

ADRIANA NEVES DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO
FITOPLASMA ASSOCIADO À PLANTAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*)
COM SINTOMAS DA DOENÇA "COURO DE SAPO" NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S729c
2012

Souza, Adriana Neves de, 1985-
Caracterização molecular e análise filogenética do
fitoplasma associado à plantas de mandioca
(*Manihot esculenta*) com sintomas da doença “couro de
sapo” no Brasil / Adriana Neves de Souza. – Viçosa, MG,
2012.

viii, 58f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Claudine Márcia Carvalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Mandioca - Doenças e pragas.
2. *Manihot esculenta*.
3. Bactérias fitopatogênicas.
4. Micoplasma - Detecção.
5. Fitopatologia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 633.68295

ADRIANA NEVES DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO
FITOPLASMA ASSOCIADO À PLANTAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*)
COM SINTOMAS DA DOENÇA "COURO DE SAPO" NO BRASIL

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitopatologia, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 13 de fevereiro de 2012



Luis Cláudio Vieira da Cunha



Gloria Patricia Castillo Urquiza



Claudine Márcia Carvalho
(Orientadora)

Dedico

À minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e sabedoria;

À minha mãe, Neiva, pelo amor, carinho, investimento, pelas ajudas nos experimentos e por acreditar em mim sempre;

Ao meu pai, José Augusto, e à minha segunda mãe, Ana, pelo apoio, amor e carinho;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pelas oportunidades;

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro;

À Prof.^a Claudine Márcia Carvalho pela orientação, disponibilidade, apoio e motivação;

Ao Prof. Reginaldo da Silva Romeiro (in memoriam) pelos ensinamentos, conselhos e amizade;

Ao Prof. Francisco Murilo Zerbini pela disponibilização do laboratório e por todo o apoio durante a realização do Mestrado;

Ao Prof. José Rogério de Oliveira pela disponibilização de equipamentos para a realização desse trabalho;

Aos funcionários do departamento de Fitopatologia que participaram direta ou indiretamente dessa jornada;

Ao Prof. Ivan Paulo Bedendo e a todos do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos-ESALQ pelas ajudas constantes, pela disponibilidade e atenção;

À Célia Lúcia Siqueira e Gildete Bispo de Oliveira pela enorme ajuda na coleta;

Ao Lydson Wagner Maffia pelas amostras de solo para as disciplinas, pela companhia e ajuda na coleta.

Ao Fábio Nascimento da Silva pela atenção, pelo apoio durante a realização dos experimentos e pelas correções;

À Silvia, Larissa, Diogo e todos do LVVM pela convivência agradável e pelas ajudas nos experimentos;

Aos amigos Stefânia, Patrícia Ferreira, Maurício, Patrícia Porta Nova, Leonardo, Thaís, Silvia, Diogo, Alexandre, Lívio e Ana Cláudia pela amizade, pelo apoio nos momentos de desespero e pelos momentos de diversão;

Aos colegas de mestrado pelos momentos de estudo e pela convivência durante as disciplinas;

Aos meus irmãos Pauline e Júnior pelos bons momentos;

Ao meu irmão Gustavo pelo envio de artigos, notícias, pela ajuda com o inglês e pelos conselhos;

Ao André Luiz Firmino pelo amor, carinho, companheirismo, paciência, incentivo, pela companhia agradável e pelas ajudas com os experimentos;

Enfim, agradeço a todos os familiares e amigos que contribuíram direta e indiretamente para o alcance desta vitória.

BIOGRAFIA

ADRIANA NEVES DE SOUZA, filha de Neiva Maria Neves e José Augusto de Souza, nasceu na cidade de Viçosa-MG, no dia 7 de fevereiro de 1985.

Cursou o ensino fundamental e ensino médio na mesma cidade.

No ano de 2005, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em janeiro de 2010.

Em 2010, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 13 de fevereiro de 2012.

No mesmo ano, ingressou no Doutorado em Fitopatologia, na mesma instituição.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. A cultura da mandioca	3
2.2. Microrganismos associados à mandioca.....	5
2.3. Características gerais dos Fitoplasmas	7
2.4. Transmissão, interação fitoplasma-hospedeiro/vetor e controle	10
2.5. Diagnose de Fitoplasmas	13
2.6. Fitoplasmas no Brasil	16
2.7. A doença “Couro de Sapo”	18
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
4. ARTIGO.....	30
4.1. Molecular characterization and phylogenetic analysis of a phytoplasma associated to cassava plants (<i>Manihot esculenta</i>) with symptoms of frog skin disease in Brazil.....	30
4.2. Figures	51
4.3. Tables.....	56

RESUMO

SOUZA, Adriana Neves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2012.

Caracterização molecular e análise filogenética do fitoplasma associado à plantas de mandioca (*Manihot esculenta*) com sintomas da doença "couro de sapo" no Brasil. Orientadora: Claudine Márcia Carvalho. Coorientadores: Francisco Murilo Zerbini Júnior e Ivan Paulo Bedendo.

Doenças causadas por fitoplasmas têm emergido em diversas culturas nas últimas décadas tornando-se responsáveis por perdas econômicas significativas. Dentre os fitoplasmas causadores de doenças na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), se destaca o causador da doença do “Couro de Sapo da mandioca” (DCSM), o qual é responsável por grandes perdas na cultura em alguns países da América do Sul. Com o objetivo de detectar e caracterizar o fitoplasma causador da DCSM no Brasil, 30 plantas de mandioca apresentando sintomas típicos e 20 plantas de mandioca sem sintomas típicos de DCSM foram coletadas em Mocaminho (Jaíba), no estado de Minas Gerais, Brasil. O DNA total das raízes, caules e folhas foi extraído e utilizado como molde para a reação de PCR duplo. Foram desenhados iniciadores específicos para facilitar a detecção do fitoplasma na presença de *Bacillus* sp. (endofítico). Utilizando estes iniciadores foi possível detectar o fitoplasma em 16,7% das raízes, 66,7% dos caules e 73,3% das folhas em plantas sintomáticas, e em nenhuma das raízes, 45% dos caules e 30% das folhas em plantas assintomáticas. Um total de 37 plantas coletadas apresentou resultado positivo para a presença de fitoplasmas. O fitoplasma detectado foi identificado como pertencente ao grupo 16SrIII, subgrupo A, através de RFLP, sequenciamento e RFLP in silico. Análises filogenéticas, baseadas no 16S rDNA deram suporte à caracterização realizada através do RFLP.

ABSTRACT

SOUZA, Adriana Neves, Msc., Universidade Federal de Viçosa, February 2012.

Molecular characterization and phylogenetic analysis of the phytoplasma associated to cassava plants (*Manihot esculenta*) with symptoms of frog skin disease in Brazil. Adviser: Claudine Márcia Carvalho. Co-advisers: Francisco Murilo Zerbini Júnior and Ivan Paulo Bedendo.

Diseases caused by phytoplasmas in different crops have emerged in the past decades being responsible for significant economic losses worldwide. Of particular note among the disease-causing phytoplasmas in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is that responsible for cassava frog skin disease (CFSD), which causes great losses in some South American countries. In order to detect and characterize the phytoplasma that causes CFSD in Brazil, 30 cassava plants showing typical disease symptoms and 20 cassava plants CFSD symptomless were collected in Mocambinho (Jaíba) in the state of Minas Gerais, Brazil. Total DNA of tubers, stems and leaves was extracted and used as a template for nested-PCR reactions. Specific primers were designed to facilitate the detection of the phytoplasma in the presence of endophytic *Bacillus* sp. Using these primers it was possible to detect the phytoplasma in 16.7% of the tubers, 66.7% of the stems and 73.3% of the leaves of symptomatic plants, but in none of the tubers, 45% of the stems and 30% of the leaves of asymptomatic plants. A total of 37 cassava plants showed positive results for presence of phytoplasma. This phytoplasma was identified as belonging to the group 16SrIII, subgroup A, by *in vitro* and *in silico* RFLP analyses and sequencing. Phylogenetic analysis, based on 16S rDNA, supports the characterization performed by RFLP.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta da família Euphorbiaceae, de grande importância socioeconômica, uma vez que ela faz parte da alimentação básica da população dos países de baixa renda (FAO, 2010). Além do consumo in natura, ela também é consumida na forma de fécula e farinha. A produção e processamento da mandioca geram elevados níveis de resíduos, que são então utilizados na alimentação animal (Abrahão et al., 2006; Rangel et al., 2008). É produzida em todo o território brasileiro, com destaque para os estados do Pará, Bahia, Paraná e Maranhão (IBGE, 2010). Em nível mundial, o Brasil é o segundo maior produtor, estando atrás apenas da Nigéria (FAO, 2010).

As mandiocas são classificadas em “de mesa” e “para indústria”, de acordo com o tipo de raiz e suas cultivares divididas em mansas ou bravas, de acordo com a concentração de glicosídeos cianogênicos, compostos envolvidos na síntese de ácido cianídrico, que conferem a toxicidade às plantas (Vetter, 2000; White et al., 1998). São plantas com boa tolerância à seca, que se desenvolvem bem em diferentes altitudes e em temperaturas variando de 20 a 27°C. Solos mais arenosos favorecem o seu desenvolvimento. A ocorrência de doenças é um fator limitante para a sua produção. Dentre os principais agentes causadores de doenças na mandioca se destacam as bactérias, os fungos e os fitoplasmas (Souza & Fialho, 2003).

Fitoplasmas são pequenas bactérias sem parede celular, restritas ao floema de suas plantas hospedeiras e que se multiplicam no interior de insetos vetores [revisado por Sugio et al., 2011]. São capazes de causar desbalanços hormonais nos seus

hospedeiros, levando a sintomas de superbrotamento, virescência, nanismo, encarquilhamento e filodia (Bertaccini & Duduk, 2009; Firrao et al., 2004; Lee et al., 2000). No ano de 1944, foi relatada a ocorrência de plantas de mandioca com sintomas de superbrotamento, no estado de São Paulo (Silberschmidt & Campos, 1944 apud Flôres, 2009). Posteriormente, descobriu-se que um fitoplasma era o agente causador da doença, sendo este classificado como pertencente ao grupo III, subgrupo B (Barros, 1998; Flôres, 2009). Recentemente, um fitoplasma pertencente ao grupo III-L foi descrito associado a plantas de mandioca apresentando sintomas característicos da doença ‘Couro de Sapo da mandioca’ (DCSM), na Colômbia (Alvarez et al., 2007; Alvarez et al., 2009).

Apesar de se ter o conhecimento da presença de plantas de mandioca no Brasil com sintomas característicos da DCSM, ainda não foram realizados estudos para se comprovar a presença de um fitoplasma associado a esses sintomas. Na região norte do estado de Minas Gerais, plantas de mandioca apresentando sintomas típicos da DCSM foram observadas em campos de produção, causando grandes prejuízos aos produtores locais. Devido a isso, o presente trabalho teve como objetivo a verificação da presença de um fitoplasma associado a plantas de mandioca com sintomas da DCSM, bem como sua caracterização molecular e análise filogenética.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cultura da mandioca

A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz., é uma planta pertencente à classe Dicotyledoneae, subclasse Archiclamydeae, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae, tribo Manihoteae e gênero *Manihot* (Fukuda, 1999). Teve sua origem na América do Sul (Allem & Goedert, 1991), fato sustentado por análises filogenéticas do gênero (Schaal et al., 1995). Diversos estudos foram realizados para melhor entender a sua origem geográfica e os centros de domesticação da mandioca (Allem, 1994; Allem, 1999; Olsen e Schaal, 1999). Dentre as diversas espécies de mandioca descritas, a maioria é originária do Brasil (Viégas, 1976).

A mandioca é cultivada principalmente em regiões tropicais e com altitudes inferiores a 2000m (FAO, 2010). Das diversas espécies de mandioca existentes, duas apresentam maior importância econômica, a *Manihot glaziovii* Müll. Arg, utilizada para a extração do látex e *M. esculenta* Crantz, utilizada para a produção de fécula, amido de mandioca e consumo in natura (Hershey, 1994). De acordo com o tipo de raiz e o teor de ácido cianídrico na polpa das raízes tuberosas, as mandiocas podem ser classificadas em “de mesa” e “para indústria” (Souza & Fialho, 2003) e “mansa” ou “brava” (Pereira et al., 1985), respectivamente. A mandioca é uma planta tóxica, sendo que suas folhas contêm os maiores níveis de glicosídeos cianogênicos, compostos que estão envolvidos no processo de síntese do ácido cianídrico (Vetter, 2000; White et al., 1998).

Segundo dados da FAO (2010), a Nigéria é o país que apresenta a maior área de cultivo, sendo também o seu maior produtor, com produção anual de 37.504.100 toneladas. O Brasil produz anualmente cerca de 24.354.000 toneladas de mandioca e ocupa o segundo lugar na lista dos maiores produtores. O cultivo da mandioca ocorre em todo o território brasileiro, sendo a região Nordeste a maior produtora. Segundo dados do IBGE (2010) os estados brasileiros com maior produção de mandioca são: Pará, com produção anual de 4.596.083 toneladas, seguido pelo Paraná, Bahia, Maranhão, Rio Grande do Sul e São Paulo. Minas Gerais ocupa a oitava colocação, com uma produção anual de 794.792 toneladas.

O cultivo de mandioca apresenta grande importância socioeconômica. As raízes tuberosas são utilizadas na alimentação humana, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (FAO, 2010). As raízes da mandioca são consumidas na forma de farinha, fécula ou in natura. Além da alimentação humana, a mandioca é utilizada na alimentação animal, especialmente os resíduos gerados pela sua produção, tais como: (i) caules; (ii) folhas; (iii) casca; e (iv) farinha de varredura (Abrahão JJS et al., 2006; Rangel et al., 2008).

A propagação da mandioca é feita de forma vegetativa, pelo uso de hastes (conhecidas como manivas), as quais devem conter de 5 a 7 nós de comprimento. A utilização de manivas de boa qualidade é fundamental para o bom rendimento da cultura da mandioca (Câmara e Godoy, 1998). A faixa de temperatura ideal para seu cultivo varia de 20 a 27°C, e fotoperíodos mais curtos favorecem o desenvolvimento das raízes. Além disso, suportam bem o cultivo em diferentes altitudes (do nível do mar até 2300m, sendo 800m a altitude máxima ideal). Adicionalmente, são tolerantes à seca, devendo-se

ter um maior cuidado apenas nos primeiros meses de cultivo para que a produção não seja afetada. Solos arenosos ou de textura média facilitam o desenvolvimento das raízes tuberosas (Souza & Fialho, 2003).

2.2. Microrganismos associados à mandioca

Microrganismos podem estar associados a plantas externa ou internamente. Diversos microrganismos podem habitar o interior de plantas, tanto de forma benéfica, sem causar danos ao seu hospedeiro, quanto como parasita. Esses microrganismos são chamados endofíticos. Dentre as bactérias, os gêneros mais comuns no interior das plantas são: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* (Hallmann et al., 1997). Teixeira et al. (2007) realizaram um levantamento da diversidade de microrganismos endofíticos em plantas de mandioca nos estados de São Paulo, Amazonas e Bahia. O gênero *Bacillus* foi o microrganismo endofítico predominante nesta cultura em todos os estados.

