônia	BR
221E	Solanaceae	<i>Nicandra physaloides</i>	São Paulo	BR
227E	Solanaceae	<i>Solanum concinnum</i>	São Paulo	BR
148E	Pentatomidae	<i>Arvelius albopunctatus</i>	São Paulo	BR
215E	Solanaceae	<i>Solanum variable</i>	São Paulo	BR
216E	Solanaceae	<i>Solanum variable</i>	São Paulo	BR
218E	Solanaceae	<i>Solanum robustum</i>	São Paulo	BR
219E	Solanaceae	<i>Solanum robustum</i>	São Paulo	BR
222E	Solanaceae	<i>Solanum viarum</i>	São Paulo	BR
223E	Solanaceae	<i>Solanum viarum</i>	São Paulo	BR
224E	Solanaceae	<i>Solanum viarum</i>	São Paulo	BR
225E	Solanaceae	<i>Solanum americanum</i>	São Paulo	BR
226E	Solanaceae	<i>Solanum erianthum</i>	São Paulo	BR
230E	Solanaceae	<i>Solanum sp</i>	São Paulo	BR
229E	Solanaceae	<i>Solanum viarum</i>	São Paulo	BR
217E	Solanaceae	<i>Solanum variable</i>	São Paulo	BR
228E	Solanaceae	<i>Solanum variable</i>	São Paulo	BR
052E	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia characias</i>		FR
347	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia hyssopifolia</i>	Rondônia	BR

370	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia hyssopifolia</i>	Rondônia	BR
053E	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia pinea</i>		FR
306E	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia hirta</i>		IN
051E	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia pinea</i>		FR
170E	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Amazonas	BR
2526	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Tolima	CO
2428	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Minas Gerais	BR
2687	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Zulia	VE
2299	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	Chupanga	MZ
2328	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	Chupanga	MZ
2300	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	Chupanga	MZ
1903	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	Chupanga	MZ
ISC0026 ^{AD}	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>		MZ
ISC0027 ^{AD}	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>		MZ
174E	Coreidae	<i>Leptoglossus gonagra</i>	Paraná	BR
110E	Coreidae	<i>Leptoglossus gonagra</i>	Paraná	BR
120E	Coreidae	<i>Leptoglossus gonagra</i>	Paraná	BR
393	Coreidae	<i>Phthia picta</i>	Rondônia	BR
233E	Rutaceae	<i>Citrus bergamia</i>	Paraná	BR
112E	Coreidae	<i>Leptoglossus gonagra</i>	Paraná	BR
232E	Rutaceae	<i>Citrus bergamia</i>	Paraná	BR
235E	Rutaceae	<i>Citrus bergamia</i>	Paraná	BR
ISC0029 ^{AD}	Coreidae		Mato Grosso	BR
ISC0030 ^{AD}	Coreidae		Mato Grosso	BR
206E	Coreidae	<i>Phthia picta</i>	Paraná	BR
207E	Coreidae	<i>Phthia picta</i>	Paraná	BR
062E	Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i>	São Paulo	BR
060E (<i>P. serpens</i>)	Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Paraná	BR
125E	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	Paraná	BR
2274	Coreidae	<i>Phthia picta</i>	Rio de Janeiro	BR
214E	Coreidae	<i>Phthia picta</i>	Minas Gerais	BR
220E	Solanaceae	<i>Solanum viarum</i>	São Paulo	BR
231E	Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Minas Gerais	BR
628	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
2272	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
2273	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
2277	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
2278	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
2279	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
2281	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
2283	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
2284	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
2285	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
202E	Coreidae	<i>Leptoglossus zonata</i>	Paraná	BR
204E	Coreidae	<i>Leptoglossus zonta</i>	Paraná	BR
163E	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	Paraná	BR
072	Fabaceae	<i>Cajanus flavus</i>	Paraná	BR
2287	Rutaceae	<i>Citrus sinensis</i>	Paraná	BR
071E	Euphorbiaceae	<i>Jatropha macrantha</i>	Lima	PE
238E	Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i>	São Paulo	BR
297E (<i>P. macghee</i>)	Poaceae	<i>Zea mays</i>	Paraná	BR
ISC0034 ^{AD}	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
ISC0033 ^{AD}	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
2282	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR

213E	Coreidae	<i>Phthia picta</i>	Minas Gerais	BR
2275	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
2610	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
2611	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
066E	Euphorbiaceae	<i>Jatropha macrantha</i>	Lima	PE
161E	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	Paraná	BR
2427	Pentatomidae	<i>Pellae stictica</i>	São Paulo	BR
067E	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia hyssopifolia</i>	Rio de Janeiro	BR

TCC (Trypanosomatidae Culture Collection); PSC (Plant Sample Collection); ISC (Insect Sample Collection); AD (Amostras Diretas); NA (não agrupado); BR (Brasil); CO (Colômbia); ES (Espanha); PE (Peru); MZ (Moçambique); VE (Venezuela); IN (Índia); FR (França); SR (Suriname).

3.2 Captura e Isolamento

3.2.1 Coleta de hemípteros fitófagos

Hemípteros fitófagos foram capturados e mantidos em frascos de vidro ou plástico, cobertos com gaze. Cada frasco continha folhas, flores ou frutos provenientes das plantas do local de coleta para a sobrevivência dos insetos. Todos os indivíduos foram devidamente rotulados com código de coleta, nome popular do inseto, da planta na qual foram encontrados, assim como do local da coleta. Os hemípteros foram coletados na América do Sul (Brasil, Venezuela e Colômbia) e no continente Africano (Moçambique).

3.2.2 Identificação dos Hemípteros

Os hemípteros coletados foram agrupados de acordo com cada espécie. Dois exemplares representativos de cada espécie foram sacrificados em vapor de clorofórmio e montados de acordo com as regras entomológicas. A coleção de todas as espécies de insetos capturados e positivos para tripanossomatídeos, bem como fotos com detalhes de cada hemíptero foram enviadas para identificação, ao Dr. Cristiano Feldens Schwertner da UNIFESP.

3.2.3 Dissecção dos Hemípteros

Para a detecção dos parasitas, os hemípteros foram dissecados e as glândulas salivares e o trato digestivo foram examinados quanto à presença de tripanossomatídeos. Antes de dissecar, os insetos foram lavados com solução de cloreto de benzalcônico a 0,1%. A dissecção foi iniciada com a

remoção das antenas, asas e patas dos insetos. Logo depois, a porção cefálica foi separada, por simples tração, e as glândulas salivares extraídas. Em seguida, os conectivos do abdomen foram cortados, o pronoto levantado e a musculatura torácica dorsal cortada para retirar o trato digestivo. As glândulas salivares e o trato digestivo foram separadamente recolhidos em lâminas, com adição de PBS estéril, para então serem analisados ao microscópio e verificados quanto à presença de flagelados.

3.2.4 Isolamento dos tripanossomatídeos de hemípteros fitófagos

Em ambiente estéril, o material positivo para tripanossomatídeos foi inoculado em tubos de meio de cultura bifásico, contendo uma fase sólida a 4% de BAB acrescido de 15% de sangue de coelho, e uma fase líquida constituída por meio LIT (Camargo, 1964). Além disso, antibióticos como ampicilina e/ou gentamicina, foram adicionados a uma concentração final de 2000ug/ml. Os tubos foram mantidos em estantes inclinadas de modo que a fase sólida ficasse totalmente imersa na fase líquida. Desta forma, as culturas foram incubadas a 28 °C e 7 dias depois verificadas para o crescimento dos parasitas. As culturas aparentemente negativas foram mantidas por mais 10 dias, para serem examinada novamente.

Fungos e leveduras, contaminantes das culturas, foram eliminados com a utilização de tubos de migração em forma de U, onde somente os flagelados migram de uma extremidade para a outra, de onde então, foram coletados e transferidos para um meio novo de cultura.

3.2.5 Coleta e isolamento de tripanossomatídeos de plantas

As plantas coletadas junto com os hemípteros fitófagos foram separadas dos mesmos e, após serem classificadas pelo nome popular foram lavadas em PBS estéril e em solução de cloreto de benzalcônico 0,1% e novamente com PBS estéril.

Caules e flores foram pressionados com auxílio de uma pinça estéril e a seiva ou látex recolhidos em lâmina, foram analisados ao microscópio de fase, para verificar a presença de flagelados.

Nos frutos, após limpeza da superfície, como já descrito, foi feita uma pequena incisão na casca com auxílio de uma tesoura. Uma pipeta Pasteur estéril foi introduzida na abertura e o sumo colhido foi transferido para uma lâmina, e então observado ao microscópio de contraste de fase. Preferencialmente, a abertura era feita em locais onde foram notados pontos de despigmentação, indicativo do local de picada de hemípteros.

O material positivo, contendo tripanossomatídeos, foi inoculado em meio bifásico como descrito previamente no item 3.2.4.

3.3 Manutenção e Cultivo

Para manutenção das culturas, amostras de tripanossomatídeos em fase exponencial de crescimento foram transferidas para tubos contendo 3 ml de BAB e 5ml de LIT suplementado com 2 - 10% de soro fetal bovino. Alguns flagelados com maiores dificuldades de crescimento foram acondicionados em garrafa de cultura contendo uma monocamada de célula HI-5 usando como sobrenadante o meio TC100. Após incubação a 28°C durante 7 dias, uma alíquota da cultura foi retirada para a verificação do crescimento dos parasitas em microscópio de contraste de fase. Os detalhes da preparação e composição dos meios de cultura estão descritos na Tabela 2.

Para a obtenção de maior quantidade de parasitas, os isolados foram cultivados em meio líquido em garrafas de 200 ml sob agitação. Após o crescimento, as culturas foram lavadas três vezes em PBS, centrifugadas por 10 minutos a 8.000g e os pellets armazenados a -20° C.

Tabela 2 - Meios de cultura utilizados neste estudo para o cultivo de *Phytomonas* sp.

Meio de Cultura	Composição	Quantidade	Armazenamento
LIT ⁽¹⁾	Triptose Infuso de fígado NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ Glicose Hemina ^a Soro Fetal Bovino ^b	5,00g 5,00g 4,00g 0,40g 8,00g 2,00g 0,01g 100ml	Autoclavado e armazenado a -20°C.
BAB/LIT ⁽²⁾	BAB (Blood Agar Base) a 4% Sangue de coelho estéril e desfibrinado	850ml 150ml	Armazenado a 4°C
TC100	Monocamadas de células HI-5 isolada de <i>Trichoplusia ni</i>		

(1) Camargo (1964); (2) Rodrigues et al. (2006); a, hemina dissolvida em NaOH 0.1N; b, soro fetal bovino inativado a 56°C por 30 minutos e armazenado a -20°C.

3.4 Criopreservação dos parasitas

Amostras clonadas das culturas originais, em fase exponencial de crescimento e livres de agentes contaminantes foram criopreservadas em nitrogênio líquido utilizando 10% de glicerina ou DMSO, e mantidas na coleção de tripanossomatídeos (TCC: Trypanosomatidae Culture Collection) do Departamento de Parasitologia/ICB/USP.

3.5 Microscopia óptica e Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para o estudo morfológico, os isolados foram cultivados em monocamada de HI-5 ou meio LIT, e observados em fase logarítmica e fase estacionária de crescimento. As culturas foram lavadas três vezes em PBS e preparados em lâmina (adicionando-se uma gota da cultura nas fases logarítmica e estacionária), em seguida fixados com metanol, corados com Giemsa e posteriormente fotografados. Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), culturas em fase logarítmica foram fixadas em 2,5% (v/v) de glutaraldeído, mais paraformaldeído 1% (w/v) em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) acrescido de cloreto de cálcio 1mM. Os parasitas foram aderidos em lamínulas redondas previamente revestidas com Poli-L-lisina 0,1% , pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, por 30 minutos, lavados em tampão cacodilato e desidratados em concentrações crescentes de etanol (50% a 100%). As amostras foram secas pelo método de ponto crítico em CO₂ em aparelho Balzers CDP-20, em seguida as lamínulas foram montadas em suporte de alumínio, metalizadas com fina camada de ouro em aparelho Sputter Coater SCD 050 Balzers e analisadas no microscópio eletrônico de varredura QUANTA 250 (Fei Company).

3.6 Extração de DNA dos parasitas

3.6.1 Obtenção de DNA genômico de culturas

Os pellets armazenados a -20 °C foram ressuspensos (10⁹ tripanossomatídeos/ml) em SE e mantidos em banho de gelo para extração de DNA. Após a adição de 0,5 % de Sarkosil, 100 µg/ml de Pronase e 10 µg/ml de RNase, o material foi incubado em banho maria, à 55 – 60°C, por 1 a 2 horas, e o DNA foi extraído uma vez com Fenol:Tris 1:1, duas vezes com Fenol:CHCl₃ 1:1, duas vezes com CHCl₃:isoamílico 24:1 e uma vez com CHCl₃. Após a última extração, o DNA foi precipitado com acetato de sódio a 3M (pH 7,0) e 2 volumes de etanol gelado à 100%. O DNA precipitado foi lavado

com etanol a 70%, os pellets foram secos a 37°C e ressuspensos em TE. As soluções utilizadas estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Soluções para obtenção de DNA dos tripanossomatídeos.

Soluções	Preparação	Volume
PBS 1X	NaCl (8g); KCl (0,2g); Na ₂ HPO ₄ (1,15g); KH ₂ PO ₄ (0,2g); em H ₂ O bidestilada autoclavada.	1000ml
SE	99,5ml NaCl (0,5M); 99,5ml Tris (2,5mM) pH 8; 1ml EDTA (0,5M) pH 8. Autoclavar	200ml
Sarkosil 10%	N-laurylsarcosine (1g) em H ₂ O bidestilada autoclavada	10ml
Acetato de sódio (3M)	CH ₃ COONa 3H ₂ O mw:136.08 (20,41g) em H ₂ O bidestilada; acertar o pH a 7 com ácido acético glacial diluído (1:10). Autoclavar	50ml
TE (Tris-EDTA)	Tris-HCl 2M pH 7,5 (1,25ml); EDTA 0,5M pH 8 (0,5ml) em H ₂ O bidestilada autoclavada	250ml
EDTA (0,5M)	EDTA (93,06g) em H ₂ O bidestilada; acertar pH para 8 com NaOH (em lentilhas), aquecer para dissolver. Autoclavar	500ml

3.6.2 Obtenção de DNA genômico de material direto (hemípteros e plantas)

Para extração de DNA de tecido de insetos ou de plantas foi utilizado o kit Chelex 100 Resin da Bio-Rad Laboratories. Desta maneira, 150µl de Chelex 5% (diluído em TE) foram adicionados a uma pequena quantidade do tecido da planta ou tubo digestivo do inseto (10-15mg). Depois de homogeneizada, a mistura foi incubada por 5 minutos a 100 °C e posteriormente centrifugada por igual período para separar o produto da resina.

