**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE
FITOPLASMAS ASSOCIADOS AO AMARELO DA VIDEIRA**

RAQUEL DE CÁSSIA NERONI

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Fitopatologia.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro – 2004

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FITOPLASMAS ASSOCIADOS AO AMARELO DA VIDEIRA

RAQUEL DE CÁSSIA NERONI

Engenheiro Agrônomo

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

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Agronomia, Área
de Concentração: Fitopatologia.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo – Brasil

Dezembro – 2004

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Neroni, Raquel de Cássia

Detecção e identificação molecular de fitoplasmas associados ao amarelo da videira /
Raquel de Cássia Neroni. - - Piracicaba, 2004.
46 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.
Bibliografia.

1. Amarelos – Doença de planta 2. Aspecto econômico 3. DNA 4. Eletroforese em gel
5. Fitoplasmas 6. Fitossanidade 7. Marcador molecular 8. Mollicutes 9. Uva I. Título

CDD 634.8

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

Aos meus pais, Antônio e Marta,
pelo amor, apoio e confiança que
permitiram meu crescimento
como ser humano, **DEDICO.**

À minha irmã Rafaela,
ao meu namorado Eduardo
e ao meu cunhado André
pelo companheirismo de todas as horas,
OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo força concedida nos momentos de desânimo e decepção, tornando possível a conclusão deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo, pela preciosa orientação, pela confiança, dedicação e incentivo;

Ao pesquisador científico Dr. Hugo Kuniyuki pela gentileza de fornecer o material de videira, pela condução dos testes de enxertia e pela atenção dada;

Ao Prof. Dr. Nelson Massola Júnior pela condução de todo o trabalho de microscopia eletrônica;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado, destinada à realização deste trabalho;

A todos os funcionários e professores do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, pelo companheirismo e amizade;

As minhas amigas Marisa e Mariana, pelos bons momentos juntas;

Aos meus amigos do Laboratório de Fitopatologia Molecular, Adriana, Ana Paula, Eliane, Isolda, Jorge, Luiz Fernando e Ricardo pelo bom convívio, amizade e respeito;

A todos os amigos dos demais laboratórios do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, que contribuíram para a realização deste trabalho;

Obrigada.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Fitoplasmas como agentes patogênicos de plantas.....	3
2.1.1 Histórico.....	3
2.1.2 Sintomatologia e diagnose de doenças associadas a fitoplasmas.....	4
2.2 A cultura da videira.....	5
2.2.1 Aspectos econômicos.....	5
2.2.2 Aspectos fitossanitários.....	6
2.3 Amarelos da videira.....	7
2.3.1 Aspectos históricos.....	7
2.3.2 Etiologia dos amarelos da videira.....	8
2.3.3 Controle.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Amostras de plantas de videira.....	11
3.2 Extração de DNA total.....	13
3.2.1 Extração rápida.....	13
3.2.2 Extração completa.....	14
3.3 Purificação do DNA.....	15

3.4 Detecção de fitoplasmas por PCR.....	15
3.5 Identificação de fitoplasma por PCR.....	16
3.6 Eletroforese em gel de agarose.....	17
3.7 Identificação dos fitoplasmas por análise de RFLP.....	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1 Detecção através de duplo PCR.....	19
4.2 Identificação de fitoplasmas por PCR.....	23
4.3 Identificação de fitoplasma através da análise de RFLP.....	28
5 CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Amostras de videira coletadas em 2000 e 2004 positivas para a presença de fitoplasmas, detectados por duplo PCR. M= Marcador molecular 1Kb ladder; Mi= padrão positivo de milho; Ch= padrão positivo de chuchu; Vs= padrão negativo videira sadia; 1= Itália, Jundaí-SP; 2= Benitaka LD1587, Londrina-PR; 3= Itália PS1788, Pilar do Sul-SP; 4= Benitaka, Marialva-PR; 5= Itália 08.1210, Campinas-SP; 10A= Brasil 1780, Marialva-PR	22
2 Amostras de videira coletadas em 2001, 2003 e 2004 positivas para a presença de fitoplasmas, detectados por duplo PCR. M= Marcador molecular 1Kb ladder; Mi= padrão positivo de milho; Ch= padrão positivo de chuchu; Vs= padrão negativo videira sadia; 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= <i>Seedling</i> Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR	23
3 e 4 Identificação de fitoplasmas presentes em amostras de videira, através de PCR usando iniciadores específicos para o grupo 16SrI e 16SrIII, respectivamente. M= marcador molecular 1Kb ladder; Mi= amostra de milho (16SrI); Ch= amostra de chuchu (16SrIII); 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= <i>Seedling</i> Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR	26

- 5 e 6 Identificação de fitoplasmas presentes em amostras de videira, através de PCR usando iniciadores específicos para o grupo 16SrI e 16SrIII, respectivamente. M= marcador molecular 1Kb ladder; Mi= amostra de milho (16SrI); Ch= amostra de chuchu (16SrIII); 1= Itália, Jundiaí-SP; 2= Benitaka LD 1587, Londrina-PR; 3= Itália PS1788, Pilar do Sul-SP; 4= Benitaka, Marialva-PR; 5= Itália 08.1210, Campinas-SP; 10A= Brasil 1780, Marialva-PR..... 27
- 7 Produtos de digestão obtidos com a enzima *KpnI*. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos P1/P7 e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento, como representante do grupo 16SrI e DNA extraído de plantas de videira com sintomas de amarelo. M= padrão de peso molecular, utilizando o marcador ΦX174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb); 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR; Mi= milho, representante do grupo 16SrI 31
- 8 Produtos de digestão obtidos com a enzima *RsaI*. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos P1/P7 e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento, como representante do grupo 16SrI e DNA extraído de plantas de videira com sintomas de amarelo. 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR; Mi= milho, representante do grupo 16SrI; M= padrão de peso molecular, utilizando o marcador ΦX174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb)..... 32
- 9 Produtos de digestão obtidos com a enzima *HpaII*. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos P1/P7 e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento,

- como representante do grupo 16SrI e DNA extraído de plantas de videira com sintomas de amarelo. 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR; Mi= milho, representante do grupo 16SrI; M= padrão de peso molecular, utilizando o marcador Φ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb) 33
- 10 Produtos de digestão obtidos com a enzima *Hinf*I. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos P1/P7 e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento, como representante do grupo 16SrI e DNA extraído de plantas de videira com sintomas de amarelo. 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR; Mi= milho, representante do grupo 16SrI; M= padrão de peso molecular, utilizando o marcador Φ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb)..... 34
- 11 Produtos de digestão obtidos com a enzima *Mbo*I. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos P1/P7 e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento, como representante do grupo 16SrI e DNA extraído de plantas de videira com sintomas de amarelo. 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR; Mi= milho, representante do grupo 16SrI; M= padrão de peso molecular, utilizando o marcador Φ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb)..... 35

- 12 Produtos de digestão obtidos com a enzima *Mse*I. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos P1/P7 e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento, como representante do grupo 16SrI e DNA extraído de plantas de videira com sintomas de amarelo. 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR; Mi= milho, representante do grupo 16SrI; M= padrão de peso molecular, utilizando o marcador Φ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb)..... 36
- 13 Produtos de digestão obtidos com a enzima *Alu*I. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos P1/P7 e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento, como representante do grupo 16SrI e DNA extraído de plantas de videira com sintomas de amarelo. 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR; Mi= milho, representante do grupo 16SrI; M= padrão de peso molecular, utilizando o marcador Φ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb)..... 37
- 14 Produtos de digestão obtidos com a enzima *Hha*I. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos P1/P7 e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento, como representante do grupo 16SrI e DNA extraído de plantas de videira com sintomas de amarelo. 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet FrancCF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR; Mi= milho, representante do grupo 16SrI; M= padrão de peso molecular, utilizando o marcador Φ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb)..... 38

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Relação das variedades de videira provenientes de diversas localidades, amostras em diferentes anos e avaliadas para a presença de fitoplasmas nos tecidos.....	12
2 Relação das plantas de videira nas quais foram detectados fitoplasmas através de testes de PCR.....	20
3 Identificação de fitoplasmas presentes em amostras de videira, através de PCR usando iniciadores para grupos específicos.....	24

