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

Identificação molecular de um fitoplasma do grupo 16SrI-B em plantas de soja

Thays Benites Camargo Pereira

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

Piracicaba
2011

Thays Benites Camargo Pereira
Engenheiro Agrônomo

Identificação molecular de um fitoplasma do grupo 16SrI-B em plantas de soja

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

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

Piracicaba
2011

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

Pereira, Thays Benites Camargo
Identificação molecular de um fitoplasma do grupo 16SrI-B em plantas de soja / Thays Benites Camargo Pereira. - - Piracicaba, 2011.
65 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Amarelo (Doença de planta) 2. Fitoplasmas - Identificação - Técnicas moleculares 3. Mollicutes 4. Soja I. Título

CDD 633.34
P436i

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

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

"Não podemos fazer grandes coisas neste planeta,
mas podemos fazer pequenas coisas com muito amor e dedicação".
Madre Tereza de Calcutá

Aos meus irmãos Luis e Lays
pela amizade,união e alegria, **OFEREÇO.**

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus por toda força e fé, tornando tudo possível.

Aos meus pais e irmãos pelo exemplo, educação, companheirismo e todo incentivo nesta etapa de minha vida.

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

Ao Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo pela oportunidade de realizar o mestrado sob sua orientação, pela confiança, compreensão e colaboração para minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Dr Eros Artur Bohac Francisco, pesquisador científico da Fundação Mato Grosso pelo envio das amostras.

Aos professores que contribuíram para a minha formação, dedicando-se em fornecer seus conhecimentos.

Aos amigos do laboratório de Procariotos Fitopatogênicos Ana Paula, Bárbara, Elizeu, Pedro, Patrícia e Rafaela pelos momentos agradáveis e pela ajuda.

Agradeço em Especial a Evandro de Jesus Ganem Junior e principalmente a Daniela Flôres pela amizade verdadeira, carinho, incentivo constante não me deixando desanimar e pelos ótimos momentos alegres que passamos e ainda passaremos juntos.

Aos todos os amigos que fiz no Departamento de Fitopatologia.

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

A Cintia Carla Avalhães pela amizade, convívio agradável, companheirismo, paciência e incentivo.

A Carolina N. Kinjo, Anne Caroline M. Leguizamón, Tainara M.dos Santos e Eduardo Couto que mesmo longe, jamais me esqueceram e me apoiaram sempre.

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

Muito Obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO.....9
ABSTRACT.....11
LISTA DE TABELAS.....13
LISTA DE FIGURAS.....15
1INTRODUÇÃO.....17
2 DESENVOLVIMENTO.....19
2.1 Revisão Bibliográfica.....19
2.1.1 A cultura da soja.....19
2.1.1.1 Histórico.....20
2.1.1.2 Características da soja.....20
2.1.1.3 Doenças na cultura.....21
2.1.2 Fitoplasmas.....22
2.1.2.1 Características e histórico.....22
2.1.2.2 Sintomatologia.....23
2.1.2.3 Classificação e Identificação.....24
2.1.2.4 Transmissão e controle.....26
2.1.2.5 A associação de fitoplasmas com doenças.....27
2.1.3 Fitoplasmas em soja.....28
2.2 Material e Métodos.....30
2.2.1 Amostras de plantas de soja.....30
2.2.2 Extração de DNA.....31
2.2.3 Detecção de fitoplasma por PCR.....32
2.2.4 Identificação de fitoplasmas por PCR com *primers* específicos.....33
2.2.5 Purificação do 16S rDNA.....33
2.2.6 Clonagem do 16S rDNA do fitoplasma.....34
2.2.7 Sequenciamento e análise das sequências do 16S rDNA do fitoplasma.....35
2.2.8 Análise de RFLP *In silico*.....35
2.2.9 Análise filogenética.....36
2.3 Resultados e Discussão.....37

2.3.1 Detecção de fitoplasmas por PCR.....37
2.3.2 Identificação de fitoplasma por PCR.....39
2.3.3 Análise das sequências nucleotídica do 16S rDNA do fitoplasma.....41
2.3.4 Análise filogenética.....45
3 CONCLUSÕES.....49
REFERÊNCIAS.....51
APÊNDICE.....63

RESUMO

Identificação molecular de um fitoplasma do grupo 16SrI-B em plantas de soja

Plantas apresentando folhas com deformações do tipo bolhas, menor quantidade de vagens de tamanho reduzido e contendo menor número de sementes, vagens que não completaram a maturação e coloração verde da parte aérea no final do ciclo foram observadas em campos de produção. As plantas foram analisadas visando à detecção de fitoplasmas e a sua identificação molecular. Para isto, o DNA total das plantas amostradas foi submetido ao teste de duplo PCR conduzido com *primers* específicos para a região do 16S rDNA de fitoplasmas. As amplificações evidenciaram que fitoplasmas estavam presentes em tecidos de plantas sintomáticas. O duplo PCR realizado com *primers* grupo-específicos revelou a ocorrência de fitoplasmas afiliados aos grupos 16SrI e 16SrIII. As análises virtuais de RFLP, baseadas no sequenciamento da referida região genômica, permitiram identificar um dos fitoplasmas como pertencente ao subgrupo 16SrI-B. Os valores de coeficientes de similaridade, calculados com base nos padrões de restrição gerados *in silico* por 17 enzimas, confirmaram a identidade deste fitoplasma. Ainda, mapas de restrição mostraram que o fitoplasma encontrado em plantas de soja apresentava sítios putativos de restrição idênticos a um fitoplasma típico do grupo 16SrI-B. A análise filogenética, envolvendo o fitoplasma alvo deste estudo e fitoplasmas representantes de alguns grupos e subgrupos relatados no Brasil, mostrou que o fitoplasma da soja estava estritamente relacionado com aqueles componentes do grupo 16SrI. O fitoplasma em estudo emergiu do mesmo ramo da árvore filogenética também compartilhado por fitoplasmas do grupo 16SrI, confirmando os resultados dos demais testes moleculares. Os resultados gerados neste trabalho evidenciaram que a soja pode ser considerada como mais um hospedeiro de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI e 16SrIII, os quais tem sido relatados em associação com diversas doenças de plantas que ocorrem no Brasil. Este estudo também gera informações que podem contribuir para aumentar os conhecimentos sobre este emergente grupo de agentes causais de doença.

Palavras-chave: Soja; Fitoplasmas; Amarelos; Mollicutes; Identificação molecular

ABSTRACT

Molecular identification of a group 16SrI-B phytoplasma in soybean plants

Plants exhibiting leaf deformation type bubbles, low quantities of pods of reduced size containing few seeds, pods not mature, and green color of stem and leaves in the end of crop growth were observed in commercial fields. The plants were tested for the detection of phytoplasmas and their molecular identification. For this, the total DNA of plants sampled was submitted to nested PCR assays conducted with universal primers for amplification of a fragment corresponding to the 16S rDNA of phytoplasmas. The amplifications revealed the presence of phytoplasmas in tissues of symptomatic plants. For identification, nested PCR performed with group-specific primers demonstrated the occurrence of phytoplasmas affiliated to the groups 16SrI and 16SrIII. The virtual RFLP analysis, based on the sequencing of DNA fragments generated from nested PCR with universal primers, allowed the identification of a phytoplasma belonging to the subgroup 16SrI-B. The values of similarity coefficients, calculated on the basis of restriction patterns generated *in silico* for 17 enzymes, confirmed the identity of this phytoplasma. Furthermore, restriction maps showed that the phytoplasma found in soybean plants had putative restriction sites identical to those phytoplasma of the group 16SI-B. Phylogenetic analysis, involving the phytoplasma identified in the present study and representatives of some groups and subgroups previously reported in Brazil, showed that the soybean phytoplasma was closely related to phytoplasmas belonging to group 16SrI. The studied phytoplasma and phytoplasmas belonging to group 16SrI emerged from the same branch, confirming the results obtained by PCR and RFLP analysis. Also, based on the results, soybean could be considered as a host for phytoplasmas belonging to the group 16SrI and 16SrIII, which has been reported in association with various diseases that occur in Brazil. The present study may contribute to improve the knowledge about this emerging group of causal agents of disease.

Keywords: Soybean; Phytoplasmas; Aster yellows; Mollicutes; Molecular identification

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Plantas sintomáticas de soja. A: Redução na produção de vagens; B: interrupção no desenvolvimento normal dos botões florais, os quais não evoluíram para abertura das flores; C: folhas com deformações do tipo bolhas na face adaxial. Figuras B e C. Fonte: Eros Francisco.....31

Figura 2 - Presença de fitoplasmas em plantas sintomáticas e ausência em planta assintomática de soja, pelo uso de duplo PCR com o uso dos *primers* R16mF2/mR1 e R16F2n/R2. As bandas presentes no gel correspondem às amplificações de fragmentos genômicos de 1,2Kb. Colunas: M= Marcador molecular (1Kb Ladder); 1 a 6 = Amostras de DNA de plantas sintomáticas de soja; 7= planta de soja assintomática (padrão negativo); Mi= padrão positivo representado por planta de milho sabidamente infectada com fitoplasma; H= água, usada como controle negativo nas reações de duplo PCR.....38

Figura 3 - Identificação de fitoplasma do grupo 16SrI em plantas sintomáticas de soja por duplo PCR com os pares de *primers* R16mF2/mR1 e R16(I)F1/ R16(I)R1. Amplificação de fragmentos de DNA de 1,1Kb. Colunas: M= Marcador molecular (1Kb Ladder); 1 a 6 = Amostras de DNA de plantas sintomáticas de soja; Mi= fitoplasma do enfezamento do milho pertencente ao grupo 16SrI, usado como referência; H= água, controle negativo da reação.....40

Figura 4 - Identificação de fitoplasma em plantas sintomáticas de soja por duplo PCR com os pares de *primers* R16mF2/mR1 e R16(III)F2/ R16(III). Amplificação de fragmentos de DNA de 0,8Kb. Colunas: M= Marcador molecular (1Kb Ladder); 1 a 6 = Amostras de DNA de plantas sintomáticas de soja; Ch= fitoplasma do enfezamento do chuchu pertencente ao grupo 16SrIII, usado como referência; H= água, controle negativo da reação.....41

Figura 5 - Padrões de restrição de RFLP gerados pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região do 16S rDNA do fitoplasma encontrado em plantas de soja (A) e do representante do 16SrI-B Maize bushy stunt (B). Enzimas de restrição: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI, *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I,*Hpa*II, *Kpn*I, *Mbo*I, *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, *Taq*I. M = marcador φX174-DNA *Hae*III digest.....43

Figura 6 - Análise de sítios putativos de restrição com as mesmas enzimas utilizadas para análise RFLP *in silico*. Soy-Br1 = sequência do 16S rDNA do fitoplasma encontrado na soja; 16SrI-B = sequência do fitoplasma representante do grupo 16SrI-B Maise bushy stunt (MBS) obtida no GenBank, número de acesso AY265208.....44

Figura 7 - Árvore filogenética construída usando o método Neighbor-Joining com as sequências da região 16S rDNA do fitoplasma identificado na soja, de fitoplasmas representantes do grupo 16SrI, fitoplasmas dos grupos 16SrIII, 16SrVII, 16SrIX, 16SrXIII, 16SrXV e o procarioto *Acholeplasma laidlawii*.....47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA de fitoplasmas representantes dos grupos 16SrI, 16SrIII, 16SrVII, 16SrIX, 16SrXIII e 16SrXV depositadas no GenBank e usadas para construção da árvore filogenética.....37

Tabela 2 - Valores de coeficiente se similaridade calculados para o fitoplasma detectado na soja e outros fitoplasmas pertencentes a diversos subgrupos do grupo 16SrI.....44

1 INTRODUÇÃO

Fitoplasmas são procariotos desprovidos de parede celular, que habitam o floema de plantas e diversos órgãos do corpo de insetos. Estes agentes fitopatogênicos estão associados com uma ampla gama de doenças encontradas em uma diversidade de espécies vegetais cultivadas, daninhas e silvestres. O desenvolvimento de metodologias moleculares tem contribuído decisivamente para aumentar os conhecimentos sobre este grupo de patógenos, uma vez que os mesmos ainda não são cultivados em meios de cultura. Assim, a demonstração da diversidade genética existente entre eles, a sua alocação nos distintos grupos de classificação e as relações com os seus hospedeiros tem sido possível graças ao emprego da biologia molecular. Embora sejam reconhecidos 31 grupos de classificação, os grupos 16SrI e 16SrIII congregam a maioria dos fitoplasmas conhecidos em associação com plantas nos diferentes continentes. Também no Brasil, os representantes destes grupos têm ocorrência predominante, sendo encontrados tanto em tecidos de plantas como de insetos, indicando sua associação com várias doenças e a possível ocorrência de vetores envolvidos na sua transmissão na natureza.

A associação entre doenças de soja e fitoplasmas tem sido relatada nas mais variadas áreas geográficas do mundo. Os sintomas exibidos pelas plantas são variáveis, bem como a identidade dos fitoplasmas relacionados às doenças. No Brasil, algumas plantas de soja suspeitas de estarem infectadas por fitoplasmas foram observadas em campos comerciais. Estas observações sugeriram que a soja poderia ser portadora de fitoplasmas e, portanto, uma provável hospedeira.