3.7 Amplificação de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction)

3.7.1 Phy-SLPCR

Essa reação de PCR (Phy-SLPCR) amplifica apenas os genes de “spliced leader” em espécies do gênero *Phytomonas* (Serrano et al., 1999). A reação foi realizada em volume total de 50µl contendo 25ng de DNA purificado; 0.2 mM de dNTP; 2.0µM de cada oligonucleotídeo PSL1 (5' GAC TTT CAA

CTA ACG CTA T 3') e PSL2 (5' GAA GGT CCC CAG TCT AAA A 3'); PCR buffer (1.5 mM de MgCl₂) e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Fermentas). Foram empregados na reação de PCR 30 ciclos de 1 minuto de 94°C, 1 minuto de 58°C (temperatura de annealing), e 1 minuto de 72°C, com uma extensão final de 10 minutos de 72°C.

3.7.2 Reações de PCR (V7V8 SSUrDNA, gGAPDH e ITS rDNA)

Nas reações de PCR foi utilizada a seguinte mistura de reação (qsp 50µl): 200mM de dNTP; 100ng de cada oligonucleotídeo; 100ng de DNA genômico; 5µl de tampão (2mM de Tris-HCl, pH 8.4; 500mM de KCl e 1,5mM de MgCl₂); 2,5µl de Taq DNA Polimerase. Os ciclos de amplificação e as temperaturas de anelamento foram definidos de acordo com cada reação (Tabela 4).

Tabela 4 - Ciclos de amplificação e temperaturas utilizadas nas diferentes reações de PCR

<i>Gene e oligonucleotídeos</i>	<i>Condições de amplificação</i>
SSU rDNA (V7-V8) 609F (5' CAC CCG CGG TAA TTC CAG C 3') 706R (5' TTG AGG TTA CAG TCT CAG 3')	1 ciclo: 3 min 94°C 30 ciclos: 1 min 94°C; 1 min 48°C; 1 min 72°C 1 ciclo: 10 min 72°C (Maia da Silva et al., 2004).
gGAPDH GAP-TRYmodF (5' GGB CGC ATG GTS TTC CAG G 3') GAP-TRYR (5' CCC CAC TCG TTR TCR TAC C 3')	1 ciclo: 3 min 94°C 30 ciclos: 1 min 94°C; 1 min 55°C; 1 min 72°C 1 ciclo: 10 min 72°C (Hamilton et al., 2004)
Oligonucleotídeos utilizados somente no sequenciamento: GAP 5R (5' CCG AGG ATG YCC TTC ATG 3') GAP 3F (5' GTG AAG GCG CAG CGC AAC 3')	
ITS rDNA IR1 (5' GCT GTA GGT GAA CCT GCA GCA GCT GGA TCA TT 3') IR2 (5' GCG GGT AGT CCT GCC AAA CAC TCAS GGT CTG 3') 5.8SR (5' GGA AGC CAA GTC ATC CAT C 3')	1 ciclo: 3 min 94 °C 30 ciclos: 1 min 94°C; 1 min 55 °C; 1 min 72°C 1 ciclo: 10 min 72°C (Cupolillo et al., 1995).

3.7.3 Reações de Nested-PCR

Devido a grande sensibilidade das reações de Nested-PCR com amostras de difícil amplificação, esse método foi empregado com o DNA extraído de material direto de plantas e hemípteros fitófagos, que apresentava uma grande concentração de DNA do hospedeiro. Esse método foi aplicado na amplificação do gene de SSU rDNA, sendo o primeiro PCR realizado com os

oligonucleotídeos KRD5 e o KRD3 (Clark et al., 1995) e o segundo com os oligonucleotídeos 609F e 706R (Maia da Silva et al., 2004). Já para o gene de gGAPDH foram utilizados os oligonucleotídeos SF e SR na primeira amplificação e 3F e 5R na segunda (Fermino et al., em preparação). As condições dos PCRs são as mesmas utilizadas na Tabela 4.

3.8 Eletroforese e purificação dos fragmentos de DNA amplificados por PCR

De 2 a 5µl do produto da reação de PCR foram acrescentados em tampão de amostra e submetidos à eletroforese em gel de agarose, na concentração de 1,5 a 2% em tampão TAE (40mM de Tris-acetato; 2mM de EDTA, pH 8.0 a 50 V/100mA), utilizando-se como marcador de peso molecular “GeneRuler DNA Ladder Mix” (Fermentas), e corados com Gel Red NucleicAcid Gel Stain (Biotium) e fotodocumentados sob luz UV. Os fragmentos foram cortados dos géis e os DNAs extraídos da agarose em coluna Spin X (Costar). Os produtos purificados foram clonados ou submetidos diretamente à reação de sequenciamento.

3.9 Clonagem de fragmentos de DNA amplificados por PCR

Fragmentos de DNA obtidos por PCR e purificados foram clonados em vetor pGEM-T Easy Vector (Promega) e utilizados para a transformação de células dH10β. A preparação das células competentes foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001), utilizando cloreto de cálcio. As células foram transformadas e ampliadas inicialmente em meio SOC e em seguida transferidas para placas de meio LB-agar contendo ampicilina em uma concentração final de 100 µg/ml.

Posteriormente os clones positivos foram ampliados por cultivo durante 16h/37 °C/120 rpm em meio LB líquido contendo a mesma concentração de ampicilina das placas. Os clones positivos foram ampliados por cultivo (16h/37°C) em meio LB líquido contendo 100µg/ml de ampicilina e purificados utilizando o sistema "Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System" (Promega).

3.10 Sequenciamento de DNA

Fragmentos de DNA clonados foram sequenciados utilizando o Kit “Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems). Para a reação de sequenciamento foram utilizados 100-200ng de DNA plasmidial e 10ng de oligonucleotídeos universais (M13 *forward* ou M13 *reverse*) em volume final de 10µl. Após a reação o DNA foi precipitado e analisado no Sequenciador automático Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

3.11 Alinhamento das sequências

Os cromatogramas das sequências foram analisados no programa Geneious 4.8.5 software (<http://www.geneious.com/>). As sequências determinadas e as obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) conforme Tabela 5, foram alinhadas no programa Clustal X (Thompson et al., 2007) alterando os parâmetros relativos à inserção de "Gaps" (peso de inserção=1, extensão =1), e ajustadas manualmente utilizando o programa Mega 6.0 (Tamura et al., 2013).

3.12 Matriz de distância

Com o alinhamento das sequências de nucleotídeos, foram determinadas matrizes de distância (baseada em distância p) com a região V7V8 do gene SSU rDNA, com o gene gGAPDH e com o gene ITS utilizando o programa Mega 6.0 (Tamura et al., 2013), com valores que refletem a porcentagem de divergência. As matrizes foram determinadas com cálculos de distâncias "par a par", "intra-grupo" e "inter-grupos".

Tabela 5 - Sequências obtidas do GenBank, dos genes SSUrDNA, ITS e gGAPDH de *Phytomonas* sp, e sequências de gGAPDH de outros gêneros de tripanosomatídeos determinados como grupo externo.

Nome	Gene	Nº Acesso GenBank	Hospedeiro	Local	Autor
<i>Phytomonas serpens</i> _1G	SSU rRNA	AF016323	<i>Phtia picta</i>	BR	Hollar et al., 1997
<i>Phytomonas</i> _sp_EhiSe	SSU rRNA	L35077	<i>Euphorbia</i> sp	SN	Marche et al., 1995
<i>Phytomonas</i> _sp_EM1	SSU rRNA	AF016322	<i>Euphorbia</i> sp	FR	Hollar et al., 1997
<i>Phytomonas</i> _sp_Hart1	SSU rRNA	L35076	<i>Cocos nucifera</i>	GF	Marche et al., 1995
Trypanosomatidae_sp_G65	SSU rRNA	JQ658841	<i>Durmia varicornis</i>	GH	Votykka et al., 2012
Trypanosomatidae_sp_G24	SSU rRNA	JQ658819	<i>Aeptus singularis</i>	GH	Votykka et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_E.hi.Sen	ITS	AY180145	<i>Euphorbia</i> sp	SN	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_EM1	ITS	AY180149	<i>Euphorbia</i> sp	FR	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_Tom.sp	ITS	AY180160	<i>Lycopersicon esculentum</i>	ES	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_Rhab	ITS	AY180159	Asclepiadiaceae	SR	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_Ps1G	ITS	AY180158	<i>Phtia picta</i>	BR	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_Mar1	ITS	AY180156	<i>Elaeis guineensis</i>	CO	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_Mar6	ITS	AY180157	<i>Elaeis guineensis</i>	VE	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_Mani.Br	ITS	AY180155	<i>Manihot esculenta</i>	BR	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_Mand.sc.Br	ITS	AY180154	Apocynaceae	BR	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_Lima	ITS	AY180152	<i>Euphorbia</i> sp	PE	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_Hart1	ITS	AY180150	<i>Cocos nucifera</i>	GF	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_E.hy.Gu	ITS	AY180148	<i>Euphorbia</i> sp	GF	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_E.hy.Vz	ITS	AY180147	<i>Euphorbia</i> sp	VE	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_E.hy.Sur	ITS	AY180146	<i>Euphorbia</i> sp	SR	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_E.hy.lnd	ITS	AY180144	<i>Euphorbia</i> sp	IN	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_E.het.Vz	ITS	AY180143	<i>Euphorbia</i> sp	VE	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_Bleph	ITS	AY180141	Apocynaceae	SR	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_Berg	ITS	AY180140	<i>Citrus bergamia</i>	BR	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_Ascl.cu.Vz	ITS	AY180139	Asclepiadiaceae	VE	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas</i> _sp_Aca	ITS	AY180138	Asclepiadiaceae	SR	Dollet et al., 2012
<i>Phytomonas serpens</i> 1G c.1	gGAPDH	EU084892	<i>Phtia picta</i>	BR	Yurchenko et al, 2009
<i>Phytomonas</i> sp EM1	gGAPDH	EU084895	<i>Euphorbia</i> sp	FR	Yurchenko et al, 2009
<i>Phytomonas</i> sp	gGAPDH	AF047496	<i>Euphorbia characias</i>	-	Hannaert et al, 1998

<i>Phytomonas_Hart1_genomic</i>	Genoma	HF955199- HF955282	<i>Cocos nucifera</i>	GF	Porcel et al., 2014
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	gGAPDH	AJ620256	<i>Rana catesbeiana</i>	CA	Hamilton et al., 2004
<i>Trypanosoma microti</i>	gGAPDH	AJ620273	<i>Microtus agrestis</i>	GB	Hamilton et al., 2004
<i>Trypanosoma cruzi</i>	gGAPDH	JN040972	<i>Sanguinus fuscicollis</i>	BR	Lima et al., 2012
<i>Trypanosoma rangeli</i>	gGAPDH	GQ140364	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	BR	Cavazzana et al, 2010
<i>Angomonas deanei</i>	gGAPDH	HM593024	<i>Lucilia cuprina</i>	BR	Teixeira et al, 2011
<i>Angomonas ambiguus</i>	gGAPDH	HM593019	<i>Chrysomya albiceps</i>	BR	Teixeira et al, 2011
<i>Angomonas desouzai</i>	gGAPDH	HM593021	<i>Lucilia eximia</i>	BR	Teixeira et al, 2011
<i>Herpetomonas samuelpeessoai</i>	gGAPDH	JQ359747	<i>Musca domestica</i>	BR	Borghesan et al, 2013
<i>Hepetomonas muscarum</i>	gGAPDH	JQ359748	<i>Musca domestica</i>	USA	Borghesan et al, 2013
<i>Herpetomonas megaseliae</i>	gGAPDH	JQ359749	<i>Megaselia scalaris</i>	USA	Borghesan et al, 2013

BR (Brasil); SN (Senegal); FR (França); GF (Guiana Francesa); GH (Gana); ES (Espanha); CO (Colômbia); VE (Venezuela); PE (Peru); IN (Índia); CA (Canadá); GB (Grã-Bretanha/Reino Unido); US(Estados Unidos).

3.13 Análises filogenéticas

As inferências filogenéticas foram determinadas pelos métodos de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (ML) e análise bayesiana (B). As árvores de MP foram construídas utilizando o programa PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 1998) via busca heurística com 100 replicatas de adição aleatória dos terminais seguida de troca de ramos ("RAS – TBR"). As análises de suporte por "bootstrap" foram feitas com 100 replicatas e os mesmos parâmetros empregados na busca.

As análises de ML foram realizadas no programa RAxML v7.2.6 (Stamatakis, 2006). Foram empregadas 500 replicatas usando GTR como modelo de substituição e quatro categorias de gama e diagramas obtidos por parcimônia como árvores iniciais. Os parâmetros do modelo de substituição empregado foram estimados durante a busca. O suporte de ramos foi estimado em 500 replicatas de "bootstrap" no programa RAxML.

As análises bayesianas foram executadas no programa MrBayes v.3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Foram empregadas 500.000 gerações usando GTR como modelo de substituição e quatro categorias de gama mais proporção de sítios invariantes. Para a construção do dendrograma final foram utilizados apenas os diagramas obtidos nas últimas 75 replicatas. Para a verificação de suporte de ramos nas análises bayesianas foram utilizados os valores de probabilidade a posteriori obtidos com programa MrBayes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diagnóstico de *Phytomonas* em culturas de tripanossomatídeos obtidas de plantas e hemípteros fitófagos com o método Phy-SLPCR.

O método Phy-SLPCR foi desenvolvido com base em sequências do gene Spliced-Leader para detecção, por PCR, especificamente de sequências de tripanossomatídeos gênero *Phytomonas*. Esse método foi utilizado para diagnóstico de parasitas desse gênero em amostras de culturas, de plantas (frutos, látex e floema), assim como de tubos digestivos de insetos (Serrano et al., 1999b,c; Teixeira et al., 2000; Godoi et al., 2002).