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FITOPLASMAS ASSOCIADOS AO AMARELO DA VIDEIRA

Autora: RAQUEL DE CÁSSIA NERONI

Orientador: Prof. Dr. IVAN PAULO BEDENDO

RESUMO

Os amarelos estão associados a fitoplasmas, procariotos pertencentes à classe Mollicutes que não possuem parede celular e habitam o floema de plantas. Os danos causados pelas doenças de etiologia fitoplasmática são relevantes e podem ocorrer em diversas espécies economicamente importantes. Em videira, pesquisas realizadas em várias partes do mundo têm relatado a presença das doenças do tipo “amarelo”, porém, no Brasil, estas doenças ainda não foram relatadas para esta cultura. Em vinhedos comerciais localizados nos Estados de São Paulo e Paraná têm sido observadas plantas com sintomas semelhantes àqueles provocados por fitoplasmas em outros países. Estes sintomas têm sido caracterizados por amarelecimento e ou avermelhamento foliar, necrose do limbo e rachaduras nas nervuras principais. Com o objetivo de detectar e identificar molecularmente fitoplasmas associados a estes tipos de sintomas, folhas e ramos foram amostrados a partir de plantas sintomática e assintomáticas. A detecção foi conduzida com PCR duplo usando-se os iniciadores R16 mF1/mR2 ou P1/P7 na primeira reação e R16 F2n/R2 na segunda reação. A identificação

foi realizada através de PCR duplo com iniciadores específicos e análises de RFLP com as enzimas de restrição *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, *HinfI* e *MboI*. Em 23 plantas amostradas, fitoplasmas foram detectados em 10 delas, através da amplificação do 16S rDNA, visualizado em gel de agarose na forma de bandas de 1,2Kb. A identificação por PCR demonstrou que os fitoplasmas associados ao amarelo da videira pertenciam aos grupos 16SrI e 16SrIII. As análises dos perfis eletroforéticos obtidos com o uso da técnica de RFLP revelaram a presença de fitoplasmas afiliados ao subgrupo 16SrI-B. A constatação de fitoplasmas pertencentes a estes dois grupos nas plantas amostradas demonstraram a ocorrência da doença conhecida como amarelo da videira nos Estados de São Paulo e Paraná. As pesquisas desenvolvidas neste trabalho vêm contribuir para aumentar os conhecimentos sobre o papel e a diversidade dos fitoplasmas no agroecossistema brasileiro.

DETECTION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF PHYTOPLASMAS ASSOCIATED TO GRAPEVINE YELLOW DISEASE

Author: RAQUEL DE CÁSSIA NERONI

Adviser: Prof. Dr. IVAN PAULO BEDENDO

SUMMARY

Yellows diseases are associated with phytoplasmas, wall-less prokaryotes, inhabitant of phloem vessels. Damage caused by these diseases are relevant for some important cultivated botanical species. Grapevine yellows diseases have been observed in several areas of the world, but in Brazil the presence of these diseases had not been reported yet. In vineyards located in São Paulo and Paraná States, plants exhibiting symptoms similar those observed in grapevines from other countries have been observed. The symptoms were characterized by yellowing or redding of leaf blade and ribs, leaf blade necrosis and main ribs fissures. In order to detect and identify phytoplasmas associated with those kind of symptoms, leaves and stems were sampled from symptomatic and asymptomatic plants. The phytoplasma detection was conducted with nested PCR using the primer pairs R16mF1/mR2 or P1/P7 for first reaction and 16 F2n/R2 for second reaction. The identification was carried out by nested PCR with group-specific primer pairs and RFLP analyses with enzymes *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, *HinfI* and *MboI*. From a total of 23 samples analysed, phytoplasmas were detected in 10 of them, through amplification of the 16S rDNA, visualized through a 1.2Kb band in agarose gel. The identification by PCR demonstrated that phytoplasmas associated with grapevine yellow belong to 16SrI and 16SrIII groups. Analyses of electrophoretic profiles

revealed the presence of phytoplasmas affiliated to 16SrI-B subgroup. The presence of phytoplasmas belonging to these two groups in the sampled plants demonstrated the occurrence of yellow disease in grapevine in São Paulo and Paraná States. The investigation conducted in the present work contributed to the knowledge of the role and the diversity of phytoplasmas in Brazilian ecosystem.

1 INTRODUÇÃO

Fitoplasmas são organismos unicelulares, procariotos, sem parede celular. Até hoje, não são cultiváveis em meio de cultura, o que dificulta a complementação de diagnoses de doenças feitas com base na sintomatologia. Por esta razão, a demonstração de sua associação com plantas doentes tem sido feita através de sua detecção nos tecidos infectados.

Tradicionalmente, a detecção de fitoplasmas em plantas doentes tem sido realizada através de microscopia eletrônica. Mais recentemente, metodologias moleculares estão sendo utilizadas tanto para detecção como para identificação de fitoplasmas, destacando-se as técnicas de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) e de RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”). A caracterização molecular por RFLP tem se mostrado extremamente útil e eficiente na identificação de fitoplasmas, permitindo a classificação dos mesmos em grupos reconhecidos internacionalmente.

Na videira, fitoplasmas estão associados a doenças de grande importância econômica, denominadas de flavescência dourada e amarelos da videira. A ocorrência destas doenças tem sido registrada em diversas partes do mundo, como na Europa, nos Estados Unidos e na Austrália. No Brasil, plantas apresentando sintomas semelhantes àqueles relatados em outros países têm sido observadas em vinhedos instalados nos Estados de São Paulo e Paraná. Este fato tem despertado a atenção de produtores e pesquisadores, justificando uma investigação mais detalhada, no sentido de esclarecer a etiologia destas doenças que ocorrem nesta importante espécie cultivada no território brasileiro.

Neste trabalho, plantas de videira exibindo sintomas do tipo amarelo foram submetidas a testes de PCR, na tentativa de associar sintomas com a presença de

fitoplasmas. Após a demonstração da associação entre fitoplasmas e plantas doentes, estes fitoplasmas foram identificados molecularmente, através de análise de RFLP, e classificados de acordo com os parâmetros atualmente adotados. Portanto, os objetivos visados foram:

- demonstrar a associação entre fitoplasmas e sintomas de amarelo;
- determinar a que grupo(s) da classificação pertencem os fitoplasmas ocorrentes nas plantas amostradas;
- relacionar os fitoplasmas presentes nos dois estados brasileiros com aqueles relatados em outros países.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fitoplasmas como agentes patogênicos de plantas

2.1.1 Histórico

Por décadas, as enfermidades genericamente conhecidas como amarelos foram atribuídas aos vírus. Em 1967, observando tecidos de plantas doentes ao microscópio eletrônico, pesquisadores japoneses evidenciaram a presença de corpúsculos arredondados semelhantes aos já conhecidos micoplasmas patogênicos aos animais (Doi *et al.*, 1967). Estes microrganismos foram identificados como MLOs (“Mycoplasma Like Organisms”) e a partir de 1994, o termo fitoplasma passou a ser empregado para designar estes patógenos vegetais (Sears & Kirkpatrick, 1994). Fitoplasmas pertencem à classe Mollicutes, habitam os vasos do floema e são transmitidos, em condições naturais, por cigarrinhas. Até hoje, seu isolamento em meio de cultura não tem sido possível, fato este que dificulta os estudos das doenças associadas a estes patógenos.

As doenças associadas a fitoplasmas têm se mostrado bastante destrutivas, causando perdas relevantes. Já na década de oitenta, centenas de doenças eram referidas como sendo causadas por estes agentes (McCoy *et al.*, 1989). No âmbito mundial, são exemplos o superbrotamento da batata, o declínio da pereira, os amarelos da videira, o enfezamento vermelho do milho, o nanismo do arroz, o superbrotamento do sândalo, os amarelos do pessegueiro, o superbrotamento e o lenho mole da macieira, o amarelo letal do coqueiro, entre outros (Davis, 1995). No Brasil, uma diversidade de gêneros e espécies vegetais são afetadas por doenças associadas a fitoplasmas, sendo exemplos o

superbrotamento do maracujazeiro, da mandioca, do feijoeiro e da soja, o irizado do chuchuzeiro, o enfezamento vermelho do milho, o cálice gigante do tomateiro, o declínio do caquizeiro entre outras (Kitajima, 1995).

2.1.2 Sintomatologia e diagnose de doenças associadas a fitoplasmas

De maneira geral, os sintomas apresentados pelas plantas doentes são clorose foliar, superbrotamento de ramos, subdesenvolvimento da planta ou de suas partes, queda de folhas, flores e frutos jovens, esterilidade de órgãos florais e declínio da planta. No entanto, todos estes sintomas podem também ser provocados por outros agentes como vírus, bactérias fastidiosas, anomalia genética, desbalanço nutricional e fatores do ambiente, como compactação do solo e estresses de natureza diversa. Assim, a detecção de fitoplasmas em plantas suspeitas é um complemento à diagnose feita com base na sintomatologia, tornando-a mais confiável.

A detecção de fitoplasmas em plantas pode ser feita por microscopia eletrônica de transmissão (Kitajima, 1994), porém, segundo Barros (1997), esta técnica torna-se inviável para ser adotada como método de rotina, devido ao custo elevado do equipamento e a exigência de mão-de-obra altamente qualificada. Ainda, a observação de fitoplasma por microscopia eletrônica não possibilita sua identificação, devido a impossibilidade de diferenciação morfológica. Dessa forma, o uso das técnicas moleculares na diagnose tem sido largamente explorado nos laboratórios de patologia vegetal das universidades, institutos de pesquisa e serviços de inspeção e quarentena de plantas no mundo inteiro. Tradicionalmente, a identificação e classificação de fitoplasmas foi baseada primeiramente nas propriedades biológicas, como os sintomas induzidos em plantas infectadas, gama de plantas hospedeiras e relação com insetos vetores (Chiykowski & Sinha, 1989).

