

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

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.

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).

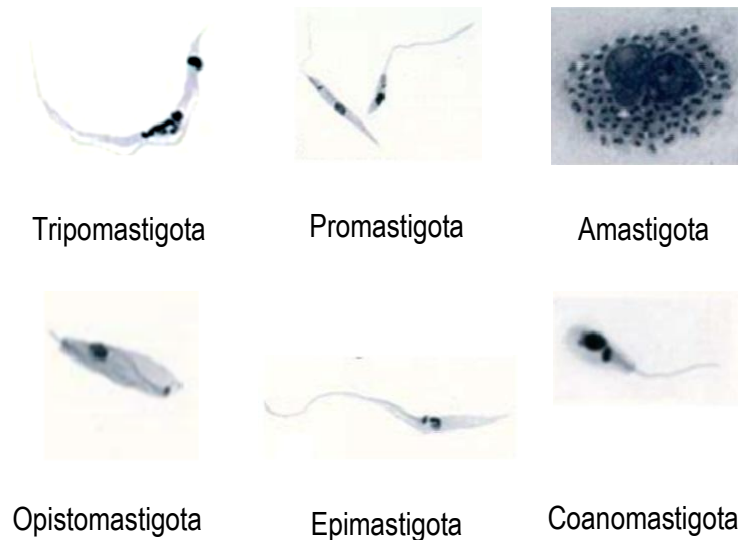


Figura 1. Formas celulares dos cinetoplastídeos encontradas nos diferentes estágios de desenvolvimento da família Trypanosomatidae (modificada: De Souza W, 2002).

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; Pathasarthy 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 leptovorum* (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).

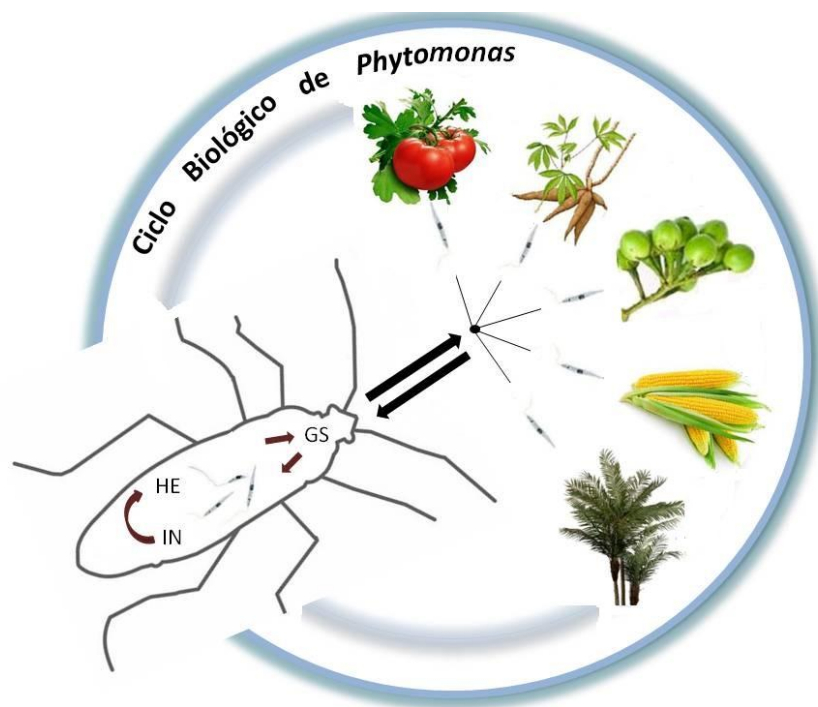


Figura 2 - Ciclo biológico de *Phytomonas*. Ao alimentar-se em uma planta infectada, o inseto fitófago ingere formas promastigotas, que atravessam a parede intestinal (IN), alcançam a hemolinfa (HE) e migram para as glândulas salivares (GS), tornando o inseto apto a infectar novas plantas através da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