Amostras de DNA dos 97 isolados em cultura obtidos de plantas e insetos fitófagos analisados nesse estudo foram submetidas a reações de PCR (Phy-SLPCR) a fim de determinar a presença de parasitas do gênero *Phytomonas* entre as culturas analisadas. Das 97 culturas analisadas, 41 já haviam sido identificadas como *Phytomonas* em estudos anteriores (Teixeira et al., 1996; Serrano et al., 1999b,c). Os resultados obtidos mostraram que das 56 novas amostras selecionadas, 45 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Phytomonas* e 11 a outros gêneros de tripanossomatídeos (Tabela 6).

Como demonstrado em estudos anteriores, parte considerável dos isolados cultivados de frutos não pertence ao gênero *Phytomonas*. Resultados de estudos anteriores e desse trabalho, com base em diagnóstico molecular, confirmaram que isolados de tomate, amora, tangerina, abobora, feijão entre outras, podem pertencer a outros gêneros tais como *Herpetomonas*, *Angomonas* e *Leptomonas* (Serrano et al., 1999a,b; Catarino et al., 2001; Fiorini et al., 2001). Infecções experimentais demonstraram que tripanossomatídeos de diversos gêneros além de *Phytomonas* se desenvolvem muito bem em tomates (Conchon et al., 1989; Camargo, 1999).

A prevalência de infecção por *Phytomonas* spp em hemípteros fitófagos é, de acordo com estudos prévios (Sbravate et al., 1989; Camargo et al., 1992; Serrano et al., 1999b), foi muito menor do que *Leptomonas*. Porém, como não existem métodos de diagnóstico específicos para os tripanossomatídeos de insetos, esses dados têm sido baseados principalmente em isolados obtidos em culturas que, com certeza, seleciona apenas aqueles que se adaptam ao meio e condições de cultivo utilizadas. *Phytomonas* spp estão entre os tripanossomatídeos mais difíceis de isolar em cultura, embora os isolados de frutos sejam mais facilmente cultiváveis do que os de látex e, principalmente, os de floema de palmeiras (Camargo, 1999).

O método Phy-SLPCR foi utilizado para a detecção de *Phytomonas* em amostras de plantas e insetos mantidas congeladas ou em esfregaços em lâminas (Teixeira et al., 2000; Godoi et al., 2002).

Nesse trabalho, esse método foi também empregado para a detecção de *Phytomonas* spp em amostras de tubos digestivos de hemípteros fitófagos preservados em etanol. De 27 amostras testadas, apenas 06 se revelaram positivas. Preparações de DNA dessas amostras positivas foram utilizadas para sequenciamento do gene gGAPDH.

Tabela 6 - Isolados de tripanossomatídeos, amostras de tubos digestivos de insetos fitófagos e látex e floema de plantas, analisados nesse estudo para identificação de *Phytomonas* sp.

PhySL-PCR		Hospedeiro		Origem geográfica	
		Família	espécie	Estado	País
PSC0001 ^{AD}	+	Aracaceae	<i>Cocos nucifera</i>	Bahia	BR
PSC0002 ^{AD}	+	Aracaceae	<i>Elaeis guineensis</i>		CO
TCC311E	+	Annonaceae	<i>Annona cherimola</i>	Granada	ES
PSC0005 ^{AD}	+	Euphorbiaceae	<i>Manihot esculenta</i>	Rondônia	BR
TCC347	+	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia hyssopifolia</i>	Rondônia	BR
TCC370	+	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia hyssopifolia</i>	Rondônia	BR
TCC347	+	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia hyssopifolia</i>	Rondônia	BR
TCC370	+	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia hyssopifolia</i>	Rondônia	BR
TCC067E	+	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia hyssopifolia</i>	Rio de Janeiro	BR
TCC216E	+	Solanaceae	<i>Solanum variabile</i>	São Paulo	BR
TCC218E	+	Solanaceae	<i>Solanum robustum</i>	São Paulo	BR
TCC223E	+	Solanaceae	<i>Solanum viarum</i>	São Paulo	BR
TCC224E	+	Solanaceae	<i>Solanum viarum</i>	São Paulo	BR
TCC230E	+	Solanaceae	<i>Solanum sp</i>	São Paulo	BR
TCC229E	+	Solanaceae	<i>Solanum viarum</i>	São Paulo	BR
TCC217E	+	Solanaceae	<i>Solanum variabile</i>	São Paulo	BR
TCC238E	+	Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i>	São Paulo	BR
TCC232E	+	Rutaceae	<i>Citrus bergamia</i>	Paraná	BR
TCC2287	+	Rutaceae	<i>Citrus sinensis</i>	Paraná	BR
TCC072	+	Fabaceae	<i>Cajanus flavus</i>	Paraná	BR
TCC2427	+	Pentatomidae	<i>Pellae stictica</i>	São Paulo	BR
TCC148E	+	Pentatomidae	<i>Arvelius albopunctatus</i>	São Paulo	BR
TCC418	+	Scutelleridae	<i>Pachycoris torridus</i>	São Paulo	BR
TCC2526	+	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Tolima	CO
TCC2428	+	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Minas Gerais	BR
TCC2687	+	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Zulia	VE
TCC2299	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	Sofala	MZ
TCC2328	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	Sofala	MZ
TCC2300	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	Sofala	MZ
TCC1903	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	Sofala	MZ
ISC0026 ^{AD}	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	Sofala	MZ
ISC0027 ^{AD}	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	Sofala	MZ
TCC393	+	Coreidae	<i>Phthia picta</i>	Rondônia	BR
ISC0029 ^{AD}	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	Mato Grosso	BR
ISC0030 ^{AD}	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	Mato Grosso	BR
TCC206E	+	Coreidae	<i>Phthia picta</i>	Paraná	BR
TCC207E	+	Coreidae	<i>Phthia picta</i>	Paraná	BR
TCC2274	+	Coreidae	<i>Phthia picta</i>	Rio de Janeiro	BR
TCC628	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
TCC2272	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
TCC2273	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
TCC2277	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
TCC2278	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
TCC2279	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
TCC2281	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
TCC2283	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
TCC2284	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
TCC2285	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
ISC0034 ^{AD}	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
ISC0033 ^{AD}	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
TCC2282	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR

TCC2275	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
TCC2610	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
TCC2611	+	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
PSC0003a	-	Aracaceae	<i>Elaeis guineensis</i>	Zulia	VE
PSC0003	-	Aracaceae	<i>Elaeis guineensis</i>	Zulia	VE
PSC0004	-	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia hyssopifolia</i>	Rondônia	BR
TCC64	-	Rosaceae	<i>Malus sp.</i>	Paraná	BR
TCC123E	-	Coreidae	<i>Fabriciella gonagra</i>	Paraná	BR
TCC2276	-	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
TCC2286	-	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
TCC2305	-	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	Sofala	MZ
TCC2469	-	Alydidae	<i>Hyalymenus sp</i>	Tolima	CO
TCC2486	-	Pyrrhocoridae	<i>Dysdercus sp</i>	Panamá	PA
TCC2556	-	Alydidae	<i>Neomegalotomus sp</i>	Tolima	CO
TCC2744	-	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
TCC2591	-	Alydidae	<i>Nariscus sp</i>	Moramanga	MG
TCC57	-	Coreidae	<i>Phthias picta</i>	Paraná	BR
ISC0024	-	Alydidae	<i>Riptortus sp</i>	Sofala	MZ
ISC0025	-	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Rio Grande do Norte	BR
ISC0028	-	Alydidae	<i>Neomegalotomus sp</i>	Minas Gerais	BR
ISC0031	-	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Tolima	CO
ISC0032	-	Pentatomidae	<i>Euschistus sp</i>	Mérida	VE
ISC0114	-	Coreidae	<i>Leptoglossus sp</i>	São Paulo	BR
ISC0115	-	Coreidae	<i>Leptoscelis sp</i>	Zulia	VE
ISC0116	-	Coreidae	<i>Crinocerus sp</i>	Tolima	CO
ISC0117	-	Pentatomidae	<i>Edessa rubromarginata</i>	Tolima	CO
ISC0118	-	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Zulia	VE
ISC0119	-	Pyrrhocoridae	<i>Odontopus sp</i>	Sofala	MZ
ISC0120	-	Coreidae	<i>Riptortus sp</i>	Sofala	MZ
ISC0121	-	Coreidae	<i>Phthias picta</i>	Rondônia	BR
ISC0122	-	Reduviidae	<i>Ricolla quadrispinosa</i>	Rondônia	BR
ISC0123	-	Reduviidae	<i>Arilus carinatus</i>	Rondônia	BR
ISC0124	-	Coreidae	<i>Phthias picta</i>	Rondônia	BR
ISC0125	-	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Rondônia	BR
ISC0126	-	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Rondônia	BR
ISC0127	-	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Zulia	VE
ISC0128	-	Coreidae	<i>Riptortus sp</i>	Zulia	VE
ISC0129	-	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Zulia	VE
ISC0130	-	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Zulia	VE
ISC0131	-	Coreidae	<i>Zica sp</i>	Zulia	VE
ISC0132	-	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Zulia	VE
ISC0133	-	Coreidae	<i>Hypselonotus sp</i>	Zulia	VE
ISC0134	-	Coreidae	<i>Chariesterus sp</i>	Zulia	VE
ISC0135	-	Coreidae		Zulia	VE

TCC (Trypanosomatidae Culture Collection); PSC (Plant Sample Collection); ISC (Insect Sample Collection); AD (Amostras Diretas); BR (Brasil); CO (Colômbia); ES (Espanha); VE (Venezuela); MZ (Moçambique); PA (Panamá); MG (Madagascar).

4.2 “Barcoding” e relacionamento filogenético entre isolados de *Phytomonas* de hemípteros fitófagos e plantas baseados em sequências da região V7V8 do gene SSU rRNA.

Foram amplificadas, por PCR, sequências da região variável V7V8 do gene SSUrDNA (700-800pb) de 47 isolados de hemípteros fitófagos e 48 de plantas previamente identificadas como pertencentes ao gênero *Phytomonas* pelo método Phy-SLPCR (Tabela 6). Essa sequência tem sido utilizada em nosso laboratório para “barcoding” de tripanossomatídeos de todos os gêneros e tem se revelado excelente para análises de relacionamento genético; resultados praticamente idênticos são obtidos quando comparamos a região V7V8 e o gene SSUrDNA inteiro (Teixeira et al., 2011;

Borghesan et al., 2013). Além disso, a maioria das sequências disponíveis de isolados de *Phytomonas*, sequenciados por outros grupos, é do gene SSUrDNA (inteiro ou partes). A comparação de todas as sequências disponíveis permite classificar os novos organismos sequenciados em gêneros e espécies, assim como pode sugerir novos gêneros e revelar espécies ainda não conhecidas.

Análises de todas as sequências de V7V8 SSUrDNA de isolados do gênero *Phytomonas* determinadas nesse trabalho, alinhadas com as disponíveis no GenBank, revelaram um considerável polimorfismo entre os isolados. O alinhamento das sequências resultou em dendograma com clados formados por isolados mais geneticamente relacionados, congruentes com grupos definidos inicialmente com base em polimorfismo de RAPD (Serrano et al., 1999a) e sequências de ITS rDNA (Dollet et al., 2012) (Figura 7A).

Portanto, as análises de sequências de SSUrDNA de um grande número de isolados de *Phytomonas* corroboraram os grupos definidos com base em um pequeno número de isolados utilizando outros marcadores. A comparação dessas sequências demonstrou que os grupos estão separados por divergências de sequências que variam de 2.0% a 6.0%. As divergências intra-grupos revelaram grande homogeneidade, com vários organismos apresentando sequências idênticas, principalmente dos grupos C e E. Os grupos D e B são os mais heterogêneos (Figura 7B).

Nessa análise, foram incluídos isolados da América do Sul (Brasil, Venezuela, Colômbia, Suriname, Guiana Francesa e Peru), Europa (França e Espanha) e África (Moçambique, Senegal e Gana). Da África, até o momento, apenas isolados de insetos de Moçambique foram sequenciados nesse estudo e duas sequências foram obtidas de insetos de Gana (Votypka et al., 2012). Apenas os isolados de Moçambique foram cultivados. O único isolado de planta da África sequenciado é de *Euphorbia hirta* do Senegal, aqui incluído no grupo D.

A inclusão de um grande número de isolados de insetos, de regiões tão distantes, ampliou consideravelmente a diversidade até então conhecida do gênero *Phytomonas*. Os novos isolados de Coreidae caracterizados nesse trabalho formaram um ramo separado do grupo A, que contém outros ramos de isolados de coreídeos da América do Sul. Um isolado do Brasil (TCC 418 de *Pachycoris torridus* da família Scutelleridae, agrupou com um isolado (Tryp sp G24) de Pentatomidae de Gana (África) (Votypka et al., 2012), formando um ramo separado no grupo B. Outros isolados do Brasil (TCC2427) e Gana (Tryp sp G24) apresentaram sequências tão divergentes que não foram agrupados; com a caracterização de novos isolados deverão formar novos clados de *Phytomonas*.

Figura 7 - "Barcoding" de trypanossomatídeos do gênero *Phytomonas*: **(A)** Análise de Máxima Parcimônia baseada em sequências do gene SSU rDNA (região V7V8) de isolados de plantas e insetos fitófagos do gênero *Phytomonas*. **(B)** Taxas de divergência entre os grupos estabelecidos na análise.

4.3 Análises filogenéticas baseadas nos genes de gGAPDH de tripanosomatídeos do gênero *Phytomonas*.

Os genes gGAPDH têm se revelado excelentes marcadores para estudos filogenéticos de tripanossomatídeos, permitindo alinhamentos confiáveis de sequências de organismos geneticamente distantes, em análises independentes, ou combinadas com sequências de SSU rRNA. Nossos estudos demonstraram que as sequências do gene gGAPDH são, em geral, mais divergentes do que as de SSUrDNA (Hamilton et al., 2004, 2007; Viola et al., 2009; Teixeira et al., 2011; Borghesan et al., 2013; Lima et al., 2012, 2013; Fermio et al., 2013). Por esses motivos, esse gene vem sendo empregado, juntamente com SSUrDNA, em todos os nossos estudos filogenéticos e taxonômicos.

Desde a primeira análise filogenética que incluiu apenas três isolados (Hollar, Maslov, 1997) o gênero *Phytomonas* tem sido considerado um grupo monofilético. Neste trabalho, para confirmar a monofilia desse gênero e melhor entender o relacionamento filogenético entre os grupos de *Phytomonas* e o posicionamento desse gênero em árvores filogenéticas da família Trypanosomatidae, sequências dos genes gGAPDH foram determinadas para praticamente todos os isolados de todos os grupos. Inferências filogenéticas foram geradas pelos métodos de máxima parcimônia (MP) máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (BI). Como grupo externo das análises, utilizamos sequências de espécies do gênero *Herpetomonas*, que foi estabelecido em estudos prévios como o grupo mais filogeneticamente relacionado com *Phytomonas* (Teixeira et al., 2011; Borghesan et al., 2012).