Considerando que uma diversidade de espécies botânicas tem sido relatada, no Brasil, como hospedeiras de distintos fitoplasmas e que as plantas de soja mostravam sintomas similares àqueles induzidos por fitoplasmas, a presente investigação foi conduzida com o objetivo de detectar a possível presença de fitoplasmas nos tecidos destas plantas, bem como de identificar molecularmente os possíveis fitoplasmas detectados.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 A cultura da soja

A soja (*Glycine max* L. Merril) é uma oleaginosa de clima tropical, encontrando condições climáticas altamente favoráveis no Brasil, o qual é o segundo maior produtor mundial (EMBRAPA, 2010).

A produção está principalmente concentrada nas regiões Centro-Oeste e Sul, com produção estimada para safra 2010/2011 de respectivamente 30,77 e 24,45 milhões de toneladas. Estima-se que para a referida safra, a produção brasileira será de 67,20 milhões de toneladas, em uma área cultivada de 23,96 milhões de hectares (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2011).

Nas últimas cinco décadas a produção de soja tem apresentado crescimento superior à taxa de crescimento populacional, ocupando lugar de destaque na alimentação humana e animal, sendo considerada a planta oleaginosa mais cultivada no mundo (BLACK, 2000). A cultura tem uso diversificado, destacando-se a produção de óleo para alimentação humana e de farelo de elevado teor protéico para alimentação animal. No Brasil, os dados revelam que mais de 90% da produção de grãos é empregada na fabricação de óleo vegetal (AMORIM, 2011).

Atualmente, a produção de soja tem se expandido para novas fronteiras de cultivo, como a região denominada Mapitoba, que engloba áreas dos estados do Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia. Na próxima safra, estima-se que a produção dos Estados Unidos, o maior produtor mundial, seja estabilizada ou reduzida, em virtude do aumento do plantio de milho para produção de etanol. Assim, caso a demanda mundial mantiver o ritmo de crescimento dos últimos cinco anos, o Brasil passará a ser o maior exportador mundial e a China consumirá aproximadamente 70% da produção brasileira (PEREIRA; TERAO, 2010).

2.1.1.1 Histórico

A soja tem como centro de origem o continente Asiático, provavelmente a região centro sul da China. Nas Américas foi citada pela primeira vez nos Estados Unidos no início do século XIX. Foi introduzida no Brasil por Gustavo D'Utra na Bahia, no ano de 1882 (COSTA, 1996).

No Estado de São Paulo foi relatada em 1892 no Instituto Agronômico de Campinas. O Estado do Rio Grande Sul foi o pioneiro no cultivo em larga escala. A exploração desta leguminosa foi intensificada a partir da década de 70, com o início do plantio nos cerrados do Centro-Oeste, ocasionando o aumento da área colhida, de menos de 100.000 hectares em 1975, para mais de 4,5 milhões de hectares na safra de 99/2000 (COSTA, 1996; BLACK, 2000).

2.1.1.2 Características da soja

A soja pertence à Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Ordem Fabales e Família Fabaceae (GAZZONI, 1994). Esta leguminosa é autógama, herbácea, com caule ereto e ciclo anual. As plantas podem ser pouco ou muito ramificadas, sua altura pode variar de 0,3 a 2,0 metros e seu ciclo é de 80 a 200 dias, em função da variedade e das condições ambientais (CÂMARA, 2000; FARIAS et al., 2007; EMBRAPA, 2010). Esta planta apresenta três tipos de folhas, ou seja, cotiledonares, unifoliadas e trifoliadas. Sua inflorescência é racemosa com 8 a 40 racemos e as flores são completas, de coloração branca ou roxa. Os frutos são do tipo vagem, contendo de 1 a 4 sementes por vagem, e suas sementes apresentam forma variável, em geral ovaladas. O sistema radicular é axial fasciculado, com a presença de nódulos nas raízes mais finas, devido à simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium,* que são fixadoras do nitrogênio atmosférico (FARIAS et al., 2007; EMBRAPA, 2010).

A soja possui melhor adaptação às regiões com temperaturas que variam de 20°C a 30°C. Para emergência da planta, a temperatura ideal é de aproximadamente 25°C, pois, proporciona uma emergência rápida e uniforme. Para o desenvolvimento, o ideal é 30°C. Não é recomendado semear em regiões ou épocas onde a temperatura do solo atinja 20°C, pois a germinação e a emergência das plântulas ficam comprometidas. As regiões com temperatura igual ou inferior a 10°C são impróprias

para o cultivo da soja e nos locais com temperatura acima de 40°C os danos acontecem na floração e na redução da capacidade de retenção de vagens. A floração ocorre somente em temperaturas acima de 13°C, e a maturação dos grãos é mais rápida em altas temperaturas (COSTA, 1996; CÂMARA, 2000; FARIAS et al., 2007; EMBRAPA, 2010).

A água constitui 90% do peso da planta, e atua praticamente em todos os processos fisiológicos e químicos. Para germinar, a semente precisa absorver água no mínimo de 50% de sua massa. Durante o ciclo, a necessidade de água varia entre 450 mm e 800 mm. As fases de maior exigência hídrica são a germinação-emergência e floração-enchimento de grãos. Nesta última, a cultura requer aproximadamente 7 a 8 mm/dia, decrescendo após esse período (COSTA, 1996; CÂMARA, 2000; FARIAS et al., 2007; EMBRAPA, 2010).

Entre os cultivares de soja, a característica mais variável é o fotoperíodo e cada cultivar possui seu fotoperíodo crítico. Esta é uma importante restrição para a adaptação de cultivares a uma determinada região (FARIAS et al., 2007; EMBRAPA, 2010).

2.1.1.3 Doenças na cultura

Dentre os fatores que podem influenciar a produtividade da soja destacam-se as práticas de manejo e a ocorrência de plantas daninhas, pragas e doenças. As doenças podem atuar durante todo o ciclo da cultura, sendo que aquelas de final de ciclo acarretam prejuízos de até 21% na produção, provocando danos principalmente sobre a redução na massa de 1000 grãos (GUERZONI, 2001). De acordo com Bonato (2000), a produção de grãos pode ser comprometida por várias doenças que infectam as plantas nos diferentes estádios de desenvolvimento.

A expansão da área cultiva com soja no país e a utilização de cultivares com pouca variabilidade genética, contribuem para o aumento da incidência de doenças na cultura (EMBRAPA, 2010). No Brasil, são relatadas cerca de 40 doenças causadas por bactérias, fungos, vírus e nematoides, resultando em perdas na produção estimadas em 5,76 milhões de toneladas (BLACK, 2000; EMBRAPA, 2010). No mundo são descritas mais de 100 doenças (SINCLAIR; BACKMAN, 1989; GAZZONI; YORINORI, 1995).

Estima-se que anualmente as doenças ocasionam perdas de 15% a 20% na produção, entretanto, algumas doenças podem ocasionar quase 100% (EMBRAPA, 2010). A importância das doenças varia de ano para ano, de uma região para outra, de acordo com as condições climáticas, com o surgimento de novas raças dos patógenos e com as estratégias de controle adotadas (BLACK, 2000).

Dentre as doenças de maior ocorrência no Brasil, destacam-se a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), a antracnose (*Colletotrichum truncatum*), o cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* var. meridionalis), a podridão branca da haste (*Sclerotinia sclerotiorum*), a podridão vermelha da raiz (*Fusarium* spp.) e aquelas provocadas por nematoides (EMBRAPA, 2010).

2.1.2 Fitoplasmas

2.1.2.1 Características e histórico

Os fitoplasmas são organismos procariotos, Gram-positivos, unicelulares, sem parede celular, cujo citoplasma é envolvido por uma única membrana. A ausência da parede resulta em pleomorfismo da célula, sendo esta uma característica típica deste grupo de Mollicutes (BERTACCINI; DUDUK, 2009; BEDENDO, 2011). Segundo Bedendo (2011), os fitoplasmas apresentam tamanho variável de 200 a 800 nm, reprodução por fissão celular ou gemulação e são visualizados nas células vegetais na forma de corpúsculos arredondados, elípticos, clavados ou alongados. Para Hogenhout et al. (2010), os fitoplasmas, aparentemente, tiveram seu genoma reduzido ao longo da evolução, sendo originários de bactérias Gram-positivas.

Em 1967, pesquisadores japoneses observaram, por microscopia eletrônica, a presença de corpúsculos pleomórficos nos vasos de floema de plantas afetadas e fizeram o primeiro relato da ocorrência de fitoplasmas, associando-os a doenças conhecidas como “amarelos”, ocorrentes em plantas de rainha margarida, amoreira, quiri e batata (DOI et al., 1967).

Antes da identificação dos fitoplasmas, as doenças conhecidas como “amarelos” eram atribuídas aos vírus, devido à sintomatologia e modo de transmissão, entretanto, os estudos feitos a esse respeito não detectavam partículas virais nos tecidos da planta

doente (DAVIS, 1995; LEE et al., 2000). Inicialmente os fitoplasmas foram chamados de organismos semelhantes aos micoplasmas (mycoplasma like organisms - MLOs), devido a sua semelhança morfológica e ultraestrutural com micoplasmas encontrados nos animais (DAVIS, 1981). Em 1994, no 10° Congresso da Organização Internacional de Micoplasmologia, realizado na França, foi proposto o termo trivial fitoplasma (DAVIS, 1995; LEE et al., 2000). Atualmente, os fitoplasmas estão classificados no SuperReino Prokaria, Reino Monera, Domínio Bacteria, Filo Tenericutes, Classe Mollicutes, Ordem Acholeplasmatales, Família Acholeplasmataceae, Gênero '*Candidatus Phytoplasma'* (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2011).

2.1.2.2 Sintomatologia

Diversos tipos de sintomas são induzidos por fitoplasmas, dependendo da planta, da estirpe do patógeno, do estágio de infecção e das condições de ambiente, podendo os mesmos aparecerem isoladamente ou combinados (DAVIS, 1995; BEDENDO, 2011). Geralmente são encontrados sintomas de clorose, enfezamento, superbrotamento de ramos, alongamento de internódios, gigantismo do cálice e redução do tamanho das flores, necrose do floema, filodia (transformação de órgãos florais em estruturas foliares), virescência (desenvolvimento de cloroplasto em órgãos florais) e esterilidade das flores (DAVIS, 1995; LEE et al., 2000).

O amarelecimento, um dos sintomas mais comuns da infecção de fitoplasma, é atribuído à modificação na síntese e transporte de carboidratos (BERTACCINI; DUDUK, 2009). Assim, há grandes diferenças na concentração de carboidratos no floema, raízes e folhas de plantas infectadas, quando comparadas com plantas sadias (MAUST et al., 2003). Estes autores também relatam redução na concentração de proteínas solúveis totais e alteração no balanço hormonal das plantas doentes. Ainda, as plantas portadoras de fitoplasmas podem apresentar redução na concentração de pigmentos fotossintéticos (BERTAMINI; NEDUNCHEZHIAN, 2001).

Geralmente os efeitos dos fitoplasmas sobre seus hospedeiros vegetais são considerados negativos. Curiosamente, no entanto, existe um caso conhecido em que infecção é desejável. Trata-se da planta ornamental *Euphorbia pulcherrima,* conhecida por bico-de-papagaio ou poinsetia, cuja infecção por fitoplasma provoca uma intensa

proliferação de ramos curtos, dando origem a um dossel muito atrativo e vistoso, valorizando seu comércio (BERTACCINI et al., 1996; LEE et al., 1997, 2000; RIBEIRO; BEDENDO, 2006).

2.1.2.3 Classificação e identificação

O primeiro sistema de classificação de fitoplasmas baseava-se em propriedades biológicas. Era realizado por meio da observação dos sintomas na espécie hospedeira e conhecimento sobre as espécies de insetos vetores. Entretanto, este sistema era trabalhoso, demorado e não proporcionava resultados confiáveis (LEE et al., 1992, 2000).

Atualmente, a observação dos sintomas é um dos fatores primordiais para a diagnose, a qual deve ser confirmada pela detecção do agente associado à doença. No entanto, a ocorrência de hospedeiros assintomáticos, infecções causadas por mais de um fitoplasma em único hospedeiro, desconhecimento de insetos vetores, baixa concentração e distribuição irregular de fitoplasmas na planta, variação do título do patógeno dependendo das estações do ano e da espécie vegetal requerem a utilização de métodos mais sensíveis, rápidos e seguros para a diagnose e detecção do agente causal de doenças (DAVIS, 1995; MARZACHI, 2004; BERTACCINI; DUDUK, 2009).

A detecção de fitoplasma em tecido vegetal doente foi realizada pela primeira vez com uso da microscopia eletrônica, contudo, não permitia a diferenciação morfológica entre os diversos fitoplasmas (LEE et al., 2000; BERTACCINI; DUDUK, 2009). A microscopia eletrônica pode comprovar a presença deste organismo em plantas, entretanto, Barros (1997) expõe que esta técnica torna-se inviável para ser adotada rotineiramente, devido ao alto custo do equipamento e a necessidade de mão-de-obra altamente qualificada. Técnicas especiais de coloração associadas à microscopia óptica comum e microscopia de fluorescência também foram empregadas por um breve tempo para detecção, o mesmo ocorrendo com as técnicas sorológicas empregadas no início dos anos oitenta (BEDENDO, 2011; BERTACCINI; DUDUK, 2009).