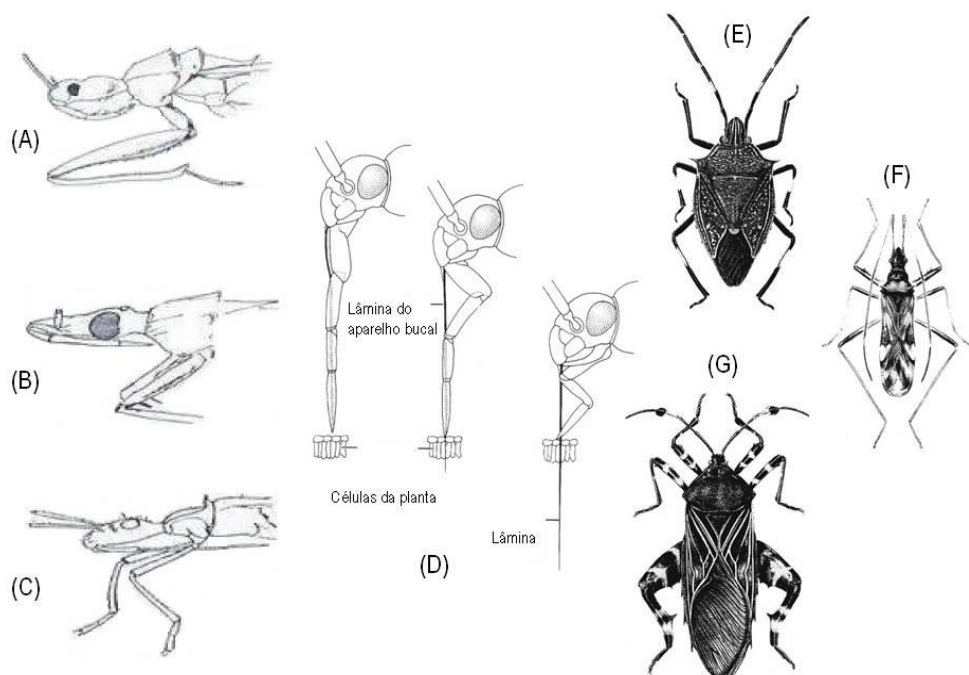


Figura 3 – Aspectos morfológicos do aparelho bucal de hemípteros, com destaque em fitófagos e representantes de 3 famílias hospedeiras de *Phytomonas*. Os hemípteros predadores (A) apresentam aparelho bucal curto, curvo e que não ultrapassa o primeiro par de patas. Os hematófagos (B) apresentam aparelho 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 leptovosorum* (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. leptovosorum* 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).

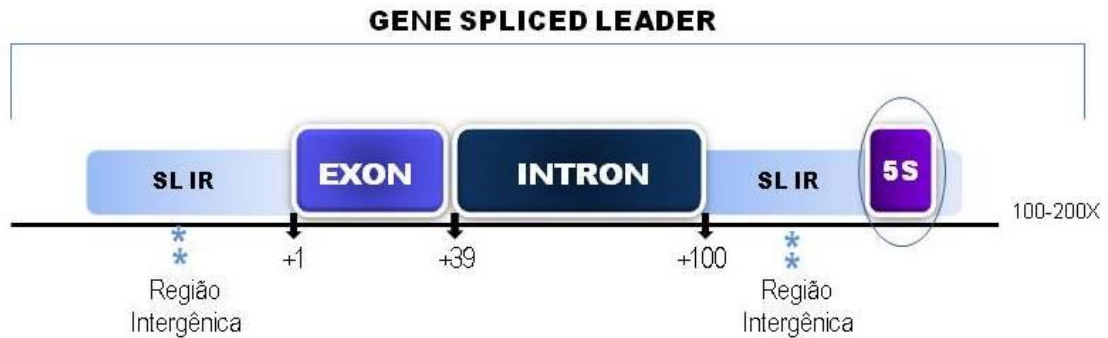


Figura 4 - Representação esquemática do gene "Spliced Leader". No gene SL ou mini-exon é possível observar um **exon** com 39 nucleotídeos altamente conservado, um **ítron** que varia de 50-150 nucleotídeos, moderadamente conservado e, uma região espaçadora intergênica (**SL IR**), que apresenta variações 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.

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, Baccan 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, Kastelein 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 samuelpeessoai 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 *Arius 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, Denoëud 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. *Agrotropica*. 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 reaction restriction 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, Filipski 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, Opperdoes 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.