Todas as sequências de gGAPDH de isolados de *Phytomonas* formaram um grupo monofilético em todas as análises, sempre fortemente apoiado (100% bootstrap) (Figura 8A). Os resultados obtidos com esses genes corroboraram as análises baseadas com as sequências de V7V8 SSUrDNA, confirmando os 7 clados principais. As análises com as sequências mais variáveis de gGAPDH permitiram uma melhor avaliação da variabilidade genética no gênero *Phytomonas* e, principalmente, do polimorfismo intra-clados. Foram identificadas mais de 10 linhagens filogenéticas separadas por grandes distâncias genéticas, algumas agrupadas em um mesmo clado.

Pela primeira vez, foi possível estabelecer relações filogenéticas entre os grupos de *Phytomonas*, que foram separados em dois grandes clados principais: um contendo os clados B, C, E e F, e o outro formado pelos clados A, D e H, apesar de grande divergência do clado H. Entretanto, o posicionamento desses clados na filogenia do gênero ainda não foi bem resolvido (Figura 8A).

A comparação entre sequências de gGAPDH mostrou que os grupos de *Phytomonas* estão separados por 3 a 14% de divergências de sequências. As divergências intra-clados corroboram a homogeneidade dos clados C e E (100% similaridade de sequências). Com o posicionamento de novos

isolados caracterizados nesse estudo, os grupos B e D apresentaram divergências internas bastante significativas (Figura 8B). O clado A apresentou subclados de sequências mais relacionadas, resolvendo grupos sugeridos com base nas sequências de SSUrDNA, separados por 0.5 - 1.0% de divergência, exceto isolado TCC 2282, separado por 3.0% de divergência de *P. serpens*.

Os resultados obtidos com as duas análises, SSUrDNA e gGAPDH, demonstraram que nos organismos do gênero *Phytomonas* o gene SSUrDNA apresenta baixa taxa de divergência, como observado para as espécies de tripanossomatídeos de insetos dos gêneros *Crithidia*, *Leptomonas* e *Leishmania*, que constituem a subfamília Leishmaniinae (Jirku et al., 2012), inicialmente denominada “slow evolving clade” (Merzlyak et al., 2001).

4.4 Análises filogenéticas baseadas em sequências combinadas dos genes SSUrDNA e gGAPDH de tripanossomatídeos do gênero *Phytomonas*.

As análises filogenéticas (MP, ML e BI) realizadas com sequências concatenadas de V7V8 SSUrDNA e gGAPDH de *Phytomonas* alinhadas com homólogos de outros gêneros da família Trypanosomatidae e disponíveis no GenBank, corroboraram a topologia obtida com as análise dos genes separados. Todos os isolados de plantas (floema, látex e fruto) e de insetos formaram um grupo monofilético (100% de bootstrap) (Figura 9). Nesse clado se agruparam as sequências de *P. serpens*, *Phytomonas* sp EM1 e *Phytomonas* HART obtidas do GenBank, que são as referências do gênero.

As análises baseadas em sequências combinadas segregaram consistentemente os isolados nos 7 grupos principais de *Phytomonas*. Como demonstrado em estudos realizados para outros gêneros, tais como *Angomonas* e *Herpetomonas* (Teixeira et al., 2011; Borghesan et al., 2012), análises combinadas resolvem melhor as topologias das árvores, com maiores valores de suporte para os clados correspondentes aos grupos definidos para *Phytomonas* (Figura 9).

As árvores filogenéticas inferidas com espécies representantes dos diversos gêneros de tripanossomatídeos corroboraram, com altos valores de suporte, o gênero *Herpetomonas* como grupo irmão de *Phytomonas*. O gênero *Herpetomonas* foi recentemente revisto com um grupo bastante relacionado com Diptera, tendo sido descrito em alguns mosquitos e diversas espécies de diversas famílias de moscas, incluindo muitas moscas, por exemplo, da família Callyphoridae, que se alimentam de néctar e de frutos (Borghesan et al., 2012). Espécies desse gênero têm sido isoladas de plantas tais como tomate (fruto) e abóbora (flor) (Fiorinni et al., 2001).

Os genomas inteiros de *Phytomonas* sp Hart e EM1 foram sequenciados, e inferências filogenéticas realizadas com grande número de genes. Entretanto, como apenas foram incluídos genes de espécies de *Trypanosoma* e *Leishmania*, que são os tripanossomatídeos com genomas disponíveis,

as análises posicionaram *Leishmania* como grupo irmão de *Phytomonas* (Porcel et al., 2014; Jaskowska et al., 2015).

Figura 8 - Árvore filogenética de trypanossomatídeos do gênero *Phytomonas* isolados de hospedeiros vegetais e insetos fitófagos (A) Análise de Máxima Verossimilhança baseada em sequências do gene gGAPDH de isolados de plantas e insetos fitófagos do gênero *Phytomonas*. (B) Taxas de divergência entre os grupos estabelecidos na análise.

Figura 9 - Posicionamento filogenético de isolados de plantas e hemípteros fitófagos pertencentes ao gênero: Análise de Máxima Verossimilhança baseada em sequências combinadas dos genes SSUrDNA e gGAPDH de isolados do gênero *Phytomonas*.

4.5 Diversidade genética baseada em sequências de ITS rDNA de isolados do gênero *Phytomonas*.

Sequências de ITS rDNA são mais polimórficas do que as de SSUrDNA e gGAPDH para todos os tripanossomatídeos comparados até o momento (Teixeira et al, 2011; Borghesan et al., 2012), sendo úteis na identificação de linhagens e genótipos de uma determinada espécie. Estudos prévios de nosso laboratório demonstraram que o polimorfismo de sequências de ITS rDNA permite separar os isolados de *Phytomonas* nos 6 grupos definidos por RAPD (Serrano, tese). Posteriormente, sequências de ITS rDNA de novos isolados ampliou o número de grupos para 11, embora alguns grupos sejam representados por apenas uma sequência (Dollet et al, 2012). Entretanto, os estudos revelaram uma grande concordância com os grupos definidos por padrões de RAPD (Serrano et al., 1999a). Resultados desse trabalho demonstraram que análises baseadas nos genes SSUrDNA e gGAPDH apresentam clados congruentes com os grupos definidos por RAPD e ITS rDNA (Serrano et al., 1999a; Dollet et al., 2012).

Uma vez que alguns grupos de *Phytomonas* só foram definidos com sequências de ITS rDNA (Dollet et al., 2012), que representa o maior número de sequências disponíveis no GenBank de isolados de *Phytomonas*, decidimos sequenciar ITS rDNA dos isolados de nossa coleção para comparar com todos os demais. Com esse objetivo, sequências de ITS (ITS1 + 5.8S + ITS2) rDNA foram determinadas para 47 isolados de plantas e insetos fitófagos do gênero *Phytomonas*, previamente posicionados (neste trabalho) em árvores filogenéticas.

As sequências obtidas de ITS rDNA foram alinhadas com todas as disponíveis no GenBank (Dollet et al., 2012). A topologia do dendrograma inferido demonstra, mais claramente, a grande diversidade encontrada no gênero *Phytomonas*, com a presença de diversos grupos, subgrupos e genótipos. Os grupos principais concordam com os clados definidos com sequências de SSUrDNA e gGAPDH. Foram corroborados os dois grandes clados de *Phytomonas*, assim como as relações mais próximas entre os grupos A e D, e um maior relacionamento entre os grupos B, C, E e F (Figura 10).

Nas divergências entre grupos baseada em sequências de ITS rDNA os valores variaram de 18% (entre C e F) a 45% (entre B e D). Curiosamente, as maiores divergências foram observadas entre D e os grupos B e G, ambos constituídos por sequências de isolados de euforbiáceas. Foi possível observar polimorfismos entre isolados que apresentaram sequências idênticas de SSUrDNA e gGAPDH em todos os grupos, revelando assim um grande número de genótipos dentro de cada grupo (Figura 10).

Figura 10 - Análise de Máxima Parcimônia baseado em sequências do gene ITS rDNA do gênero *Phytomonas* de plantas e insetos fitófagos

4.6 Grupos de *Phytomonas* definidos com sequências de SSUrDNA, gGAPDH e ITSrDNA.

Análises filogenéticas baseadas em sequências de V7V8 SSUrDNA, gGAPDH e ITS rDNA de isolados de plantas e insetos do gênero *Phytomonas* definiu dois grandes clados principais formados por, no mínimo, 7 clados consistentes em todas as análises. Apesar do grande número de isolados analisados, o número de clados bem resolvidos corroborou grupos já estabelecidos em estudos anteriores (Serrano et al, 1999a; Dollet et al., 2000, 2012; Sturm et al., 2007). Entretanto, ao contrário desses estudos anteriores que criaram novos grupos simplesmente separando isolados com pequenas divergências, no nosso estudo os clados foram definidos pelo valor de suporte incluindo sequências mais divergentes, porém, de isolados filogeneticamente relacionados. Dos estudos anteriores, apenas o baseado em análises de padrões de RAPD incluiu isolados de insetos fitófagos (Serrano et al., 1999a). Com esse trabalho, observamos que isolados de insetos são amplamente distribuídos entre os grupos indicando, inclusive, a formação de novos grupos ainda não descritos (Figuras 7, 8, 10).

Estudos filogenéticos prévios sugeriram a existência de grupos de isolados relacionados com floema, látex ou frutos e, inclusive, propunham a separação dos isolados de frutos e látex dos de floema, que corresponderiam ao “verdadeiro” gênero *Phytomonas* (Marín et al., 2008). Com esse primeiro estudo abrangente do gênero *Phytomonas*, ficou comprovado que essa divisão não tem nenhum suporte filogenético. Isolados de plantas laticíferas foram distribuídos em clados pouco relacionados. Por exemplo, o clado D formado por isolados de diferentes espécies de eufórbias se mostrou, em todas as análises, mais relacionado com o clado A, que contém apenas um isolado de euforbiácea; o clado E, formado por isolados de solanáceas, foi posicionado próximo dos clados B e F de euforbiáceas. Isolados de uma mesma planta, foram distribuídos em dois grupos pouco relacionados: tomate, A e C; *Euphorbia hirta*, B, D e G (Figura 10).

Enquanto alguns clados apresentaram, até o momento, certo grau de associação com a origem geográfica, por exemplo, clado B (Suriname – região Amazônica) e C (Espanha). Outros compreendem isolados de regiões distantes e, até mesmo, de diferentes continentes como os clados A e D. Com esse estudo, isolados de insetos agruparam com isolados de plantas de quase todos os clados, exceto os clados H e F. Os clados estabelecidos com esse estudo foram detalhados a seguir:

]

4.6.1 Clado A de *Phytomonas*

Esse clado é composto por 57 isolados, de várias procedências geográficas e hospedeiras, sendo o que apresenta o maior número de isolados, provavelmente, porque é o mais abundante, além de ser muito mais fácil de isolar em cultura (Tabela 6). O grupo A inclui *P. serpens* e *P. mcgheeii*,

respectivamente, espécies descritas em tomate e milho. A comparação de sequências de V7V8 SSUrDNA e gGAPDH das duas espécies revelou que elas são muito similares (0.5% de gGAPDH), sugerindo que *P. mcghee* deve ser revisto taxonomicamente.

Das 57 amostras analisadas do grupo A, 14 apresentam sequências de gGAPDH idênticas ou muito similares à de *P. serpens*; esses isolados foram obtidos de plantas das famílias Solanaceae (tomate), Poaceae (milho), Fabaceae (feijão) e Rutaceae (bergamota e laranja), coletadas no Brasil (São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná). Apenas um isolado de Euphorbiaceae do Peru foi agrupado nesse clado. Os 43 isolados de insetos desse grupo foram obtidos de insetos da família Coreidae (gêneros *Phthia*, *Leptoglossus* e *Hypselonotus*) capturados no Brasil (Estados de Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rondônia e Amazonas), Venezuela, Colômbia e Moçambique (Figura 11).

Figura 11 - Diversidade e distribuição geográfica dos isolados do clado A. Candidatos a novas espécies (★)

Inferências filogenéticas com todas as sequências analisadas demonstraram que o clado A compreende diversos subclados (Figura 12).

Figura 12 - Dendograma dos isolados do clado A com divisões em subgrupos, destacando os isolados selecionados para análises morfológicas(★).

Nas análises baseadas no gene gGAPDH, esses subclados foram separados por divergências entre 0.5% e 1.0%: Subclado A1, corresponde ao grupo que contém a espécie-referência *P. serpens* (tomate), outros isolados de tomate e um isolado de *Solanum viarum*, além de isolados de coreídeos (*Leptoglossus* e *Phthia*), todos do Brasil. Subclado A2, formado por isolados de coreídeos (*Hypselonotus* sp) do Brasil e Venezuela. Subclado A3, composto somente por isolados de coreídeos

(*Leptoglossus* sp) de Moçambique. Subclado A4, formado por isolados de bergamota e de coreídeos (*Leptoglossus* sp e *Phthia*) do Brasil. Subclado A5, contendo *P. macgheeii* (milho) e isolados de tomate, feijão e laranja, além do isolado Jma de euforbiácea do Perú; esse grupo compreende também isolados de coreídeos (*Leptoglossus* e *Phthia*) do Brasil (SP, PR e MG).

As divergências de sequências de gGAPDH entre o subclado A1, que contém *P. serpens*, e os subclados A2-A5 ficaram em torno de 1.0%, exceto o isolado TCC 2282, separado por 3.0% de divergência de sequência de *P. serpens*. Foram selecionados isolados representantes dos diferentes subclados para análises morfológicas (resultados apresentados no item 4.3).

4.6.2 Clado B de *Phytomonas*

Esse grupo é formado por 7 isolados, sendo 5 de plantas laticíferas das famílias Apocynaceae, Euphorbiaceae e Asclepiadaceae do Suriname (*Rhabdadenia biflora*, *Allamanda cathartica*, *Mandevilla scabra*, *Euphorbia hirta* e *Blepharodon nitidus*) (Figura 13). Esses flagelados constituem um grupo extremamente homogêneo com total similaridade de sequências de SSUrDNA e gGAPDH. A grande proximidade filogenética foi confirmada pela alta similaridade de sequências de ITS rDNA (Dollet et al., 2012). Como nenhuma espécie foi nomeada nesse grupo até o momento, adotamos como referência do grupo o isolado TCC083E de *Allamanda cathartica*, que deverá ser descrito como uma nova espécie de *Phytomonas*.