Além dos microrganismos endofíticos benéficos, microrganismos patogênicos podem colonizar o interior das plantas e causar uma série de prejuízos. A ocorrência de doença na cultura da mandioca é um fator limitante para a sua produção. As principais doenças que afetam esta cultura são: (i) bacteriose causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Lozano, 1986; Nery-Silva et al., 2007; Ogunjobi et al., 2007); (ii) podridões radiculares causadas por *Phytophthora* sp. e *Fusarium* sp. (Poltronieri et al., 2002; Souza & Fialho, 2003); (iii) o superalongamento causado por *Sphaceloma manihoticola* (Alvarez & Molina, 2000; Alvarez et al., 2003); (iv) o mosaico comum, causado por *Cassava common mosaic virus* (Potexvirus) (Calvert &

Thresh, 2002); (v) o mosaico africano, causado por diferentes espécies de Begomovirus (Legg e Fauquet, 2004); (vi) o superbrotamento da mandioca (Flôres, 2009) e (vii) o ‘Couro de Sapo’ da mandioca, sendo as duas últimas causadas por fitoplasmas (Alvarez et al., 2007; Alvarez et al., 2009). A bacteriose causada por *X. campestris* pv. *manihotis* é a de maior ocorrência mundial, sendo responsável por grandes perdas na cultura. É uma doença muito agressiva e os principais sintomas são necrose do sistema vascular, murcha, morte descendente, manchas foliares e exsudação de pus bacteriano (Lozano, 1986; Nery-Silva et al., 2007). No Brasil, as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste são as mais afetadas (Souza & Fialho, 2003). Dentre as viroses, o mosaico africano da mandioca é considerado a mais importante. Essa virose, causada por diversas espécies de Begomovirus, é o principal problema no cultivo de mandioca nos países africanos, responsável pela devastação de grandes áreas produtoras de mandioca. É transmitida pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e os principais sintomas são: (i) mosaico; (ii) redução de número e tamanho de tubérculos; (iii) diminuição do diâmetro do caule e tamanho das plantas (Kittelmann & Jeske, 2008; Legg & Fauquet, 2004; Serubombwe et al., 2008). Apesar de ser uma doença restrita à região africana, países produtores de mandioca devem ficar atentos à sua disseminação.

O primeiro relato de uma doença causada por fitoplasmas no Brasil ocorreu no ano de 1944 na cidade de Lins, estado de São Paulo (Silberschmidt & Campos, 1944 apud Flôres, 2009), porém, a etiologia da doença só ocorreu há alguns anos (Barros, 1998; Flôres, 2009). Plantas infectadas por esse fitoplasma apresentam superbrotamento de ramos, diminuição no tamanho das folhas, amarelecimento e diminuição do porte da planta. No Brasil, fitoplasmas associados ao superbrotamento da mandioca estão

classificados como pertencentes ao grupo 16SrIII-B (Barros, 1998; Barros, 2002; Flôres, 2009; Oliveira et al., 2009).

2.3. Características gerais dos Fitoplasmas

Fitoplasmas são pequenos procariotos pertencentes à classe Mollicutes, parasitas obrigatórios de plantas e insetos, que não possuem parede celular e apresentam apenas uma única membrana celular os envolvendo (Lee et al., 1998a; Lee et al., 2000; Weintraub, 2007). Possuem partículas pleomórficas, com diâmetro variando de 200 a 800nm (Ammar el & Hogenhout, 2003) e material genético de tamanho bem reduzido comparado a bactérias ancestrais Gram-positivas.

Os fitoplasmas foram descobertos e visualizados pela primeira vez em 1967, por um grupo de pesquisa japonês, em plantas de amora, quiro, batata e petúnia que apresentavam sintomas de doenças conhecidas por “amarelos” (Doi et al., 1967). Inicialmente, eram atribuídos aos vírus, uma vez que a sintomatologia e a forma de transmissão eram semelhantes, além da impossibilidade de isolamento e cultivo do organismo causador dos sintomas, porém, partículas virais não eram encontradas nos tecidos infectados (Lee et al., 2000). Entretanto, Doi et al. (1967) examinaram em microscópio eletrônico de transmissão o tecido vascular de amoreira, quiro, petúnia e batata com sintomas característicos, e detectaram a presença de corpos pleomórficos nos elementos de tubo crivado e menos comumente em células do parênquima floemático. Os corpúsculos visualizados eram parecidos com os de organismos encontrados no homem e em animais, conhecidos como Micoplasmas. Devido à semelhança com esses

organismos, eles passaram a ser denominados MLOs (Mycoplasma-like organisms). Apenas em 1992, o termo ‘fitoplasma’ foi proposto, no 9º Congress of the International Organization of Mycoplasmology (IJSB, 1993). Segundo a classificação atual dos Fitoplasmas, eles são organismos pertencentes ao SuperReino Prokaryota, Reino Monera, Domínio Bacteria, Filo Tenericutes, Classe Mollicutes, Ordem Acholeplasmatales, Família Acholeplasmataceae e Gênero ‘Candidatus Phytoplasma’ (Hogenhout et al., 2008; NCBI, 2011).

O seu genoma cromossomal é reduzido comparado a outras bactérias fitopatogênicas, variando de 600 a 900 kb, o que explica o fato de várias rotas metabólicas estarem ausentes nestes organismos (Hogenhout & Music, 2010). O pequeno genoma dos fitoplasmas é constituído de um cromossomo principal, que pode ser circular ou linear e de pequenos plasmídeos, que podem variar em número de dois a quatro (Bai et al., 2006; Kube et al., 2008; Liefting et al., 2006; Oshima et al., 2004; Tran-Nguyen et al., 2008). A porcentagem de citosina/guanina (C+G) presente no cromossomo dos fitoplasmas varia de 23 a 29% (Kollar & Seemüller, 2008; Sears et al., 1989), faixa confirmada pelas quatro sequências cromossomais completas de fitoplasmas disponíveis, onde a porcentagem variou de 21 a 27% de C+G (Bai et al., 2006; Kube et al., 2008; Oshima et al., 2004; Tran-Nguyen et al., 2008). Os plasmídeos apresentam variação no que diz respeito ao tamanho e às ORFs (Open Reading Frame), podendo se recombinar uns com os outros, ou até mesmo com o cromossomo principal (Ammar el & Hogenhout, 2003). Acredita-se que a classe Mollicutes se divergiu de um ancestral Gram-positivo, através da perda de parte do genoma, resultando na perda de parede celular externa e de várias rotas importantes, tais como: (i) síntese de ATP; (ii)

síntese de aminoácidos; e (iii) síntese de nucleotídeos (Hogehout & Music, 2010). Comparações entre sequências do 16Sr rDNA de “MLOs”, representantes da classe Mollicutes, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, realizadas por Woese et al. (1980), inicialmente mostraram a proximidade dos “MLOs” com as bactérias Gram-positivas formadoras de endósporos (*Bacillus* e *Clostridium*) e com o gênero *Acholeplasma*. Posteriormente, Lim et al. (1989), compararam as sequências do 16S rDNA e sequência e conformação do tRNA dos “MLOs”, presentes nos bancos de dados, com representantes de quatro gêneros de bactéria mais próximos a eles (*Escherichia coli*, *Mycoplasma capricolum*, *Bacillus subtilis* e *Anacystis nidulans*) e através dessas comparações e de análises filogenéticas, confirmaram que os “MLOs” eram mais relacionados com bactérias Gram-positivas do que as Gram-negativas, confirmando assim sua ancestralidade. Comparações entre todos os representantes da classe Mollicutes e bactérias do gênero *Clostridium* mostraram também que os “MLOs” estão mais intimamente ligados aos *Acholeplasmas* do que aos *Micoplasmas* animais. Atualmente as espécies *Acholeplasma palmae* e *A. modicum*, são consideradas filogeneticamente mais próximas aos fitoplasmas (Gundersen et al., 1994; Lee et al., 2000). Características comuns entre fitoplasmas e *Acholeplasmas* que os diferem de outros Mollicutes dão suporte às análises filogenéticas da classe, como por exemplo, a utilização do códon UGA como códon de terminação pelos fitoplasmas e *Acholeplasmas*, enquanto *Mycoplasmas* e *Spiroplasmas* utilizam esse códon para triptofano (Lim & Sears, 1991) e a ausência de sistema de transporte de açúcar fosfotransferase [revisado por Hogehout et al., 2008].

Nas plantas, os fitoplasmas são restritos aos tecidos do floema e até hoje não foi possível cultivá-los em meio de cultura (Gasparich, 2010). São sensíveis aos antibióticos do grupo da tetraciclina, mas são insensíveis à penicilina (Ishii et al., 1967; Firrao et al., 2004). Plantas infectadas por fitoplasmas podem apresentar sintomas de filodia (transformação de órgãos florais em folhas), envasouramento (encurtamento dos nós), virescência (coloração verde nas pétalas), nanismo, esterilidade de órgãos florais, coloração avermelhada nas folhas, encarquilhamento de folhas, superbrotamento e amarelecimento (Firrao et al., 2004; Bertaccini & Duduk, 2009). Esses sintomas são característicos de um desbalanço hormonal, sugerindo que os fitoplasmas sejam responsáveis por alguma forma de desequilíbrio nos hormônios reguladores do crescimento (Sugio et al., 2011). Os fitoplasmas estão associados a diversas doenças em várias espécies de plantas hospedeiras, inclusive culturas de grande importância econômica, como citros, videira, milho e algumas ornamentais [revisado por Bertaccini & Duduk, 2009].

2.4. Transmissão, interação fitoplasma-hospedeiro/vetor e controle

A transmissão do fitoplasma de uma planta doente para outras sadias pode ocorrer através de insetos vetores, da prática da enxertia e através de plantas parasitas, como *Cuscuta* sp. (Marcone et al., 1997; Jarausch et al., 1999; Kaminska & Korbin, 1999). Devido ao fato de os fitoplasmas serem restritos ao floema das plantas hospedeiras, a transmissão por insetos potencialmente ocorre através daqueles que se alimentam nos tecidos do floema. Os principais insetos vetores de fitoplasmas encontram-se na ordem Hemiptera, a qual é dividida em três subordens (Heteroptera,

Stenorrhyncha e Auchenorrhyncha), sendo que na subordem Auchenorrhyncha encontra-se o maior número de representantes dos vetores de fitoplasmas (família Cicadellidae e quatro famílias da infraordem Fulgoromorpha), seguida da ordem Stenorrhyncha (família Psyllidae) (Weintraub, 2007; Weintraub & Wilson, 2010). Segundo Weintraub & Beanland (2006), algumas características dos insetos vetores de fitoplasmas fazem com que eles sejam eficientes na transmissão dos mesmos, tais como: (i) serem hemimetabulos, ou seja, com ninfas e adultos com os mesmos hábitos alimentares, e, portanto, com capacidade de transmissão do fitoplasma; (ii) se alimentarem em tecidos específicos e de maneira não destrutiva; (iii) terem um modo de transmissão de fitoplasmas circulativo, propagativo e persistente, com o fitoplasma se multiplicando no interior do inseto; e (iv) apresentarem transmissão transovariana do fitoplasma, transmitindo-os para a sua prole.

Existem interações altamente específicas entre os fitoplasmas e os seus vetores, mas sua base molecular ainda não é bem entendida (Seemuller et al., 2002). Os fitoplasmas são adquiridos de forma passiva no momento da alimentação do inseto vetor, sendo que o período de aquisição (PA) pode durar poucos minutos, mas geralmente leva algumas horas. Acredita-se que quanto maior o tempo de alimentação nas plantas infectadas, maior a eficiência de transmissão [revisado por Purcell, 1982]. Após a aquisição, o fitoplasma deve atravessar a parede do intestino na sua porção média, multiplicando-se na hemolinfa e acumulando-se nas glândulas salivares (Seemuller et al., 2002). O período de tempo entre a aquisição do fitoplasma e o momento em que ele é capaz de ser transmitido, chamado de período latente (PL), pode durar de 10 dias a 3 semanas. O aparecimento de sintomas após a inoculação é altamente

variável e dependente do fitoplasma e da planta hospedeira (Weintraub & Wilson, 2010).

Nas últimas décadas, diversos trabalhos foram realizados, buscando um melhor entendimento dos mecanismos de patogenicidade dos fitoplasmas e interação com seus vetores. Inicialmente, os trabalhos tinham como objetivo entender o papel dos hormônios nas infecções por fitoplasmas, como é o caso de Pertot et al. (1998), que observaram que os níveis de ácido indol-acético (AIA) em *Catharanthus roseus* aumentavam cerca de dez vezes em plantas infectadas por fitoplasmas, comparadas à plantas não infectadas e Davey et al. (1981), que correlacionaram o aumento do nível de citocininas ao desenvolvimento de virescência em *Catharanthus roseus*. O sequenciamento completo de alguns fitoplasmas permitiu o avanço nos estudos de interação fitoplasma-vetor/hospedeiro. Atualmente, esforços tem sido realizados no intuito de identificar proteínas provavelmente envolvidas na interação fitoplasma-vetor/hospedeiro, bem como entender as formas pelas quais elas ocorrem. Bai et al. (2009) identificaram 56 proteínas candidatas a efetoras e demonstraram que uma delas (SAP11) tinha o núcleo das células do hospedeiro como alvo. Galetto et al. (2011) demonstraram a existência de fortes evidências de que a ATP sintase dos insetos vetores age como receptor de uma proteína antigênica de membrana (Amp) de “*Ca. Phytoplasma asteris*” (CYP). Sugio et al. (2011) demonstraram que a proteína efetora SAP11 modula respostas de defesa da planta, faz com que a planta sintetize menores quantidades de jasmonatos, levando a um aumento do número de progênie do vetor *Macrostelus quadrilineatus*, além de também ser responsável pelo sintoma de envassouramento em *Arabidopsis*.

O controle de doenças causadas por fitoplasmas após o seu aparecimento no campo é uma tarefa difícil, uma vez que esses microrganismos se encontram disseminados sistemicamente no interior das plantas. Devido a isso, medidas preventivas são as mais indicadas para o seu controle. Como são organismos restritos às células do floema e transmitidos por insetos vetores, algumas das medidas de controle que podem ser adotadas são: (i) o uso de material propagativo livre do patógeno; (ii) o roguing (eliminação das plantas doentes); (iii) o controle dos insetos vetores; (iv) a eliminação de hospedeiros alternativos; e (v) a resistência de plantas, quando disponível (Weintraub & Wilson, 2010).