As técnicas de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) e de RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphisms”) têm predominado quando o objetivo é detectar e identificar fitoplasmas. O PCR é um método rápido e sensível permitindo a detecção de fitoplasmas em plantas e insetos vetores em algumas horas, até mesmo quando a concentração do patógeno nos tecidos é baixa (Henson & French, 1993; Schaff *et al.*,

1992). Já o RFLP tem se mostrado muito eficiente para a identificação, permitindo a classificação de fitoplasmas em grupos (Lee *et al.*, 1998). A partir da classificação, é possível determinar o grau de similaridade entre fitoplasmas e mesmo a identificação de fitoplasmas representantes de novos grupos, caso não se enquadre em nenhum dos grupos existentes (Montano *et al.*, 2000; Montano *et al.*, 2001). A identificação pode contribuir para demonstrar a ocorrência de infecções mistas de fitoplasmas em um único hospedeiro ou a ocorrência de um mesmo fitoplasma em espécies vegetais distintas (Davis, 1995).

2.2 A cultura da videira

A videira cultivada pertence à família *Vitaceae*, possui 11 gêneros e cerca de 450 espécies. O gênero *Vitis* é o mais importante, abrangendo cerca de 50 espécies, sendo muitas silvestres (Simão, 1998).

No Brasil, a videira foi introduzida em 1532 através da expedição de Martim Afonso de Souza. As mudas, oriundas de Portugal não chegaram a constituir uma cultura de importância econômica em nosso país devido a falta de adaptação das variedades européias (*Vitis vinifera*) as nossas condições ambientais. A cultura só tomou impulso no século XIX, quando foram trazidas para o Brasil videiras americanas mais rústicas, de maior resistência a pragas e doenças, apresentando maior adaptação ao ambiente brasileiro (Corrêa & Boliani, 2001).

2.2.1 Aspectos econômicos

As videiras costumam ser divididas em dois grandes grupos, aquelas que produzem uvas de mesa e as uvas para vinho e outros fins industriais. A maior parte da produção mundial das videiras permanece destinada à produção de vinho. Calcula-se que cerca de 80% do total produzido anualmente é transformado em vinhos ou outros tipos de bebidas alcóolicas e 10% é consumido *in natura*. A Europa é responsável por 51% da produção mundial de uvas, sendo a Itália o maior produtor mundial com 9.731.580 toneladas no ano de 2000 (Corrêa & Boliani, 2001).

O cultivo da videira somente adquiriu importância econômica no Brasil com a imigração italiana, que se estabeleceu nos Estados do Rio Grande do Sul e São Paulo. As uvas produzidas nestes estados são utilizadas predominantemente para a produção de vinhos e mercado de frutas para mesa, respectivamente.

No ano de 2001, o Brasil apresentou uma área colhida de 63.288 hectares e uma produção de 1.058.579 toneladas. Dentre os estados brasileiros, os maiores produtores de uva são o Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Paraná e Bahia (Agrianual, 2004).

As exportações brasileiras se destinam, em sua maior parte, para a Europa, sendo os países Baixos, Reino Unido e Alemanha os principais compradores. Em 2002, o Brasil exportou 26.457 toneladas de uvas frescas e secas, correspondendo a 33.843 milhões de dólares. Quanto às importações, em 2002 o Brasil importou 24.797 toneladas de uvas frescas e secas, oriundas principalmente do Chile, Argentina e Turquia, correspondendo a 17.159 milhões de dólares (Agrianual, 2004).

2.2.2 Aspectos fitossanitários

Segundo Gallotti *et al.* (2002), nas regiões vitícolas brasileiras, as doenças constituem-se em um dos maiores entraves para a cultura. As doenças fúngicas são as mais prevalentes e causam os maiores danos, tanto que a omissão das medidas de controle pode acarretar em perdas totais. O controle químico foi por muitas vezes utilizado como medida única no controle das doenças fúngicas da videira, porém, o controle integrado, isto é, a utilização das várias formas de controle associadas, além de reduzir o uso de fungicidas, diminui o risco de contaminação do aplicador e do consumidor e reduz a poluição ambiental.

Além das doenças fúngicas, as viroses são outro ponto importante na cultura. Segundo Kuniyuki (2001), a videira é uma planta comumente infectada por vírus em São Paulo e em outras áreas vitícolas do Brasil e do mundo. Estes patógenos vêm sendo considerados como um dos importantes fatores de natureza fitossanitária que afetam o vigor e a longevidade produtiva das plantas, diminuem a produção e reduzem a cotação do produto no mercado. As principais viroses da videira já foram constatadas no Brasil e a importância dessas doenças é semelhante a atribuída em outros países vitícolas, já que

a viticultura nacional resulta da multiplicação de clones de variedades de copa e de porta-enxerto, introduzidos há muitos anos, de regiões que hoje enfrentam esses problemas.

Os fitoplasmas, assim como os vírus, são patógenos biotróficos, que vivem nos vasos do floema das plantas e podem ser perpetuados por meio da propagação vegetativa, comum na cultura. Daí a importância em saber se o patógeno está presente em plantas, que podem estar sendo usadas como matrizes na produção de mudas.

2.3 Amarelos da videira

2.3.1 Aspectos históricos

Na videira, duas doenças do tipo “amarelos” têm sido registradas, sendo uma delas chamada de flavescência dourada e a outra denominada de amarelo da videira (Caudwell & Martelli, 1993).

A flavescência dourada foi relatada pela primeira vez em 1954 (Caudwell, 1957), no sudoeste da França, de onde se disseminou rapidamente para o sul do país e norte da Itália. A flavescência dourada foi aparentemente introduzida na Europa a partir da região dos Grandes Lagos, nos Estados Unidos, habitat natural da cigarrinha *Scaphoideus titanus*, vetora da doença e onde também ocorre uma doença similar em *Vitis vinifera* (Caudwell & Dalmasso, 1985; Pearson *et al.*, 1985).

Algumas cultivares de videira não são suscetíveis à flavescência dourada e não mostram sintomas. Por ser muito sensível à doença, a cultivar Baco 22A é considerada como principal indicadora, porém, outras cultivares como ‘Aramon’, ‘Chardonnay’, ‘Sangiovese’ e ‘Alicante Bouchet’ também apresentam sensibilidade e podem ser usadas como indicadoras. Os sintomas geralmente aparecem no final da primavera e se manifestam na forma de encurtamento de internódios, enrolamento de folhas, queda de brotos, seca das inflorescências, declínio e morte da planta. As variedades brancas apresentam amarelecimento das folhas seguido de necrose, enquanto as variedades tintas exibem avermelhamento foliar e posterior necrose de tecido. Manchas pontuais negras

aparecem na região dos internódios e a lignificação dos ramos se dá de forma irregular (Caudwell, 1988).

O amarelo da videira apresenta sintomas idênticos àqueles da flavescência dourada, no entanto estas doenças diferem em alguns aspectos relacionados à suscetibilidade das cultivares, epidemiologia e transmissão pelo vetor *Scaphoideus titanus*. Quanto à transmissão, a cigarrinha *S. titanus* não transmite o agente do amarelo. A variedade ‘Chardonnay’ é usada como indicadora.

Sintomas similares aos relatados inicialmente na França (Caudwell, 1961), têm sido relatados em muitos outros países, como Alemanha, Suíça, Itália, Grécia, Israel, Chile, Argentina e Austrália (Caudwell, 1988).

2.3.2 Etiologia dos amarelos da videira

Alguns estudos têm mostrado que os amarelos da videira são um complexo de doenças que, embora semelhantes quanto à sintomatologia, são causados por fitoplasmas molecularmente distintos, os quais variam em função da área geográfica (Caudwell, 1993). Análises de RFLP revelaram uma estreita relação filogenética entre os agentes causais da doença que ocorrem na Alemanha, França e em vários outros países (Daire *et al.*, 1993). Prince *et al.* (1993) detectaram a associação de dois fitoplasmas diferentes com os amarelos da videira na Virgínia, EUA, e identificou os fitoplasmas como membros dos grupos 16SrI (“aster yellows group”) e 16SrIII (“peach X-disease group”), porém, a identificação dos fitoplasmas até o nível de subgrupos não foi relatada. Segundo Davis *et al.* (1998), o conhecimento das afiliações de fitoplasmas em subgrupos é significativo porque facilita a identificação futura de insetos vetores e a gama de plantas hospedeiras alternativas ainda desconhecidas.