Os isolados de insetos (TCC167E e 418) incluídos com nossas análises no clado B, embora em ramo separado, foram obtidos de hemípteros da família Coreidae, *Podisus* sp capturado em Manaus, Amazônia Brasileira, e *Pachycoris torridus* capturado em São Paulo, estado de São Paulo. Interessantemente, o isolado de *Podisus* sp. da Amazonia (TCC 167) se mostrou muito mais relacionado com os isolados de plantas do Suriname (0.8% de divergência de sequência de gGAPDH). Portanto, é possível que *Podisus* sp sejam vetores de fitomonas de eufórbias do Suriname. O isolado de *Pachycoris torridus* (TCC 418) de São Paulo foi separado do isolado TCC 167 por 2.6% de divergência de gGAPDH, enquanto dos isolados de euforbiáceas esse isolado divergiu ~ 2.6% na sequência do gene gGAPDH. Portanto, as sequências de gGAPDH de dois isolados de insetos posicionados no clado B divergiram significativamente das sequências idênticas dos flagelados das plantas laticíferas, o que nos permite reconhecer o isolado TCC418 como candidato uma nova espécie de *Phytomonas*. Por esse motivo, esse isolado foi selecionado para análises morfológicas.

Figura 13- Diversidade e distribuição geográfica dos isolados do clado B. Candidatos a novas espécies (★)

4.6.3 Clado C de *Phytomonas*

O grupo C foi composto por 4 isolados de frutos, todos da Espanha, de cherimólia (*Annona cherimolia*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e também do fruto do trevo de três folhas (*Trifolium glomeratum*) (Figura 14). Esses isolados apresentaram padrões de kDNA muito semelhantes e apenas pequenas diferenças bioquímicas (Fernandez-Becerra et al., 1996). Esses flagelados foram isolados no Sudeste da Espanha, onde o mesmo grupo de pesquisadores também isolou *Herpetomonas samuelpeessoai* de tomates (Marin et al., 2007).

As sequências de V7V8 SSU rRNA e gGAPDH obtidas com esse trabalho mostraram que os isolados da Espanha são idênticos, todos representando uma só espécie de *Phytomonas*, confirmando que uma só espécie de *Phytomonas* pode parasitar distintas espécies vegetais como observamos para isolados do clado A. Adotamos como referência do grupo C o isolado TCC 299E de cherimólia (*Annona cherimolia*), que deverá ser descrito como uma espécie de *Phytomonas*, com esse trabalho, validada por análises filogenéticas. Esse isolado já foi caracterizado morfológicamente, assim como o de tomate, e não foram encontradas diferenças entre eles, enquanto diversas peculiaridades foram observadas por comparação com *P. serpens* (Sanchez-Moreno et al., 1995).

É interessante notar que os flagelados do clado C da Espanha, inclusive o de tomate, são filogeneticamente mais relacionados com os isolados do clado E, formado por flagelados obtidos exclusivamente de solanáceas silvestres do Brasil, do que de *P. serpens*, de tomate do Brasil. Portanto,

solanáceas podem ser infectadas por isolados dos clados A, C e E. *Solanum lycopersicon* (tomate) foi encontrado infectado por, pelo menos, duas espécies diferentes de *Phytomonas*: *P. serpens* no Brasil e *Phytomonas* sp TCC 305E na Espanha.

Figura 14 - Diversidade e distribuição geográfica dos isolados do clado C. Candidato a nova espécie (★)

4.6.4 Clado D de *Phytomonas*

Esse clado compreende 8 isolados, sendo 6 de plantas da família Euphorbiaceae de diversas regiões: Rondônia e Rio de Janeiro no Brasil, França e Índia, além de duas sequências obtidas do GenBank (*P. sp.* EM1 da França e *P. sp.* E.hi. Se do Senegal) (Figura 15). No clado D, anteriormente formado apenas por isolados de Euphorbiaceae da França (*E. pinea* and *E. characias*), Senegal (*E. hirta*) e Índia (*E. hirta*), foram incluídos dois isolados de *Euphorbia hyssopifolia* da Amazônia brasileira (Rondônia). Esses isolados apresentam sequências de SSU rRNA e gGAPDH muito similares, compatíveis com genótipos de uma mesma espécie, exceto o isolado do Senegal com divergência suficiente para ser considerado um táxon distinto. A mais provável explicação para essa elevada similaridade de sequências de isolados de diferentes continentes deve ser o cosmopolitismo das espécies de eufórbias hospedeiras de isolados do grupo D, embora sejam originalmente plantas de diferentes origens geográficas.

Nesse grupo, foram também posicionados isolados similares geneticamente (0.3% de divergência de gGAPDH) de insetos coreídeos da Colômbia (Oeste da Cordilheira dos Andes) e da Amazônia Brasileira (Amazonas), ambos do gênero *Hypselonotus* (TCC 170E e 2526). Entretanto,

esses isolados apresentam relevante divergência (3.7%-3.4) comparados os isolados de euforbiácea do Brasil e da Europa constituindo, assim, uma nova espécie de *Phytomonas*.

Adotamos o isolado EM1 como referência do grupo por dois motivos: foi o primeiro isolado filogeneticamente posicionado nesse grupo; o genoma deste isolado foi totalmente sequenciado (Porcel et al., 2014). Esse isolado deve ser nomeado com uma espécie definida filogeneticamente. Nesse estudo, selecionamos o isolado TCC 347 para caracterização morfológica (figura 22 do item 4.8).

Figura 15 - Diversidade e distribuição geográfica dos isolados do clado D. Candidatos a novas espécies (★)

4.6.5 Clado E de *Phytomonas*

O clado E foi formado por 15 isolados de São Paulo parasitas de diferentes espécies de plantas, de diversas espécies silvestres da família Solanaceae coletadas em um perímetro de 200 km da cidade de São Paulo (Figura 16). O clado E, previamente definido por RAPD (Serrano et al., 1999a), apresentou forte correlação com a região geográfica de origem (São Paulo) e com espécies do gênero *Solanum*. Foram posicionados nesse clado isolados de *S. variable*, *S. robustum*, *S. viarum*, *S. americanum* e *S. eriatum*. Com esse trabalho, um isolado (TCC 148E) de hemíptero Pentatomidae, *Arvelius albopunctatus* também capturado em São Paulo, apresentou sequências idênticas às dos flagelados de solanáceas.

Os flagelados deste grupo apresentam sequências de V7V8 SSUrDNA e gGAPDH idênticas, indicando que constituem uma única nova espécie de *Phytomonas* (figuras 07 e 08). Apenas um isolado (TCC 227E) apresentou uma pequena divergência na análises de sequências de ITS rDNA e pode ser considerado um genótipo diferente dessa espécie (Figura 10). Os resultados das análises do isolado de *Arvelius albopunctatus* corroboraram sugestão de que esse inseto deveria ser vetor de

Phytomonas entre solanáceas (Camargo et al., 1990). É importante lembrar que Solanáceas são hospedeiras de flagelados dos clados A, C e E, que são separados por grandes divergências de seqüências de gGAPDH: 9% entre A e E ou A e C e 3% entre os clados C e E.

Figura 16 - Diversidade e distribuição geográfica dos isolados do clado E. Candidatos a novas espécies (★)

4.6.6 Clado F de *Phytomonas*

O clado F foi formado por apenas dois isolados de mandioca, planta da família Euphorbiaceae de origem Sul Americana. Os dois isolados são do Brasil: *P. francai* do Espírito Santo, sudeste do Brasil, que foi isolada em cultura, e o isolado PSC005, sequenciado diretamente de amostra de látex de mandioca de Rondônia, Amazônia brasileira (Figura 17).

P. francai isolada de *Manihot esculenta* foi obtida de planta doente, em uma grande epidemia de mandioca, com clorose das folhas e atrofia das raízes, seguida da destruição de grandes plantações do cultivar Unha em 1986 no Espírito Santo (Katajima et al., 1986). Dezoito anos depois, nosso grupo obteve de mandiocas examinadas em Monte Negro, Rondônia, um isolado (PSC 005) que apresentou seqüências muito similares as de *P. francai*. As plantas examinadas em Monte Negro não apresentaram nenhum sinal de doença nas folhas e raízes, mesmo com acompanhamento das plantas por 22 dias. Beaurepaire Aragão (1927) no Rio de Janeiro e Siqueira-Jaccoud (1955) na Amazônia já

havam descrito a presença de flagelados no látex de mandioca sem qualquer sinal de doença (Camargo, 1999). Desta forma, assumindo que *P. francai* é de fato o agente etiológico da atrofia das raízes da mandioca este fato sugere que, além do parasita, outros fatores são necessários ao desenvolvimento da doença.

Não se conhece o inseto vetor de *P. francai*. Neste trabalho, caracterizamos um isolado (TCC 2427), de *Pellae stricta* (Pentatomidae), que apresentou sequência de gGAPDH 97% similar a de *P. francai*. Porém, não foi possível resolver a posição desse isolados em nenhum dos grupos bem definidos.

Figura 17 - Diversidade e distribuição geográfica dos isolados do clado F.

4.6.7 Clado H de *Phytomonas*

Esse grupo contém, exclusivamente, isolados de *Phytomonas* obtidos de palmeiras, dendezeiros e coqueiros. Antes desse trabalho, apenas Hart 1, isolada de coqueiro da Guiana Francesa, havia sido posicionada em árvores filogenéticas. Nesse estudo, incluímos também as sequências dos isolados PSC001 (coqueiro do Brasil) e PSC002 (palmeira dendê da Colômbia) (Figura 18). Todas as amostras são de plantas com patologias típicas de *Phytomonas* (Dollet, 1984; Camargo, 1999).

Concordando com análises prévias de sequências de ITS rDNA (Dollet et al., 2012), todos isolados formaram um só clado. As divergências entre as sequências de gGAPDH desse grupo são pequenas para justificar mais de uma espécie apenas com base nesse critério. Comparamos, juntando dados das três sequências disponíveis, duas amostras de palmeiras de dendê da Venezuela e Colômbia, e duas de coqueiro, Hart 1 da Guiana Francesa e PSC 001 do Brasil. É importante notar que

isolados de coqueiros e palmeiras não formaram grupos separados, sugerindo que as diferentes doenças descritas nessas plantas e atribuídas a *Phytomonas*, não são causadas por espécies diferentes desses flagelados.

Figura 18 - Diversidade e distribuição geográfica dos isolados do clado H. Candidato a nova espécie (★)

4.6.8 Isolados de *Phytomonas* não agrupados nos clados A-H

Apenas dois isolados classificados como *Phytomonas* incluídos nesse estudo não foram agrupados em nenhum dos sete clados principais: TCC2427 isolado de hemíptero fitófago pentatomídeo (*Pellae stictica*) capturado Minas Gerais, e TCC 067E, isolado de látex de *Euphorbia hyssophifolia* coletada no Rio de Janeiro.

A posição do isolado TCC 2427 nas filogenias não pode ser bem resolvida, apresentado diferenças de acordo com as sequencia e método empregado nas análises (Figuras 7, 8 e 10). Apenas foi bem estabelecida sua posição no grande grupo contendo os clados C, B, E e F (Figura 8). Quando analisamos as divergências de sequências, esse isolado se mostrou igualmente relacionado (3.0% de divergência de gGAPDH) com os membros dos clados C, E e F.

O isolado TCC 067 também variou de posição nas diferentes análises filogenéticas, não pode ser agrupado, com suporte estatístico, em nenhum dos dois grandes grupos. As divergências de sequências de gGAPDH revelaram valores igualmente elevados, de 10 a 13%, entre esse isolado e os clados A-H, sendo o clado A o mais divergente (13%) (Figura 8).

4.7 Identificação de isolados candidatos a novas espécies de *Phytomonas*

O posicionamento nas árvores filogenéticas é o primeiro passo para a classificação de tripanossomatídeos em gêneros e definição de espécies dentro de cada gênero. Divergências de gGAPDH superiores a 1-3% tem sido consideradas suficientes para separar espécies de tripanossomatídeos dependendo do gênero (Teixeira et al., 2011; Borghesan et al., 2013). Portanto, análises de diferentes marcadores moleculares, taxas de divergências, características morfológicas e de cultivo devem ser utilizadas em conjunto, levando em consideração os parâmetros adotados por especialistas, na identificação de espécies. Qualquer que seja o gênero analisado, as primeiras etapas devem ser o posicionamento em árvores filogenéticas e análises de divergência de sequências de SSU rRNA e gGAPDH. Uma vez demonstrado que um novo isolado difere o suficiente das espécies já nomeadas, esse candidato a nova espécie deve ser caracterizado morfolologicamente por microscopia de luz e eletrônica de varredura e transmissão. Com esse trabalho, identificamos diversos candidatos a novas espécies de *Phytomonas* (indicados na descrição de cada clado) e iniciamos a caracterização do comportamento em cultura e da análise morfológica, que serão utilizadas, futuramente, na complementação da descrição de diversas novas espécies do gênero *Phytomonas*.

4. 8 Comportamento em cultura e caracterização morfológica de *Phytomonas* spp. de hemípteros fitófagos e plantas.

Podemos classificar os isolados de *Phytomonas* de plantas e insetos de acordo com o crescimento em cultura. Em relação aos isolados de plantas, os resultados corroboraram dados obtidos em estudos anteriores. Dependendo da origem do flagelado (tecido da planta), o isolamento e cultivo “in vitro” apresentam diferentes níveis de dificuldade, isolados distintos tem requerimentos nutricionais e crescimento diferentes. Os isolados de floema são os mais exigentes, dificilmente isolados e cultivados apenas sobre monocamadas de células de insetos (Dollet et al., 2001; Sturn et al., 2007), tentativas de cultivo de *Phytomonas* de coqueiros não foram bem sucedidas em nosso laboratório. Os isolados de látex são um pouco menos exigentes quanto ao cultivo, mas ainda assim, difíceis de isolar e de crescimento irregular (Camargo, 1999; Marín et al., 2004; Miranda et al., 2004). Por outro lado, isolados de frutos são, em geral, fáceis de cultivar (Camargo, 1999; Catarino et al., 2001).