O desenvolvimento das técnicas moleculares proporcionou um grande avanço nos estudos com fitoplasmas. A análise molecular tem provado ser mais precisa e confiável para a detecção e identificação de fitoplasmas do que os critérios biológicos

(LEE et al., 1998). As técnicas mais utilizadas são PCR (Polymerase Chain Reaction), a qual permite a detecção pela amplificação de fragmentos genômicos e a RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), fundamental para a classificação, por proporcionar a clivagem destes fragmentos e sua posterior análise (HARRISON et al., 1996; LEE et al., 1998).

Estas técnicas têm sido utilizadas de maneira frequente nos estudos deste grupo de patógenos, conduzindo à comprovação de associações entre distintos fitoplasmas e diversas espécies de plantas herbáceas, arbóreas, florestais, frutíferas, ornamentais, gramíneas, daninhas e, também diferentes espécies de insetos vetores (DAVIS, 1995).

Lee et al. (1994) relatam a aplicação da técnica de duplo PCR para detecção de fitoplasmas, usando-se *primers* universais. Dentre os *primers* mais comumente empregados para realização do duplo PCR destacam-se: P1/P7 (GREEN; THOMPSON; MACKENZIE, 1999), P1/Tint (DENG; HIRUKI, 1991; SMART et al., 1996) e R16F2n/R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996). Os *primers*, iniciadores da síntese do DNA, são sequências curtas de 20 a 30 bases. São desenvolvidos a partir de determinadas regiões de genes. Nos procariotos, esta região alvo geralmente corresponde ao 16S e 23S rDNA, que são altamente conservadas (LEE et al., 1993).

Um sistema clássico e confiável para a detecção e identificação foi desenvolvido com o uso das ferramentas moleculares PCR/RFLP, analisando a região conservada dos fitoplasmas (LEE et al., 1998; BERTACCINI; DUDUK, 2009). De acordo com este esquema, os fitoplasmas são classificados em diferentes grupos e subgrupos (LEE et al., 1998). A identificação realizada por meio de PCR/RFLP emprega enzimas de restrição para clivar os fragmentos de DNA que foram amplificados no PCR. Uma sequência específica de nucleotídeos é reconhecida por enzimas específicas, que cortam os fragmentos de DNA, originando fragmentos menores, os quais são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os padrões de restrição resultantes são confrontados com os padrões existentes na literatura, permitindo a classificação dos fitoplasmas em 19 grupos distintos e mais de 40 subgrupos (LEE et al., 1993, 1998).

Recentemente, uma nova modalidade de RFLP, denominada de RFLP virtual, tem sido adotada para a identificação e classificação de fitoplasmas (WEI et al., 2007;

ZHAO et al., 2009). Os fragmentos genômicos amplificados por PCR são sequenciados diretamente ou clonados e, posteriormente, sequenciados. A digestão *in silico* é conduzida com programas de computador. Os padrões de restrição gerados para o fitoplasma em estudo são comparados com aqueles relatados para outros fitoplasmas. Índices de similaridade entre os padrões apresentados pelo fitoplasma em estudo e aqueles encontrados na literatura são calculados a partir de equações matemáticas, permitindo a classificação deste fitoplasma em algum dos 31 grupos e diversos subgrupos reconhecidos até o momento (LEE et al., 1998, 2010, 2010b; BERTACCINI; DUDUK, 2009; WEI et al., 2007, 2011).

2.1.2.4 Transmissão e controle

Na natureza, a transmissão de fitoplasmas ocorre por meio de insetos vetores; no entanto, experimentalmente, estes agentes de doença podem ser transmitidos por insetos vetores, plantas parasitas do gênero *Cuscuta* e por enxertia de tecido (DAVIS, 1995; GOODWIN et al., 1999; LEE et al., 2000; BERTACCINI; DUDUK, 2009). Os insetos vetores, além de atuarem como agentes transmissores de fitoplasmas, também podem ser hospedeiros do patógeno e garantirem sua sobrevivência (LEE; DAVIS, 1992). Estes insetos adquirem o fitoplasma ao se alimentarem no floema de plantas infectadas, podendo, após um determinado período de incubação, transmití-lo para plantas sadias (BEDENDO, 2011).

Para Weintraub; Beanland (2006), os vetores mais importantes de fitoplasmas são os insetos das famílias Cicadellidae, Cixidae, Psyllidae, Delphacidae e Derbidae. O patógeno entra no corpo do inseto via estilete durante a alimentação, sendo absorvido pela hemolinfa e, subsequentemente, coloniza a glândula salivar. Este processo dura, em média, algumas semanas (BERTACCINI; DUDUK, 2009). O período de latência do fitoplasma no vetor pode variar de 7 a 80 dias, após o qual o inseto passa a transmitir o patógeno por toda sua vida (MOYA-RAYGOZA; NAULT, 1998).

As medidas preventivas de controle que visam impedir a entrada do patógeno na área são fundamentais para o controle das doenças associadas aos fitoplasmas (BEDENDO, 2011). Estas medidas envolvem o uso de mudas de boa qualidade fitossanitária, bem como o controle de insetos com uso de agroquímicos, principalmente

nos estádios iniciais da cultura. Estes procedimentos visam reduzir as fontes de inóculo e a disseminação do patógeno, prevenindo surtos da doença. Ainda, a remoção de plantas invasoras ou de plantas da própria cultura que permanecem no campo após a colheita pode contribuir para a redução do inóculo na área (BERTACCINI; DUDUK, 2009). O tratamento com antibiótico pode resultar na remissão temporária dos sintomas, mas esta medida deve ser analisada com cuidado, em função da segurança dos consumidores e da eficiência de controle (SECOR, 2007).

2.1.2.5 A associação de fitoplasmas com doenças

Doenças associadas aos fitoplasmas ocorrem em centenas de espécies de plantas, causando perdas em culturas agronomicamente importantes (DAVIS, 1995; LEE et al., 2000). Dentre as doenças de impacto, pode-se destacar o amarelecimento letal do coqueiro, que causa a morte de milhões de plantas no Caribe; o amarelo do pessegueiro, responsável pelo deslocamento das áreas produtoras nos Estados Unidos; o amarelo da videira que está entre as mais sérias doenças da videira no continente americano e europeu; o nanismo amarelo do arroz, afetando várias regiões do sudeste da Ásia; o declínio da pereira que reduz a produtividade e diminui a vida útil dos pomares; o enfezamento do milho, que provoca grandes perdas nas Américas Central e do Sul (LEE et al., 2000).

Segundo Kitajima (1994), no Brasil há uma extensa diversidade de plantas afetadas por fitoplasmas, tais como ornamentais, frutíferas, cereais e hortaliças. São relatadas como exemplos o enfezamento vermelho do milho (BEDENDO et al., 2000); superbrotamento do hibisco (MONTANO et al., 2001); cálice gigante do tomateiro (AMARAL MELO et al., 2006); lenho mole da macieira (RIBEIRO et al., 2007); superbrotamento do maracujazeiro (RIBEIRO; BEDENDO, 2007); enfezamento do repolho (AMARAL MELO, 2007); enfezamento da couve-flor (RAPUSSI; BEDENDO, 2008); enfezamento do brócolis (ECKSTEIN et al., 2008); síndrome do amarelecimento foliar da cana de açúcar (SILVA et al., 2009); malformação de folhas de Celosia sp. (ECKSTEIN, 2008); superbrotamento da mandioca (FLORES, 2009); e fitoplasmas em citros (BARBOSA, 2010).

2.1.3 Fitoplasmas em soja

Derrick e Newson (1984), após análises ao microscópio eletrônico de transmissão, relataram a associação de fitoplasmas com uma doença presente em campos do estado norte-americano da Louisiania, caracterizada por sintomas de superbrotamento das gemas, atraso na senescência e ocorrência de apenas uma semente nas vagens. Os corpúsculos pleomórficos foram observados no floema de plantas sintomáticas coletadas no campo e em plantas que foram inoculadas experimentalmente por meio de cigarrinhas da espécie *Scaphytopius acutus*.

Granada (1979a), ao investigar na Colômbia, no ano de 1968, as possíveis causas da doença conhecida como 'machismo da soja', propôs fitoplasmas como possíveis agentes causais da doença. O autor observou os sintomas em plantas naturalmente infectadas e em plantas cujo patógeno foi transmitido pela cigarrinha *Scaphytopius fulinosus*, encontrada com alta incidência nos campos cultivados com soja. Todas as plantas inoculadas, após um período médio de 39 dias, apresentaram sintomas idênticos àqueles observados no campo. Os sintomas exibidos por plantas doentes se expressavam pela coloração verde intensa das plantas e pelo prolongamento do ciclo vegetativo, o qual se mostrava duas a três vezes mais longo que aquele das plantas sadias. Também foram observados os sintomas de má formação das vagens e grãos, sépalas longas e largas com aparência de folhas, filodia, flores pequenas, fechadas e de coloração pálida, quando o normal é violeta. Granada (1979b) demonstrou a suscetibilidade do organismo causador do 'machismo' ao antibiótico tetraciclina. As plantas sintomáticas quando submetidas a aplicação de tetraciclina apresentavam a restauração da dominância apical e as folhas novas voltavam a se desenvolver normalmente.

Fletcher et al. (1984) encontraram no México plantas de soja apresentando sintoma de 'machismo', caracterizado por senescência atrasada, superbrotamento de gemas, vagens e sementes deformadas e diminutas e algumas plantas com filodia e virescência de pétalas. Estes autores, ao inocularem plantas de soja com a cigarrinha *Scaphytopius fuliginosus* infectada com fitoplasma, obtiveram os mesmos sintomas de 'machismo' observados anteriormente. Por meio da observação em microscópio

eletrônico foram visualizados organismos pleomórficos no floema das plantas infectadas.

Lee et al. (1998a, 1998b) relataram a ocorrência de dois fitoplasmas distintos em plantas de soja em Wisconsin (EUA). A presença de fitoplasma do grupo 16SrVI foi predominante nas amostras, entretanto algumas apresentavam infecção mista com o fitoplasma do grupo 16SrI-B. Os sintomas típicos da doença foram o nanismo, superbrotamento dos ramos novos, folhagem escura ou com manchas amarelas e necrose marginal, redução no número de vagens por nó e permanência de plantas verdes, mesmo após a maturação das vagens e folhas.

Jomantiene et al. (2000) identificaram a ocorrência de fitoplasma do grupo 16SrIII-B em plantas de soja na Lituânia. As plantas apresentavam desenvolvimento normal, porém ocorria necrose dos vasos, quando as hastes eram cortadas.

Lee et al. (2002) detectaram fitoplasma do grupo 16SrI-A e 16SrI-O em plantas de soja cultivadas em Wisconsin (EUA). As plantas mostravam um tipo de sintoma conhecido por “síndrome da haste-verde”. Tais plantas permaneciam verdes após a maturação das vagens, dificultando assim a colheita.

Na Costa Rica, Villalobos et al. (2009) encontraram plantas de soja com sintomas de nanismo, folhas pequenas, formação excessiva de brotos e vagens abortadas. Um fitoplasma foi detectado nestas plantas e, após análise dos padrões de RFLP e da sequência do 16S rDNA clonado, descobriram que o mesmo representava um novo táxon estreitamente relacionado com representantes do grupo 16SrXII. Também em plantas de soja cultivadas na Costa Rica e portadoras dos mesmos sintomas acima descritos, porém incluindo a permanência da planta verde após a maturação das vagens, Lee et al. (2011) detectaram infecção por fitoplasma. Após a condução de análise de PCR/RFLP virtual com as 17 enzimas, propuseram um novo grupo de classificação (16SrXXXI) para o referido fitoplasma.

Kumar et al. (2011) identificaram molecularmente fitoplasmas do grupo 16SrII-C nos países africanos de Malauíe e Moçambique. Os sintomas típicos da infecção eram caracterizados por filodia, virescência, redução do tamanho foliar, encurtamento dos internódios e superbrotamento nas brotações. Estes autores relataram que em 1984 já

fora observada a ocorrência de filodia e superbrotamento em plantas de soja em Moçambique, entretanto, a etiologia da doença não havia sido determinada.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Amostras de plantas de soja

Plantas de soja, no estádio de final de ciclo, foram coletadas em duas propriedades localizadas na cidade de Sorriso, no estado de Mato Grosso. Dentre as amostras enviadas para análise foram selecionadas três amostras sintomáticas de cada uma das propriedades.

As plantas apresentavam folhas com deformações do tipo bolhas na face adaxial; desenvolvimento anormal dos botões florais, os quais não se abriam em flores; vagens de tamanho reduzido, com menor número de sementes; menor número de vagens por planta; vagens que não completaram a maturação; coloração verde da parte aérea de plantas em final de ciclo (Figura 1).

Figura 1 - Plantas sintomáticas de soja. A: redução na produção de vagens; B: interrupção no desenvolvimento normal dos botões florais, os quais não evoluíram para abertura das flores; C: folhas com deformações do tipo bolhas na face adaxial
Figuras B e C. Fonte: Dr Eros Francisco- Fundação Mato Grosso.