Com base nas análises de RFLP do 16S rDNA, o fitoplasma da flavescência dourada tem sido classificado no grupo 16SrV (“elm yellows group”), subgrupos C (Lee *et al.*, 1998; Martini & Murari, 1999; Davis & Dally, 2001) e D (Martini & Murari, 1999; Davis & Dally, 2001); o fitoplasma associado ao amarelo na Europa, tem sido classificado no grupo 16SrXII (“stolbur group”), subgrupo A (Lee *et al.*, 1998); o fitoplasma associado ao amarelo que ocorre na Austrália (“*Candidatus* Phytoplasma

australiense”) está classificado no grupo 16SrXII, subgrupo B (Davis *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998) e os fitoplasmas agentes dos amarelos nos Estados Unidos foram classificados nos grupos 16SrI, subgrupo A e 16SrIII, subgrupo I (Davis *et al.*, 1998). Portanto, apesar dos sintomas serem similares há uma diversidade de fitoplasmas associados aos amarelos da videira nas diferentes regiões do mundo.

O fato das plantas infectadas pela flavescência dourada e outros amarelos da videira exibirem sintomas aparentemente idênticos, torna importante o esclarecimento da identidade do fitoplasma que está infectando plantas com esses sintomas. A ocorrência de infecções mistas, ou seja, mais de um grupo ou mais de um subgrupo de fitoplasmas presentes na mesma planta também tem sido relatada. Alma *et al.* (1996) confirmaram a infecção mista em videiras na Itália pelos grupos 16SrI e 16SrV e pelos subgrupos 16SrI-B e 16SrI-G, em áreas onde se observou a presença da cigarrinha *S. titanus*, vetora do fitoplasma da flavescência dourada. Este trabalho foi o primeiro relato confirmando a suscetibilidade de videiras à infecção pelo subgrupo 16SrI-B de fitoplasmas, responsável por infecções em uma ampla gama de plantas hospedeiras, em diferentes partes do mundo (Lee *et al.*, 1998). A presença de infecções mistas pelos grupos 16SrI e 16SrIII também foi confirmada em Golan Heights, importante região vitícola de Israel (Orenstein *et al.*, 2001). Na Austrália, também foram detectados fitoplasmas distintos na mesma planta, porém os mesmos não foram relacionados com os grupos de classificação de Lee *et al.* (1998); neste caso, os fitoplasmas foram relacionados com os diferentes tipos de sintomas exibidos pelas plantas doentes (Constable *et al.*, 2003).

No Brasil, sintomas que se assemelham àqueles encontrados nas videiras cultivadas no continente europeu e na América do Norte têm sido observados em plantas cultivadas em algumas regiões produtoras dos Estados de São Paulo e Paraná. Como as variedades de videira aqui cultivadas são provenientes de materiais europeus ou norte-americanos é possível que nossas culturas estejam infectadas por este tipo de patógeno. A sintomatologia manifestada pela planta de videira infectada por fitoplasmas é muito semelhante àquela provocada por viroses, freqüentes na cultura, como o vírus do

enrolamento das folhas da videira. Este fato pode estar mascarando a presença do patógeno e dificultando a diagnose da doença.

2.3.3 Controle

No controle das doenças causadas por fitoplasmas, as medidas devem estar voltadas sobretudo para a prevenção, principalmente evitando a entrada do patógeno numa área anteriormente livre da doença. A adoção de medidas de controle de doenças baseiam-se principalmente na diagnose precoce e segura. No entanto, a diagnose baseada apenas nos sintomas manifestados pela planta não é totalmente segura para o caso de fitoplasma. Assim, é necessária a detecção do fitoplasma no tecidos da planta para que se tenha uma diagnose confiável.

A obtenção de material propagativo a partir de matrizes livres do patógeno é uma medida complementar de controle, após a chegada do patógeno numa determinada área. No caso da videira, cuidados especiais devem ser tomados, pois é muito comum a importação de matrizes para a produção de mudas, a partir de países onde os amarelos da videira ocorrem com frequência. Essas matrizes podem estar contaminadas, porém, sem manifestar sintomas. Dessa forma, uma importante medida de controle é manter as plantas matrizes importadas em viveiros de quarentena, por um ou dois anos. Outras medidas de controle recomendadas são o plantio de cultivares que não sejam suscetíveis ao patógeno e o controle de insetos vetores, quando estes são conhecidos, como *S. titanus*, vetor da flavescência dourada (Caudwell, 1988).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de plantas de videira

As amostras, na sua grande maioria, foram compostas de folhas obtidas de plantas sintomáticas e assintomáticas cultivadas em campos comerciais. Algumas amostras foram constituídas de ramos dormentes (ano de 2001). As plantas foram amostradas no campo e mantidas em casa de vegetação. Amostra foliar coletada a partir de uma planta assintomática cultivada em local diferente daqueles amostrados serviu como controle negativo.

Os vinhedos amostrados estavam localizados nos municípios de Biritiba Mirim-SP, Campinas-SP, Jundiaí-SP, Pilar do Sul-SP, Marialva-PR, Londrina-PR e Maringá-PR. As plantas amostradas pertenciam às variedades Baco 22A, Benitaka, Brasil, Cabernet Franc, Itália e Maria. As amostragens foram realizadas nos anos de 2000, 2001, 2003 e 2004. A relação de variedades amostradas, procedência e ano de coleta estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Relação das variedades de videira provenientes de diversas localidades, amostradas em diferentes anos e avaliadas para a presença de fitoplasmas nos tecidos

Variedade	Ano de coleta				Procedência
	2000	2001	2003	2004	
Itália 08.1210	x	x	x	x	Campinas-SP
Benitaka	x	---	---	---	Marialva-PR
Itália	x	---	---	---	Pilar do Sul-SP
Itália	x	---	---	---	Jundiaí-SP
Benitaka LD 1587	x	x	x	x	Londrina-PR
Itália PS 1788	x	x	---	---	Pilar do Sul-SP
Benitaka 08.3136	---	x	x	---	Campinas-SP
Cabernet Franc CF 1261	---	x	x	x	Campinas-SP
Maria LV 1459	---	x	---	---	Jundiaí-SP
Benitaka 08.3140	---	---	x	---	Londrina-PR
110R (BG 1590)	---	---	x	x	Campinas-SP
<i>Seedling</i> Itália (01/96)	---	---	x	x	Campinas-SP
Baco 22A	x	x	x	x	Campinas-SP
Benitaka MV 1774	---	---	x	---	Marialva-PR
Brasil TP 1780	---	x	x	x	Marialva-PR
Brasil MV 1781	---	---	x	---	Maringá-PR
Itália BM 1970	---	x	x	---	Biritiba Mirim-SP
<i>Seedling</i> Brasil (01/2002)	---	---	x	x	Campinas-SP
<i>Seedling</i> Brasil (03/2002)	---	---	x	---	Campinas-SP
<i>Seedling</i> Brasil (04/2002)	---	---	x	---	Campinas-SP
Brasil (08.3282)	---	---	---	x	Campinas-SP
Brasil (08.3283)	---	---	---	x	Campinas-SP
MV 1775 (08.3278)	---	---	---	x	Marialva-PR

x = plantas amostradas

--- = plantas não amostradas

3.2 Extração de DNA total

Para a extração do DNA total das amostras foram empregadas duas metodologias, uma delas denominada de extração rápida (Daire *et al.*, 1992) e a outra de extração completa (Lee *et al.*, 1993). Para as folhas, o DNA total foi extraído a partir das nervuras centrais, enquanto para os ramos foi usada a região que continha os vasos de floema. Após a extração, o DNA total foi usado como molde nas reações de PCR.

3.2.1 Extração rápida

Cerca de 0,2g de material vegetal fresco foi macerado em almofariz de porcelana com o auxílio de nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para microtubos de 1,5mL, sendo adicionados 800µL de tampão de extração 2X CTAB a 60°C. Os tubos foram incubados em “banho-maria” a 65°C por 60 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos para homogeneizar a suspensão. A cada tubo foram adicionados 600µL de CIA (clorofórmio/álcool isoamílico 24:1). Centrifugou-se o lisado por 15 minutos a 14.000rpm. A fase superior (aquosa) foi retirada e transferida para outro tubo de 1,5mL no qual foram adicionados 540µL de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos por uma noite a -20°C. No dia seguinte, fez-se a centrifugação por 10 minutos a 14.000rpm e descartou-se o sobrenadante. Ao precipitado foi adicionado 1mL de etanol 80% e incubou-se por um período de 10 minutos. Em seguida, o etanol foi descartado e esta operação foi repetida mais uma vez. Foram adicionados 500µL de NaCl 1M e procedeu-se à incubação por 30 a 60 minutos a 4°C. Novamente fez-se centrifugação por 14.000rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado com 1mL de etanol 80% por 10 minutos e a operação foi realizada mais uma vez. O etanol foi descartado e os tubos foram mantidos abertos e invertidos sobre papel toalha para secar o precipitado. Após a secagem, o precipitado foi ressuspendido em 100µL de água deionizada ou solução tampão 1xTE e armazenado a -20°C.

Para o preparo do tampão de extração 2X CTAB foi seguido o seguinte protocolo: Foram pesados 2g de CTAB; 8,18g de NaCl; 0,74g de EDTA; 1,57g de Tris-HCl e 1,0g de PVP. Os materiais foram dissolvidos em água deionizada, completando o

volume para 100mL. O pH foi acertado para 8,0. No momento de uso do tampão, acrescentou-se 0,2mL de mercaptanol.