Comportamentos semelhantes aos descritos acima para isolados de plantas foram observados para os isolados de insetos, que diferem em cultivo dependendo do clado ao qual pertencem. De acordo com o descrito acima, a maioria dos isolados obtidos em cultura foi classificada no clado A. Considerando que insetos das espécies e famílias examinadas também podem ser encontrados

infectados por espécies de *Phytomonas* de outros clados, esses resultados sugerem uma seleção em cultura de isolados do clado A de *Phytomonas*. Nesse estudo, padronizamos um método para amplificação de *Phytomonas* diretamente a partir de amostras de plantas e insetos preservados em etanol. A utilização dessa metodologia em estudos de uma grande quantidade e variedade de amostras poderá revelar uma diversidade até então desconhecida no gênero *Phytomonas*.

Para análise morfológica foram selecionados isolados candidatos a novas espécies representativos dos grupos A, B, D e E, além de um isolado não agrupado. Os isolados foram cultivados em LIT e co-cultivados sobre monocamadas de células de insetos Hi-5 em meio TC100. Amostras das culturas foram utilizadas na confecção de esfregaços, fixados em lâminas com metanol e coradas com Giemsa. Embora os membros do gênero *Phytomonas* apresentem exclusivamente formas promastigotas, durante seu desenvolvimento nas plantas e nos insetos fitófagos, estes organismos apresentam grandes variações de formas e tamanhos (Jankevicius et al., 1989; Camargo, 1999).

O polimorfismo observado nas análises morfológicas dos flagelados obtidos em cultura não é tão acentuado quanto o encontrado nas formas presentes nas plantas. Em geral, os isolados em cultura apresentam formas promastigotas (a única forma apresentada pelas espécies de *Phytomonas*) que variam mais de acordo com o meio de cultivo e tempo de cultura do que entre os isolados. Em geral, as fitomonas apresentam formas longas, com um número crescente de torções no eixo longitudinal dos parasitas à medida que a cultura envelhece, especialmente quando cultivadas em Hi-5/TC100. Essas formas, embora mais frequentemente observadas em *Phytomonas* (Camargo, 1999), não são exclusivas deste gênero, sendo também observadas em espécies do gênero *Herpetomonas* (Borghesan et al., 2013). Entretanto, nessas condições de cultivo, isolados de espécies classificadas em diferentes clados apresentam algumas peculiaridades em relação à forma do corpo, variando no comprimento e na largura. Por exemplo, as espécies dos clados A e D apresentam formas promastigotas bastante finas e compridas, com maior número de torções. Os flagelados dos clados B e E são, em geral, menores e mais largos com um menor número de torções, porém, algumas formas longas e espiraladas semelhantes as das espécies dos clados A e D também são observadas. Apenas divisão celular por fissão binária longitudinal foi observada em isolados de todos os grupos. Quando analisados na fase estacionária, observamos maior polimorfismo entre as culturas.

Devido ao grande polimorfismo dependendo do meio de cultivo e fase da cultura e ausência de características morfológicas únicas e bem definidas de grupos e espécies, nosso estudo demonstrou, mais uma vez, que a morfologia é insuficiente para classificação de tripanossomatídeos de plantas e insetos no gênero *Phytomonas*, tanto ao nível de gênero quanto de espécie (Camargo, 1999).

Selecionamos fotografias de algumas culturas para ilustrar as formas observadas com diferentes isolados e o polimorfismo encontrado quando comparamos espécies diferentes de

Phytomonas, posicionada nos clados A, B, D e E, incluímos também um isolado TCC 2427 que não foi agrupado em nenhum dos clados definidos no gênero.

Figura 19. Formas promastigotas de cultura de isolados de *Phytomonas* do clado A, coradas com Giemsa, observadas por microscopia de luz (a, c, f, h, j, k, l) e microscopia eletrônica de varredura (b, d, e, g, i). Isolado TCC 2299 co-cultivado com uma camada de células de insetos Hi-5 em meio TC100 (a, b, e) ou meio LIT (c, d). Isolado TCC 628 em meio Hi-5/Tc100 (f, g), e em meio LIT (h, i). *Phytomonas serpens* (TCC 060E) (j). Isolados TCC 202E (k) e TCC 2428 (l). c; cinetoplasto, n; núcleo, f; flagelo. Barra = 10μm.

Figura 20. Formas promastigotas de cultura de isolados de *Phytomonas* do clado B, coradas com Giemsa, observadas por microscopia de luz (a, b, c, e, i) e microscopia eletrônica de varredura (d, f, g, h). Isolado TCC 418 cultivado em Hi-5/TC100 (a, d, f, h) e meio LIT (b, c, e, g). Isolado TCC 083E cultivado em Hi-5/TC100 (i). c; cinetoplasto, n; núcleo, f; flagelo. Barra = 10 μ m.

Figura 21. Formas promastigotas de cultura de isolados de *Phytomonas* do clado D, coradas com Giemsa, e observadas por microscopia de luz (a, c, f) e microscopia eletrônica de varredura (b, d, e). Isolado TCC 347 cultivado em Hi-5/TC100 (b, c, d, e) e meio LIT (a). Isolado TCC 051E cultivado em meio LIT (f) c; cinetoplasto, n; núcleo, f; flagelo. Barra = 10µm.

Figura 22. Formas promastigotas de cultura de isolados de *Phytomonas* do clado E, coradas com Giemsa e observadas por microscopia de luz (a, c, e) e microscopia eletrônica de varredura (b, d, f). Isolado TCC 148E cultivado em Hi-5/TC100 (a, b) e meio LIT (c, d). Isolado TCC 215E cultivado em meio LIT (e, f). Cinetoplasto (c); núcleo (n), flagelo (f). Barra = 10μm.

Figura 23. Formas promastigotas de cultura do isolado TCC 2427 de *Phytomonas*, coradas com Giemsa e observadas por microscopia de luz (a, b) e microscopia eletrônica de varredura (c, d, e). Os flagelados foram co-cultivados com uma camada de células de insetos Hi-5 em meio TC100 (a,b,c,d) ou meio LIT (e). Cinetoplasto (c); núcleo (n), flagelo (f). Barra = 10 μ m.

5 CONCLUSÕES

Neste estudo identificamos diversos novos isolados do gênero *Phytomonas* que foram, juntamente com isolados previamente identificados e parcialmente caracterizados, analisados com três marcadores moleculares: SSU rRNA, gGAPDH e ITS rRNA. Investigamos o repertório de espécies e genótipos e o posicionamento de grupos, assim como de todo o gênero em árvores filogenéticas da família Trypanosomatidae. Grupos de isolados desse gênero foram identificados por análises moleculares prévias de fragmentos de DNA amplificados por RAPD e sequências de ITS rDNA. Realizamos a primeira análise comparativa de sequências de SSU rRNA e gGAPDH (recomendadas para filogenia e taxonomia dos tripanossomatídeos) dos principais grupos que constituem o gênero *Phytomonas*. Para isso, caracterizamos 94 isolados obtidos de plantas e insetos fitófagos.

O gênero *Phytomonas* foi previamente dividido em 6-11 grupos, dependendo do marcador molecular utilizado e da amostragem. Neste estudo, corroboramos 7 clados (e sugerimos mais dois) apoiados em todas as análises filogenéticas: O clado A, formado principalmente por isolados de frutos e de hemípteros fitófagos da América do Sul e África. O clado B, parasitas de látex da Europa e dois isolados de insetos do Brasil. O clado C, isolados de plantas de famílias diferentes da Espanha. O grupo D, *Euphorbia* spp. da França, Índia, Senegal e Brasil. O grupo E, de várias espécies de Solanaceae e de um hemíptero do Brasil. O grupo F, restrito a *P. francai* de mandioca. O clado H, restrito a coqueiros e dendezeiros da América do Sul.

Inferimos o relacionamento filogenético entre os clados, confirmando a monofilia de *Phytomonas* e a proximidade com o gênero *Herpetomonas*. Portanto, *Phytomonas*, um gênero criado para acomodar todos, e exclusivamente, os tripanossomatídeos de plantas, foi confirmado como um táxon que compreende a maioria, mas não todos, os isolados de plantas, e também uma variedade de isolados de insetos hemípteros fitófagos, que são os vetores. As análises filogenéticas demonstraram que a proposta de manter apenas isolados de floema (clado H) no gênero *Phytomonas* não tem apoio filogenético: o gênero é formado por isolados de frutos, látex e floema e, além disso, isolados de frutos e de látex formaram clados distintos.

Este estudo gerou informações muito importantes para a classificação de isolados de insetos fitófagos no gênero *Phytomonas*. Verificamos que isolados desse gênero são bastante comuns na família Coreidae, especialmente no gênero *Leptoglossus*. Encontramos também insetos das famílias Pentatomidae e Scutelleridae infectados, porém, não encontramos nenhum inseto da família Pyrrhocoridae infectado com *Phytomonas*. Embora esta seja a família de hemípteros com maior prevalência de infecção por tripanossomatídeos, até o momento, todos os isolados foram classificados em outros gêneros. Confirmamos que o coreídeo *Phthia picta* pode ser vetor de *P. serpens* assim como

Leptoglossus. O pentatomídeo *Arvelius albopunctatus* pode desempenhar esse papel na transmissão de *Phytomonas* do clado E entre solanáceas.

Nossos resultados também confirmam o cosmopolitismo de *Phytomonas*, encontrado em diferentes continentes. Neste estudo, foram caracterizados os primeiros isolados cultivados de insetos africanos. Alguns clados foram formados apenas por isolados de uma determinada região geográfica. Por outro lado, isolados de regiões muito distantes foram agrupados em outros clados, provavelmente, porque algumas plantas hospedeiras, particularmente as solanáceas e euforbiáceas, têm distribuição global. Porém, é possível que algumas espécies de *Phytomonas* sejam endêmicas, como *P. francai* da mandioca e *P. staheli* de palmeiras.

Este estudo forneceu também importantes informações sobre a taxonomia do gênero *Phytomonas*. Analisamos filogeneticamente as três únicas espécies nomeadas disponíveis até o momento, *P. francai*, *P. serpens* e *P. mcgheeii*, todas baseadas nos parâmetros taxonômicos de hospedeiro de origem, morfologia e comportamento biológico, inclusive presença ou ausência de patogenicidade. A partir dos resultados deste trabalho, identificamos diversos isolados candidatos a novas espécies. Os clados A-H contêm, no mínimo, uma espécie diferente de *Phytomonas* por clado. Certamente, um dos novos isolados do clado A corresponde a uma espécie nova, diferente de *P. serpens*, e alguns dos subclados podem corresponder a outras espécies. Duas espécies foram identificadas no clado B e outras duas no clado D, e os dois isolados não agrupados certamente pertencem a novas espécies. Por outro lado, as divergências internas dos clados C, E, F e H indicam que cada um constitui uma única espécie. Dessa forma, com os resultados obtidos neste trabalho, pudemos definir mais de 10 fortes candidatos a novas espécies de *Phytomonas*, todos de culturas criopreservadas em nossa coleção. Todas essas espécies serão oportunamente descritas e nomeadas.

Finalmente, questionamos um aspecto importante sobre a patogenicidade de *Phytomonas* ao encontrarmos em Rondônia, Amazônia brasileira, mandiocas perfeitamente normais, sem nenhuma clorose das folhas e com exuberante desenvolvimento das raízes, embora infectados com grande quantidade de flagelados no látex identificados como *P. francai*. Esse achado sugere que outros fatores associados, até mesmo independentes de *P. francai*, são necessários para a manifestação da doença reportada no Espírito Santo em 1986.

REFERÊNCIAS*

- Aders WM. *Herpetomonas aspongopi*. Parasitol. 1909; 2:202-7.
- Agabian N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. Cell. 1990 Jun 29;61(7):1157-60.
- Aragão HB. Pesquisas sobre *Phytomonas françai*. Rev Biol Hig. 1931; 2:185-9.
- Attias M, Resende MLV, Bezerra JL, De Souza W. Occurrence of *Phytomonas staheli* in *Roystonea regia* (royal palm). Microelectron Biol Cel. 1989;13:183-90.
- Batistoti M, Cavazzana Jr M, Serrano MG, Ogatta SF, Bacchan GC, Jankevicius JV, Teixeira MMG, Jankevicius SI. Genetic variability of trypanosomatids isolated from phytophagous hemiptera defined by morphological, biochemical, and molecular taxonomic marker. J. Parasitol. 2001; 87(6):1335-41.
- Bhattarai NR, Auwera GV, Khanal B, Doncker S, Rijal S, Dias ML, Uranw S, Ostyn B, Praet N, Speybroeck N, Picado A, Davies C, Boelaert M, Dujardin JC. PCR and direct agglutination as *Leishmania* infection markers among healthy Nepalese subjects living in areas endemic for Kala-Azar. Trop Med Int Health. 2009;14(4):404-11.
- Borghesan TC, Ferreira RC, Takata CSA, Campaner M, Borda CC, Paiva F, Milder RV, Teixeira MMG, Camargo EP. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. Protist. 2013; 164 (1):129-52.
- Brener Z; Andrade Z, Barral NM. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2000. 215 p.
- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. Int J Parasitol. 2001;31:1218-26.
- Camargo EP. *Phytomonas* and other trypanosomatids parasites of plants and fruit. Adv. Parasitol. 1999;42:30-112.
- Camargo EP, Wallace G. Vectors of plant parasites of the genus *Phytomonas* (Protozoa, Zoomastigophorea, Kinetoplastida). Adv Dis Vector Res. 1994;10:333-59.
- Camargo EP, Sbravate C, Teixeira MMG, Uliana SR, Soares MBM, Affonso HT, Floeter-Winter. Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids. J Parasitol. 1992;78:40-8.
- Camargo EP, Kestelein P, Roitman I. Trypanosomatid parasites of plants (*Phytomonas*). Parasitol Today. 1990;6:22-5.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Camargo EP, Silva S, Roitman I, De Souza W, Jankevicius JV, Dollet M. Enzymes of ornithine-arginine metabolism in trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. J Protozool. 1987;34:439-41.

Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1964;6:93-100.

Campaner M, Kastelein P, Sanchez-Moreno M, Teixeira MMG, Camargo EP. Different *Phytomonas* spp. circulate among Solanaceae [Abstract]. Mem I Oswaldo Cruz. 1996;91:101.

Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? Microbes Infect. 2003 Nov;5(13):1231-40.

Campbell DA, Sturm NR, Yu MC. Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. Parasitol Today. 2000 Feb;16(2):78-82.

Catarino LM, Serrano MG, Cavazzana M, Almeida ML, Kaneshima K, Campaner M, Jankevicius JV, Teixeira MMG, Itow-Jankevicius S. Classification of trypanosomatids from fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates. FEMS Microbiol. 2001;201:65-72.