2.5. Diagnose de Fitoplasmas

A incapacidade de cultivo desses organismos dificultou, durante algum tempo, a identificação e diagnose adequadas dos mesmos. No entanto, o avanço tecnológico tornou possível uma diagnose mais precisa, através do uso da PCR (Polymerase Chain Reaction) seguido do RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e sequenciamento, sendo essas as técnicas mais utilizadas atualmente (Seemuller et al., 2002; Hodgetts & Dickinson, 2010). A PCR é realizada através do uso de iniciadores universais para a detecção de fitoplasmas, seguido de uma segunda PCR com iniciadores específicos. Os iniciadores universais P1/P7 amplificam um fragmento de aproximadamente 1,8 kb, abrangendo uma porção do 16S rDNA, a região espaçadora 16S-23S e mais uma porção do 23S rDNA (Deng & Hiruki, 1991; Smart et al., 1996). O iniciadores específicos R16F2n/R16R2, amplificam uma sequência do 16S rDNA de aproximadamente 1,2 Kb (Gundersen & Lee, 1996). O fragmento de 1,2 Kb amplificado

é utilizado para reação de digestão utilizando 17 enzimas de restrição específicas, seguido da comparação com o padrão de restrição gerado em cada grupo taxonômico. As 17 enzimas utilizadas são: AluI, BamHI, BfaI, Bsh1236 (BstUI), DraI, EcoRI, HaeIII, HhaI, HinfI, HpaI, HpaII, KpnI, MboI (Sau3AI), MseI, RsaI, SspI e TaqI (Lee et al., 1998b). Inicialmente, a classificação era baseada na comparação do padrão de restrição de 15 enzimas e levando em conta o coeficiente de similaridade (F), através da fórmula $F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$, onde $2N_{xy}$ é o número de bandas em comum no perfil entre os dois isolados e N_x e N_y são os números de bandas existentes no perfil de cada isolado (Lee et al., 1993), sendo posteriormente atualizada, com a inclusão de duas enzimas de restrição (Lee et al., 1998b). Atualmente, uma nova ferramenta para análise de restrição tem sido utilizada, o RFLP in silico. Sequências de nucleotídeos geradas pelos iniciadores R16F2n/R2 são submetidas a uma análise de RFLP simulada em computador, através do programa pDRAW32, desenvolvido pela Acaclone Software (<http://www.acaclone.com>), com a utilização das mesmas enzimas anteriores. Através desse método, 10 novos grupos de fitoplasmas foram descritos, totalizando 28 grupos (16SrI a 16SrXXVIII) (Wei et al., 2007). Atualmente existem 30 grupos de fitoplasmas propostos [revisado por Zhao et al., 2010]. Zhao et al. (2009), desenvolveram uma ferramenta online para facilitar a classificação dos fitoplasmas, chamada iPhyClassifier. Através dessa ferramenta, sequências do 16S rDNA derivadas de amplificação com os iniciadores R16F2n/R2 são comparadas com sequências presentes em banco de dados. As sequências apresentando identidade igual ou superior a 92% com outros fitoplasmas, passarão por uma análise de RFLP in silico, com os coeficientes de similaridade (F) calculados e serão classificadas em grupos, subgrupos e espécies. Se o maior valor de F

encontrado for 0,99 ou 0,98, o organismo será considerado uma variante de um determinado subgrupo. Valores de F menores ou iguais 0,97 são considerados subgrupos diferentes. Além da comparação dos padrões de restrição, valores de F menores ou iguais a 0,85 são considerados grupos diferentes.

Atualmente, outros genes, além do 16S rDNA, também têm sido utilizados para a complementação da classificação dos fitoplasmas. Os principais são: os genes Tuf, que codificam o fator de alongação Tu (Schneider et al., 1997); genes do operon de proteínas ribossomais (operon rp), onde estão presentes 21 genes em todos os fitoplasmas sequenciados até hoje (Martini et al., 2007); e os genes sec Y e sec A, que codificam proteínas envolvidas no mecanismo de secreção de proteínas bacterianas (Lee et al., 2006; Hodgetts et al., 2008).

A detecção dos fitoplasmas no tecido do hospedeiro nem sempre é uma tarefa fácil. Primeiramente, a distribuição e acumulação do fitoplasma nos tecidos da planta não ocorrem de forma homogênea. Além disso, uma baixa concentração do microrganismo nos tecidos dificulta a sua detecção (Fránová, 2011). A similaridade de sequência entre fitoplasmas e outros microrganismos relacionados, como espécies de *Acholeplasma* e, principalmente de espécies de *Bacillus*, é um grande problema. Esses organismos são encontrados com frequência na superfície e no interior das plantas e podem interferir na amplificação do 16S rDNA dos fitoplasmas, levando a resultados falso-positivos (Fránová, 2011; Harrison et al., 2002; Teixeira et al., 2007).

2.6. Fitoplasmas no Brasil

No Brasil, fitoplasmas já foram detectados causando doenças em diversas famílias de plantas, dentre as quais se encontram culturas de grande importância econômica (Tabela 1). Fitoplasmas associados ao enfezamento vermelho do milho (Bedendo et al., 2000) e associados a plantas de citros com sintomas típicos de Huanglongbing (Teixeira et al., 2008) merecem destaque devido à grande importância dessas culturas no país e às perdas de produção geradas por elas. Na cultura da mandioca, fitoplasmas já foram detectados causando sintomas de superbrotamento, levando a grandes perdas de produção, principalmente no estado de São Paulo (Barros et al., 1998; Flôres, 2009). Plantas com sintomas típicos da Doença do Couro de Sapo da Mandioca (DCSM) têm sido observadas com frequência, em países como o Brasil, Venezuela, Peru, Costa Rica, Panamá e Colômbia (Calvert & Thresh, 2002; Alvarez et al., 2009). Essa doença é caracterizada por sintomas no sistema radicular das plantas de mandioca, sendo lesões profundas nas raízes, diminuição do seu diâmetro e raízes com aspecto lenhoso, os mais comuns. Sintomas na parte aérea são pouco comuns, mas dependendo da cultivar, pode haver o aparecimento de clorose, mosaico e enrolamento do bordo das folhas. Normalmente, as plantas com sintomas da doença do Couro de Sapo da Mandioca apresentam a parte aérea mais vigorosa e desenvolvida do que as plantas sadias. Na grande maioria das vezes, a ocorrência da doença só é observada no momento da colheita quando a planta tem seu sistema radicular exposto (Calvert & Thresh, 2002; Alvarez et al., 2007; Alvarez et al., 2009).

Tabela 1. Lista de fitoplasmas no Brasil

Famílias de hospedeiras	Espécies hospedeiras	Grupos/Subgrupos de Fitoplasmas	Referências
Amaranthaceae	<i>Celosia argentea</i>	16SrIII-J	Eckstein, 2008
	<i>Celosia spicata</i>	16SrIII-J	Eckstein, 2008
Vitaceae	<i>Vitis Vinifera</i>	16SrI-B; 16SrIII-J	Neroni, 2009
Apocynaceae	<i>Catharanthus roseus</i>	16SrII; 16SrIII; 16SrXV-A	Barros et al., 1998; Kreyci et al., 2010; Montano et al., 2001
Asteraceae	<i>Ageratum conizoides</i>	16SrIII	Eckstein, 2010
	<i>Bidens pilosa</i>	16SrIII, 16SrVII	Eckstein, 2010
	<i>Emilia sonchifolia</i>	16SrIII, 16SrVII	Eckstein, 2010
Asteraceae	<i>Erigeron bonariensis</i>	16SrI; 16SrVII-B; 16SrIII	Barros et al., 2002; Eckstein 2010
	<i>Helychrisum bracteatum</i>	16SrIII	Montano et al., 2001
	<i>Sonchus oleracea</i>	16SrIII, 16SrVII	Eckstein, 2010
	<i>Solidago microglossa</i>	16SrIII	Flôres et al., 2011
Begoniaceae	<i>Begonia sp.</i>	16SrIII	Ribeiro et al., 2006
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita moschata</i>	16SrIII-J	Montano et al., 2006
	<i>Cucurbita pepo</i>	16SrIII	Melo et al., 2009b
	<i>Luffa cylindrica</i>	16SrIII	Montano et al., 2007b
	<i>Momordica charantia</i>	16SrIII-J	Montano et al., 2000
	<i>Sechium edule</i>	16SrIII-J	Montano et al., 2000
	<i>Sicana odorifera</i>	16SrIII	Montano et al., 2007a
Brassicaceae	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	16Sr; I16SrIII, 16SrIII-J, 16SrXV	Rapussi da silva, 2010
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	16SrIII	Amaral-Mello et al., 2006
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	16SrIII; 16SrIII; 16SrXIII	Eckstein, 2010
	<i>Lepidium virginicum</i>	16SrIII	Eckstein, 2010
Euphorbiaceae	<i>Manihot esculenta</i>	16SrIII-B	Barros et al., 1998; Flôres, 2009
	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	16SrIII	Ribeiro e Bedendo, 2006
	<i>Ricinus comunis</i>	16SrIII	Eckstein, 2010

Famílias de hospedeiras	Espécies hospedeiras	Grupos/Subgrupos de Fitoplasmas	Referências
Poaceae	Zea mays	16SrI-B; 16SrIII-B	Barros et al., 1998; Bedendo et al. 1998
	Saccharum sp.	16SrI-B	Silva et al., 2009 ^a
Lamiaceae	Leonurus sibiricus	16SrIII	Eckstein, 2010
Fabaceae	Crotalaria juncea	16SrIII-B; 16SrV	Barros et al., 1998; Amaral-Melo et al., 2004
	Crotalaria lanceolata	16SrIII	Eckstein, 2010
Malvaceae	Hibiscus rosa-sinensis	16SrXV-A	Silva et al., 2009b
	Sida sp.	16SrXV	Eckstein et al., 2011
	Sida rhombifolia	16SrIII	Eckstein, 2010
Meliaceae	Melia azedarach	16SrIII-B	Duarte et al., 2009
Nyctaginaceae	Bougainvillea spectabilis	16SrI	Silva, 2006
Arecaceae	Elaeis guineensis	16SrI	Brioso et al., 2006
Passifloraceae	Passiflora edulis f. flavicarpa	16SrIII-B	Ribeiro, 2008;
Turneraceae	Turnera ulmifolia	16SrXIII	Montano et al., 2011
Rosaceae	Fragaria sp.	16SrIII, 16SrXIII	Melo, 2009a
Rubiaceae	Paulicourea marcgravii	16SrIII	Eckstein, 2010
Rutaceae	Citrus sinensis	16SrIII, 16SrVII; 16SrIX	Teixeira et al., 2008; Barbosa, 2010
Solanaceae	Solanum lycopersicum	16SrIII	Barros et al., 1998
	Solanum melongena	16SrIII-B; 16SrIII-U	Barros et al., 1998; Amaral-Melo et al., 2011
	Nicandra physalodes	16SrIII-J	Eckstein, 2010

2.7. A doença “Couro de Sapo”

O primeiro relato da doença do couro de Sapo da mandioca (DCSM) ocorreu no ano de 1975 (Hernández et al., 1975), na Colômbia, porém pouco se sabia sobre seu agente causal. Acreditava-se que a doença era causada por um vírus. Visualizações de

partículas isométricas parecidas com partículas virais já tinham sido observadas em Microscópio Eletrônico, mas a etiologia da doença ainda não tinha sido comprovada. Além disso, a presença de padrões de dsRNA e sintomas de hiperplasia no córtex das raízes eram características típicas da presença de um reovirus (Calvert & Thresh, 2002). Porém, Alvarez et al. (2007) verificaram a presença de um fitoplasma em plantas com sintomas da DCSM utilizando dupla PCR. A primeira caracterização molecular do fitoplasma associado à DCSM em nível de subgrupo ocorreu apenas em 2009, na Colômbia. A presença do fitoplasma foi confirmada por PCR e dupla PCR, e sua identificação feita através de análises de RFLP e sequenciamento de regiões específicas do 16S rDNA. O fitoplasma foi identificado como sendo do grupo III, subgrupo ribossomal III-L e subgrupo de proteína ribossomal rpIII-H (Alvarez et al., 2009). Apesar de sintomas típicos da DCSM já terem sido encontrados em outros países, ainda não se tem a comprovação da associação desta doença nesses locais com a presença do fitoplasma.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahão JJS, Prado IN, Marques JA, Perotto D, Lugão SMB, 2006. Avaliação da substituição do milho pelo resíduo seco da extração da fécula de mandioca sobre o desempenho de novilhas mestiças em confinamento. *Revista Brasileira de Zootecnia* **35**(2):512-518.
- Allem AC, 1994. The origin of *Manihot esculenta* Crantz. (Euphorbiaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution* **41**:133-150
- Allem AC, 1999. The closest wild relatives of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* **107**:123-133.
- Allem AC, Goedert CO, 1991. Formação da base genética e manejo dos recursos genéticos da mandioca: O caso do Brasil. In: Hershey C, eds., *Mejoramiento genético de la yuca en América Latina*. Cali, Colômbia: Ciat, 125-161.

- Alvarez E, Molina ML, 2000. Characterizing the Sphaceloma fungus, causal agent of superelongation Disease in Cassava. *Plant Disease* **84**:423-428.
- Alvarez E, Mejia JF, Valle TL, 2003. Molecular and pathogenicity characterization of Sphaceloma manihoticola isolates from south-central Brazil. *Plant Disease* **87**:1322-1328.
- Alvarez E, Mejia JF, Llano GA, Loke JB, 2007. Detection and characterization of a phytoplasma associated with frog skin disease in cassava. *Bulletin of Insectology* **60**:273-274.
- Alvarez E, Mejia JF, Llano GA, Loke JB, Calari A, Duduk B, Bertaccini A, 2009. Characterization of a phytoplasma associated with Frogskin Disease in Cassava. *Plant Disease* **93**:1139-1145.
- Amaral-Mello AP, Eckstein B, Flôres D, Kreycki PF, Bedendo IP, 2011. Identification by computer-simulated RFLP of phytoplasmas associated with eggplant giant calyx representative of two subgroups, a lineage of 16SrIII-J and the new subgroup 16SrIII-U. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**:1454-1461.
- Amaral-Mello APO, Flôres D, Bedendo IP, 2006. Identificação do fitoplasma associado ao enfezamento do repolho, através de análise de RFLP. *Fitopatologia Brasileira* **31**:239.
- Amaral-Mello APO, Ribeiro LF, Massoja-junior NS, Bedendo IP, 2004. Um fitoplasma do grupo 16SrV associado ao superbrotamento da crotalária. *Summa Phytopathologica* **30**:432-435.
- Ammar el D, Hogenhout SA, 2003. Mollicutes associated with arthropods and plants. In: Bourtzis K, Miller TA, eds. *Insect Symbiosis: volume 2*. Boca Raton, USA: CRC, 97-118.
- Bai X, Zhang J, Ewing A, Miller SA, Radek AJ, Shevchenko DV, Tsukerman K, Walunas T, Lapidus A, Campbell JW, Hogenhout SA, 2006. Living with genome instability: the adaptation of Phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* **188**:3696.
- Bai XD, Correa VR, Toruno TY, Ammar ED, Kamoun S, Hogenhout SA, 2009. AY-WB Phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**:18-30.
- Barbosa JC, 2010. Caracterização molecular e diversidade de fitoplasmas em pomares de citros no Estado de São Paulo. Piracicaba, Brasil: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Tese de Doutorado.