3.2.2 Extração completa

Cerca de 2g de material vegetal fresco foi macerado em nitrogênio líquido. Adicionou-se um volume de 14mL de solução tampão de extração I e o material foi transferido para tubos de vidro de 30mL. A mistura foi centrifugada a 13.000rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 8mL de solução tampão de extração II. Volumes de 160μL de proteinase K e 880μL de sarkosyl 10% foram adicionados e os tubos foram mantidos por 2 horas a 55°C, em “banho-maria”. O lisado foi centrifugado a 8.000rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para outros tubos sendo adicionados 5,5mL de isopropanol. O material foi mantido a -20°C por uma noite. No dia seguinte, o material foi centrifugado por 15 minutos a 8.000rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em uma mistura de 3mL de solução tampão 1X TE, 75μL de SDS 20% e 60μL de proteinase K. Os tubos foram mantidos em “banho-maria” a 37°C por 1 hora e, em seguida, foram adicionados em cada tubo 525μL de NaCl 5M e 420μL de CTAB/NaCl, sendo feita uma nova incubação por 10 minutos a 65°C. Aliquota de 4mL de CIA (clorofórmio/álcool isoamílico 24:1) foi adicionada à mistura, sendo a mesma centrifugada a 6.000rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi removida para novos tubos, sendo acrescentados 4mL de CIA. Nova centrifugação foi conduzida a 6.000rpm por 5 minutos, salvando a fase aquosa para novos tubos, nos quais foram adicionados 2mL de fenol e 2mL de CIA. A mistura foi centrifugada a 6.000rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para novos tubos, acrescida de 4mL de CIA. Após centrifugação a 6.000rpm por 5 minutos, a fase aquosa foi transferida para novos tubos e acrescida de 2,5mL de isopropanol. Os tubos foram mantidos a -20°C por uma noite para ocorrer a precipitação dos ácidos nucleicos. Após esse período, o material foi centrifugado a 10.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 8mL de etanol 70%, mantendo-se a mistura a 4°C por 30 minutos. Fez-se nova centrifugação a 6.000rpm por 10 minutos, descartando o sobrenadante. Os tubos

foram invertidos sobre papel toalha e, após estarem devidamente secos, os precipitados foram ressuspensos em 200-300µL de solução tampão TE 1X. Fez-se a transferência da suspensão para microtubos e o DNA total extraído foi armazenado a -20°C.

Segue abaixo as especificações sobre o preparo das soluções tampão usadas neste protocolo:

- **Tampão de extração I:** Foram pesados 5,42g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 1,02g de K_2HPO_4 , 25g de sucrose, 0,375g de BSA e 5,0g de PVP-10. Os materiais foram dissolvidos em agitador magnético, completando o volume com água destilada autoclavada para 250mL. O tampão foi mantido em geladeira, a 4°C. Antes de começar a extração, adicionou-se 0,53g de ácido ascórbico para cada 100mL de tampão, agitando a mistura e por último, acertou-se o pH para 7,6.

- **Tampão de extração II:** Foram pesados 6g de Tris-base, 7,3g de NaCl e 18,6g de EDTA. Dissolveu-se a mistura em agitador magnético, completando o volume com água destilada para 500mL. Acertou-se o pH para 8,0 e o tampão foi autoclavado.

- **Tampão TE 100X:** Foram pesados 6,05g de Tris-base e 1,86g de EDTA. Dissolveu-se a mistura em agitador magnético e completou-se o volume com água destilada para 50mL. Acertou-se o pH para 8,0 com HCl concentrado e o tampão foi autoclavado.

3.3 Purificação do DNA

Após a extração, parte do DNA total extraído foi purificado, com o objetivo de aumentar a sensibilidade de detecção nos testes de PCR. Para isto foi empregado um conjunto de reagentes pertencentes ao “Gene Clean Kit – BIO 101” (Vista/CA). O procedimento para a purificação seguiu as instruções do fabricante.

3.4 Detecção de fitoplasmas por PCR

O DNA total de cada amostra, purificado ou não, foi diluído nas proporções de 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100 em água destilada deionizada (‘miliq’). Para a detecção de fitoplasmas foram empregados os iniciadores (‘primers’) universais R16mF2/mR1, P1/P7 e R16F2n/R2, em PCR duplo. Na primeira reação, foi usado o par R16mF1/mR2 ou P1/P7, sendo o produto amplificado diluído em água deionizada na proporção 1:50 e

usado como molde para a segunda reação com o par R16F2n/R2. Esses últimos iniciadores amplificam uma determinada sequência de 1,2Kb do DNA genômico dos fitoplasmas, correspondente ao 16S rDNA.

Cada reação de PCR foi processada utilizando um volume final de 25µL, contendo os seguintes componentes: 1µL de extrato de DNA diluído de cada amostra de videira; 18,3µL de água destilada deionizada; 0,5µL de cada iniciador (solução 20 pmol/µL); 2µL de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo); 2,5µL de solução tampão 10X PCR e 0,17µL de Amplitaq 5U/µL.

Como controles negativos foram usados o DNA extraído de planta assintomática de videira e água destilada deionizada autoclavada. Os padrões positivos foram representados pelos DNA extraído de plantas de milho e de chuchu comprovadamente infectadas por fitoplasma. O padrão de peso molecular utilizado foi 1 Kb ladder.

O termociclador foi programado para 35 ciclos, compreendendo as etapas: 1 minuto a 94°C para a etapa de desnaturação do ácido nucléico, 2 minutos a 50°C para o anelamento e 3 minutos a 72°C para a fase de extensão do “primer”. Um tempo adicional de 1 minuto e de 7 minutos foram permitidos para a etapa de desnaturação do primeiro ciclo e para a etapa de extensão do último ciclo, respectivamente.

As seqüências dos iniciadores utilizados encontram-se descritas abaixo:

R16 P1- 5'AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T 3' (Deng & Hiruki, 1991)

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

R16 mF2 - 5'CAT GCA AGT CGA ACG A 3' (Gundersen & Lee, 1996)

R16 mR1- 5'CTT AAC CCC AAT CAT CGA C 3' (Gundersen & Lee, 1996)

R16 F2n- 5'GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG 3' (Gundersen & Lee, 1996)

R16 R2- 5'TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G 3'(Gundersen & Lee, 1996)

3.5 Identificação de fitoplasma por PCR

Para as amostras positivas de videira, nas quais ocorreu a detecção de fitoplasmas, foram conduzidos novos testes de PCR empregando-se, agora, os iniciadores específicos, os quais permitem a identificação de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrV.

Os produtos de PCR obtidos com os iniciadores R16 F2n/R2 foram diluídos em água deionizada na proporção 1:20 e submetidos à re-amplificação usando-se os iniciadores R16(I)F1/R1, R16(III)F2/R1 e R16(V)F1/R1. As condições de PCR foram as mesmas descritas no item 3.4. Como padrão positivo para o grupo 16SrI foi usado extrato de planta de milho infectada pelo fitoplasma do enfezamento vermelho, representante do grupo 16SrI. Para o grupo 16SrIII, foi usada uma amostra de chuchu infectada com o fitoplasma do superbrotamento, representante do grupo 16SrIII. Como padrão para o grupo 16SrV, extrato de planta de crotalaria infectada pelo fitoplasma do superbrotamento, representante do grupo 16 SrV. O padrão negativo foi representado pela água.

A seqüência dos iniciadores específicos utilizados segue abaixo:

***Iniciadores específicos** (Lee *et al.*, 1994):

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

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

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

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

R16(V)F1- TTA AAA AGA CTT CTT CGG 3'

R16(V)R1- TTC AAT CCG TAC TGA GAC TAC C 3'

3.6 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da re-amplificação com os iniciadores universais e com os iniciadores específicos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TAE 1X. A corrida eletroforética se deu à voltagem constante de 65V por 90 minutos. A seguir, o gel foi imerso em uma solução de brometo de etídio por 10 minutos, para coloração, com posterior lavagem em água destilada por 10 minutos. As bandas de DNA foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta.

3.7 Identificação dos fitoplasmas por análise de RFLP

As seqüências amplificadas por duplo PCR com o par R16 F2n/R2 foram analisadas por RFLP através do uso de diversas enzimas de restrição. Uma alíquota de

5µL de cada produto de PCR foi digerida, separadamente, com as enzimas *AluI*, *KpnI*, *MseI*, *RsaI*, *HhaI*, *HpaII*, *MboI* e *Hinf I* segundo as instruções dos fabricantes, durante um período de 30 horas a 36°C. Os produtos da digestão enzimática foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, usando tampão TBE 1X. A corrida eletroforética foi processada a 220V por 5 min e 150V por 50 min. O gel foi colorido com brometo de etídio e os fragmentos de DNA visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta.