Cavalier-Smith T. Only six kingdom of life. Proc R Soc Lond B. 2004;271:1251-62.

Cavalier-Smith T. A revised six kingdom-system of life. Biol Rev. 1998;73:203-66.

Cavazzana MJr, Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira AC, Veludo HH, Viola LB, Campaner M, Nunes VL, Paiva F, Coura JR, Camargo EP, Teixeira MM. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (SSUrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. Int. J. Parasitol. 2010, 40(3):345-55.

Chaumont F, Schanck AN, Blum JJ, Opperdoes FR. Aerobic and anaerobic glucose metabolism of *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. Mol Biochem Parasitol. 1994;67:321-31.

Clark CG, Martin DS, Diamond LS. Phylogenetic relationships among anuran trypanosomes as revealed by riboprinting. J Eukaryot Microbiol. 1995;42:92-6.

Conchon I, Campaner M, Sbravate C, Camargo EP. Trypanosomatids, other than *Phytomonas* spp., isolated and cultured from fruit. J Protozool. 1989;36:412-4.

Cupolillo E, Grimaldi JR, Momem H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol. 1995;73:145-55.

De Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. Mem I Oswaldo Cruz. 2009;104:89-100.

De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. Kinetop Biol Dis. 2002;31;1(1):3.

Deschamps P, Lara E, Marande W, Lopez-García P, Ekelund F, Moreira D. Phylogenomic analysis of kinetoplastids supports that trypanosomatids arose from within bodonids. Mol Biol Evol. 2011;28(1):53-8.

Deschamps S, Rotashak JP, Biddle P, Thureen D, Farmer A, Luck S, Beatty M, Nagasawa N, Michael L, Llaca V, Sakai H, May G, Lightener J, Campbell MA. Rapid genome-wide single nucleotide polymorphism discovery in soybean and rice via deep resequencing of reduced representation libraries with the illumine genome analyzer. *T Plant Gen.* 2010;42:92-6.

Dollet M, Sturm NR, Campbell DA. The internal transcribed spacer of ribosomal RNA genes in plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) resolve 10 groups. *Infect, Genet Evol.* 2012;12:299-308.

Dollet M, Sturm NR, Campbell DA. The spliced leader RNA gene array in phloem-restricted plant trypanosomatids (*Phytomonas*) partitions into two major groupings: epidemiological implications. *M M Gen.* 2001; 122:289-297.

Dollet M. Phloem-restricted trypanosomatids form a clearly characterised monophyletic group among trypanosomatids isolated from plants. *J Parasitol.* 2001;31:459-67.

Dollet M, Sturm NR, Sanches-Moreno M, Campbell DA. 5S ribosomal RNA gene repeat sequences define at least eight groups of plant trypanosomatids (*Phytomonas* spp.): phloem-restricted pathogens form a distinct section. *J. Euk Mic.* 2000; 47(6):569-74.

Dollet M, Gargani D, Muller E, Vezian K. Development of a method for the acquisition of *in vitro* cultured plant trypanosomatids (*Phytomonas* spp.) by *Lincus croupius* (Pentatomidae). ANPP-Fourth International Conference on Agricultural Pests. 1997; 122:289-97.

Dollet M. Identification and characterization of pest organisms: a plant trypanosomes case study. In: Hawksworth DL (ed.) *The identification and characterization of pest organisms*. Wallingford, UK: Cab International; 1994. p. 415-26.

Dollet M. Plant diseases caused by flagellate Protozoa (*Phytomonas*). *R Phytop.* 1984;22:115-32.

Dollet M, Gianotti J, Ollagnier, M. Observation de protozoaires flagellés dans les tubes cribles de palmiers à huile malades. *Ann NY Acad Sci.* 1977;284:643-5.

Donovan C. Kala-azar in Madras, especially with regard to its connexion with the dog and the bug (*Conorrhinus*). *Lancet.* 1909;177:1495-6.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science.* 2005;309:404-9.

Fermino BR, Viola LB, Paiva F, Garcia HA, de Paula CD, Botero-Arias R, et al. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. *Parasit Vectors.* 2013;6(1):313.

Fernandez-Becerra C, Osuna A, Muller E, Dollet M, Sanchez-Moreno M. Characterization of *Phytomonas* isolated from fruits by electrophoretic isoenzymes and kinetoplast-DNA analysis. *FEMS Microbiology Letters.* 1996 Oct; 145: 463-468.

Fernandes O, Teixeira MM, Sturm NR, Sousa MA, Camargo EP, Degraeve WM, et al. Mini-exon gene sequences define six groups within the genus *Crithidia*. *J Eukar Microbiol.* 1997 Nov-Dec;44(6):535-9.

Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degraeve WM, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol*. 1994 Aug;66(2):261-71.

Fernandes O, Degraeve W, Campbell DA. The mini-exon gene: a molecular marker for *Endotrypanum schaudinni*. *Parasitol*. 1993 Sep;107 (Pt 3):219-24.

Ferreira RC, De Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CSA, Barrett TB, Shaw JJ, Teixeira MMG. A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and Sandy flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazônia. *J Eukar Microbiol*. 2008;55:427-35.

Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CSA, Takeda GF, Teixeira MMG. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazônia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitol*. 2007;134: 1623-38.

Flegontov P, Votypka J, Skalicky T, Logacheva MD, Penin AA, Tanifuji G, et al. *Paratrypanosoma* is a novel earlybranching trypanosomatid. *Cur Biol*. 2013 23;23(18):1787-93.

Fothergill-Gilmore LA, Michels PAM. Evolution of glycolysis. *Progr. Biophys. Mol Biol*. 1993;59:105-235.

França C. La flagellose des euphorbes. *An Inst Past*. 1920;34:432-65.

Fiorini JO, Atilde OE, Takata CSA, Teofilo VM, Nascimento LC, Faria-e-Silva PM, Soares MJ, Teixeira MMG, De Souza W. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Herpetomonas samuelpessoai camargoi* n. subsp., a Trypanosomatid Isolated from the Flower of the Squash *Cucurbita moschata*. *J Eukaryot Microbiol*. 2001; 48(1):62–9

Geneious 4.8.5 software. Biomatters Limited 2009. (www.geneious.com).

Gibbs AJ. *Leptomonas serpens* n. sp. parasitic in the digestive tract and salivary glands of *Nezara viridula* (Pentatomidae) and in the sap of *Solanum lycopersicum* (tomato) and other plants. *Parasitol*. 1957;47:297-303.

Gibson W, Bingle L, Blendeman W, Brown J, Wood J, Stevens J. Structure and sequence variation of the trypanosome spliced leader transcript. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Apr 15;107(2):269-77.

Godoi MMI, Serrano MG, Teixeira MMG, Camargo EP. A PCR-based survey on *Phytomonas* (Euglenozoa: Trypanosomatidae) in phytophagous hemipterans of the Amazon region. *J. Eukaryot. Microbiol*. 2002;49:275-279.

Guerrini F, Cendrine S, Gargani D, Tibayrenc M, Dollet M. Na isoenzyme analysis of the genus *Phytomonas*, genetic, taxonomic and epidemiologic significance. *J Protozool*. 1992;39:516-521.

Gullan PJ, Cranston PS. The insects. An outline of entomology. 3 ed. Malden, MA: Blackwell Publishing; 2005. p. 529.

Hamilton PB, Adams ER, Njiokou F, Gibson WC, Cuny G, Herder S. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. *Infect Genet Evol*. 2009;9(1):81-6.

Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Mol Phylogenet Evol.* 2007;44:15-25.

Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *Int J Parasitol.* 2005a;35:431-43.

Hamilton PB, Stevens JR, Cooke B, Boag B, Holz P, Gibson WC. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. *Mol Ecol.* 2005b;14:3167-76.

Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson CW. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small ribosomal RNA. *Int J Parasitol.* 2004;34:1393-404.

Hannaert V, Opperdoes FR, Michels PA. Comparison and evolutionary analysis of the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from different Kinetoplastida, *J Mol Evol.* 1998, 47(6):728-738.

Hernández R, Rios P, Valdés AM, Piñero D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 1990;41:207-212.

Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature.* 1966;212:1385-6.

Hollar L, Maslov DA. A phylogenetic view on the genus *Phytomonas*. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;89:295-299.

Honigberg BM. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In: Ludvik J, Lom J, Vavra J (eds). *Progress in Protozoology*. New York : Academic Press; 1963. p. 68-75

Huitorel P, Pantaloni D. Bundling of microtubules 92~9122-9126 by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP. *Eur. J. Biochem.* 1985;150:265-9.

Hury A, Goldshmidt H, Tkacz ID, Michaeli S. Trypanosome spliced-leader-associated RNA (SLA1) localization and implications for spliced-leader RNA biogenesis. *Eukaryot Cell.* 2009;8(1):56-68.

Jankevicius SI, Almeida ML, Jankevicius JV, Cavazzana M, Attias M, De Souza W. Axenic cultivation of trypanosomatids found in corn (*Zea mays*) and in phytophagous hemipterans (*Leptoglossus zonatus* Coreidae) and their experimental transmission. *J Euk Microbiol.* 1993;40:576-581.

Jankevicius JV. Ciclo Biológico de *Phytomonas serpens*. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia da Escola Paulista de Medicina, São Paulo. 1992.

Jankevicius JV, Jankevicius SI, Campaner M, Conchon I, Maeda L, Teixeira MMG, Freymuller E, Camargo EP. The life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes. *J Protozool.* 1989;36:265-271.

Jankevicius JV, Jankevicius SI, Maeda LA, Campaner M, Conchon I, Carmo JB, Dutra-Menezes MCN, Menezes JR, Camargo EP, Roitman I, Traub-Csek YM, Borges MB, Moreira N. Ciclo Biológico de *Phytomonas*. Mem I Oswaldo Cruz. 1988;1:83-601.

Jaskowska E, Butler C, Preston G, Kelly S. *Phytomonas*: Trypanosomatids Adapted to Plant Environments. PLoS Pathog. 2015;11(1):E100448. doi:10.1371/journal.ppat.1004484

Jirku M, Yurchenko VY, Lukes J, Maslov DA. New species of insect trypanosomatids from Costa Rica and the proposal for a new subfamily within the Trypanosomatidae. J Eukaryot Microbiol. 2012;59(6):537-47.

Kastelein P, Camargo EP. Trypanosomatid protozoa in fruit of Solanaceae in southeastern Brazil. Mem I Oswaldo Cruz. 1990;85:413-7.

Kendall G, Wilderspin AF, Ashall F, Miles MA, Kelly JM. Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the 'hotspot' topogenic signal model. EMBO J. 1990;9(9):2751-8.

Kitajima EW, Vainstein MH, Silveira JSM. Flagellate protozoon associated with poor development of the root system of cassava in the Espírito Santo State, Brasil. Phytopathology. 1986;76:638-42.

Lafont A. Sur la presence d'un parasite de la classe des flagelles dans le latex de l'*Euphorbia pilulifera*. C. R. Seances Soc. Biol. 1909;66:1011-3.

Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. Eukaryot Cell. 2003;2(5):830-40.

Lima L, Espinosa-Alvarez O, Hamilton PB, Neves L, Takata CS, Campaner M, et al. Trypanosoma livingstonei: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the Trypanosoma cruzi clade. Parasit Vectors. 2013;6(1):221-36.

Lima L, Silva FM, Neves L, Attias M, Takata CS, Campaner M, De Souza W, Hamilton PB, Teixeira MMG. Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *erneyi* sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* and allied species. J Protist. 2012;163(6):856-72.

Lopes AH, Souto-Pradón T, Dias FA, Gomes MT, Rodrigues GC, Zimmermann LT, Silva TLA, Vermelho AB. Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. Open Parasitol J. 2010;4:30-59.

Maia Da Silva F, Junqueira AC, Campaner M, Rodrigues AC, Crisante G, Ramirez LE, et al. Comparative phylogeography of Trypanosoma rangeli and Rhodnius (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. Mol Ecol. 2007;16(16):3361-73.

Maia da Silva F, Noyes H, Campaner M, Junqueira AC, Coura JR, Anez N. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. Parasitology. 2004;129(5):549-61.

Marché S, Roth C, Philippe H, Dollet M, Baltz T. Characterization and detection of plant trypanosomatids by sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. Mol Biochem Parasitol. 1995;71:15-26.

- Marín C, Dollet M, Pagès M, Bastien P. Large differences in the genome organization of different plant trypanosomatid parasites (*Phytomonas* spp.) reveal wide evolutionary divergences between taxa. *Infect Genet Evol.* 2009;9:235-40.
- Marín C, Alberge B, Dollet M, Pagès M, Bastien Patrick. First complete chromosomal organization of a protozoan plant parasite (*Phytomonas* spp.). *Genomics.* 2008;91:88-93.
- Marín C, Fabre S, Sánchez-Moreno M, Dollet M. *Herpetomonas* spp. isolated from tomato fruits (*Lycopersicon esculentum*) in southern Spain. *Exp Parasitol.* 2007;116:88–90.
- Marín C, Hitos AB, Rodríguez-González I, Dollet M, Sánchez-Moreno M. *Phytomonas* iron superoxide dismutase: a possible molecular marker. *FEMS Microbiol Letter* 2004; 234(1): 69-74.
- Maslov DA, Votýpka J, Yurchenko V, Lukes J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends Parasitol.* 2012;29(1):43-52.
- Maslov DA, Westenberger SJ, Xu X, Campbell DA, Sturm NR. Discovery and Barcoding by Analysis of Spliced Leader RNA Gene Sequences of New Isolates of Trypanosomatidae from Heteroptera in Costa Rica and Ecuador. *J Eukaryot Microbiol.* 2007;54:57-65.
- Maslov DA, Simpson L. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. *Parasitol Today.* 1995;11(1):86-91.
- Maslov DA, Yurchenko VY, Jirku M, Lukes J. Two new species of trypanosomatids parasites isolated from Heteroptera in Costa Rica. *J Eukaryot Microbiol.* 2010;57:177-88.
- McGhee RB, Hanson WL. Changes in structure of *Phytomonas elmassiani* in experimental infections of Apocynaceae, a presumably foreign plant host. *J Protozool.* 1971;18:80-87
- Meneguetti DUO, Trevisan O. Ocorrência de protozoários morfologicamente semelhante a *Phytomonas staheli* em Reduviidae e potencial do *Arilus* sp como controlador biológico. *Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente.* 2010;1(1):84-93.
- Merzlyak E, Yurchenko V, Kolesnikov AA, Alexandrov K, Podlipaev SA, Maslov DA. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *J Euk Microbiol.* 2001;48:161-9.
- Michels PA, Poliszczak A, Osinga KA, Misset O, Van Beeumen J, Wierenga RK, et al. Two tandemly linked identical genes code for the glycosomal glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* 1986;5(5):1049-56.
- Miranda K, Rodrigues CO, Hentchel J, Vercesi A, Plattner H, de Souza W, Docampo R. Acidocalcisomes of *Phytomonas francai* possess distinct morphological characteristics and contain iron. *Microsc Microanal.* 2004; 10(5): 647-55.
- Molinas SM, Altabe SG, Opperdoes FR, Rider MH, Michels PA, Uttaro AD. The multifunctional isopropyl alcohol dehydrogenase of *Phytomonas* sp. could be the result of a horizontal gene transfer from a bacterium to the trypanosomatid lineage. *J Biol Chem.* 2003;278(38):36169-75.