- Barros TSL, 2002. Caracterização molecular de Mollicutes fitopatogênicos no Brasil. Brasília, Brasil: Universidade Federal de Brasília, Tese de Doutorado.
- Barros TSL, Kitajima EW, Resende RO, 1998. Diversidade de isolados brasileiros de fitoplasmas através da análise do 16S rDNA. *Fitopatologia Brasileira* **23**:459-465.
- Barros TSL, Davis RE, Resende RO, Dally EL, 2002. Erigeron witches'-broom phytoplasma in Brazil represents new subgroup VII-B in 16S rRNA gene group VII, the ash yellows phytoplasma group. *Plant Disease* **86**:1142-1148.
- Bedendo IP, Davis RE, Dally EL, 1998. Identificação molecular do fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho. *Fitopatologia Brasileira* **23**:329.
- Bedendo IP, Davis RE, Dally EL, 2000. Detection and identification of the maize bushy stunt phytoplasma in corn plants in Brazil using PCR and RFLP. *International Journal of Pest Management* **46**:73-76.
- Bertaccini A, Duduk B, 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* **48**:355-378.
- Brioso PST, Montano HG, Figueiredo DV, Poltronieri JS, Furlan-Junior J, 2006. Amarelecimento fatal do dendezeiro: sequenciamento parcial do fitoplasma associado. *Summa Phytopathologica* **32**:50.
- Calvert LA, Thresh JM, 2002. The viruses and virus diseases of cassava. In: Hillocks RJ et al., eds. *Cassava: biology, production and utilization*. Londres, UK: CAB International, 237-260.
- Câmara GMS, Godoy OP, 1998. Desempenho vegetativo e produtivo de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) a partir de manivas com diferentes diâmetros. *Scientia Agricola* **55**(2):326-331.
- Davey JE, Van Staden J, De Leeuw GTN, 1981. Endogenous cytokinin levels and development of flower virescence in *Catharanthus roseus* infected with mycoplasmas. *Physiological Plant Pathology* **19**:193-200.
- Deng X, Hiruki C, 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* **14**:53-61.
- Doi YM, Teranaka M, Yora K, Asuyama H, 1967. Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **33**:259-266.

- Duarte V, Silva EG, Hass ICR, Bedendo IP, Kitajima EW, 2009. First report of a group 16SrIII-B phytoplasma associated with decline of china tree in Brazil. *Plant Disease* **93**:666.
- Eckstein B, 2008. Identificação molecular de um fitoplasma associado à malformação das folhas das ornamentais *Celosia argentea* L. e *Celosia spicata* L. Piracicaba, Brasil: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-Universidade de São Paulo, Dissertação de Mestrado.
- Eckstein B, 2010. Enfezamento do brócolis: identificação molecular de fitoplasmas, potenciais insetos vetores e hospedeiros alternativos, e análise epidemiológica da doença. Piracicaba, Brasil: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-Universidade de São Paulo, Tese de Doutorado.
- Eckstein B, Barbosa JC, Rezende JAM, Bedendo IP, 2011. *Sida* sp. a new host for "Candidatus *Phytoplasma brasiliensis*" in Brazil. *Plant Disease* **95**:363.
- FAO, 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [<http://faostat.fao.org>] Acessado em 01 Fevereiro 2012.
- Firrao G, Andersen M, Bertaccini A, Boudon E, Bove JM, Daire X, Davis RE, Fletcher J, Garnier M, Gibb KS, Gundersen-Rindal DE, Harrison N, Hiruki C, Kirkpatrick BC, Jones P, Kuske CR, Lee IM, Liefting L, Marcone C, Namba S, Schneider B, Sears BB, Seemuller E, Smart CD, Streten C, Wang K, 2004. 'Candidatus *Phytoplasma*', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:1243-1255.
- Flôres D, 2009. Caracterização molecular e análise filogenética do fitoplasma agente do superbrotamento da mandioca (*Manihot esculenta*) no Estado de São Paulo. Piracicaba, Brasil: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-Universidade de São Paulo, Dissertação de Mestrado.
- Flôres D, Eckstein B, Bedendo IP, 2011. Identificação molecular do um fitoplasma do grupo 16SrIII associado à arnica-do-campo (*Solidago microglossa*). *Summa Phytopathologica* **37**:148.
- Fránová J, 2011. Difficulties with conventional phytoplasma diagnostic using PCR/RFLP analyses. *Bulletin of Insectology* **64**:S287-S288.
- Fukuda WMG, 1999. Melhoramento da mandioca. In: Borém A, ed. *Melhoramento de espécies cultivadas*, Viçosa, Brasil: Editora UFV, 409-428.
- Galetto L, Bosco D, Balestrini R, Genre A, Fletcher J, Marzachi C, 2011. The major antigenic membrane protein of "Candidatus *Phytoplasma asteris*" selectively interacts with ATP synthase and actin of leafhopper Vectors. *Plos one* **6**(7):e22571

- Gasparich GE, 2010. Spiroplasmas and phytoplasmas: Microbes associated with plant hosts. *Biologicals* **38**:193-203.
- Gundersen DE, Lee IM, 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* **35**:144-151.
- Gundersen DE, Lee IM, Rehner SA, Davis RE, Kingsbury DT, 1994. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (Phytoplasmas): a basis for their classification. *Journal of Bacteriology* **176**:5244-5254.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloeppe JW, 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* **43**:895-914.
- Harrison NA, Womack M, Carpio ML, 2002. Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Disease* **86**:676-681.
- Hernández A, Calderón H, Zárate RD, Lozano JC, 1975. El Cuero de sapo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Notícias fitopatológicas* **4**:117-118.
- Hershey C, 1994. *Manihot Genetic Diversity*. In: First Meeting of International Network for Cassava Genetic Resources. Cali, Colômbia: Ciat, 111-134.
- Hodgetts J, Dickinson M, 2010. Phytoplasma phylogeny and detection based on genes other than 16S rRNA. In: Weintraub PG, Jones P, eds. *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Londres, UK: CAB International, 93-113.
- Hodgetts J, Boonham N, Mumford R, Harrison N, Dickinson M, 2008. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**:1826-37.
- Hogenhout SA, Music MS, 2010. Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics - What have we learnt?. In: Weintraub PG, Jones P, eds. *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Londres, UK: CAB International, 19-36.
- Hogenhout SA, Oshima K, Ammar el D, Kakizawa S, Kingdom HN, Namba S, 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects **9**:403-423.
- IBGE, 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [www.ibge.gov.br/] Acessado em 1 Fevereiro 2012
- ICSBS, 1993. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**:394-397.

- Ishie T, Doi Y, Yora K, Asuyama H, 1967. Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **33**:267-275.
- Jarausch W, Lansac M, Bliot C, Dosba F, 1999. Phytoplasma transmission by in vitro graft inoculation as a basis for a preliminary screening method for resistance in fruit trees. *Plant Pathology* **48**:283-287.
- Kaminska M, Korbin M, 1999. Graft and dodder transmission of phytoplasma affecting lily to experimental hosts. *Acta Physiologiae Plantarum* **21**:21-26.
- Kittelmann K, Jeske H, 2008. Disassembly of African cassava mosaic virus. *Journal of General Virology* **89**:2029-36.
- Kollar A, Seemüller E, 2008. Base Composition of the DNA of Mycoplasma-Like Organisms associated with various plant diseases. *Journal of Phytopathology* **127**:177-186.
- Kreyci PF, Birito RAS, Lanza R, Bedendo IP, 2010. Ocorrência de fitoplasma pertencente ao grupo 16SrXV em Vinca encontrado no estado de São Paulo. *Tropical Plant Pathology* **36**:1-2.
- Kube M, Schneider B, Kuhl H, Dandekar T, Heitmann K, Migdoll AM, Reinhardt R, Seemüller E, 2008. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Candidatus Phytoplasma mali'. *Bmc Genomics* **9**:306.
- Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Bertaccini A, 1998a. Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology* **88**:1359-1366.
- Lee IM, Davis RE, Gundersen-Rindal DE, 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* **54**:221-55.
- Lee IM, Zhao Y, Bottner KD, 2006. SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Mol Cell Probes* **20**:87-91.
- Lee IM, Hammond RW, Davis RE, Gundersen DE, 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Molecular Plant Pathology* **83**:834-842.
- Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, Bartoszyk IM, 1998b. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequence. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**:1153-1169.
- Legg JP, Fauquet CM, 2004. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. *Plant Molecular Biology* **56**:585-599.

- Liefting LW, Andersen MT, Lough TJ, Beever RE, 2006. Comparative analysis of the plasmids from two isolates of "Candidatus Phytoplasma australiense". *Plasmid* **56**:138-44.
- Lim PO, Sears BB, 1989. 16S rRNA Sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionary distinct from animal mycoplasmas *Journal of Bacteriology* **171**:5901-5906.
- Lim PO, Sears BB, 1991. DNA sequence of the ribosomal protein genes rp12 and rps19 from a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. *Fems Microbiology Letters* **84**(1):71-73.
- Lozano JC, 1986. Cassava bacterial blight: A manageable disease. *Plant Disease* **70**:1089-1093.
- Marcone C, Ragozzino A, Seemuller E, 1997. Dodder transmission of alder yellows phytoplasma to the experimental host *Catharanthus roseus* (periwinkle). *European Journal of Forest Pathology* **27**:347-350.
- Martini M, Loi N, Ermacora P, Carraro L, Pastore M, 2007. A real-time PCR method for detection and quantification of 'Candidatus Phytoplasma prunorum' in its natural hosts. *Bulletin of Insectology* **60**:251-252.
- Melo LA, 2009a. Identificação de fitoplasmas associados ao amarelo da abobrinha-de-moita e à filodia de frutos de morangueiro. Piracicaba, Brasil: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-Universidade de São Paulo, Dissertação de Mestrado.
- Melo LA, Bedendo IP, Yuki VA, 2009b. Abobrinha-de-moita: um novo hospedeiro de fitoplasma do grupo 16SrIII. *Tropical Plant Pathology* **34**:114-117.
- Montano HG, Brioso PST, Pereira RC, Pimentel JP, 2007a. *Sicana odorifera* (Cucurbitaceae) a new phytoplasma host. *Bulletin of Insectology* **60**:287-288.
- Montano HG, Davis RE, Dally EL, Pimentel JP, Brioso PST, 2000. Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. *Plant Disease* **84**:429-436.
- Montano HG, Dally EL, Davis RE, Pimentel JP, Brioso PST, 2001. First Report of Natural Infection by "Candidatus Phytoplasma brasiliense" in *Catharanthus roseus*. *Plant Disease* **85**:1209.
- Montano HG, Brioso PST, Pimentel JP, Figueiredo DV, Cunha JO, 2006. *Cucurbita moschata*, new phytoplasma host in Brazil. *Journal of Plant Pathology* **88**:226-226.

- Montano HG, Brioso PST, Cunha JO, Figueiredo DV, Pimentel JP, 2007b. First report of group 16SrIII phytoplasma in loofah (*Luffa cylindrica*). *Bulletin of Insectology* **60**:277-278.
- Montano HG, Contaldo N, Pimentel JP, Cunha-Junior JO, Paltrinieri S, Bertaccini A, 2011. *Turnera ulmifolia*, a new phytoplasmas host species. *Bulletin of Insectology* **64**:S99-S100.
- NCBI, 2011. National Center for Biotechnology Information. [www.ncbi.nlm.nih.gov/] Acessado em 15 Janeiro 2012.
- Neroni RC, 2009. Amarelos da videira: identificação e análise filogenética dos fitoplasmas, transmissão dos agentes causais e otimização da diagnose. Piracicaba, Brasil: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-Universidade de São Paulo, Tese de Doutorado.
- Nery-Silva FA, Fernandes JJ, Juliatti FC, Melo B, 2007. Reação de germoplasma de mandioca a *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihots*. *Semina: Ciências Agrárias* **28**:3-10.
- Ogunjobi AA, Fagade OE, Dixon AGO, 2007. Physiological studies on *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) strains isolated in Nigeria, *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and food Chemistry* **6**(10):2482-2489.
- Oliveira AS, Silva MS, Batista BCC, Resende RO, 2009. Molecular identification of a phytoplasma belonging to the 16SrIII group found naturally infecting cassava. *Tropical Plant pathology* **34**:Suplemento.
- Olsen KM, Schaal BA, 1999. Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**:5586-5591.
- Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung HY, Wei W, Suzuki S, Arashida R, Nakata D, Miyata S, Ugaki M, Namba S, 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* **36**:27-29.
- Pereira AS, Lorenzi JO, Valle TL, 1985. Avaliação do tempo de cozimento e padrão de massa cozida em mandiocas de mesa. *Revista Brasileira de Mandioca* **4**(1):27-32.
- Pertot I, Musetti R, Pressacco L, Osler R, 1998. Changes in indole-3-acetic acid level in micropropagated tissues of *Catharanthus roseus* infected by the agent of the clover phyllody and effect of exogenous auxins on phytoplasma morphology. *Cytobios* **95**:13-23.

- Poltronieri LS, Trindade DR, Albuquerque FC, Duarte MLR, Cardoso SS, 2002. Incidência de *Fusarium solani* em mandioca no estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira* **27**(5).
- Purcell AH, 1982. Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **20**:397-417.
- Rangel AHN, Leonel FP, Braga AP, MJPP, Junior DML, 2008. Utilização de mandioca na alimentação de ruminantes. *Revista Verde* **3**:1-12.
- Rapussi-da-Silva MCC, 2010. Enfezamento da couve-flor: identificação molecular de fitoplasmas, evidência de potencial vetor e análise epidemiológica da doença. Piracicaba, Brasil: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-Universidade de São Paulo, Tese de Doutorado.
- Ribeiro LF, 2008. Fitoplasma do superbrotamento do maracujazeiro: identificação molecular, análise filogenética e prova de patogenicidade. Piracicaba, Brasil: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-Universidade de São Paulo, Dissertação de Mestrado.
- Ribeiro LF, Bedendo IP, 2006. Proliferação de ramos em plantas comerciais de bico-de-papagaio associada a fitoplasma do grupo 16SrIII. *Fitopatologia Brasileira* **31**:367-371.
- Ribeiro LF, Bedendo IP, Sanhueza RMV, 2007. Evidência molecular da ocorrência de uma fitoplasma associado ao lenho mole da macieira. *Summa Phytopathologica* **33**:30-33.
- Ribeiro LFC, Mello APD, Bedendo IP, Gioria R, 2006. Phytoplasma associated with shoot proliferation in *Begonia*. *Scientia Agricola* **63**:475-477.
- Schaal B, Olson P, Prinze T, Carvalho JCB, Tonukari NJ, Hayworth D, 1995. Phylogenetic analysis of the genus *Manihot* based on molecular markers. In: *The Cassava Biotechnology Network : proceedings of the second international scientific meeting*, Bogor, Indonesia. Cali (Colombia): CIAT 1:62-70
- Schneider B, Gibb KS, Seemuller E, 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* **143**:3381-3389.
- Sears BB, Lim PO, Holland N, Kirkpatrick BC, Klomparens KL, 1989. Isolation and characterization of DNA from a mycoplasma-like organism. *Molecular plant microbe interactions* **2**:175-180.
- Seemuller E, Garnier M, Schneider B, 2002. Mycoplasmas of plants and insects. In: Razin S, Hermann R, eds. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Nova York, USA: Kluwer Academic Publishers, 91-115.