2.2.2 Extração do DNA

A extração do DNA total foi processada a partir da nervura central e do pecíolo das folhas amostradas no campo. Para este procedimento foi empregado um *kit* comercial de extração (DNeasy Plant Mini Kit - Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

O protocolo de extração é descrito a seguir. Aproximadamente 1,0 g de material vegetal fresco foi macerado em almofariz de porcelana, usando-se nitrogênio líquido. O material foi colocado em microtubo do tipo Eppendorf de 1,5 mL, adicionados 400 µL do tampão AP1 (Qiagem) e 4 µL RNase. Os microtubos foram mantidos por 10 minutos a 65°C. Em seguida, foram adicionados 130 µL do tampão AP2 (Qiagem) e a mistura foi incubada a -20°C por 5 minutos. Após centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos, o precipitado foi descartado e o sobrenadante aplicado em uma coluna montada sobre um tubo coletor. O material foi centrifugado nas mesmas condições citadas anteriormente. Ao filtrado que passou pela coluna foram adicionados 675 µL do tampão AP3 (Qiagem). Um volume de 650 µL desta mistura foi aplicado em uma coluna e

centrifugado por 1 minuto a 8.000 rpm. O filtrado que passou pela coluna foi descartado e a coluna contendo o DNA foi transferida para um novo microtubo. Ao DNA foram adicionados 500 µL do tampão AW (Qiagem), centrifugados por 1 minuto a 8.000 rpm. Este processo foi realizado duas vezes, sendo que, na segunda lavagem, a centrifugação foi processada a 14.000 rpm por 2 minutos. Posteriormente, o material foi transferido para um novo microtubo e adicionados 100 µL do tampão AE (Qiagem), para eluição do DNA. Finalmente, o DNA foi armazenado a -20°C.

2.2.3 Detecção de fitoplasma por PCR

O DNA total extraído de cada amostra foi diluído em água deionizada (miliQ) e autoclavada em diferentes concentrações, para serem utilizados nas reações de PCR. O controle negativo foi representado pelo DNA de plantas assintomáticas e água, enquanto como controle positivo foi usado DNA de plantas de milho, comprovadamente infectadas por fitoplasma.

Na detecção foram utilizados *primers* que amplificam a região correspondente ao 16S rDNA de fitoplasmas. Os *primers* R16mF2/mR1 (GUNDERSEN; LEE, 1996), P1/P7 (DENG; HIRUKI, 1991; SMART et al., 1996) e R16F2n/R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996) foram usados nas reações de duplo (*nested*) PCR. O produto da primeira reação com os *primers* mF2/mR1 ou P1/P7, foi usado como molde para a segunda reação, onde foi usado o par F2n/R2. Este último amplifica uma sequência nucleotídica de aproximadamente 1,2Kb.

As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas abaixo.

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

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

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

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

R16 F2n - 5’ GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG 3’ (GUNDERSEN; LEE, 1996).

R16 R2 - 5’ TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G 3’ (GUNDERSEN; LEE, 1996).

Cada reação foi processada com um volume final de 25 µL contendo: 1 µL do extrato do DNA diluído ou puro; 18,7 µL de água miliQ; 0,5 µL de cada *primer* (na

concentração de 20 pmol/ µL); 2 µL de solução tampão 10 X PCR e 0,17 µL de Amplitaq 5 U/ µL. Para os *primers* mF2/mR1, P1/P7 e F2n/R2, o termociclador foi programado para 35 ciclos, compreendendo: 1 minuto a 94°C para desnaturação, 2 minutos a 50°C para anelamento e 3 minutos a 72°C para extensão; uma única etapa de desnaturação inicial de 1 minuto a 94°C e uma de extensão final de 7 minutos a 72°C também foram incluídas.

Os produtos obtidos nas reações de duplo PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo o corante Sybr safe® 1%, usando tampão TBE 0,5 X. O DNA gerado nas reações de PCR foi submetido à corrente elétrica por 60 minutos a 65 volts e a visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta.

2.2.4 Identificação de fitoplasma por PCR com *primers* específicos

Após a detecção do fitoplasma, o produto da primeira reação de PCR com os *primers* mF2/mR1 e P1/P7, foi re-amplificado com *primers* específicos para os grupos 16SrI e 16SrIII. As reações de PCR e a eletroforese foram processadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

Como padrões positivos foi utilizado DNA extraído de plantas de milho, infectadas pelo fitoplasma do enfezamento pertencente ao grupo 16SrI, e DNA de plantas de chuchu, portadoras do fitoplasma do superbrotamento pertencente ao grupo 16SrIII.

As sequências dos *primers* específicos utilizados são descritas a seguir (LEE et al., 1994).

R16(I)F1 - 5’ TAA AAG ACC TAG CAA TAG G 3’
R16(I)R1 - 5’ CAA TCC GAA CTG AGA CTG T 3’
R16(III)F2 - 5’ AAG AGT GGA AAA ACT CCC 3’
R16(III)R1 - 5’ TCC GAA CTG AGA TTG A 3’

2.2.5 Purificação do 16S rDNA

A purificação do DNA foi realizado com o *kit* de purificação *PureLinkTM* (Invitrogen), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Em um microtubo de

1,5 mL, foram adicionados 300 µL do tampão de captura e 75 µL do produto obtido na reação de PCR com *primers* F2n/R2. A mistura obtida foi colocada em uma coluna com filtro, acoplada ao tubo coletor, centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. O líquido que passou pela coluna foi descartado. A coluna foi recolocada ao tubo coletor, adicionados 650 µL do tampão de lavagem e realizada uma nova centrifugação, nas mesmas condições descritas anteriormente. O líquido que passou pela coluna foi descartado e o restante foi submetido a uma nova centrifugação por 3 minutos a 13.000 rpm, para remover os resíduos do tampão de lavagem. Após a centrifugação, a coluna foi transferida para um novo tubo e adicionados 50 µL de tampão de eluição. O material foi incubado à temperatura ambiente por 1 minuto e, em seguida, centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos. As amostras purificadas foram armazenadas à temperatura de 20°C negativos.

A concentração do DNA foi estimada por comparação visual da banda do marcador Lambda DNA com as bandas do DNA purificado.

2.2.6 Clonagem do 16S rDNA do fitoplasma

Para realizar a clonagem, o fragmento de DNA de 1,2Kb purificado foi inserido no vetor pGEM®- T Easy Vector System I (Promega) e clonado em *Escherichia coli* da estirpe DH5α. A inserção do DNA ao plasmídeo é chamada ligação. Neste processo foram utilizados 3 µL do DNA purificado, 1 µL do vetor (25 ng. μL^{-1}), 5 µL de tampão ligase 2X e 1 µL de T4DNA ligase (3 U. μL^{-1}), formando uma mistura de 10 µL que foi colocada em um microtubo e armazenada por 12 horas a 4°C.

A transformação é o processo de inserção do vetor contendo o fragmento de DNA nas células competentes da *E. coli.* As células competentes foram preparadas conforme Hanahan (1983), onde em um microtubo adicionou-se 2 µL do produto da ligação em 50 µL de células competentes e incubou-se no gelo por 30 minutos. Em seguida, a mistura foi submetida a um choque térmico, por incubação a 42°C por 50 segundos, e, imediatamente, imersão em gelo durante 2 minutos. Após o choque, foi adicionado às células transformadas 450 µL de meio de cultura SOC (1% de triptona, 0,5% extrato de levedura, 8,5 mM NaCl, 2,5 mM de KCl, 0,001 mM MgCl, 0,02 mM de glicose e água até completar o volume de 1000 mL) pré-aquecido a 37°C. Os

microtubos permaneceram por 2 horas a 37°C em agitador para promover o crescimento das células transformadas. Após este período, 80 µL da suspensão de células transformadas foram plaqueados em meio LB (1% de triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,25% de NaCl, 4% de ágar) e acrescidos 20 µL de ampicilina (100 $mg.mL^{-1}$), 20 µL X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosida na concentração de 50 ng/mL) e 20 µL de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosida na concentração de 50 mg/mL). As colônias foram incubadas a 37°C por 12 horas. Os produtos X-gal e IPTG foram usados para avaliar a atividade de β-galactosidae nos transformantes, permitindo diferenciar as bactérias transformadas das não transformadas. As colônias de coloração branca corresponderam às células transformadas, enquanto aquelas de coloração azul representaram as células não transformadas. Os clones foram transferidos para tubos do tipo Falcon, contendo meio líquido LB e incubados a 37°C por 12 horas, sob agitação de 200 rpm para promover o crescimento da bactérias.

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

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

Os plasmídeos contendo os clones foram sequenciados pela empresa *Macrogen* (Seul, Coréia do Sul), usando o par de *primers* SP6/T7. As sequências obtidas foram analisadas através dos programas computacionais de construção Bio Edit V.7.0.9.0 (HALL, 1999) e análise de sequências (Multiple Sequence Alignment - CLUSTALW).

2.2.8 Análise de RFLP *in silico*

O programa pDraw32 V.1.1.110 (AcaClone Software) foi usado para análise dos mapas de sítios putativos de restrição das sequências do 16S rDNA do fitoplasma encontrado nas plantas sintomáticas de soja. A sequência nucleotídica do 16S rDNA do fitoplasma obtido neste estudo e as sequências dos fitoplasmas representantes do

grupo 16SrI depositadas no GenBank foram clivadas e alinhadas no programa Bio Edit V.7.0.9.0. No programa pDraw32 V.1.1.110 foi realizada uma digestão simulada por computador com as 17 enzimas propostas por Wei et al., (2007). Estas enzimas foram *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI, *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I,*Hpa*II, *Kpn*I, *Mbo*I, *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, *Taq*I. Após a digestão *in silico*, foi gerada uma imagem simulada de eletroforese em gel de agarose 3%.

Os padrões gerados pela análise de RFLP *in silico*, correspondentes ao fitoplasma encontrado neste estudo, foram comparados com aqueles dos fitoplasmas representantes dos diversos subgrupos do grupo 16SrI, para fins do cálculo dos coeficientes de similaridade (F). Para cada par de fitoplasma, foi calculado o coeficiente de similaridade de acordo com a fórmula descrita por Nei e Li (1979), F= 2Nxy/(Nx+Ny), onde Nx e Ny representam o número total de bandas no perfil de cada fitoplasma resultantes da digestão com as 17 enzimas e Nxy é o número de bandas compartilhadas pelos dois fitoplasmas. As bandas de até 50 pb foram consideradas para os cálculos.

2.2.9 Análise filogenética

Uma árvore filogenética foi construída usando-se as sequências nucleotídicas componentes da região do 16S rDNA do fitoplasma encontrado neste estudo e de representantes de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI, 16SrIII, 16SrVII, 16SrIX, 16SrXIII e 16SrXV, através do programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011). Como raiz da árvore foi utilizada a sequência do microrganismo *Acholeplasma laidlawii.* Na construção da árvore filogenética foi utilizado o método de agrupamento Neighbour-joining e o teste Bootstrapping foi processado 1.000 vezes, para garantir a confiabilidade da posição dos ramos. Os fitoplasmas utilizados na construção da árvore estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA de fitoplasmas representantes dos grupos 16SrI, 16SrIII, 16SrVII, 16SrIX, 16SrXIII e 16SrXV depositadas no GenBank e usadas para construção da árvore filogenética

Nome da doença	Fitoplasma	Acesso Genbank	Referência
Soybean	Soy-Br1	* --	Presente estudo
Tomato Big Bud (BB)	16SrI-A	AF222064	Wei et al., 2011
Maize bushy stunt (MBS)	16SrI-B	AY265208	Lee et al., 2004
Clover Phyllody (CPh)	16SrI-C	AF222065	Wei et al., 2011
Paulownia Witches' Broom (PaWB)	16SrI-D	AY265206	Wei et al., 2011
Blueberry Stunt (BBS3)	16SrI-E	AY265213	Wei et al., 2011
Apricot Chlorotic Leaf Roll (ACLR-AY)	16SrI-F	AY265211	Wei et al., 2011
Strawberry Multiplier (STRAWB2)	16SrI-K	U96616	Wei et al., 2011
Onion Proliferation (OnP2)	16SrI-L	GU223209	Wei et al., 2011
Valeriana Yellows (ValY)	16SrI-M	AY102273	Jomantiene et al., 2010
Ipomoea Obscura Witches' Broom (IOWB)	16SrI-N	AY265205	Wei et al., 2011
Soybean Aster Yellows	16SrI-O	AF268405	Wei et al., 2011
Aster Yellows (AYIP)	16SrI-P	AF503568	Wei et al., 2011
Cherry Little Leaf (CherLL)	16SrI-Q	AY034089	Wei et al., 2011
Cherry Bunchy Leaf (ChBL)	16SrI-R	HM067754	Jomantiene et al., 2011
Lilac Little Leaf (LcLL)	16SrI-S	HM067755	Jomantiene et al., 2011
Azalea Little Leaf (AzLL)	16SrI-T	HQ285917	Wei et al., 2011
Potato Purple Top (PPT-JAL6)	16SrI-U	FJ914650	Santos-Cervantes et al., 2010
Potato Purple Top (PPT-SON18)	16SrI-V	FJ914642	Santos-Cervantes et al., 2010
Canadian Peach X-Disease (CX)	16SrIII-A	L33733	Gundersen et al., 1994
Ash Yellows (AshY)	16SrVII-B	AY034608	Barros et al., 2002
Pigeon Pea Witches' Broom (PPWB)	16Sr-IX	U18763	Lee et al., 1998
Mexican Periwinkle Virescence (MPV)	16Sr-XIII	AF248960	Wei et al., 2007
Hibiscus Witches' Broom (HibWB)	16Sr-XV	AF147708	Montano et al., 2001
Acholeplasma laidlawii	*Acholeplasma laidlawii*	M23932	Weisburg et al., 1989

***** A sequência foi depositada no GenBank, porém ainda não foi registrada oficialmente

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Detecção de fitoplasmas por PCR

Os resultados mostraram que fitoplasmas estavam presentes nos tecidos das seis plantas sintomáticas analisadas (Figura 2). A presença dos fitoplasmas foi evidenciada pela amplificação de fragmentos de DNA de aproximadamente 1,2Kb em PCR duplo com o uso dos *primers* R16mF2/mR1, na primeira reação e R16F2n/R2, na segunda reação. O peso molecular dos fragmentos genômicos amplificados é esperado para o par de *primers* usados nas reações de re-amplificação do PCR duplo. Resultados idênticos foram também obtidos para as reações que continham o DNA extraído de plantas de milho infectadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho, as quais foram empregadas como controle positivo. No entanto, nenhuma amplificação

ocorreu quando o DNA de planta assintomática de soja, representando padrão negativo, foi usado na mistura de reação de duplo PCR (Figura 2).