Os fragmentos correspondentes ao 16S rDNA dos fitoplasmas do enfezamento vermelho do milho e do superbrotamento do chuchu foram usados como padrões para o grupo 16SrI e 16SrIII, respectivamente, nas análises de RFLP. Como marcador de peso molecular foi usado Phi X174RFHaeIII.

O perfil eletroforético obtido para cada fitoplasma foi comparado com padrões existentes na literatura, para a respectiva enzima de restrição (Lee *et al.*, 1998). Desta forma, os fitoplasmas encontrados nas plantas de videira foram classificados, de acordo com os grupos atualmente considerados para esta finalidade.

Seguem descritas as enzimas de restrição e seus respectivos sítios de corte:

- *Alu I*: AG▼CT
- *Kpn I*: GGTAC▼C
- *Mse I*: T▼TAA
- *Rsa I*: GT▼AC
- *Hha I*: GCG▼C
- *Hpa II*: C▼CGG
- *Mbo I*: ▼GATC
- *Hinf I*: G▼ANTC

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Detecção através de duplo PCR

Os sintomas presentes nas plantas suspeitas de infecção por fitoplasma eram semelhantes àqueles relatados em outras regiões do mundo. As folhas mostravam enrolamento marginal, amarelecimento ou avermelhamento do limbo e nervuras, seguido de necrose e rachaduras nas nervuras principais.

No total, foram coletadas e submetidas aos testes de PCR amostras de 23 plantas sintomáticas e assintomáticas, sendo que fitoplasmas foram detectados em 10 destas plantas (Tabela 2). Especificamente para a amostra identificada com o número 10 (variedade Brasil 1780 coletada em Marialva-PR em 2004), fitoplasmas foram detectados em amostras de folhas jovens e adultas. Neste caso, as sub-amostras foram identificadas como 10A (folha adulta) e 10B (folha jovem).

Os fragmentos do 16S rDNA dos fitoplasmas foram amplificados pelos pares de iniciadores R16 mF2/R1 (amostras coletadas em 2000) ou P1/P7 (amostras coletadas em 2001, 2003 e 2004) e re-amplificados sempre pelo par R16 F2n/R2. Os materiais positivos para a presença de fitoplasmas foram identificados pela visualização de bandas de aproximadamente 1,2Kb, no gel de agarose, após a eletroforese. Os padrões positivos de milho e chuchu também apresentaram bandas típicas de 1,2Kb, enquanto nenhuma amplificação ocorreu nos padrões negativos, representados pela planta de videira assintomática e pela água deionizada (Figuras 1 e 2).

A maioria das plantas usadas nos testes de detecção por PCR foram amostradas em anos diversos, porém, resultados positivos para a presença de fitoplasmas só foram

obtidos, em mais de um ano, para três plantas (Benitaka LD 1587, Londrina-PR, Itália PS 1788, Pilar do Sul-SP e *Seedling* Brasil 01/2002, Campinas-SP), como pode ser visto na Tabela 2.

O resultado negativo obtido em determinados anos para plantas infectadas pode ser atribuído a fatores diversos, como à época de amostragem em relação ao período fenológico da planta, a presença de substâncias inibidoras à reação de PCR encontradas na planta, à distribuição desuniforme do patógeno ou a presença do patógeno em baixa concentração nos tecidos da planta.

Tabela 2. Relação das plantas de videira nas quais foram detectados fitoplasmas através de testes de PCR

Identificação	Variedade	Local de Coleta	Ano de Coleta
1	Itália	Jundiaí-SP	2000
2	Benitaka LD1587	Londrina-PR	2000/2001
3	Itália PS 1788	Pilar do Sul-SP	2000/2001
4	Benitaka	Marialva-PR	2000
5	Itália 08.1210	Campinas-SP	2000
6	Benitaka 08.3136	Campinas-SP	2001
7	Cabernet Franc CF1261	Campinas-SP	2001
8	Maria LV1459	Jundiaí-SP	2001
9	<i>Seedling</i> Brasil (01/2002)	Campinas-SP	2003/2004
10A	Brasil 1780	Marialva-PR	2004
10B	Brasil 1780	Marialva-PR	2004

A videira é uma planta de clima temperado, que apresenta um período de dormência durante seu ciclo vegetativo. Trabalhos conduzidos com videira e algumas

outras plantas lenhosas que apresentam período de dormência, como por exemplo a pêra, têm apontado dificuldades na detecção do patógeno, decorrentes da distribuição e concentração desuniformes do patógeno na planta, em função do seu estágio fenológico (Chapa *et al.*, 2003). Em estudos feitos para avaliar o efeito do estágio vegetativo da videira sobre a detecção de fitoplasmas, Del Serrone & Barba (1996) demonstraram que existem diferenças em função do estágio fenológico e das partes da planta amostradas. Em trabalho conduzido ao longo de alguns anos na Austrália, constatou-se que fitoplasmas nem sempre foram detectados a partir de um mesmo tipo de tecido de plantas de videira ou a partir de um mesmo período de amostragem (Constable *et al.*, 2003). Estes resultados sugeriram que os fitoplasmas persistem nas plantas de ano para ano, sobrevivendo e se multiplicando mesmo durante o período de dormência da planta. Outros trabalhos realizados com fitoplasmas em videira e outras plantas lenhosas relatam que apesar da sensibilidade, a diagnose através da técnica de PCR pode ser confundida pela distribuição irregular e baixa concentração do fitoplasma na planta (Daire *et al.*, 1992) e também porque a presença de inibidores da reação de PCR podem variar ao longo do ano (John, 1992; Green *et al.*, 1999).

No presente trabalho, pode-se atribuir a não detecção de fitoplasmas em videiras infectadas a estes diversos fatores, com base nos trabalhos anteriormente relatados (Daire *et al.*, 1992; John, 1992; Del Serrone & Barba, 1996; Green *et al.*, 1999; Chapa *et al.*, 2003; Constable *et al.*, 2003). As amostragens não foram sempre realizadas na mesma época do ano, portanto, foram feitas em diferentes estádios fenológicos da planta. As amostras coletadas constituíram-se quase que na sua maioria de folhas, ou seja, foi analisado somente um tipo de tecido da planta. A concentração do patógeno neste tipo de tecido vegetal poderia estar baixa nas épocas em que foi coletada a amostra, dificultando a extração do patógeno. Ainda, a concentração de compostos inibidores, como por exemplo os compostos fenólicos, produzidos pela videira poderiam estar presentes em concentrações altas, em função do estágio fenológico ou do tecido amostrado, o que poderia impedir a amplificação do fragmento alvo dos fitoplasmas nas reações de PCR.

Um resultado interessante foi a detecção de fitoplasmas em material obtido a partir de sementes de videira (*Seedling* Brasil 01/2002, Campinas-SP), em dois anos consecutivos (2003 e 2004). De acordo com a literatura, até o momento, não existem evidências substanciais que indiquem a transmissão de fitoplasmas por sementes (Lee *et al.*, 2000). A presença de fitoplasmas em material de videira proveniente de semente talvez possa ser explicada ou por infecção ocorrida em casa de vegetação ou pela própria passagem do patógeno via semente. Esta última possibilidade deverá ser objeto de futuras investigações.

Figura 1- Amostras de videira coletadas em 2000 e 2004 positivas para a presença de fitoplasmas, detectados por duplo PCR. M= Marcador molecular 1Kb ladder; Mi= padrão positivo de milho; Ch= padrão positivo de chuchu; Vs= padrão negativo videira sadia; 1= Itália, Jundaí-SP; 2= Benitaka LD1587, Londrina-PR; 3= Itália PS1788, Pilar do Sul-SP; 4= Benitaka, Marialva-PR; 5= Itália 08.1210, Campinas-SP; 10A= Brasil1780, Marialva-PR

Figura 2- Amostras de videira coletadas em 2001, 2003 e 2004 positivas para a presença de fitoplasmas, detectados por duplo PCR. M= Marcador molecular 1Kb ladder; Mi= padrão positivo de milho; Ch= padrão positivo de chuchu; Vs= padrão negativo videira sadia; 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR

4.2 Identificação de fitoplasmas por PCR

Após a detecção de fitoplasmas em 10 amostras de videira, os produtos da segunda reação de PCR de todas estas amostras foram diluídos na proporção de 1:20 e submetidos a um novo teste de PCR. Os iniciadores utilizados foram aqueles específicos para identificação de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrV. Os resultados estão expressos na Tabela 3. Nas amostras 6, 7, 8 e 9 foram amplificados fragmentos de DNA pelos iniciadores específicos do grupo 16SrI (Figura 3). Nas amostras 1, 2, 3, 4 e 5 ocorreram amplificações com o uso dos iniciadores específicos para fitoplasmas do grupo 16SrIII (Figura 6). Para a amostra 10 foram amplificados

fragmentos de DNA genômico tanto de fitoplasmas representantes de grupo 16SrI como 16SrIII (Figuras 3 e 6).