- Silva EG, Haas ICR, Bedendo IP, Flôres D, 2006. Detecção de fitoplasma em plantas de primavera (*Bougainvillea spectabilis*) com sintoma de superbrotamento. *Summa Phytopathologica* **32**:45.
- Silva EG, Bedendo IP, Casagrande MV, Moraes VA, 2009a. Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of a Group 16SrI-B Phytoplasma Associated with Sugarcane Yellow Leaf Syndrome in Brazil. *Journal of Phytopathology* **157**:771-774.
- Silva EG, Bedendo IP, Massola NS, Silva RF, 2009b. "Candidatus Phytoplasma brasiliensis" associado ao superbrotamento do hibisco. *Summa Phytopathologica* **35**:234-236.
- Smart CD, Schneider B, Blomquist CL, Guerra LJ, Harrison NA, Ahrens U, Lorenz KH, Seemuller E, Kirkpatrick BC, 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl Environ Microbiol* **62**:2988-93.
- Souza LS, Fialho JF, 2003. A cultura da mandioca. Embrapa mandioca e Fruticultura: Sistemas de produção **8**.
- Serubombwe WS, Briddon RW, Baguma YK, Ssemakula GN, Bull SE, Bua A, Alicai T, Omongo C, Otim-Nape GW, Stanley J, 2008. Diversity of begomoviruses associated with mosaic disease of cultivated cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its wild relative (*Manihot glaziovii* Mull. Arg.) in Uganda. *Journal of General Virology* **89**:1759-69
- Sugio A, Kingdom HN, MacLean AM, Grieve VM, Hogenhout SA, 2011. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **108**:E1254-63.
- Sugio A, MacLean AM, Kingdom HN, Grieve VM, Manimekalai R, Hogenhout SA, 2011. Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annual Review of Phytopathology* **49**:175-195.
- Teixeira DC, Wulff NA, Martins EC, Kitajima EW, Bassanezi R, Ayres AJ, Eveillard S, Saillard C, Bove JM, 2008. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of Sao Paulo, Brazil. *Phytopathology* **98**:977-84.
- Teixeira MA, Melo IS, Vieira RF, Costa FEC, Harakava R, 2007. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **42**:43-49.
- Tran-Nguyen LTT, Kube M, Schneider B, Reinhardt R, Gibb KS, 2008. Comparative genome analysis of "Candidatus Phytoplasma australiense" (subgroup tuf-

- Australia I; rp-A) and "Ca. *Phytoplasma asteris*" strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology* **190**:3979-3991.
- Vetter J, 2000. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* **38**:11-36.
- Viégas AP, 1976. Estudos sobre a mandioca. São Paulo, Brasil: Instituto Agronômico do Estado de São paulo
- Wei W, Lee IM, Davis RE, Suo XB, Zhao Y, 2007. Virtual RFLP analysis of 16S rDNA sequences identifies new subgroups in the clover proliferation phytoplasma group. *Bulletin of Insectology* **60**:349-350.
- Weintraub PG, 2007. Insect vector of phytoplasmas and their control - an update *Bulletin of Insectology* **60**:169-173.
- Weintraub PG, Beanland LA, 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* **51**:91-111.
- Weintraub PG, Wilson MR, 2010. Control of phytoplasma diseases vectors. In: Weintraub PG and Jones P, eds. *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Londres, UK: CAB International, 233-249.
- White WLB, Arias-Garzon DI, McMahon JM, Sayre RT, 1998. Cyanogenesis in Cassava. *Plant Physiology* **116**:1219-1225.
- Woese CR, Maniloff J, Zablen LB, 1980. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:494-498.
- Zhao Y, Wei W, Davis RE, Lee IM, 2010. Recent Advances in 16S rRNA Gene based *Phytoplasma* differentiation, classification and taxonomy. In: Weintraub PG, Jones P, eds. *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Londres, UK: CAB International, 64-92.
- Zhao Y, Wei W, Lee IM, Shao J, Suo X, Davis RE, 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**:2582-93.

4. ARTIGO

Molecular characterization and phylogenetic analysis of a phytoplasma associated to cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) with symptoms of frog skin disease in Brazil

A. Souza¹, F. Silva¹, I. Bedendo², C. Carvalho^{1*}

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brazil; ²Departamento de Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo (USP), 13418-900, Piracicaba, São Paulo, Brazil; * Author for correspondence: claudine.carvalho@ufv.br

Abstract

Diseases caused by phytoplasmas in different crops have emerged in recent decades and are responsible for significant economic losses. Of particular note among the disease-causing phytoplasmas in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is that responsible for cassava frog skin disease (CFSD), which causes great losses in cassava. In order to detect and characterize the phytoplasma associated with CFSD in Brazil, 30 cassava plants showing typical symptoms and 20 cassava symptomless were collected in Mocambinho (Jaíba) in the state of Minas Gerais, Brazil. Total DNA was extracted from tubers, stems and leaves and used as a template for nested-PCR. Specific primers were designed to facilitate the detection of phytoplasma in the presence of endophytic *Bacillus* sp. These primers allowed the detection of the phytoplasma in 16.7% of the tubers, 66.7% of the stems and 73.3% of the leaves from symptomatic plants, but in none of the tubers, 45% of the stems and 30% of the leaves from asymptomatic plants. The detected phytoplasma was identified as belonging to the group 16SrIII, subgroup A,

by RFLP, sequencing and RFLP in silico. The phylogenetic analysis supports the characterization performed by RFLP.

Key words: phytoplasmas, cassava, diagnosis, frog skin, RFLP

Introduction

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz; Euphorbiaceae) is a plant of great socioeconomic importance, since it is part of the basic food for the population of developing countries. Nigeria is the largest producer in the world and Brazil is the second largest (FAO, 2010). Among the noteworthy characteristics of cassava is its tolerance to drought, and its good development at different altitudes, latitudes and temperatures. In addition, sandy soils favor its growth (Ceballos et al, 2004.). These features allow this crop to be produced all over Brazil, especially the states of Pará, Paraná, Bahia and Maranhão (IBGE, 2010). However, the occurrence of diseases, including those caused by phytoplasmas, constitutes a limiting factor for its production in Brazil (Souza and Fialho 2003).

Phytoplasmas are small cell-wall-less bacteria, surrounded by a single membrane (Doi et al., 1967). These pathogens are restricted to the phloem of their host plants and multiply inside the insect vectors (Purcell, 1982; Hanboonsong et al., 2002; Pedrazzoli et al., 2007). They have pleomorphic particles and are not yet cultivatable in culture medium. Their genetic material consists of a unique chromosome, that can be circular or linear, and may additionally contain up to four different plasmids (Oshima et al., 2004; Bai et al., 2006; Liefting et al., 2006; Kube et al., 2008; Tran-Nguyen et al., 2008). The chromosome is of a reduced size compared to the ancestral Gram-positive bacteria. The

most common symptoms seen in diseases caused by phytoplasmas are: (i) phyllodes, (ii) witches' broom (iii) virescence (iv) dwarfism (v) sterility of floral organs, (vi) wrinkled leaves and (vii) yellowing (Firrao et al., 2004; Bertaccini & Duduk, 2009).

The distribution and accumulation of phytoplasmas in the host plants are quite variable (Douglas, 1986; Siddique et al., 1998). A low concentration of microorganisms in certain tissues, as well as the presence of inhibitors in the host tissue, may turn their detection harder (Hodgetts & Dickinson, 2010). Another problem related to the detection of phytoplasmas is the presence of bacteria on the plant surface or endophytic, as certain genera of bacteria have a high nucleotide sequence homology with the 16SrDNA phytoplasma (Lim & Sears, 1989). The presence of these bacteria can interfere in the amplification reactions, favoring the occurrence of false positives and making it difficult to detect the pathogen (Harrison et al., 2002). Moreover, the presence of different operons in gene 16rRNA may hamper its characterization (Liefing et al., 1996; Oshima et al., 2004), which is based on the comparison of the restriction patterns of 16SrDNA fragment, using 17 different enzymes (Lee et al., 1998).

In Brazil, the first report of a phytoplasma causing disease in cassava occurred in 1944 in the city of Lins, São Paulo. This disease was named cassava witches' broom disease (Silberschmidt & Campos, 1944 apud Flôres, 2009), however, the etiology was determined many years later its description (Flôres, 2009). This disease has been spread throughout Brazil, leading to significant losses. Because the cassava stems are the source of planting stakes for the next cycle, its control has been difficult (Flôres, 2009). Recently, an unrelated phytoplasma associated with cassava was described in Colombia. The plants showed characteristic symptoms of cassava frog skin disease (CFSD), such as

deep lesions, decreased tuber diameter and woody tubers. No symptoms were observed in the aerial parts of the plants (Hernández, Calderón et al. 1975; Alvarez et al., 2007; Alvarez et al., 2009). Despite the presence of cassava plants showing characteristic symptoms of the CFSD in Brazil, little is known about the presence of a phytoplasma associated with these symptoms in cassava.

Here, cassava plants with CSFD symptoms were collected from Mocambinho (Jaíba, State of Minas Gerais, Brazil) in order to diagnose the disease. Specific primers were designed to allow the detection of phytoplasma in the cassava crop in the presence of endophytic bacteria. Additionally, the molecular characterization of the phytoplasma was performed by amplification of part of 16S rDNA, followed by RFLP analysis, sequencing and phylogenetic analysis.

Material and methods

Sources of healthy and diseased cassava

Cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) were collected in Mocambinho (Jaíba, Minas Gerais, Brazil), where the occurrence of cassava frog skin disease in the field is significant. Among the 50 cassava plants collected, 30 had obvious symptoms of the disease and 20 were asymptomatic (Figure 1). Samples were collected from tubers, stems and leaves of each plant for analysis.

The 50 collected plants were separated into tuber, stem and leaf. The 30 samples of tubers, stems and leaves of symptomatic plants were called RCS, CCS and FCS, respectively, and numbered from 1 to 30. The 20 samples of tubers, stems and leaves of

asymptomatic plants were called RS, CS and FS, respectively, and numbered from 1 to 20.

DNA extraction

Total DNA was extracted from cassava samples (tubers, stems and leaves) following the protocol proposed by Doyle & Doyle (1987), with some modifications. Prior to DNA extraction, the leaves underwent surface sterilization to reduce the chances of contamination with other microorganisms. This was carried out through the passage of the plant material for 30 seconds in 50% ethanol, followed by 3 minutes in sodium hypochlorite (2%) and 3 washes in sterile distilled water. Approximately 2 g of plant tissue was macerated in liquid nitrogen and then transferred to 1.5 mL microtubes. To each microtube were added 800 μ l of 2X CTAB extraction buffer plus 2 μ L of β -mercaptoethanol per mL of buffer, preheated to 60 °C. The microtubes were vortexed and incubated at 65 °C for 60 minutes, being inverted every 10 minutes in order to homogenize the suspension. After incubation, 600 μ L of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) were added to each microtube. The solution was homogenized by inverting the tubes and they were centrifuged for 10 minutes at 14,000rpm. The upper phase formed (aqueous) was transferred to a new microtube (approximately 540 μ L). To these new microtubes, 540 μ L of cold isopropanol (- 20°C) was added. The microtubes were left overnight at -20°C, for greater precipitation of nucleic acids. After incubation, the microtubes were centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes. The supernatant was discarded and the pellet formed was washed with 1mL of 80% ethanol twice. Subsequently, the pellet was resuspended in 500 μ L of 1M NaCl. The microtubes were

incubated for 60 min at 4°C and centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes. The pellet formed was washed with 1mL of 80% ethanol twice. After evaporation of all the ethanol, the pellet was resuspended in 60µL of TE plus RNase. The microtubes were stored at -20 °C for later use.

Phytoplasma detection

For detection, we performed a nested-PCR using universal primers for detection of phytoplasmas, P1 and P7, followed by the amplification reaction with primers FTP (F) and FTP (R), developed in this work. The program used for the primers P1/P7 consisted of 30 cycles, comprising the steps of nucleic acid denaturation (1 minute at 94°C), annealing of primers (1 minute at 56°C) and extension (2 min at 72°C); for the primers FTP(F)/(R), the program consisted of 35 cycles, comprising the steps of denaturation of nucleic acids (1 minute at 94°C), annealing of primers (1 minute at 46°C) and extension (1 min at 72°C). Both programs had a single initial step of 1 minute at 94°C and a final 7 min at 72°C. The amplified product in the first reaction (P1/P7) was used as template for the second PCR reaction at a dilution of 1:15 in Milli-Q water, using the primers FTP(F) and FTP(R).

Two cassava plants with symptoms of CFSD were kept in the greenhouse and used to amplify the fragment of 1200bp generated by primers R16F2n and R16R2. A nested-PCR was performed using the primers P1/P7, followed by R16F2n/R2. The first reaction product (1µl) was used as a template for the second reaction. The program used for the primers R16F2n/R2 consisted of 35 cycles, comprising the steps of denaturation of nucleic acids (1 minute at 94°C), annealing of primers (2 minutes at 50°C) and

extension (3 minutes at 72°C), only an initial step of 1 minute at 94°C and a final step of 7 minutes at 72°C.

PCR reactions to detection were performed using the DNA amplification kit GoTaq Master Mix (Promega) according to manufacturer instructions. PCR reactions to sequencing were performed using the Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) according to manufacturer instructions. The primers used in amplifications are listed in table 1. The final product amplified in the PCR reactions was subjected to agarose gel electrophoresis, and subsequently the gels were stained with ethidium bromide and photographed under ultraviolet light (UV).

Cloning and sequencing of 16S rDNA fragments

The samples considered positive for the presence of phytoplasma had the fragments generated by nested-PCR purified using Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) according to manufacturer's recommendations. The purified fragments were ligated to the plasmid vector pGEM T Easy Vector System I (Promega) for 12 hours at 4°C and transferred to *Escherichia coli* DH5 α competent cells, through the transformation process by the use of heat shock (Sambrook & Russel 2001). After cloning, *E. coli* transformed cells had their plasmidial DNA extracted using the Illustra kit Plasmidprep Mini Spin Kit (GE Healthcare), according to manufacturer's recommendations. The cloned fragments were sent for sequencing at Macrogen Inc. (Korea).