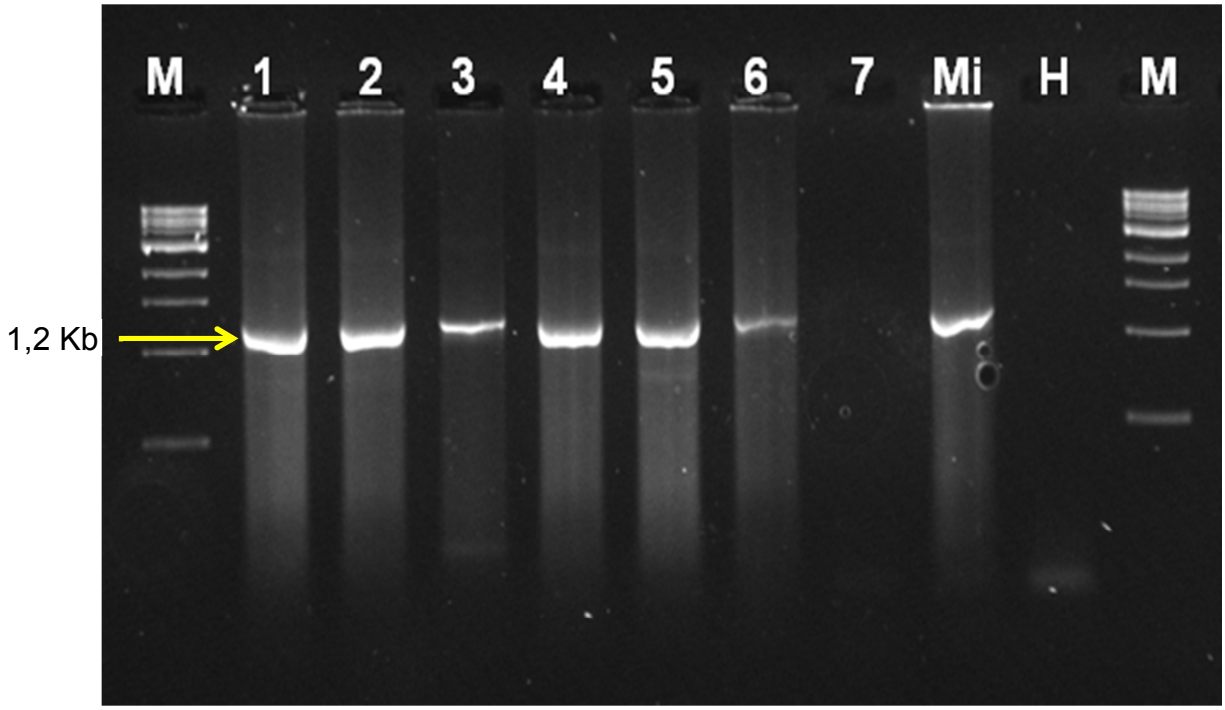

Figura 2 – Presença de fitoplasmas em plantas sintomáticas e ausência em planta assintomática de soja, pelo uso de duplo PCR com os *primers* R16mF2/mR1 e R16F2n/R2. As bandas presentes no gel correspondem às amplificações de fragmentos genômicos de 1,2Kb. Colunas: M= Marcador molecular (1Kb Ladder); 1 a 6 = Amostras de DNA de plantas sintomáticas de soja; 7= planta de soja assintomática (padrão negativo); Mi= padrão positivo representado por planta de milho sabidamente infectada com fitoplasma; H= água, usada como controle negativo nas reações de duplo PCR

Os sintomas encontrados nas amostras de soja analisadas se caracterizavam por folhas com deformações do tipo bolhas; vagens de tamanho reduzido; vagens menor número de sementes; menor quantidade de vagens por planta; vagens que não completaram a maturação; presença de coloração verde nas plantas de final de ciclo. Sintomas similares aos acima descritos foram relatados em alguns países por Derrick; Nelson (1984); Granada (1979a); Fletcher et al. (1984); Lee et al. (1998a, 1998b, 2002, 2011). No Brasil, fitoplasmas também foram detectados, por microscopia eletrônica, em plantas de soja com sintomas de superbrotamento de ramos (KITAJIMA; COSTA, 1979) e por PCR, em plantas que exibiam enfezamento generalizado e excesso de pequenas brotações (RIBEIRO et al., 2001).

2.3.2 Identificação de fitoplasmas por PCR

Em todas as seis amostras foi detectado um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrI, através do PCR duplo conduzido com os *primers* R16(I)F1/R16(I)R1, específicos para a identificação de fitoplasmas deste grupo (Figura 3). Os produtos amplificados corresponderam a fragmentos de DNA de 1,1Kb, os quais foram visualizados na forma de bandas em gel de agarose. Como esperado, as reações contendo DNA de plantas de milho usadas como controle, portadoras de fitoplasma do grupo 16SrI, também geraram amplificações de mesmo peso molecular. Quando as mesmas seis amostras foram submetidas ao teste de duplo PCR com os *primers* R16(III)F2/R16(III)R1, um fitoplasma do grupo 16SrIII foi identificado em três das seis amostras analisadas (Figura 4). Neste caso, a presença do fitoplasma foi evidenciada pela amplificação de fragmentos genômicos de 0,8Kb, típicos para quando se utiliza os referidos *primers*. Produtos de PCR de 0,8Kb também foram obtidos para a amostra de chuchu infectada pelo fitoplasma do superbrotamento, o qual foi usado como referência para este grupo de classificação.

A ocorrência de fitoplasmas de ambos os grupos em três plantas de soja é caracterizada como infecção mista. Este tipo de infecção, provocada por dois ou mais fitoplasmas distintos, tem sido relatada para diversos patossistemas envolvendo fitoplasmas. No Brasil, por exemplo, em plantas de repolho com enfezamento foram também identificados fitoplasmas representantes dos grupos 16SrI e 16SrIII (AMARAL MELLO, 2007). Em couve-flor, fitoplasmas pertencentes a estes dois grupos foram associados a plantas que apresentavam redução no crescimento e deformação de inflorescência (RAPUSSI-SILVA, 2010). Os resultados do presente trabalho sugerem que há predominância do fitoplasma do grupo 16SrI em relação àquele do grupo 16SrIII, considerando as plantas de soja analisadas. No entanto, em função do pequeno número de amostras estudadas, esta evidência poderá ou não ser confirmada futuramente, em amostragens mais amplas.

Os grupos 16SrI e 16SrIII reúnem o maior número de fitoplasmas conhecidos até o presente, destacadamente em países dos continentes americano e europeu. No Brasil, membros de ambos os grupos já foram relatados em espécies cultivadas, daninhas e silvestres. Assim, fitoplasmas do grupo 16SrI foram relatados em

associação com a síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (SILVA et al., 2009), enfezamento vermelho do milho (BEDENDO et al., 1997) e filodia em frutos de morangueiro (MELO, 2008), entre outras. Por sua vez, fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII foram associados, entre outras doenças, ao amarelo da abobrinha-de-moita (MELO, 2008), superbrotamento da begônia (RIBEIRO et al., 2006), declínio ou amarelecimento do cinamomo (DUARTE et al., 2009), lenho mole da macieira (RIBEIRO et al., 2007), enfezamento do tomateiro (AMARAL MELLO et al., 2006) e enfezamento da berinjela (AMARAL MELLO et al., 2011).

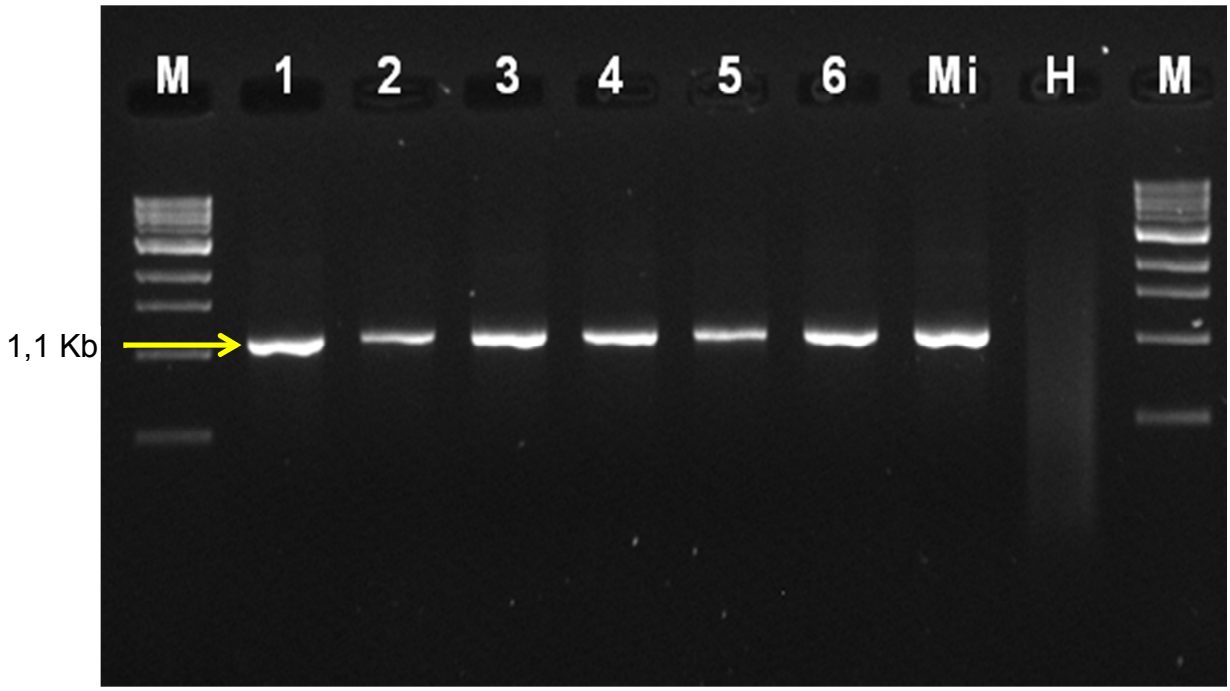

Figura 3 - Identificação de fitoplasma do grupo 16SrI em plantas sintomáticas de soja por duplo PCR com os pares de *primers* R16mF2/mR1 e R16(I)F1/ R16(I)R1. Amplificação de fragmentos de DNA de 1,1Kb. Colunas: M= Marcador molecular (1Kb Ladder); 1 a 6 = Amostras de DNA de plantas sintomáticas de soja; Mi= fitoplasma do enfezamento do milho pertencente ao grupo 16SrI, usado como referência; H= água, controle negativo da reação