Tabela 3. Identificação de fitoplasmas presentes em amostras de videira, através de PCR usando iniciadores para grupos específicos

Identificação	Variedade	Local de Coleta	Ano de Coleta	Grupo Específico
1	Itália	Jundiaí-SP	2000	16SrIII
2	Benitaka LD1587	Londrina-PR	2000	16SrIII
3	Itália PS 1788	Pilar do Sul-SP	2000	16SrIII
4	Benitaka	Marialva-PR	2000	16SrIII
5	Itália 08.1210	Campinas-SP	2000	16SrIII
6	Benitaka 08.3136	Campinas-SP	2001	16SrI
7	Cabernet Franc CF1261	Campinas-SP	2001	16SrI
8	Maria LV1459	Jundiaí-SP	2001	16SrI
9	<i>Seedling</i> Brasil	Campinas-SP	2003	16SrI
10A	Brasil 1780	Marialva-PR	2004	16SrIII
10B	Brasil 1780	Marialva-PR	2004	16SrI

Os fragmentos amplificados pelos iniciadores R16(I)F1/R1, específicos para a identificação de fitoplasmas do grupo 16SrI, possuíam cerca de 1,1Kb (Figuras 3 e 5), enquanto que os fragmentos amplificados pelos iniciadores R16(III)F2/R1, específicos para fitoplasmas do grupo 16SrIII, possuíam cerca de 0,8Kb (Figuras 4 e 6). A amplificação destes dois tipos de fragmentos genômicos com os pares de iniciadores para grupos específicos correspondem aos descritos por Lee *et al.* (1994) para os respectivos grupos e confirmam a presença de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII

nas plantas de videira amostradas. Para as amostras de milho e de chuchu, usadas como padrões, fragmentos da ordem de 1,1Kb e de 0,8Kb foram amplificados, respectivamente, pelos iniciadores específicos para fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII, confirmando a validade do teste de PCR para a identificação dos fitoplasmas ocorrentes em videira.

Fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrV não foram detectados nas plantas de videira amostradas, pois, não ocorreu amplificação quando os iniciadores específicos para a identificação de fitoplasmas deste grupo foram empregados nas reações de PCR duplo (dados não apresentados). PCR utilizando iniciadores específicos para o grupo 16SrV foi conduzido pelo fato do agente causal da flavescência dourada ser um fitoplasma pertencente a este grupo, como demonstrado em outros trabalhos (Prince *et al.*, 1993; Daire *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Martini & Murari, 1999; Davis & Dally, 2001). Assim sendo, caso alguma das amostras se apresentasse positiva para estes iniciadores, estaria evidenciada a presença da flavescência dourada em nossas condições.

Os testes de duplo PCR usando os iniciadores para grupos específicos foram bastante úteis, pois além de possibilitarem a identificação de fitoplasmas detectados na videira, permitiram demonstrar a ocorrência de fitoplasmas pertencentes a diferentes grupos de classificação em um mesmo hospedeiro. Isto caracterizou a chamada infecção mista, a qual, no presente caso, foi promovida por fitoplasmas afiliados aos grupos 16SrI e 16SrIII, presentes na variedade Brasil 1780, coletada em Marialva-SP. Lee *et al.* (2000) relataram que uma determinada espécie de planta ou inseto vetor pode, potencialmente, compartilhar dois ou mais tipos distintos de fitoplasmas e que infecções mistas de fitoplasmas em uma única planta são evidentes na natureza. As infecções mistas já foram relatadas em videiras por Alma *et al.* (1996) na Itália, por Orenstein *et al.* (2001) em Israel e por Constable *et al.* (2003), na Austrália. Na Itália, foram identificados fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI e 16SrV, enquanto em Israel foi identificada infecção mista, na qual estavam presentes representantes dos grupos 16SrI e 16SrIII. Este tipo de trabalho tem revelado que a planta é geralmente infectada por um fitoplasma predominante e por um ou mais fitoplasmas que estão presentes em baixa concentração.

Figuras 3 e 4- Identificação de fitoplasmas presentes em amostras de videira, através de PCR usando iniciadores específicos para o grupo 16SrI e 16SrIII, respectivamente. M= marcador molecular 1Kb ladder; Mi= amostra de milho (16SrI); Ch= amostra de chuchu (16SrIII); 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR

Figuras 5 e 6- Identificação de fitoplasmas presentes em amostras de videira, através de PCR usando iniciadores específicos para o grupo 16SrI e 16SrIII, respectivamente. M= marcador molecular 1Kb ladder; Mi= amostra de milho (16SrI); Ch= amostra de chuchu (16SrIII); 1= Itália, Jundaí-SP; 2= Benitaka LD1587, Londrina-PR; 3= Itália PS1788, Pilar do Sul-SP; 4= Benitaka, Marialva-PR; 5= Itália 08.1210, Campinas-SP; 10A= Brasil 1780, Marialva-PR

4.3 Identificação de fitoplasma através da análise de RFLP

As análises de RFLP foram realizadas com os isolados de fitoplasmas presentes nas amostras identificadas pelos números 6, 7, 8, 9 e 10B, sendo estes fitoplasmas identificados como membros do grupo 16SrI, através de PCR conduzido com iniciadores específicos.

Os cinco isolados de fitoplasmas analisados por RFLP apresentaram perfis eletroforéticos idênticos para cada uma das enzimas de restrição, sendo, portanto, indistinguíveis entre si. Estes cinco isolados também mostraram, para cada endonuclease, padrões de restrição idênticos ao isolado do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho, típico representante do grupo 16SrI, usado como padrão.

A enzima *KpnI* gerou um perfil típico para fitoplasmas do grupo 16SrI, permitindo diferenciar os fitoplasmas ocorrentes na videira dos fitoplasmas pertencentes aos demais grupos de classificação, exceção feita ao representante do grupo 16SrXII (Figura 7). Os perfis obtidos com a enzima *MseI*, no entanto, demonstraram que os isolados da videira são afiliados ao grupo 16SrI e não ao grupo 16SrXII (Figura 12). Para as enzimas *MseI*, *AluI* e *RsaI*, os perfis resultantes da digestão enzimática dos produtos amplificados pelo PCR duplo demonstraram que os cinco isolados presentes em videira são afiliados ao grupo 16SrI (Figuras 12, 13 e 8, respectivamente) de acordo com os padrões considerados por Lee *et al.* (1998). O emprego das endonucleases *HpaII*, *HinfI* e *MboI* confirmaram os resultados obtidos com as demais enzimas de restrição (Figuras 9, 10 e 11). A classificação destes fitoplasmas ao nível de subgrupo foi feita com base nos perfis eletroforéticos obtidos para as endonucleases *MseI* e *HhaI*. A comparação dos perfis gerados por estas duas enzimas para os fitoplasmas encontrados nas amostras de videira com aqueles relatados pela literatura (Lee *et al.*, 1998) revelou que os cinco isolados podem ser classificados como pertencentes ao subgrupo B (Figuras 12 e 14). As análises de RFLP, portanto, possibilitaram confirmar a identificação molecular conduzida com os iniciadores específicos usados em PCR duplo.

A associação de fitoplasmas do grupo 16SrI com os amarelos da videira, como demonstrado no presente trabalho, também tem sido relatada em vinhedos localizados em países como os Estados Unidos (Prince *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1998), Israel

(Orenstein *et al.*, 2001) e Itália (Alma *et al.*, 1996). No entanto, fitoplasmas pertencentes ao subgrupo 16SrI-B somente foram reportados em videiras cultivadas na Itália (Alma *et al.*, 1996). Fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII, identificados em plantas de videiras amostradas em São Paulo e no Paraná, através de PCR usando-se iniciadores específicos, também já foram associados com amarelo da videira em algumas regiões vitícolas dos Estados Unidos (Prince *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1998) e de Israel (Orenstein *et al.*, 2001).

A ocorrência de fitoplasmas do grupo 16SrI e 16SrIII em plantas de videira coletadas nos Estados de São Paulo e Paraná revela que nestes estados está presente a doença conhecida como amarelo da videira. No entanto, a ausência de fitoplasmas do grupo 16SrV nas amostras analisadas é um indicativo da não ocorrência da flavescência dourada na região amostrada.

Corrêa & Boliani (2001) mencionam que a cultura da videira só tomou impulso no Brasil no século XIX, quando foram introduzidas variedades americanas mais rústicas, de maior resistência a pragas e doenças, as quais apresentaram maior adaptação ao ambiente brasileiro. Kuniyuki (2001) relatou que a viticultura nacional se desenvolveu a partir da multiplicação de clones de variedades originárias de países tradicionalmente produtores de uva que enfrentam sérios problemas fitossanitários causados pela ocorrência de viroses. As doenças do tipo amarelo em videira foram relatadas a partir da década de cinquenta, na Europa (Caudwell, 1957), porém, provavelmente, já ocorriam anteriormente. Partindo-se destas informações e com base nos resultados do presente trabalho que revelaram a ocorrência do amarelo da videira no Brasil, pode-se inferir que esta doença tenha chegado ao Brasil juntamente com os materiais de videira aqui introduzidos, visto que os mesmos são propagados por reprodução vegetativa a partir de estacas. A suposição de que os fitoplasmas detectados nas videiras amostradas em São Paulo e Paraná possam ter sido introduzidos justamente por variedades americanas não pode ser descartada, pois fitoplasmas dos mesmos grupos foram encontrados associados ao amarelo presente nos Estados Unidos e no Brasil. Ainda, como os sintomas provocados por alguns vírus são semelhantes àqueles incitados por fitoplasmas fica a

suposição de que os fitoplasmas associados ao amarelo da videira possam estar no Brasil há muito tempo e a doença estar sendo atribuída a vírus ou outro agente.