Phytoplasma characterization by RFLP analysis

The clones obtained by insertion of 1,2kb fragment were amplified again using the R16F2n/R2, according to the program described for this reaction. The PCR product generated was purified using Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), following the manufacturer's recommendations. Subsequently, the purified fragment was subjected to enzymatic cleavage using the following restriction enzymes: BamHI, EcoRI, HaeIII, HinfI, MboI, RsaI, SspI and TaqI. The digestion reactions were performed using approximately 1.5 µg of the purified PCR product and 5 units of enzyme in a total reaction volume of 20µL. The cleavage reactions using the enzymes BamHI, EcoRI, HaeIII, HinfI, MboI, RsaI and SspI were performed at 37°C during 12 hours while the reaction using the enzyme TaqI was performed at 65°C during 1 hour.

The products of the enzymatic cleavage reactions were subjected to electrophoresis in polyacrylamide gel (4.5%), stained with ethidium bromide and photographed under UV light.

RFLP in silico analysis of the sequences obtained

A restriction analysis in silico of the sequences obtained by amplification using the primers R16F2n/R2 was performed using the online tool iPhyClassifier (Zhao et al. 2009). The in silico restriction was made with the 17 commonly used restriction enzymes for RFLP analysis of phytoplasmas. The enzymes were: AluI, BamHI, BfaI, Bsh1236 (BstUI), DraI, EcoRI, HaeIII, HhaI, HinfI, HpaI, HpaII, KpnI, MboI, MseI, RsaI, SspI and TaqI. A comparison of restriction patterns of the sequences obtained with the patterns described in literature was made in order to identify the group to which this phytoplasma. We calculated the coefficients of similarity (F) for each pair of isolates

used for the analysis, through the iPhyClassifier (Zhao et al. 2009), following the formula $F=2N_{xy}/(N_x+N_y)$, where $2N_{xy}$ is the number of bands in common in the profile between the two isolates and N_x and N_y are the numbers of bands existing in the profile of each isolate.

Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences

The eight 16S rDNA nucleotide sequences generated were aligned and compared with other sequences of 33 phytoplasmas representative of different groups of existing phytoplasmas (NCBI 2011) (Table 2). Twenty-one 16S rDNA sequences of different subgroups within the group 16SrIII were also compared along with the sequences of the phytoplasmas responsible for cassava witches' broom disease (CaWB Br1 and CaWB Br2) and cassava frog skin disease (CFSD1, 2 and 3). The nucleotide sequence of *Acholeplasma palmae* was used as outgroup for analysis. Sequence alignment was performed using the program Muscle (Edgar, 2004) implemented in the program Mega 5.5 (Tamura et al., 2011). The phylogenetic analysis was performed using Bayesian inference (MB) through the program Mr. Bayes, based on the Monte Carlo Markov Chain (MCMC) (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). The model used was previously selected by AIC (Akaike Information Criterion) through the program MrModeltest V.2.3. (Nylander, 2004). Ten million generations were used. Sampling of trees was carried out every 1,000 generations, generating 10,000 trees. A total of 2,500 trees (25%) were excluded for the calculation of posterior probability and it was verified if there was convergence of cold chains.

Trees were also constructed using Neighbor-joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML), using the program Mega 5.5 (data not shown). The trees were rooted using the sequence of *Acholeplasma palmae* as the outgroup, since they belong to the same family of the genus *Ca. Phytoplasma* (*Acholeplasmataceae*).

Results

Detection of phytoplasma in the samples collected

In all plant tissues examined (tubers, stems and leaves) the presence of phytoplasma was confirmed. Nested-PCR reactions of all collected samples using the primers P1/P7 and R16F2n/R2, generated fragments of 1200 bp, as expected for phytoplasmas. However, the sequencing results showed that the fragments belonged to different *Bacillus* species (endophytic of cassava), especially *Bacillus megaterium*. Due to the high sequence homology among phytoplasmas and *Bacillus* species found on plant surfaces or endophytically, the detection of phytoplasma in the collected samples with universal primers commonly used for diagnosis (R16F2n/R2) was not possible. In order to overcome this problem, new pair of specific primers was designed, by comparing the sequences of the phytoplasma that causes CFSD present in the database and sequences of *Bacillus megaterium* obtained from the amplification of cassava samples (Figure 2). The new primers gave amplified a fragment of 816 bp (Figure 3). They were called FTP(F) and FTP(R) and were used for the detection of phytoplasma in all cassava samples collected. Some of these fragments were cloned and then sequenced in order to confirm that the amplified fragment belonged to the phytoplasma. Nested-PCR reactions using primers P1/P7 in the first reaction and primers FTP(F)/(R) in the

second reaction gave consistent results. A ninety and 50% of symptomatic and asymptomatic plants, respectively, were positive for the presence of phytoplasmas (37 positive samples). In the group of symptomatic plants, 16.7% of tuber samples, 66.7% of the stem samples and 73.3% of the leaf samples were positive. In the group of asymptomatic plants, none of the tuber samples, 45% of stem samples and 30% of the leaf samples was positive (Table 3).

These results suggest that the best regions for detection of phytoplasmas in cassava plants affected by this phytoplasma are leaf and stems. However, in order to obtain a more reliable result, it is important to perform the detection in more than one part of the plant. This becomes clear when looking at the results obtained in asymptomatic plants, which had higher detection rates in stems. The detection of phytoplasma in the tubers showed the lowest efficiency, which may be due to the presence of high levels of substances that inhibit PCR (John, 1992; Galetto & Marzachi, 2010).

Characterization by RFLP and RFLP in silico

Two plants were kept in a greenhouse and were used to attempt amplification of 1200bp fragment generated by primers R16F2n/R2. After some attempts, it was possible to amplify a 1200bp fragment, which was later confirmed as belonging to a phytoplasma. These fragments were cloned and eight of the clones obtained, five clones belonging to a plant (CFSDBr21, CFSDBr22, CFSDBr23, CFSDBr24, CFSDBr25) and three clones belonging to other plant (CFSDBr11, CFSDBr12, CFSDBr13). These clones were used for molecular characterization of the phytoplasma. Enzymatic cleavage

was performed using the enzymes BamHI, EcoRI, HaeIII, HinfI, MboI, RsaI SspI and TaqI (Figure 6). We can also see that digestion using the enzymes EcoRI and TaqI was partial and a 1200bp fragment is present. Additionally, the nucleotide sequences of eight clones obtained were subjected to RFLP analysis in silico, with 17 enzymes commonly used for the characterization of phytoplasmas (Figure 5), and were subsequently analyzed using the software iPhyClassifier (Zhao et al., 2009).

The restriction patterns obtained by enzymatic cleavage, followed by running polyacrylamide gels, confirmed the patterns obtained by RFLP analysis in silico. Clones CFSDBr13, CFSDBr21, CFSDBr22, CFSDBr23, CFSDBr24 and CFSDBr25 had identical restriction patterns and were classified within the 16SrIII group (Figure 5c). They had values of F equal to 0.99 when compared to the representative of the 16SrIII-A subgroup. The absence of only one cleavage site of the enzyme MseI in these clones, compared to the representative of 16SrIII-A subgroup, indicates that this phytoplasma is a variant of this subgroup.

Clones CFSDBr11 and CFSDBr12 had a slightly different restriction pattern, but were also included in the 16SrIII group. The clone CFSDBr11 besides presenting an additional cleavage site of the enzyme MseI, presented one less cleavage site of the MboI enzyme, when compared to other clones (Figures 5a and 6b). The absence of this cleavage site of the enzyme MboI made the largest F value found be equal to 0.96, compared to the representative of the 16SrIII-A subgroup. The same happened with the clone CFSDBr12 that besides the additional cleavage site of the enzyme MseI, has one less site of the RsaI and F value equal to 0.96 compared to the same representative

16SrIII-A subgroup (Figures 5b and 6f). These results suggest that these sequences are of a phytoplasma belonging to a new subgroup.

Phylogenetic analysis of phytoplasmas

Phylogenetic analysis was performed with a total of 65 sequences, including at least one representative from each group, representatives of different subgroups of the 16SrIII group, three representatives of the phytoplasma that causes the CFSD in Colombia (CFSD1, 2 and 3), two representatives of the phytoplasma that causes cassava witches' broom (CaWB1 and 2), the eight clones obtained in this work (CFSDBr11, 12, 13, CFSDBr21, 22, 23, 24 and 25) and a nucleotide sequence of *Acholeplasma palmae* (outgroup). The trees generated by different methods NJ, ML and MB showed similar topology, so only the MB tree is presented.

Branches well supported by posterior probability values (1.0) grouped all representatives of the 16SrIII group and the eight clones obtained in this work, supporting the classification by the use of RFLP. It can be observed that the eight clones obtained in this work were grouped with representative of the 16SrIII-L and close to 16SrIII-A, 16SrIII-G and 16SrIII-S subgroups, but are far from the representatives of CFSD from Colombia and from representatives of cassava witches' broom disease.

Discussion

Many symptoms caused by phytoplasmas are characteristic of changes in the plant's hormonal balance (Sugio, 2011). With CFSD, symptoms in shoots are unusual, not showing the typical symptoms of phytoplasma infections such as virescence,

phyllody, wrinkling, dwarfism, sterility of flowers or witches' broom (Alvarez et al., 2007; Alvarez et al., 2009). Woody-type tubers, with thick bark and reduced diameter may be related to increased levels of lignin and suberin in tuber tissue, a fact previously reported in apple trees infected by phytoplasma (Musetti et al., 2000).

The interference in the PCR reaction caused by contaminant microorganisms is quite common in the process of detection of phytoplasmas through this technique (Harrison et al., 2002). Due to this problem, additional care must be taken to avoid the occurrence of contamination, such as surface sterilization of plant tissues prior to DNA extraction, the use of filter tips, gloves and contaminant-free water. The use of different combinations of primers described in the literature can be a solution if all the procedures listed above are insufficient. Another alternative consists of designing new primers based on existing nucleotide sequences, as carried out in this paper.

The presence of phytoplasmas in the tissues of cassava plants has been proven through nested-PCR using different combinations of primers. The detection by nested-PCR with the primers P1/P7 followed by FTP(F)/(R) was quite efficient, with a positive result in 90% of the symptomatic plants and 50% of asymptomatic plants. It is noteworthy that even asymptomatic plants had a high incidence of phytoplasmas. Despite the presence of phytoplasmas, the absence of symptoms may be related to plant age at the moment of infection. If the phytoplasma is already present in the cassava stakes at planting, it will have enough time to accumulate in the tissues of the host, thus affecting the whole process of tuber formation. If infection occurs latter in the cycle, the accumulation of the phytoplasma might not be enough to support the occurrence of visible symptoms, although still enough to allow detection.

Leaves and stems were the best tissues used to perform detection. Detection of phytoplasma in the tubers was not very efficient. The presence of PCR inhibitors may be one of the factors that explain the lower detection rate in the tuber tissues (John, 1992; Galetto & Marzachi, 2010). To reduce the interference of these inhibitors in the PCR reaction, a dilution of the DNA extract is recommended prior to the first reaction and between the two nested-PCR reactions (Heinrich et al., 2001). Even with the implementation of these dilutions, the detection rate in the tubers was still very low. Due to the fact that phytoplasmas are distributed and accumulated heterogeneously in plants, the detection should be made using samples extracted from different parts of the plant to ensure the reliability of the results.

The molecular characterization was performed by RFLP and RFLP in silico analyses in sequences generated by R16F2n/R2 primers. The first characterization of a phytoplasma associated with CFSD suggested the inclusion of this phytoplasma in a new subgroup called 16SrIII-L (Alvarez et al., 2009). However, the restriction pattern generated by the sequence determined by R16F2n/R2 primers by RFLP in silico analysis, shows no differences when compared to the restriction pattern of the representative of the 16SrIII-B subgroup phytoplasmas and phytoplasmas associated with cassava witches' broom disease (CaWB Br1 and CaWB Br2), also classified as belonging to the 16SrIII-B subgroup (Flôres, 2009). The difference between them was demonstrated only in the sequence generated by primers P1/P7, which presented an additional cleavage site of the enzyme MseI at position 1524 (Alvarez et al., 2009), which is not within the fragment generated by 16RF2n/R2 primers used for characterization. The RFLP and RFLP in silico analysis, in fragments generated by

R16F2n/R2 primers of the phytoplasma characterized in this work, have shown that it belonging to 16SrII-A subgroup. This is the first report of a phytoplasma belonging to 16SrIII-A subgroup in cassava plants and also the first reported case and molecular characterization of the phytoplasma associated with CFSD in Brazil.

The occurrence of distinct ribosomal sequences can be explained in different ways: (i) the presence of infection by phytoplasmas of different groups and subgroups (Seemuller et al., 2010), (ii) heterogeneity of the two ribosomal operons in the same phytoplasma (Liefiting et al., 1996), (iii) errors occurring during the PCR reaction (Cha, 1993). The possibility of errors during sequencing was discarded due to verification of the different cleavage patterns through the use of restriction enzymes.

The characterization based on only in part of the sequence of the 16S rDNA and the separation of phytoplasma subgroups is still very subjective, because it shows no relationship with biological characteristics of the pathogen, of its host, or the type of symptoms caused. Differences of only a few nucleotides in these sequences do not seem to be able to solve problems in the separation of these phytoplasmas. One example is the phytoplasmas associated with cassava. The phytoplasmas responsible for cassava witches' broom disease and the phytoplasma related to the CFSD in Colombia have the same restriction fragment pattern of 16S rDNA, and have cassava as a host in common, but cause very different symptoms (Alvarez et al., 2009; Flôres, 2009). The phytoplasma featured in this work, which causes CFSD and the phytoplasma that causes CFSD in Colombia have the same host, cause the same type of symptoms, but have distinct cleavage patterns of 16S rDNA, being characterized differently. The inability to cultivate these organisms makes their characterization difficult (Firrao et al., 2004).

Increased knowledge of its relationships with insect vectors, interaction with its hosts and larger number of genes or genomes being sequenced of several phytoplasma groups, will bring greater clarity and greater support for the classification of this group of plant pathogens.

As expected, the phylogenetic analysis divided the different groups of phytoplasmas in three distinct clades. According to Zhao et al. (2009), the separation of the subclass should be thoroughly investigated to see if these different clades must be separated into different genera, and the genus *Ca. Phytoplasma* being raised to family level.

Conclusion

The data obtained with this research proves the existence of a phytoplasma associated to cassava plants presenting the CFSD in the town of Jaíba, Minas Gerais, Brazil. This phytoplasma was characterized as belonging to the 16SrIII group and subgroup A, based on RFLP, RFLP in silico and sequencing. This is the first report of a phytoplasma belonging to the 16SrIII-A subgroup associated with cassava plants and the first molecular characterization of a phytoplasma causing CFSD in Brazil.