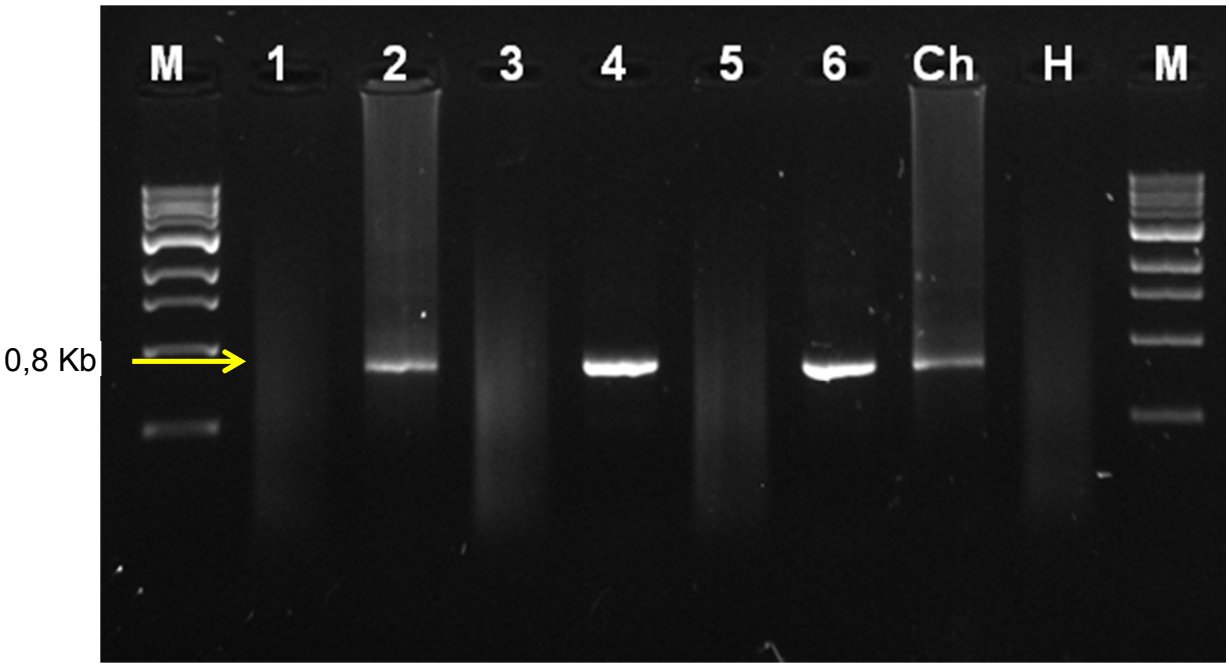

Figura 4 - Identificação de fitoplasma em plantas sintomáticas de soja por duplo PCR com os pares de *primers* R16mF2/mR1 e R16(III)F2/ R16(III). Amplificação de fragmentos de DNA de 0,8Kb. Colunas: M= Marcador molecular (1Kb Ladder); 1 a 6 = Amostras de DNA de plantas sintomáticas de soja; Ch= fitoplasma do enfezamento do chuchu pertencente ao grupo 16SrIII, usado como referência; H= água, controle negativo da reação

2.3.3 Análise das sequências nucleotídicas do 16S rDNA do fitoplasma 16SrI

Cada fitoplasma encontrado em cada uma das amostras de soja foi considerado como um isolado. Assim, no presente trabalho, foram encontrados seis isolados do grupo 16SrI e três isolados do grupo 16SrIII.

A análise das sequências do DNA do fitoplasma de grupo 16SrIII não foi realizada devido a não obtenção de clones suficientes, sendo feita somente sua identificação por PCR.

Para o fitoplasma do grupo 16SrI, quatro dos seis isolados foram clonados, enquanto para os dois restantes não foi possível a obtenção de clones. Para cada um dos quatro isolados foram obtidos três clones e as três sequências correspondentes aos três clones de cada isolado foram alinhadas e comparadas entre si. Para cada isolado foi determinada uma sequência consenso, sendo que estas quatro sequências consenso foram indistinguíveis entre si. Os padrões de restrição gerados pela digestão *in silico* destas sequências foram idênticos para os quatro isolados analisados, possibilitando concluir que um único fitoplasma estava presente nos tecidos de plantas sintomáticas. Estes padrões estão representados na Figura 5. Com base nestes

achados, o isolado identificado por Soy-Br1 foi escolhido para representar o fitoplasma do grupo 16SrI, encontrado nas plantas sintomáticas de soja. Esta sequência de 1246 pb foi depositada no GenBank.

A similaridade de sequência do isolado Soy-Br1 foi de 99% com os fitoplasmas representantes dos diversos subgrupos que compõem o grupo 16SrI. A análise virtual de RFLP, utilizando dezessete enzimas e os fragmentos de 1,2Kb produzidos pelo PCR com os *primers* R16F2n/R2, revelou que o fitoplasma Soy-Br1, identificado nas plantas de soja, e o fitoplasma representante do grupo 16SrI-B apresentaram os mesmos padrões de restrição, em relação às sequências do 16S rDNA (Figura 5). Isto demonstra a total identidade entre estes fitoplasmas.

Com base nos padrões de restrição gerados pela digestão *in silico* foram calculados os valores dos coeficientes de similaridade entre o fitoplasma identificado em soja e os representantes de diferentes subgrupos que compõem o grupo 16SrI. Estes valores variaram de 1 para os representantes dos subgrupo 16SrI-B (fitoplasma do enfezamento do milho-MBS) e 16SrI-N (fitoplasma do enfezamento da bata doce-IOWB “Ipomoea Obscura Witches' Broom”) a 0,87 para o representante do subgrupo 16Sr-O (fitoplasma do amarelo da soja - “Soybean aster yellows”) (Tabela 2).

Com base na análise virtual de RFLP e nos valores dos coeficientes de similaridade, o fitoplasma identificado nas plantas de soja é idêntico àquele pertencente ao subgrupo 16SrI-B e 16SrI-N.

Apesar dos valores idênticos dos coeficientes de similaridade entre o isolado Soy-Br1 e o representante do subgrupo 16SrI-N, os padrões de restrição gerados pelo representante deste subgrupo não correspondem ao modelo internacional aceito para a identificação de fitoplasmas, que estabelece a análise dos padrões de restrição obtidos a partir da digestão enzimática de fragmentos de DNA de 1,2Kb (LEE et al., 1998; WEI et al., 2007). O representante do subgrupo 16SrI-N foi diferenciado do representante do subgrupo 16SrI-B utilizando sequências de 1,8Kb (MARCONE et al., 2000). A diferenciação ocorreu somente para os padrões de restrição gerados pela enzima *Hpa*II. Portanto, de acordo com os critérios adotados pelos esquemas de classificação atualmente mais aceitos (LEE et al., 1998; WEI et al., 2007), ambos os fitoplasmas apresentam padrões de restrição idênticos, baseados nas sequências de nucleotídeos

do 16S rDNA. Por esta razão, o presente estudo considera que o fitoplasma identificado em plantas de soja pertencente ao grupo 16SrI-B.

A análise do fragmento de DNA clonado e sequenciado pertencente ao isolado Soy-Br1 e do fragmento pertencente ao fitoplasma representante do subgrupo 16SrI-B mostrou que ambos os fitoplasmas apresentam os mesmos sítios de restrição em relação à sequência de nucleotídeos componentes do gene 16S rDNA para todas as enzimas testadas (Figura 6). Estes resultados confirmam aqueles obtidos pela análise virtual de RFLP.

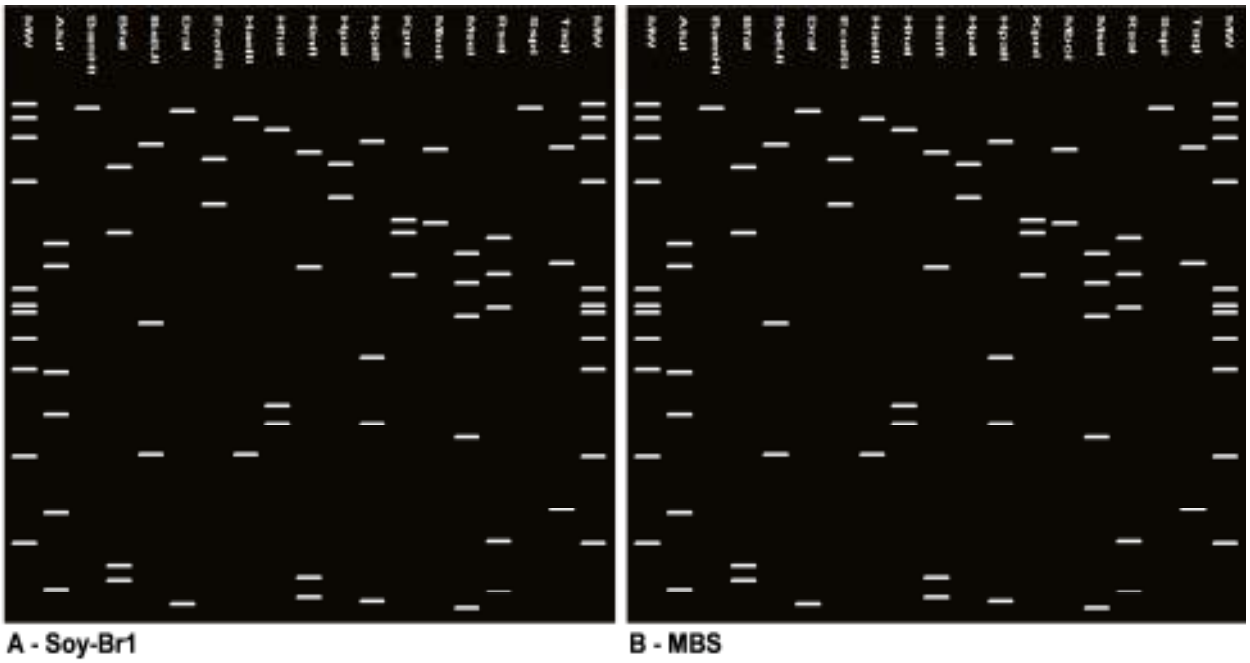

Figura 5 - Padrões de restrição de RFLP gerados pela digestão *in silico* de fragmentos de DNA correspondentes à região do 16S rDNA do fitoplasma encontrado em plantas de soja (A) e do representante do 16SrI-B Maize bushy stunt (B). Enzimas de restrição: *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI, *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I,*Hpa*II, *Kpn*I, *Mbo*I, *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, *Taq*I. M= marcador φX174-DNA *Hae*III digest

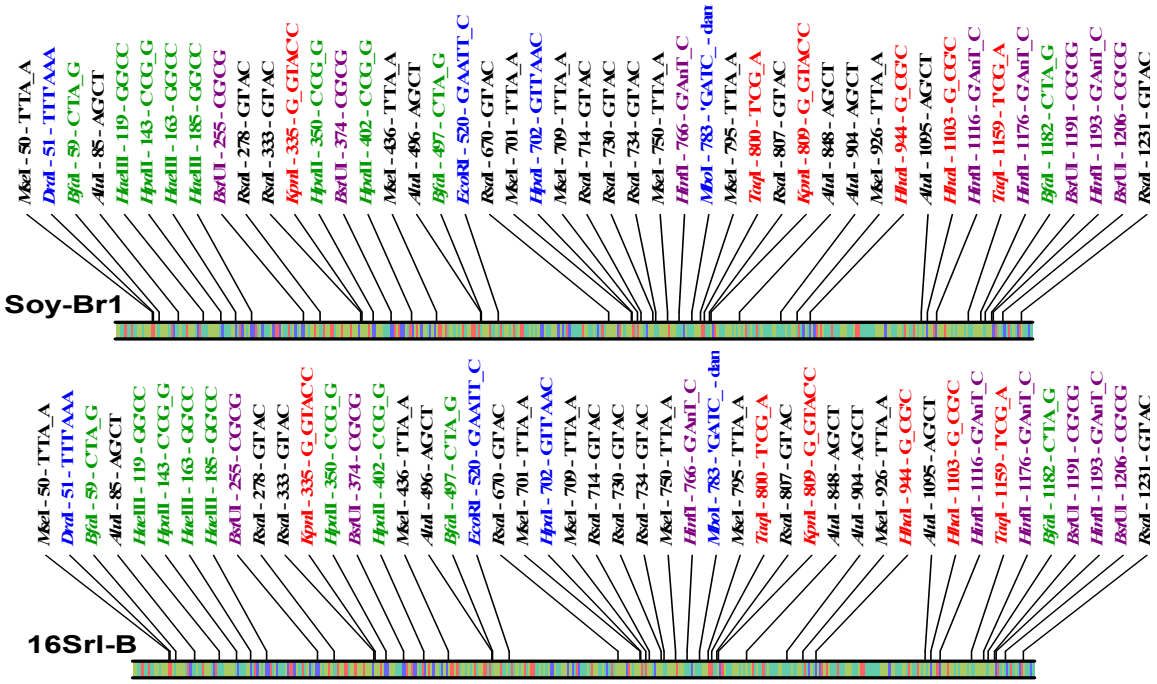

Figura 6 - Análise de sítios putativos de restrição com as mesmas enzimas utilizadas para análise de RFLP *in silico*. Soy-Br1 = sequência do 16S rDNA do fitoplasma encontrado na soja; 16SrI-B= sequência do fitoplasma representante do grupo 16SrI-B (Maise bushy stunt-MBS) obtida no GenBank, número de acesso AY265208

Tabela 2 - Valores de coeficientes se similaridade calculados para o fitoplasma detectado na soja e outros fitoplasmas pertencentes a diversos subgrupos do grupo 16SrI