Moreira D, López-García P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54:1861-75.

Muller E, Gargani D, Banuls AL, Tibayrenc M, Dollet M. Classification of plant trypanosomatids (*Phytomonas* spp.) parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Parasitology*. 1997;115:403-9.

Muller E, Gargani D, Schaeffer V, Stevens J, Fernandez-Becerra C, Sanchez-Moreno M, Dollet M. Variability in the phloem restricted plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) associated with wilts of cultivated crops. Isoenzyme comparison with the lower trypanosomatids. *Europ J Plant Pathol*. 1994;100:425-34.

Noyes HA, Reyburn H, Bailey JM, Smith D. A Nested-PCR-Based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clin Microbiol*. 1998;36:2877-81.

Nunes LR, Teixeira MMG, Camargo EP, Buck GA. Sequence and structural characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Phytomonas*. *Mol Biochem Parasitol*. 1995;74:233-7.

Paiva BR, Secundino NF, Nascimento JC, Pimenta PF, Galati EA, Junior HF, et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop*. 2006;99(2-3):252-9.

Parthasarathy MV, Slobbe WG, Soudant C. Trypanosomatid flagellate in the phloem of diseased coconut palms. *Science*. 1976;192:1346-8.

Petry K, Gargani D, Baltz TH, Kastelein P, Dollet M. Use of monoclonal antibodies for differentiation of different isolates of *Phytomonas* (Plant trypanosomatids). *J Phytopathol*. 1989;126:59-68.

Podlipaev S, Sturm N, Fiala I, Fernandes O, Westenberger S, Dollet M, Campbell D, Lukes J. Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5s rRNA genes and intergenic regions. *J Euk Microbiol*. 2004a;51:283-90.

Podlipaev S, Votycka J, Jirju M, Svobodová M, Lukes J. *Herpetomonas zitplika* n.sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): A parasite of the blood sucking biting midge *Culicoides kibunensis* Tokunaga 1937 (Diptera: Ceratopogonidae). *J Parasitol*. 2004b;90:342-7.

Podlipaev SA. *Phytomonas elmassiani* (Mastigophora: Trypanosomatidae) from the plant *Cynanchum sibiricum* (Asclepiadaceae) in Central Asia and Kazakhstan. *Proc Zool Inst Acad Sci. USSR*. 1986;144:61-5.

Porcel BM, Denoeud F, Opperdoes F, Noel B, Madoui MA, Hammarton TC, Field MC, Da Silva C, Couloux A, Poulain J, Katinka M, Jabbari K, Aury JM, Campbell DA, Cintron R, Dickens NJ, Docampo R, Sturm NR, Koumandou VL, Fabre S, Flegontov P, Lukes J, Michaeli S, Mottram JC, Szoor B, Zilberstein D, Bringaud F, Wincker P, Dollet M. The streamlined genome of *Phytomonas* spp. relative to human pathogenic kinetoplastids reveals a parasite tailored for plants. *Journal PLoS Genet*. 2014;10(2):E1004-7.

Rodrigues AC, Garcia HA, Batista JS, Minervino AH, Goes-Cavalcante G, Maia da Silva F, et al. Characterization of spliced leader genes of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri*: phylogeographical analysis of Brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. *Parasitology*. 2010;137(1):111-22.

Rodrigues AC, Paiva F, Campaner M, Stevens JR, Noyes HA, Teixeira MMG. Phylogeny of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. 2006;132(2):215-24.

Ronai Z. Glycolytic enzymes as DNA binding proteins. *Int J Biochem*. 1993;25:1073-6.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003;19:1572-4.

Rozario C, Morn L, Roger AJ, Smith MW, Müller M. Primary Structure and Phylogenetic Relationships of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Genes of Free-Living and Parasitic Diplomonad Flagellates. *J Euk Microbiol*. 1996;43(4):330-40.

Sanchez-Moreno M, Fernandez-Beceira C, Fernandez-Ramos C, Luque E, Rodriguez-Cabezas MN, Dollet M, Osuna A. Trypanosomatid protozoa in plants of southeastern Spain: characterization by analysis of isoenzymes, kinetoplast DNA. and metabolic behavior. *Parasitol Res*. 1998;84:354-61.

Sanchez-Moreno M, Fernandez-Becerra C, Mascaro C, Rosales MJ, Dollet M, Osuna A. Isolation, in vitro culture, ultrastructure study, and characterization by lectin-agglutination tests of *Phytomonas* isolated from tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and cherimoyas (*Annona cherimola*) in southeastern Spain. *Parasitol Res*. 1995;81(7):575-81.

Santos A, Bezerra JL, Oliveira AC, Nascimento ML, Souza TP, Silva ALM. Diagnóstico da Murcha-de-*Phytomonas* em Palmeira imperial em estágio final de infecção. *Agrotrópica*. 2006;18:101-2.

Sbravate C, Campaner M, Camargo LEA, Conchon I, Teixeira MMG, Camargo EP. Culture and generic identification of trypanosomatids of phytophagous hemiptera in Brazil. *J Protozool*. 1989;36:543-7.

Schaub GA. Pathogenicity of Trypanosomatids on Insects. *Parasitology Today*. 1994;10:10-2.

Schuh RT, Slater JA. True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera). New York: Cornell University; 1995. 336 p.

Serin MS, Waki K, Chang KP, Aslan G, Direkel S, Otag F, et al. Consistence of minixon polymerase chain reactionrestriction fragment length polymorphism and single-copy gene sequence analyses in discriminating *Leishmania* genotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;57(3):295-9.

Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MMG. *Phytomonas*: analysis of polymorphism and genetic relatedness between isolates from plants and phytophagous insects from different geographic regions by RAPD fingerprints and synapomorphic markers. *J Eukaryot Microbiol*. 1999a;46(6):618-25.

Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MMG. Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of a genus-specific sequence of the spliced leader gene. *Exp Parasitol*. 1999b;91:268-79.

- Serrano MG, Campaner M, Buck GA, Teixeira MMG, Camargo EP. PCR amplification of the spliced leader gene for the diagnosis of trypanosomatid parasites of plants and insects in methanol fixed smears. *FEMS Microbiol Letters*. 1999c;176:241-6.
- Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol*. 2006;22(4):168-74.
- Simpson L. Kinetoplast DNA in trypanosomatid flagellates. *Int Rev Cytol*. 1986;99:119-79.
- Singh R, Green MR. Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Science*. 1993;259:365-8.
- Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83(5):1383-7.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;83:141-52.
- Souza NS. Murcha-de-*Phytomonas*, uma Nova Doença do Coqueiro em Mato Grosso. *Fitopatol. Bras*. 2005;30(3).
- Stahel G. Zur Kenntnis der Siebrohrenkrankheit (Phloemnekrose) des Kaffeebaumes in Surinam. I. Mikroskopische Untersuchungen und Infektionsversuche. *Phytopathologische Zeitschrift*. 1931a;4:65-82.
- Stahel G. Zur Kenntnis der Siebrohrenkrankheit (Phloemnekrose) des Kaffeebaumes in Surinam. II. *Phytopathologische Zeitschrift*. 1931b;4:539-44.
- Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. 2006;22:2688-90.
- Stevens JR. Free-living bodonids and derived parasitic trypanosomatids: but what lies in between? *Trends Parasitol*. 2014;30(3):113-4.
- Stevens JR. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite*. 2008;15(3):226-32.
- Stevens J, Rambaut A. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infect Genet Evol*. 2001 Dec;1(2):143-50.
- Stuart K, Feagin JE. Mitochondrial DNA of kinetoplastids. *Int. Rev Cytol*. 1992;141:65-88.
- Sturm NR, Dollet M, Lukes J, Campbell DA. *Infect, Genet Evol*. 2007;7: 570-6.
- Sturm NR, Fernandes O, Campbell DA. The mini-exon genes of three *Phytomonas* isolates that differ in plant tissue tropism. *FEMS Microbiol Letters*. 1995;130:177-82.
- Svobodova M, Zidkova L, Cepicka I, Obornik M, Lukes J, Votypka J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *Inter J Syst Evolution Microbiol*. 2007;57:23.

Swofford DL. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0, , Sunderland, MA: Sinauer Associates; 1998. 197 p.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. Mega 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol Biol Evol. 2013;30:2725-9.

Teixeira MM, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, Campaner M, Nunes VL, Milder RV, de Souza W, Camargo EP. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterialsymbionts. Protist. 2011;162(3):503-24.

Teixeira MMG., Serrano MG. and Camargo EP. New Data from Old Trypanosomatid Preparations. Parasitol. Today. 2000; 6: 261-3.

Teixeira MMG, Takata CS, Conchon I, Campaner M. Camargo EP. Ribosomal and kDNA Markers distinguish two subgroups of *Herpetomonas* among old species and new trypanosomatids isolated from flies. J Parasitol. 1997;83(1):58-65.

Teixeira MM, Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP. Trypanosomatidae: a spliced-leader derived probe specific for the genus *Phytomonas*. Exp Parasitol. 1996;84(3):311-9.

Teixeira MMG, Campaner M, Camargo EP. Characterization of the target-antigens of anti-*Phytomonas* specific monoclonal antibodies. J Euk Microbiol. 1995;42:232-7.

Teixeira MMG, Camargo EP. Monoclonal antibodies for the identification of trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. J Protozool. 1989;36:262-4.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 1997;25:4876-82.

Uttaro AD, Sanchez-Moreno M, Oppendoes E R. Genus-specific biochemical markers for *Phytomonas* spp. Mol Biochem Parasitol. 1997;90:337-42.

Vainstein MH, Da Silva JBT, De Lima VMQG, Roitman I, De Souza W, Dollet M, Camargo EP. Electrophoretic analysis of isoenzyme in the identification of trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. J Protozool. 1987;34:422-44.

Ventura RM, Paiva F, Silva RA, Takeda GF, Buck GA, Teixeira MM. Trypanosoma vivax: characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. Exp Parasitol. 2001;99(1):37-48.

Vermeulen H. Investigations into the cause of the phloem necrosis disease of *Coffea liberica* in Surinam, South America. Netherlands J Plant Pathol. 1968;74:202-18.

Vermeulen H. Awilt of *Coffea liberica* in Surinam and its association with a flagellate, *Phytomonas leptovasorum* Stahel. J Protozool. 1963;10:216-22.

Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. Int J Parasitol. 1994;24(8):1317-31.

Vickerman K. The Diversity of the Kinetoplastid Flagellates. In: Lumdsen WHR, Evans DA (eds.). Biology of the Kinetoplastida. New York, NY: Academic Press; 1976. p. 1-34.

Viola LB, Almeida RS, Ferreira RC, Campaner M, Takata CS, Rodrigues AC, Paiva F, Camargo EP, Teixeira MMG. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. Parasitology. 2009;136(1):55-65.

Viola LB, Campaner M, Takata CS, Ferreira RC, Rodrigues AC, Freitas RA, Duarte MR, Grego KF, Barrett TV, Camargo EP, Teixeira MMG. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. Parasitology. 2008;135(5):595-605.

Votýpka J, Kostygov AY, Kraeva N, Grybchuk-Ieremenko A, Tesarova M, Grybchuk D, Lukes J, Yurchenko V. *Kentomonas* gen. n., a New Genus of Endosymbiont-containing Trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n. Protist. 2014;165:825–38.

Votýpka J, Sukova E, Kraeva N, Ishemgulova A, Duzi I, Lukes J, et al. Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus *Blechomonas* gen. n. Protist. 2013;164(6):763-81.

Votýpka J, Klepetkova H, Jirku M, Kment P, Lukes J. Phylogenetic relationships of trypanosomatids parasitising true bugs (Insecta: Heteroptera) in sub-Saharan Africa. Int J Parasitol. 2012;42 (5):489-500.

Votýpka J, Maslov DA, Yurchenko V, Jirku M, Kment P, Lun ZR, Lukes J. Probing into the diversity of trypanosomatid flagellates parasitizing insect hosts in South-West China reveals both endemism and global dispersal. Mol Phylogenet Evol. 2010;54:243-53.

Wallace FG, Roitman I, Camargo EP. Trypanosomatids of plants. In: Kreier J, Baker JR (eds). Parasitic Protozoa. San Diego: Academic Press; 1992. Cap.2 p. 55-84.

Wallace FG, Camargo EP, McGhee RB, Roitman I. Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. J Protozool. 1983;30:308-13.

Wallace FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. Exp Parasitol. 1966;18:124-93.

Westenberger SJ, Sturm NR, Yanega D, Podlipaev SA, Zeledon R, Campbell DA, et al. Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: genotyping of parasites from Heteroptera using the spliced leader RNA gene. Parasitology. 2004;129:537-47.

Yurchenko VY, Lukes J, Jirku M, Maslov DA. Selective recovery of the cultivation-prone components from mixed trypanosomatid infections: a case of several novel species isolated from Neotropical Heteroptera. Int J Syst Evol Microbiol. 2009, 59:893-909.

Yurchenko VY, Lukes J, Tesarova M, Jirku M, Maslov DA. Morphological discordance of the new trypanosomatid species phylogenetically associated with the genus *Crithidia*. Protist. 2008 Jan;159(1):99-114.

Yurchenko VY, Lukes J, Jirku M, Zeledon R, Maslov DA. *Leptomonas costaricensis* sp. n. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae), a member of the novel phylogenetic group of insect trypanosomatids closely related to the genus *Leishmania*. *Parasitology*. 2006;133(Pt 5):537-46.

Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, et al. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol*. 1998;28(1):105-12.