References

- Alvarez E, Mejia JF, Llano GA, Loke JB, 2007. Detection and characterization of a phytoplasma associated with frog skin disease in cassava. *Bulletin of Insectology* **60**:273-274.
- Alvarez E, Mejia JF, Llano GA, Loke JB, Calari A, Duduk B, Bertaccini A, 2009. Characterization of a Phytoplasma Associated with Frogskin Disease in Cassava. *Plant Disease* **93**:1139-1145.

- Bai X, Zhang J, Ewing A, Miller SA, Radek AJ, Shevchenko DV, Tsukerman K, Walunas T, Lapidus A, Campbell JW, Hogenhout SA, 2006. Living with genome instability: the adaptation of Phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* **188**:3696.
- Bertaccini A, Duduk B, 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* **48**:355-378.
- Ceballos H, Iglesias CA, Pérez JC, Dixon AGO, 2004. Cassava breedings: opportunities and challenges. *Plant molecular biology* **56**:503-516
- Cha RS, Thill WG, 1993. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *Genome Research* **3**:S18-S29.
- Deng X, Hiruki C, 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* **14**:53-61.
- Doi YM, Teranaka M, Yora K, Asuyama H, 1967. Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **33**:259-266.
- Douglas SM, 1986. Detection of Mycoplasma-like Organisms in peach and chokecherry with X-disease by fluorescence microscopy. *Phytopathology* **76**:784-787.
- Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemistry Bulletin* **19**:11-15.
- Edgar RC, 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**:1792-1797.
- FAO, 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [<http://faostat.fao.org>] Accessed 01 February 2012.
- Firrao G, Andersen M, Bertaccini A, Boudon E, Bove JM, Daire X, Davis RE, Fletcher J, Garnier M, Gibb KS, Gundersen-Rindal DE, Harrison N, Hiruki C, Kirkpatrick BC, Jones P, Kuske CR, Lee IM, Liefting L, Marcone C, Namba S, Schneider B, Sears BB, Seemuller E, Smart CD, Streten C, Wang K, Work IPS, 2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:1243-1255.
- Flôres D, 2009. Caracterização molecular e análise filogenética do fitoplasma agente do superbrotamento da mandioca (*Manihot esculenta*) no Estado de São Paulo. Piracicaba, Brazil: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo. Master's degree thesis.

- Galetto L, Marzachi C, 2010. Real-time PCR diagnosis and quantification of phytoplasmas. In: Weintraub PG and Jones P, eds. *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. London, UK: CAB International, 1-18.
- Hanboonsong Y, Choosai C, Panyim S, Damak S, 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Molecular Biology* **11**:97-103.
- Harrison NA, Womack M, Carpio ML, 2002. Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Disease* **86**:676-681.
- Hernández A, Calderón H, Zárate RD, Lozano JC, 1975. El Cuero de sapo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Notícias fitopatológicas* **4**:117-118.
- Heinrich M, Botti S, Caprara L, Arthofer W, Sttromer S, Hanzer V, Katinger H, Bertaccini A, Machado MLC, 2001. Improved Detection Methods for Fruit Tree Phytoplasmas. *Plant Molecular Biology Reporter* **19**:169-179.
- Hodgetts J, Dickinson M, 2010. Phytoplasma phylogeny and detection based on genes other than 16S rRNA. In: Weintraub PG and Jones P, eds, *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. London, UK: CAB International, 93-113.
- IBGE, 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [www.ibge.gov.br/] Accessed 1 February 2012
- John ME, 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research* **20**:2381.
- Kube M, Schneider B, Kuhl H, Dandekar T, Heitmann K, Migdoll AM, Reinhardt R, Seemuller E, 2008. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Candidatus *Phytoplasma mali*'. *Bmc Genomics* **9**:306.
- Lee IM, Hammond RW, Davis RE, Gundersen DE, 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Molecular Plant Pathology* **8**:834-842.
- Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Hammond RW, Davis RE, 1994. Use of micoplasmalike organisms (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested PCR assay to detect mixed MLO infections in a single host plant. *Phytopathology* **84**:559-566.
- Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, Bartoszyk IM, 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequence. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**:1153-1169.
- Liefting LW, Andersen MT, Lough TJ, Beever RE, 2006. Comparative analysis of the plasmids from two isolates of "Candidatus *Phytoplasma australiense*". *Plasmid* **56**:138-44.

- Liefting LW, Andersen MT, Beever RE, Gardner RC, Forster RL, 1996. Sequence heterogeneity in the two 16S rRNA genes of Phormium yellow leaf phytoplasma. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:3133-9.
- Lim PO, Sears BB, 1989. 16S rRNA Sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionary distinct from animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology* **171**:5901-5906.
- Musetti R, Favali MA, Pressacco L, 2000. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios* **102**:133-47.
- NCBI, 2011. National Center for Biotechnology Information. [www.ncbi.nlm.nih.gov/] Accessed 15 January 2012.
- Nylander JAA, 2004. MrModeltest v2. , Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung HY, Wei W, Suzuki S, Arashida R, Nakata D, Miyata S, Ugaki M, Namba S, 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* **36**:27-9.
- Pedrazzoli F, Gualandri V, Forno F, Mattedi L, Malagnini V, Salvadori A, Stoppa G, Ioriatti C, 2007. Acquisition capacities of the overwintering adults of the psyllid vectors of 'Candidatus Phytoplasma mali'. *Bulletin of Insectology* **60**:195-196.
- Purcell AH, 1982. Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **20**:397-417.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**:1572-1574.
- Sambrook J, Russel DW, 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Seemuller E, Kiss E, Sandor S, Schneider B, 2010. Multiple Infection of Apple Trees by Distinct Strains of 'Candidatus Phytoplasma mali' and Its Pathological Relevance. *Phytopathology* **100**:863-870.
- Seemuller E, Schneider B, Maurer R, Ahrens U, Daire X, Kison H, Lorenz KH, Firrao G, Avinent L, Sears BB, Stackebrandt E, 1994. Phylogenetic Classification of Phytopathogenic Mollicutes by Sequence Analysis of 16s Ribosomal DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**:440-446.
- Siddique ABM, Guthrie JN, Walsh KB, White DT, Scott PT, 1998. Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. *Plant Disease* **82**:1112-1120.

- Souza LS, Fialho JF, 2003. A cultura da mandioca. Embrapa mandioca e Fruticultura: Sistemas de produção **8**.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
- Tran-Nguyen LTT, Kube M, Schneider B, Reinhardt R, Gibb KS, 2008. Comparative genome analysis of "Candidatus Phytoplasma australiense" (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and "Ca. Phytoplasma asteris" strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology* **190**:3979-3991.
- Zhao Y, Wei W, Lee IM, Shao J, Suo X, Davis RE, 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**:2582-93

4.2. Figures



Figure1. Typical symptoms observed in cassava plants with CFSD. Figures (A) and (C): Cassava tubers with deformities, deep injuries, looking woody and with reduced diameters, (B) Tuber of healthy cassava plant, showing smooth surface and without deformations.

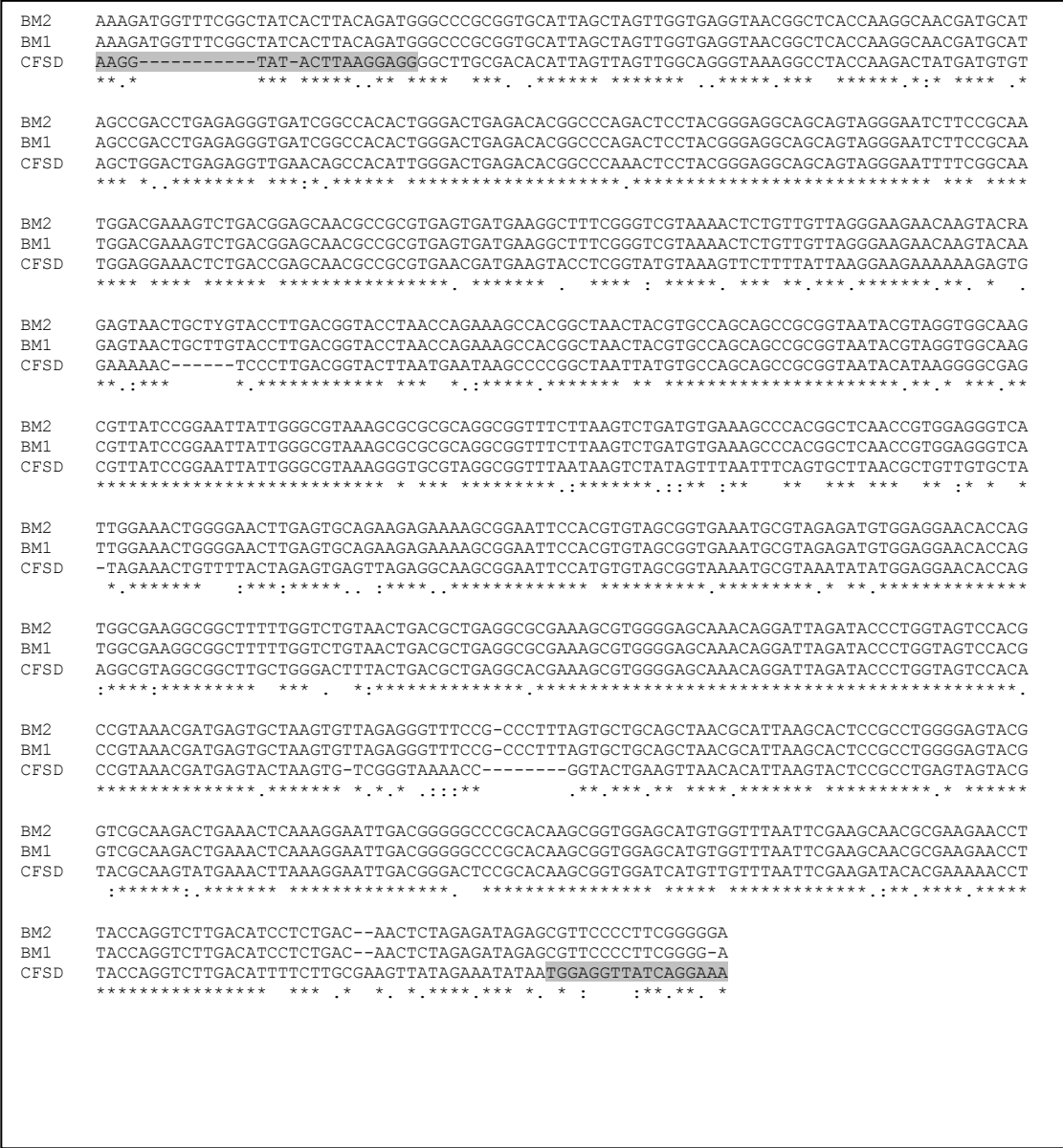


Figure 2. Alignment of sequences of *Bacillus megaterium* (BM1 and BM2) with the sequence of the phytoplasm of CFSD available in GenBank (CFSD). The highlighted sequences correspond to primers FTP(F) and FTP(R), proposed and used in this study in order to detect phytoplasm.

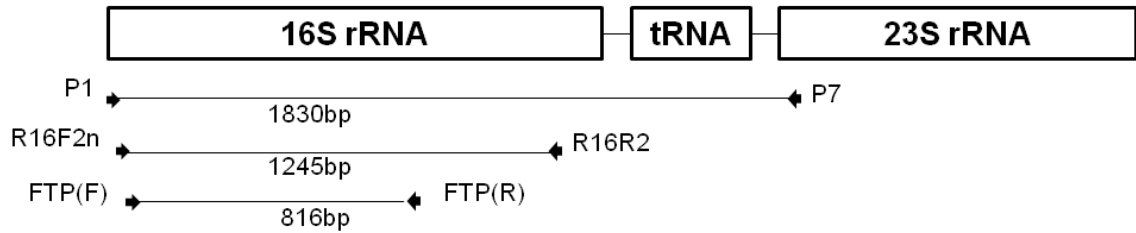


Figure 3. Annealing region of primers and size of fragments generated

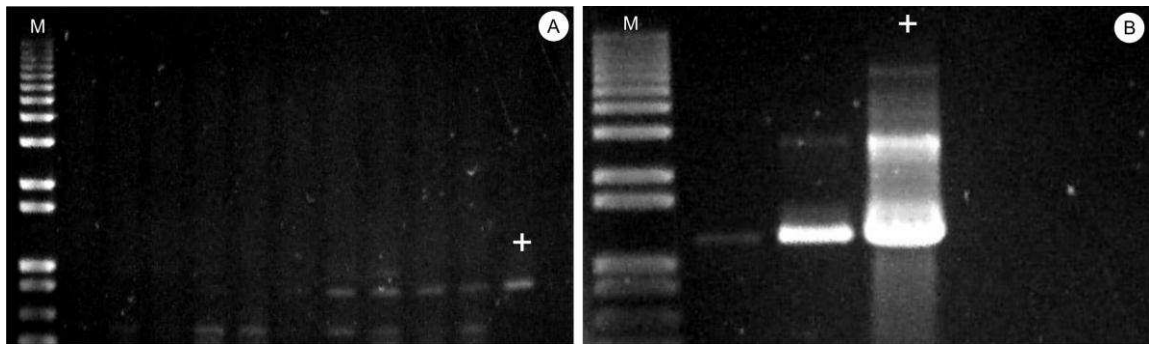


Figure 4. Confirmation of infection of cassava plants by phytoplasma CFSD disease-causing. (A) PCR amplification of a 816bp fragment using primers P1 and P7 in the first PCR and primers FTP(F) and FTP(R) in the second PCR reaction. (B) PCR amplification of a fragment of 1200bp using the primers P1 and P7 in the first PCR and primers R16F2n and R16R2 in the second PCR reaction. Molecular length marker ("1Kb plus DNA ladder"), "M"; Amplification from citrus plants known to be infected by phytoplasma, "+".

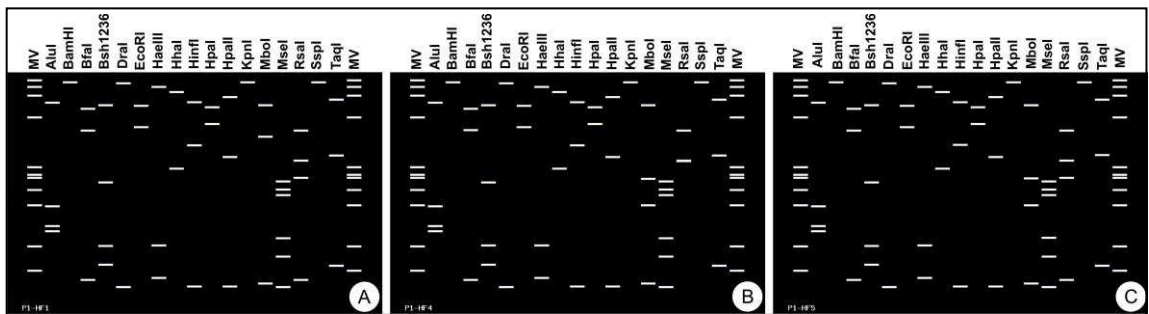


Figure 5. RFLP patterns in silico generated by the nucleotide sequences from the eight clones. (A) patterns generated by clones CFSDBr11, presenting one less cleavage site of the enzyme MboI; (B) pattern generated by the clone CFSDBr12, presenting one less cleavage site of the enzyme RsaI; (C) pattern generated by clones CFSDBr13, CFSDBr21, CFSDBr22, CFSDBr23, CFSDBr24 and CFSDBr25; MW = phiX174 digested with HaeIII.