Subgrupo	A	B	C	D	E	F	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	Soy-Br1
16SrI-A	1																		
16SrI-B	0,92	1																	
16SrI-C	0,91	0,93	1																
16SrI-D	0,93	0,97	0,90	1															
16SrI-E	0,91	0,93	0,92	0,90	1														
16SrI-F	0,86	0,86	0,89	0,85	0,87	1													
16SrI-K	0,90	0,92	0,91	0,89	0,91	0,92	1												
16SrI-L	0,89	0,97	0,90	0,94	0,90	0,85	0,89	1											
16SrI-M	0,88	0,96	0,93	0,95	0,89	0,84	0,88	0,93	1										
16SrI-N	0,91	0,99	0,92	0,96	0,92	0,87	0,91	0,96	0,95	1									
16SrI-O	0,87	0,87	0,80	0,84	0,84	0,75	0,81	0,84	0,83	0,87	1								
16SrI-P	0,92	0,94	0,93	0,91	0,93	0,94	1,00	0,91	0,90	0,93	0,81	1							
16SrI-Q	0,84	0,92	0,89	0,89	0,89	0,84	0,84	0,89	0,92	0,91	0,81	0,86	1						
16SrI-R	0,91	0,93	1,00	0,90	0,92	0,87	0,91	0,90	0,93	0,92	0,80	0,93	0,89	1					
16SrI-S	0,90	0,92	0,93	0,89	0,91	0,88	0,92	0,89	0,88	0,91	0,81	0,94	0,84	0,93	1				
16SrI-T	0,84	0,92	0,85	0,89	0,85	0,80	0,84	0,89	0,90	0,91	0,82	0,86	0,90	0,85	0,84	1			
16SrI-U	0,87	0,93	0,88	0,90	0,87	0,81	0,85	0,90	0,90	0,92	0,85	0,87	0,87	0,89	0,87	0,88	1		
16SrI-V	0,85	0,93	0,87	0,90	0,87	0,81	0,85	0,92	0,90	0,92	0,83	0,87	0,87	0,87	0,85	0,88	0,94	1	
Soy-Br1	**0,92**	**1**	**0,93**	**0,97**	**0,93**	**0,88**	**0,92**	**0,97**	**0,95**	**1**	**0,87**	**0,94**	**0,92**	**0,93**	**0,92**	**0,92**	**0,93**	**0,93**	**1**

O grupo 16SrI reúne uma diversidade de fitoplasmas pertencentes a distintos subgrupos, sendo este grupo conhecido como “Aster yellows” (LEE et al., 2004). Estes fitoplasmas estão associados a culturas agronomicamente importantes, sendo considerado um dos maiores e mais diversificados grupo de fitoplasmas, com mais de 100 representantes descritos em várias áreas geográficas do mundo (MARCONE et al.,

2000; LEE et al., 2004). Entre os fitoplasmas pertencentes ao grupo “Aster yellows” estão aqueles afiliados ao subgrupo 16SrI-B, o qual é destacadamente o mais importante pela frequência de ocorrência, número de hospedeiros, importância das doenças às quais estão associados e ampla distribuição, abrangendo áreas dos continentes americano, europeu e asiático (MARCONE et al., 2000).

No Brasil, o fitoplasma do grupo 16SrI-B está associado a várias doenças. O enfezamento vermelho do milho é um bom exemplo, uma vez que esta doença é reconhecida como sendo uma das mais importantes da cultura, tanto para o plantio convencional como para aquele conhecido como “safrinha” (BEDENDO et al., 2000). A síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar, uma doença que causou danos significativos em canaviais comercias na década de noventa, também está associada a um fitoplasma do subgrupo 16SrI-B, além de um vírus que parece ser prevalecente nas condições brasileiras (SILVA et al., 2009). Um fitoplasma deste subgrupo também foi encontrado em videira apresentando predominantemente sintomas de clorose foliar, em vinhedos paulistas e paranaenses, sendo a doença denominada de amarelo da videira (NERONI, 2009). Em primavera, uma anomalia caracterizada por forte deformação foliar e superbrotamento de ramos foi associada com fitoplasma deste subgrupo em plantas comercias (SILVA, 2008). Recentemente, uma doença conhecida por enfezamento, de relevante importância econômica para a cultura, foi relatada em plantas de brócolis que apresentavam deformação na inflorescência e redução no crescimento (ECKSTEIN, 2010). Plantas de braquiária (*Brachiaria decumbens*), capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea*) e capim-colonião (*Panicum maximum*) foram relatadas como hospedeiros potenciais de um representante do subgrupo 16SrI-B, evidenciando a ampla gama de hospedeiros deste fitoplasma (HAAS, 2005).

2.3.4 Análise filogenética

A sequência do 16S rDNA determinada para o fitoplasma Soy-Br1, identificado no presente estudo, e as sequências de fitoplasmas representantes dos grupos 16SrI, 16SrIII, 16SrVII, 16SrIX, 16SrXIII e 16SrXV foram utilizadas para a construção de uma árvore filogenética (Figura 7). Fitoplasmas destes grupos foram selecionados para comporem a árvore filogenética por possuírem representantes que ocorrem no Brasil.

As sequências correspondentes a cada um destes fitoplasmas foram obtidas junto ao GenBank, sendo que na árvore filogenética da Figura 7, estão assinalados os respectivos números de acesso. Os números nos ramos representam os valores de confiança de Bootstraping, o qual foi realizado 1.000 vezes.

A sequência nucleotídica correspondente ao fitoplasma Soy-Br1 emergiu do mesmo ramo que os demais representantes do grupo 16SrI, mostrando que este fitoplasma está estritamente relacionado aos fitoplasmas deste grupo de classificação. A árvore filogenética mostrou resultados concordantes com aqueles gerados pela análise virtual de RFLP, bem como nas análises dos sítios putativos de restrição, revelando uma concordância muito forte entre os resultados, os quais permitiram relacionar geneticamente o fitoplasma presente nas plantas de soja com aqueles usados como referências para o grupo 16SrI.

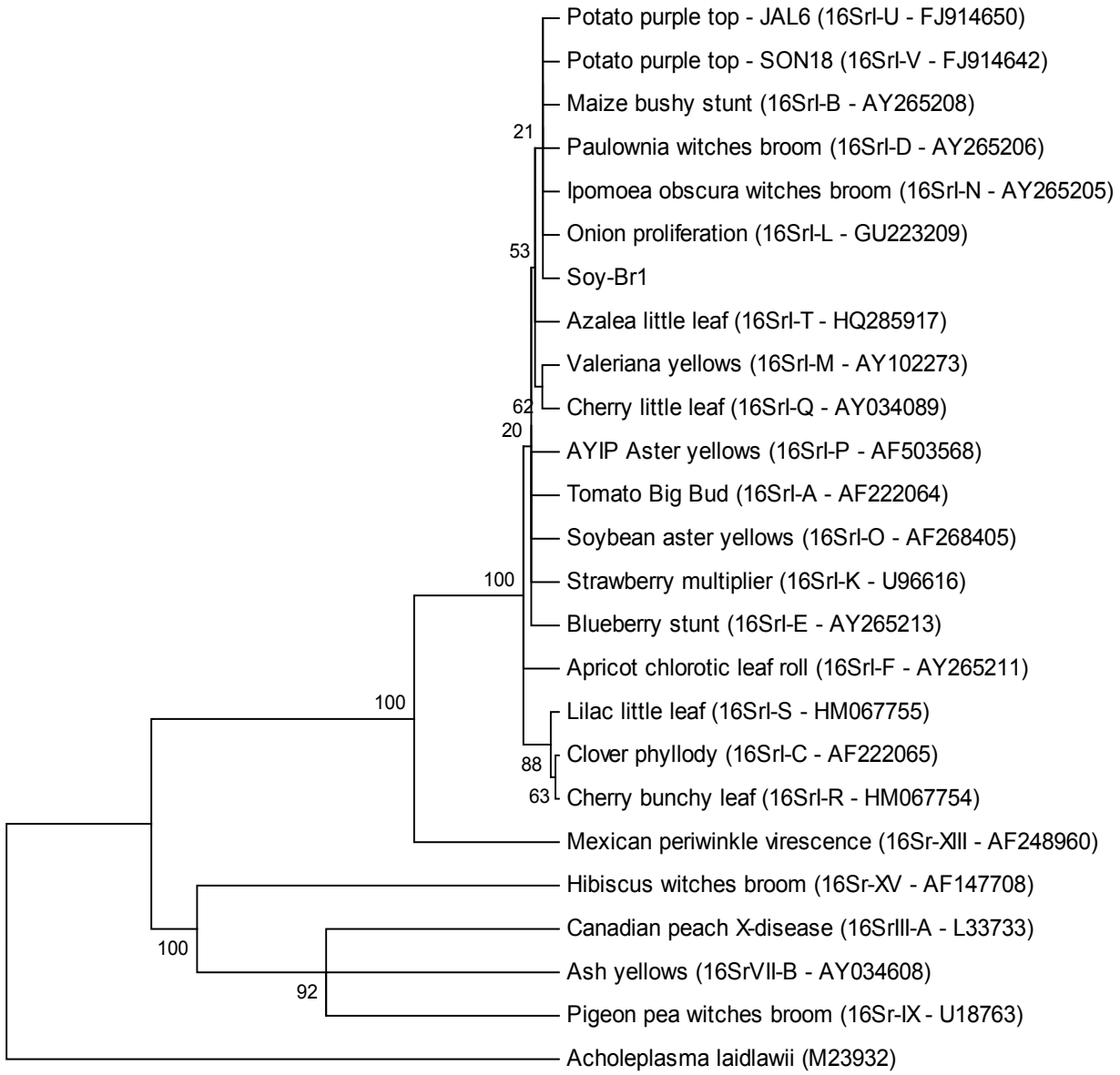

Figura 7 - Árvore filogenética construída usando o método *Neighbor-Joining* com as sequências da região 16S rDNA do fitoplasma identificado na soja, de fitoplasmas representantes do grupo 16SrI, fitoplasmas dos grupos 16SrIII, 16SrVII, 16SrIX, 16SrXIII, 16SrXV e o procarioto *Acholeplasma laidlawii*

Especificamente para soja, além de fitoplasmas do grupo 16SrI, fitoplasmas de outros grupos têm sido identificados em tecidos de plantas sintomáticas. Em infecção mista, juntamente com o fitoplasma do subgrupo 16SrI-B, foi identificado, através de duplo PCR, um fitoplasma do grupo 16SrVI, o qual foi relatado como sendo predominante nas amostras de plantas infectadas (LEE et al., 1998a, 1998b). Um fitoplasma do subgrupo 16SrI-A e um representante do subgrupo 16SrI-O, também

foram encontrados em plantas de soja que exibiam sintomas de uma doença conhecida por síndrome da haste verde, as quais se mantinham verdes mesmo após o período de maturação das vagens (LEE et al., 2002). No presente trabalho, foram caracterizados fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII, porém não foi possível classificá-los ao nível de subgrupo. Na Lituânia, no entanto, foi relatado que um fitoplasma do subgrupo 16SrIII-B estava associado a plantas que mostravam crescimento normal, apresentando como alteração somente a necrose de tecidos da região dos vasos condutores (JOMANTIENE et al., 2000). Fitoplasmas bastante diversos daqueles encontrados em associação com as plantas de soja analisadas no presente estudo foram caracterizados na África e na América Central. Assim, em Malauí e Moçambique, a etiologia de uma doença de soja conhecida desde a década de oitenta foi esclarecida recentemente quando um fitoplasma do grupo 16SrII-C foi identificado em plantas infectadas (KUMAR et al., 2011). Na Costa Rica, um fitoplasma encontrado em soja e geneticamente distinto daqueles até então conhecidos foi proposto como representante de um novo grupo de classificação, denominado de 16SrXXXI (LEE et al., 2011).

As pesquisas desenvolvidas neste trabalho demonstraram a presença de fitoplasmas afiliados aos grupos 16SrI e 16SrIII em tecidos provenientes de plantas sintomáticas de soja. Destaca-se que o objetivo maior deste estudo foi identificar molecularmente e classificar os fitoplasmas que foram detectados nestas plantas, cujos sintomas chamaram a atenção de técnicos envolvidos com a cultura. Considera-se que um maior número de amostras coletadas em áreas mais diversas e abrangentes, bem como testes de transmissão seriam necessários para fundamentar a hipótese de que os fitoplasmas identificados estariam relacionados com os sintomas exibidos pelas plantas. No entanto, o presente trabalho pode contribuir para estudos futuros mais aprofundados, uma vez que os resultados aqui obtidos evidenciaram que plantas de soja são hospedeiras de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII, os quais também ocorrem em vários outros hospedeiros cultivados nas condições brasileiras.

3 CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste trabalho, foi revelada a presença de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI-B e 16SrIII em plantas sintomáticas de soja. O representante do grupo 16SrI-B foi predominante em relação àquele do grupo 16SrIII, nas amostras analisadas. A detecção e identificação destes agentes evidenciaram que a soja pode ser considerada como uma espécie hospedeira de fitoplasmas. Este trabalho se constitui no primeiro relato sobre a identificação molecular de fitoplasmas ocorrentes em soja no Brasil.

REFERÊNCIAS

AMARAL MELLO, A.P.O. **Identificação de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença.** 2007. 64 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

AMARAL MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; KITAJIMA, E.W.; RIBEIRO, L.F.C.; KOBORI, R. Tomato big bud associated with a phytoplasma belonging to group 16SrIII in Brazil. **International Journal of Pest Management,** Oxford, v. 52, n. 3, p. 233-237, 2006.

AMARAL MELLO, A.P.O.; ECKSTEIN, B.; FLORES, D.; KREYCI, P.F.; BEDENDO, I.P. Identification by computer-simulated RFLP of phytoplasma associated with eggplant giant calyx representative of two subgrups, a lineage of 16SrIII-J and the new subgroup 16SrIII-U. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** Reading, v. 61, p. 1454-1461, 2011.