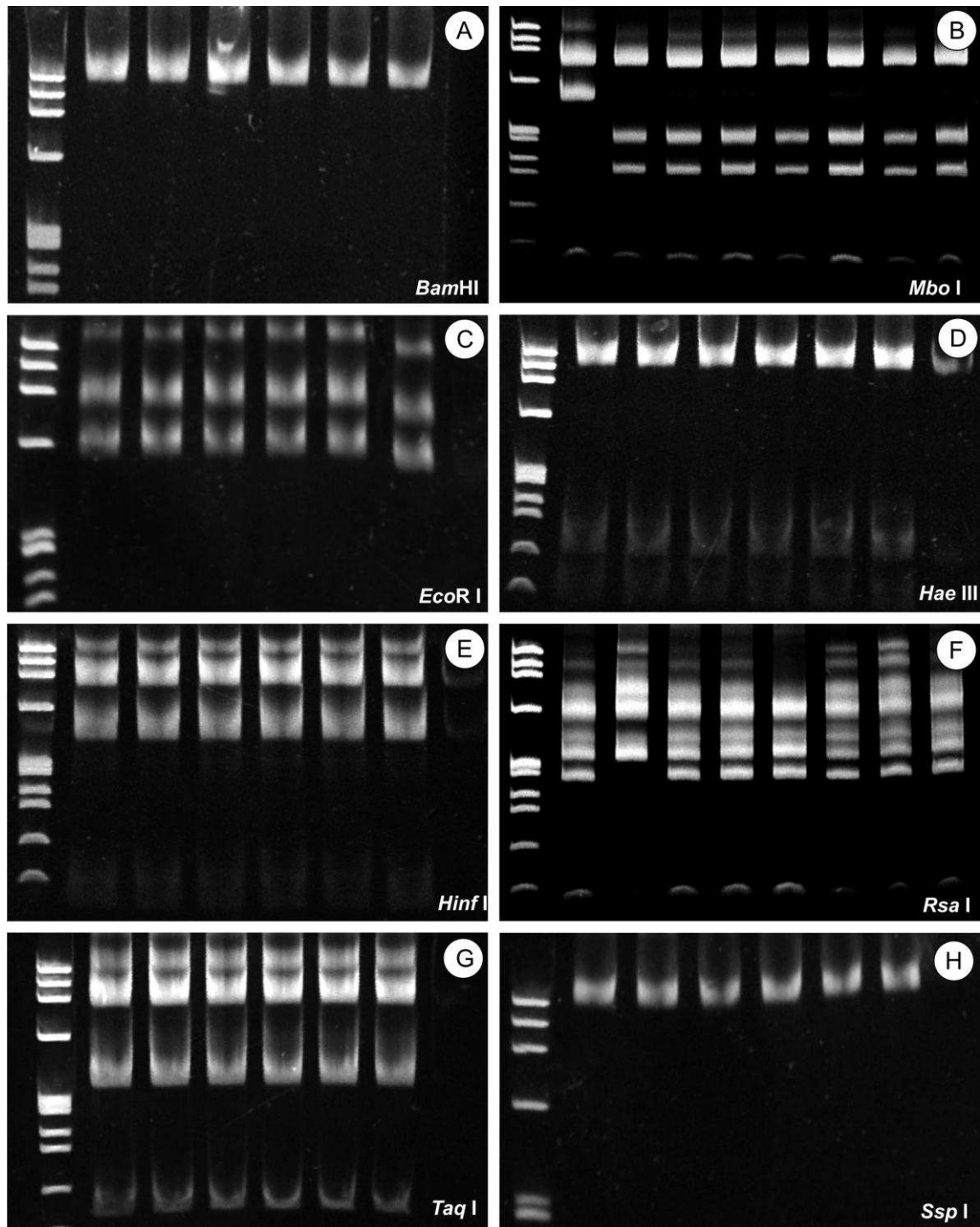


Figure 6. Digestion patterns of clones CFSDBr11, CFSDBr14, CFSDBr15, CFSDBr21, CFSDBr22, CFSDBr23, from left to right, using the enzymes BamHI (A), MboI (B), EcoRI (C), HaeIII (D), HinfI (E), RsaI (F), TaqI (G) and SspI (H). Figures C, E and G show partial digestion. The marker used was the phiX174 digested with HaeIII.

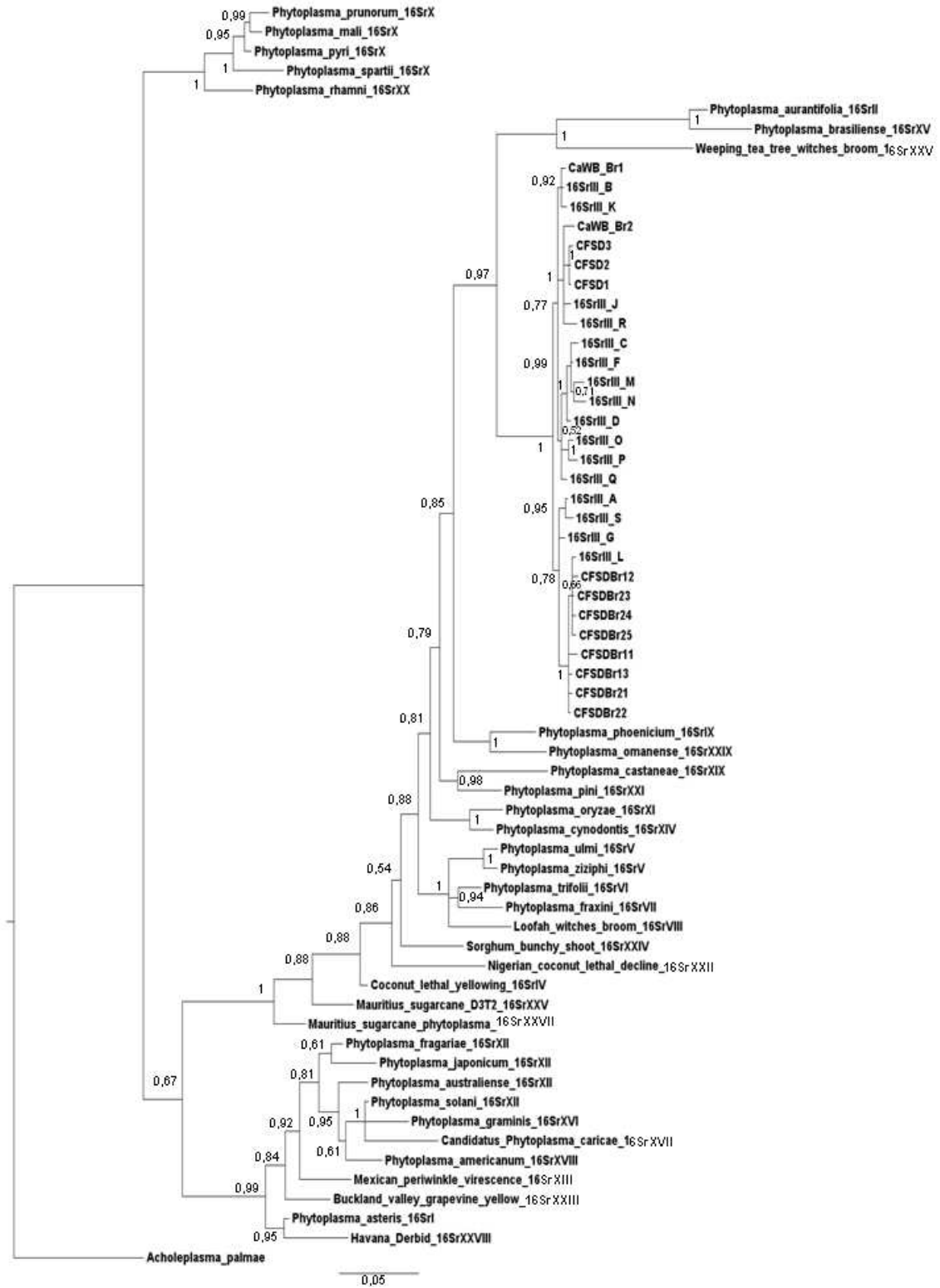


Figure 7. Phylogenetic reconstruction of an amplified fragment of 16S rDNA using the primers R16F2n/R2, through Bayesian inference. Numbers on branches indicate the posterior probability.

4.3. Tables

Table 1. Primers used in PCR reactions

Primers	Nucleotide sequence	Reference
P1	5' AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T 3'	Deng and Hiruki 1991
P7	5' CGT CCT TCA TCG GCT CTT 3'	Seemuller, Schneider et al. 1994
R16F2n	5' GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG 3'	Lee, Gundersen-Rindal et al. 1994
R16R2	5' TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G 3'	Lee, Gundersen-Rindal et al. 1994
FTP(F)	5' AAG GTA TAC TTA AGG AGG 3'	Present paper
FTP(R)	5' TTT CCT GAT AAC CTC CA 3'	Present paper

Table 2. List of phytoplasmas used for phylogenetic analysis, with the classification and GenBank accession number.

Phytoplasma	Group/Subgroup	Access number
CaWB Br01	16SrIII-B	GU193976
CaWB Br02	16SrIII-B	GU193977
CFSD3	16SrIII-L	EU346761
CFSD2	16SrIII-L	AY737646
CFSD1	16SrIII-L	AY737647
CFSD_Br1	16SrIII	Present paper
CFSD_Br2	16SrIII	Present paper
CFSD_Br3	16SrIII	Present paper
CFSD_Br4	16SrIII	Present paper
CFSD_Br5	16SrIII	Present paper
CFSD_Br6	16SrIII	Present paper
CFSD_Br7	16SrIII	Present paper
CFSD_Br8	16SrIII	Present paper
Ca. Phytoplasma asteris	16SrI	M30790
Ca. Phytoplasma aurantifolia	16SrII	U15442
16SrIII_A	16SrIII-A	L33733
16SrIII_B	16SrIII-B	AF189288
16SrIII_C	16SrIII-C	FJ376626
16SrIII_D	16SrIII-D	FJ376627
16SrIII_F	16SrIII-F	AF510724
16SrIII_G	16SrIII-G	AF190226
16SrIII_J	16SrIII-J	AF147706
16SrIII_K	16SrIII-K	AF274876
16SrIII_L	16SrIII-L	EU169138
16SrIII_M	16SrIII-M	FJ226074

Phytoplasma	Group/Subgroup	Access number
16SrIII_N	16SrIII-N	FJ376629
16SrIII_O	16SrIII-O	AF370120
16SrIII_P	16SrIII-P	AF370119
16SrIII_Q	16SrIII-Q	AF302841
16SrIII_R	16SrIII-R	AF373105
16SrIII_S	16SrIII-S	L04682
Coconut lethal yellowing	16SrIV	AF498307
Ca. Phytoplasma ulmi	16SrV	AY197655
Ca. Phytoplasma ziziphi	16SrV	AB052876
Ca. Phytoplasma trifolii	16SrVI	AY390261
Ca. Phytoplasma fraxini	16SrVII	AF092209
Loofah witches broom	16SrVIII	AF353090
Ca. Phytoplasma phoenicium	16SrIX	AF515636
Ca. Phytoplasma prunorum	16SrX	AJ542544
Ca. Phytoplasma pyri	16SrX	AJ542543
Ca. Phytoplasma mali	16SrX	AJ542541
Ca. Phytoplasma spartii	16SrX	X92869
Ca. Phytoplasma oryzae	16SrXI	AB052873
Ca. Phytoplasma fragariae	16SrXII	DQ086423
Ca. Phytoplasma japonicum	16SrXII	AB010425
Ca. Phytoplasma australiense	16SrXII	L76865
Ca. Phytoplasma solani	16SrXII	AJ964960
Mexican periwinkle virescence	16SrXIII	AF248960
Ca. Phytoplasma cynodontis	16SrXIV	AJ550984
Ca. Phytoplasma brasiliense	16SrXV	AF147708
Ca. Phytoplasma graminis	16SrXVI	AY725228
Ca. Phytoplasma caricae	16SrXVII	AY725234
Ca. Phytoplasma americanum	16SrXVIII	DQ174122
Ca. Phytoplasma castaneae	16SrXIX	AB054986
Ca. Phytoplasma rhamni	16SrXX	X76431
Ca. Phytoplasma pini	16SrXXI	AJ632155
Nigerian coconut lethal decline	16SrXXII	Y14175
Buckland valley grapevine yellows	16SrXXIII	AY083605
Sorghum bunchy shoot	16SrXXIV	AF509322
Weeping tea tree witches broom	16SrXXV	AF521672
Mauritius sugarcane phytoplasma D3T1	16SrXXVI	AJ539179
Mauritius sugarcane D3T2	16SrXXVII	AJ539180
Havana Derbid	16SrXXVIII	AY744945
Ca. Phytoplasma omanense	16SrXXIX	EF666051
Acholeplasma palmae		L33734

Table 3. Detection of phytoplasma in different tissues of 30 symptomatic and 20 asymptomatic cassava plants collected in the city of Jaíba, Minas Gerais, Brazil.

Symptomatic plants				Asymptomatic plants			
Sample	Leaf	Stem	Tuber	Sample	Leaf	Stem	Tuber
1	+	+	-	1	-	-	-
2	+	+	-	2	+	-	-
3	+	+	+	3	-	-	-
4	+	+	-	4	-	-	-
5	+	-	+	5	-	-	-
6	+	-	-	6	+	+	-
7	+	+	-	7	-	-	-
8	+	+	-	8	-	-	-
9	-	+	-	9	-	-	-
10	+	+	-	10	-	-	-
11	+	-	-	11	+	+	-
12	+	-	-	12	-	+	-
13	+	+	-	13	-	-	-
14	-	-	-	14	-	+	-
15	+	-	-	15	-	+	-
16	+	-	-	16	-	+	-
17	+	+	-	17	+	+	-
18	-	+	-	18	-	-	-
19	-	+	-	19	+	+	-
20	+	+	-	20	+	+	-
21	+	+	-				
22	+	+	+				
23	+	+	+				
24	+	-	-				
25	+	+	+				
26	-	-	-				
27	+	+	-				
28	-	-	-				
29	-	+	-				
30	+	+	-				
Σ positives	23	20	5	Σ positives	6	9	0
% positives	76.7	66.7	16.7	% positives	30	45	0