AMORIM, F.A. **Efeitos do gene *CP4 EPSPS* na produtividade de óleo em populações de soja.** 2011. 198 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BARBOSA, J.C. **Caracterização molecular e diversidade de fitoplasmas em pomares de citros no Estado de São Paulo.** 2010. 100 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BARROS, T.S.L. **Fitoplasmas no Brasil:** caracterização molecular via “Polymerase chain reaction” e “Restriction length polymorphism”. 1997. 88 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 1997.

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

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

BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Molecular evidence for the presence of maize bushy stunt phytoplasma in corn In Brazil. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 81, p. 957, 1997.

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

BERTACCINI, A.; DUDUK, B. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recente research. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 48, p. 355-378, 2009.

BERTACCINI, A.; BELLARDI, M.G.; VIBIO, M. Virus diseases of ornamental shrubs. X. *Euphorbia pulcherrima* Willd. infected by viruses and phytoplasmas. **Pytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 35, p. 129-132, 1996.

BERTAMINI, M.; NEDUNCHEZHIAN, N. Effect of phytoplasma, stolbur-subgroup (Bois noir-BN)] of photosynthetic pigments, saccarides, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, nitrate and nitrite reductases and photosynthetic activities in field-grow grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Chardonnay) leaves. **Photosynthetica,** Prague, v. 39, p. 119-122, 2001.

BLACK, R.J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva. In: CÂMARA, G.M.S. **Soja:** tecnologia de produção II. Piracicaba: ESALQ, LPV, 2000. cap. 1, p. 1-17.

BONATO, E.R. **Estresses em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 254 p.

CÂMARA, G.M.S.; HEIFFIG, L.S. Fisiologia, ambiente e rendimento da cultura da soja. In: CÂMARA, G.M.S. **Soja:** tecnologia de produção II. Piracicaba: ESALQ, LPV, 2000. cap. 5, p. 81-119.

COSTA, J.A. **Cultura da soja.** Porto Alegre: Cinco Continentes, 1996. 233 p.

DAVIS, R.E. Antibiotics sensitivities in vitro in diverse spiroplasma strains associated with plants and insects. **Applied Environmental Microbiology,** Washington, v. 41, p. 329-331, 1981.

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

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

DERRICK, K.S.; NEWSOM, L.D. Occurrence of a leafhopper-transmitted disease of soybeans in Louisiana. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 68, p. 343-344, 1984.

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

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

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

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

ECKSTEIN, B.; SILVA, E.G.; BEDENDO, I.P.; BRUNELLI, K. Primeiro relato da ocorrência de fitoplasmas em cultura do brócolis no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, p. 93, 2008. Suplemento.

EMBRAPA. **Tecnologia de produção de soja região central do Brasil 2011**. Londrina: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste, 2010. 255 p.

FARIAS, J.R.B.; NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 2007. 9 p. (EMBRAPA. CNPSo. Circular Técnica, 48).

FLETCHER, J.; IRWIN, M.E.; BRADFUTE, O.E.; GRANADA, G. Discovery of a mycoplasmalike organism associated with diseased soybeans in Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 68, p. 994-996, 1984.

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

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Soja. In: _____. **AGRIANUAL 2011**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2011. p. 419-450.

GAZZONI, D.L. Botany. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa da Soja.**Tropical soybeans improvement and production.** Rome: FAO, 1994. p. 1-12.

GAZZONI, D.L; YORINORI, J.T. **Manual de identificação de pragas e doenças da soja.** Brasília: EMBRAPA, SPI, 1995. 128 p.

GOODWIN, P.H.; MAHUKU, G.S.; LIU, H. W.; XUE, B.G. Monitoring phytoplasma in populations of aster leafhopper from lettuce fields using the polymerase chain reaction. **Crop Protection,** Guildford, v. 18, n. 2, p. 91-99, 1999.

GRANADA, G.A. Machismo disease of soybean: I. Symptomatology and transmission. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 63, n. 1, p. 47-50, 1979a.

_____. Machismo disease of soybean: II. Supressive effects os tetracycline on symptom development. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 63, n. 4, p. 309-312, 1979b.

GREEN, M.J.; THOMPSON, D.A.; MacKENZIE, D.J. Easy and eficiente DNA extration from woody plants for the detection of phytoplasma by polymerase chain reaction. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 83, p. 482-485, 1999.

GUERZONI, R.A. **Efeitos das doenças foliares de final de ciclo (*Septoria glicyni, Hemmi* e *Cercospora kikichii Matsu* e *Tomoyasu Gardner*), na duração da área foliar sadia da soja.** 2001. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

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

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

HAAS, I.C.R. **Gramíneas forrageiras como potenciais hospedeiros alternativos para o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho.** 2005. 38 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

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

HARRISON, N.A.; RICHARDSON, P.A.; TSAI, J.H. Assay for detection of phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 80, p. 263-269, 1996.

HOGENHOUT, S.A.; MUSIC, M.S. Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics – what have we learnt? In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. **Phytoplasmas:** genomes, plant hosts and vectors. Wallingford: CAB International, 2010. chap. 2, p. 19-36.

JOMANTIENE, R.; DAVIS, R.E.; ANTONIUK, L.; STANIULIS, J.; First report of phytoplasmas in soybean, alfalfa, and Lupinus sp. in Lithuania. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 84, n. 2, p. 198, 2000.

JOMANTIENE R.; ZHAO Y.; LEE I.-M.; DAVIS R.E. Phytoplasmas infecting cherry and lilac represent two distinct lineages having close evolutionary affinities with clover phyllody phytoplasma. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 130, p. 97-107, 2011.

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

KITAJIMA, E.W. Enfermidades de plantas associadas a organismos do tipo micoplasma. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 153-174, 1994.

KITAJIMA, E.W.; COSTA, A.S. Microrganismos do tipo micoplasmas associados a moléstias do tipo amarelo em algumas plantas cultivadas e ornamentais, no Estado de São Paulo e no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 2, p. 317-327, 1979.

KUMAR, L.P.; SHARMA, K.; BOAHEN, S.; TEFERA, H.; TAMÓ, M. First report of soybean witches'-broom disease caused by group 16SrII phytoplasma in soybean in Malawi and Mozambique. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 95, n. 4, p. 492, 2011.

LEE, I.M.; DAVIS, R.E. Mycoplasmas witch infect plants and insects. In: MANILOFF, J.; McELHANSEY, R.N.; FINCH, L.R.; BASEMAN, J.B. (Ed.). **Mycoplasmas:** molecular biology and pathogenesis. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 379-390.

LEE, I.M.; DAVIS, R.E.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, Washington, v. 54, p. 221-255, 2000.

LEE, I.-M.; ZHAO, Y.; DAVIES, R.E. Prospects of multiple gene-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. **Phytoplasmas:** genomes, plant hosts and vectors. Wallingford: CAB International, 2010b. chap. 4, p. 51-63.

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

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

LEE, I.M.; HAMMONS, R.W.; DAVIS, R.E.; GUNDERSEN, D.E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and indentification of mycoplasmalike organisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 8, p. 834-842, 1993.

LEE, I.-M.; BOTTNER-PARKER, K.D.; ZHAO, Y.; DAVIES, R.E.; HARRISON,N.A. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 60, p. 2887-2897, 2010.

LEE, I.-M.; BOTTNER-PARKER, K.D.; ZHAO, Y.; VILLALOBOS, W.; MOREIRA, L. '*Candidatus* Phytoplasma costaricanum'a new phytoplasma associated with a newly emerging disease in soybean in Costa Rica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2011. Discponivel em: <http://ijs.sgmjournals.org/content/early/2011/01/07/ijs.0.029041-0.full.pdf >. Acesso em: 02 abr. 2011

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

LEE, I.M., KLOPMEYER, M., BARTOSZYK, I.M., GUNDERSEN-RINDAL, D.E., CHOU, T., THOMSON, K.L.; EISENREICH, R. Phytoplasma induced free-branching in commercial poinsettia cultivars. **Nature Biotechnology,** New York, v. 15, p.178-182, 1997.

LEE, M.E.; GRAU, C.R.; LUKAESKO, L.A.; LEE, I.-M. Identification of aster yellows phytoplasmas in soybean in Wisconsin based on RFLP analysis of PCR-amplified products (16S rDNAs). **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 24, p. 125-130, 2002.

LEE, M.E.; LEE, I.-M.; LUKAESKO, L.A.; HEIMANN, M.F.; OPLINGER, E.S.; GRAU, C.R. R16SrVI (clover proliferation group) and R16SrI (aster yellows group) phytoplasmas are associated with soybeans in Wisconsin. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. S116, 1998a.

LEE, M.E.; LEE, I.-M.; LUKAESKO, L.A.; OPLINGER, E.S.; HOGG, D.B.; WEDBURG, J.L.; GRAU, C.R. Survey and field investigation of phytoplasmas associated with soybean in Wisconsin. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. S52, 1998b.

MARCONE, C.; LEE,I.M.; DAVIS, R.E.; RAGOZZINO, A.; SEEMULLER, E. Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and tuf gene sequences. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, p. 1703-1713, 2000.

MARZACHI, C. Molecular diagnosis of phytoplasmas. **Phytopathologia Mediterranea,** Bologna, v. 43, n. 2, p. 228-231, 2004.

MAUST, B.E.; ESPADAS, F.; TALAVERA, C.; AGUILAR, M.; SANTAMARÍA, J.M; OROPEZA, C. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 976–981, 2003.

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

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

MOYA-RAYGOZA, G.; NAULT, L.R. Transmission biology of maize bushy stunt Phytoplasma by the corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America,** Columbus, v. 91, p. 668-676, 1998.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI. Disponível em:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>. Acesso em: 09 out. 2011.

NEI, M.; LI, W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA,** Washington, v.76, p.5269-5273, 1979.

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

PEREIRA, A.; TERAO, F. China determina o preço da soja, mas o câmbio preocupa. In: AgraFNP. **AGRIANUAL 2011:** anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2010. p. 419-420.

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

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

RIBEIRO, L.F.; BEDENDO, I.P. Proliferação de ramos em plantas comerciais de bico-de-papagaio associada à fitoplasma do grupo 16SrIII. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 367-371, 2006.

_____. Associação constante de um fitoplasma do grupo SrIII com o superbrotamento do maracujazeiro cultivado em diversas regiões brasileiras. **Summa Phytopathologica,** Botucatu, v. 33, p. 60, 2007. Suplemento.

RIBEIRO, L.F.C.; BEDENDO, I.P.; KITAJIMA, E.W. Detecção molecular de fitoplasma associado ao enfezamento da soja. **Summa Phytopathologica,** Jaboticabal, v. 27, p. 99, 2001.

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

RIBEIRO, L.F.C.; MELLO, A.P.O.A.; BEDENDO, I.P.; GIORIA, R. Phytoplasma associated with shoot proliferation in begonia. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 5, p. 475-477, 2006.

SANTOS-CERVANTES, M.E.; CHÁVEZ-MEDINA, J.A.; ACOSTA-PARDINI, J.; FLORESZAMORA, G.L.; MÉNDEZ-LOZANO, J.; LEYVA-LOPEZ, N.E. Genetic diversity and geographical distribution of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p. 388–395, 2010.

SECOR, G.A. The canon of potato science: phytoplasma diseases. **Potato Research,** Wageningen, v. 50, p. 255-257, 2007.

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

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

SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. (Ed.). **Compendium of soybean diseases.** 3rd ed. St. Paul: APS Press, 1989. 106 p.

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

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011. Disponível em: <http://mbe.oxfordjournals.org/content/early/2011/05/04/molbev.msr121.full.pdf+html >. Acesso em: 15 jun. 2011

VILLALOBOS, W.; MOREIRA, L.; RIVERA, C.; LEE, I.-M. First report of new phytoplasma diseases associated with soybean, sweet pepper, and passion fruit in Costa Rica. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 93, n. 2, p. 201, 2009.

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

WEI, W.; CAI, H.; JIANG, Y.; LEE, I-M.; DAVIS, R.E.; DING,Y.; YUAN, E.; CHEN, H.; ZHAO, Y. A new phytoplasma associated with little leaf diseases in azalea: multilocus sequence characterization reveals a distinct lineage within the aster yellows phytoplasma group. **Annals of Applied Biology,** Warwick, v. 158, p. 318-330, 2011.

WEINTRAUB, P.G.; BEANLAND, L.A. Insect vectors of phytoplasmas. **Annual Review of Entomology,** Palo Alto, v. 51, p. 91-111, 2006.

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

YORINORI, J.T. Controle integrado das principais doenças da soja. In: CÂMARA, G.M.S. **Soja:** tecnologia de produção II. Piracicaba: ESALQ, LPV, 2010. cap. 11, p. 203-222.

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

APÊNDICE

Sequência parcial do gene 16S rDNA do fitoplasma presente na soja

>Soy-Br1
GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAG
ACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGG
GTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCAC
ATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTC
GGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTCGG
TACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTA
CCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGG
GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGT
TTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAG
TAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGA
GGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAA
AGCGTGGGGAGCAGACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA
GTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGA
GTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGG
TGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGC
TTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGG
TTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGAT
AAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGC
TACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCG
AATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGT
TGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTT
GTACACACCGCCCGTCA