As pesquisas desenvolvidas neste trabalho revelaram a presença do amarelo da videira no território brasileiro e demonstraram que fitoplasmas pertencentes a grupos distintos estão associados com a doença. Estes resultados trouxeram à tona um problema fitossanitário que até este momento praticamente passou despercebido. Em razão da importância das doenças da videira associadas a fitoplasmas em outros países e da relevância econômica da cultura para o Brasil, o assunto merece maiores investigações. Com relação a isto, alguns pontos podem ser destacados, como a necessidade de se fazer um levantamento mais amplo em vinhedos para dimensionar melhor o problema; confirmar se somente o amarelo ocorre em nossas condições ou se a flavescência dourada também está presente; buscar informações sobre a ocorrência de possíveis vetores do patógeno; pesquisar formas de se obter matrizes sadias, visando a produção de mudas de boa qualidade. Além do aspecto aplicado, o presente trabalho também traz uma contribuição ao conhecimento do papel e da diversidade dos fitoplasmas no agroecossistema brasileiro.

Figura 7- Produtos de digestão obtidos com a enzima *KpnI*. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos P1/P7 e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento, como representante do grupo 16SrI e DNA extraído de plantas de videira com sintomas de amarelo. M= padrão de peso molecular, utilizando o marcador Φ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb); 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR; Mi= milho, representante do grupo 16SrI

Figura 8- Produtos de digestão obtidos com a enzima *RsaI*. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos P1/P7 e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento, como representante do grupo 16SrI e DNA extraído de plantas de videira com sintomas de amarelo. 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR; Mi= milho, representante do grupo 16SrI; M= padrão de peso molecular, utilizando o marcador Φ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb)

Figura 9- Produtos de digestão obtidos com a enzima *HpaII*. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos P1/P7 e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento, como representante do grupo 16SrI e DNA extraído de plantas de videira com sintomas de amarelo. 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR; Mi= milho, representante do grupo 16SrI; M= padrão de peso molecular, utilizando o marcador Φ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb)

Figura 10- Produtos de digestão obtidos com a enzima *HinfI*. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos P1/P7 e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento, como representante do grupo 16SrI e DNA extraído de plantas de videira com sintomas de amarelo. 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR; Mi= milho, representante do grupo 16SrI; M= padrão de peso molecular, utilizando o marcador Φ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb)

Figura 11- Produtos de digestão obtidos com a enzima *MboI*. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos P1/P7 e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento, como representante do grupo 16SrI e DNA extraído de plantas de videira com sintomas de amarelo. 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR; Mi= milho, representante do grupo 16SrI; M= padrão de peso molecular, utilizando o marcador Φ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb)

Figura 12- Produtos de digestão obtidos com a enzima *Mse*I. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos P1/P7 e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento, como representante do grupo 16SrI e DNA extraído de plantas de videira com sintomas de amarelo. 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR; Mi= milho, representante do grupo 16SrI; M= padrão de peso molecular, utilizando o marcador Φ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb)

Figura 13- Produtos de digestão obtidos com a enzima *AluI*. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos P1/P7 e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento, como representante do grupo 16SrI e DNA extraído de plantas de videira com sintomas de amarelo. 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR; Mi= milho, representante do grupo 16SrI; M= padrão de peso molecular, utilizando o marcador Φ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb)

Figura 14- Produtos de digestão obtidos com a enzima *HhaI*. Análise dos produtos de duplo PCR conduzido com os pares de nucleotídeos P1/P7 e R16 F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de milho com sintomas de enfezamento, como representante do grupo 16SrI e DNA extraído de plantas de videira com sintomas de amarelo. 6= Benitaka 08.3136, Campinas-SP; 7= Cabernet Franc CF1261, Campinas-SP; 8= Maria LV1459, Jundiaí-SP; 9= *Seedling* Brasil, Campinas-SP; 10B= Brasil 1780, Marialva-PR; Mi= milho, representante do grupo 16SrI; M= padrão de peso molecular, utilizando o marcador Φ X174RFHaeIII (1353pb, 1078pb, 872pb, 603pb, 310pb, 271pb, 281pb, 234pb, 194pb, 118pb, 72pb)

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

- 1 A doença conhecida como amarelo da videira está presente em vinhedos instalados nos Estados de São Paulo e Paraná.
- 2 Fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI e 16SrIII estão associados com o amarelo da videira ocorrente nos locais amostrados.
- 3 Os fitoplasmas associados ao amarelo da videira podem ocorrer na forma de infecção mista em um único hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMA, A.; DAVIS, R.E.; VIBIO, M.; DANIELLI, A.; BOSCO, D.; ARZONE, A.; BERTACCINI, A. Mixed infection of grapevines in northern Italy by phytoplasmas including 16S rRNA RFLP subgroup 16SrI-B strains previously unreported in this host. **Plant Disease**, v.80, p.418-421, 1996.
- BARROS, T.S.L. Fitoplasmas no Brasil: caracterização molecular via “polymerase chain reaction” and “restriction fragment length polymorphism”. Brasília, 1997. 89p. Dissertação (M.S.) – Universidade de Brasília.
- CAUDWELL, A. Deux années d'études sur la Flavescence dorée, nouvelle maladie grave de la vigne. **Annales de l'Amélioration des Plants**, v.12, p. 359-393, 1957.
- CAUDWELL, A. Etude sur la maladie du bois noir de la vigne: ses rapports avec la flavescence dorée. **Annals of Epiphytology**, v.12, p.241-262, 1961.
- CAUDWELL, A.; DALMASSO, A. Epidemiology and vectors of grapevine viruses and yellows diseases. **Phytopathology Mediterranea**, v.24, p.170-176, 1985.
- CAUDWELL, A. Bois noir and Vergilbungkrankheit. Other grapevine yellows. In: PEARSON, R.C.; GOHEEN A.C. (Ed.) **Compendium of Grapevine diseases**, St Paul, MN, USA: Am. Phytopathol. Soc, 1988, p.46-47.

- CAUDWELL, A. Advances in grapevine yellows research since 1990. In: MEETING ICVG 11, **Abstracts**. Ed. Montreaux, 1993, p.79-83.
- CAUDWELL, A.; MARTELLI, G.P. In: MARTELLI, G.P. (Ed.) **Graft-transmissible diseases of grapevines**: hanbook for detection and diagnosis. Rome: International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine/Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1993, p.37-44.
- CHAPA, M.G.; MEDINA, V.; VIRUEL, M.A.; LAVIÑA, A.; BATLLE, A. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. **Plant Pathology**, v.52, p.513-520, 2003.
- CHIYKOWSKI L.N.; SINHA, R.C. Differentiation of MLO disease by means of symptomatology and vetor transmission. **Zentralblatt fur Bakteriologie**, Suppl., v.20, p.280-287, 1989.
- CONSTABLE, F.E., GIBB, K.S.; SYMONS, R.H. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. **Plant Pathology**, v. 52, p.267-276, 2003.
- CORRÊA, L. S.; BOLIANI, A.C. **Cultura de uvas de mesa do plantio à comercialização**. Ilha Solteira: Ed. Algraf, 2001. 328p.
- DAIRE, X.; CLAIR, D.; REINERT, W.; BOUDON-PADIEU, E. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribossomal DNA. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.507-514, 1997.

- DAIRE, X.; BOUDON-PADIEU, E.; BERVILLÉ, A.; SCHNEIDER, B.; CAUDWELL, A. Cloned DNA probes for detection of grapevine flavescence dorée mycoplasma-like organism (MLO). **Annals of Applied Biology**, v.121, p.95-103, 1992.
- DAIRE, X.; CLAIR, D.; LARRUE, J.; BOUDON-PADIEU, E.; ALMA A.; ARZONE, A.; CARRARO, L.; OSLER, R.; REFATTI, E. ; GRANATA, G.; CREDI, R.; TANNE, E.; PEARSON, R.; CAUDWELL, A. Occurrence of diverse MLOs in tissues of grapevine affected by grapevine yellows in different countries. **Vitis**, v.32, p. 247-248, 1993.
- DAVIS, R.E. Fitoplasmas: Fitopatógenos procarióticos sem parede celular habitantes de floema e transmitidos por artrópodos. **Revisão Anual de Patologia de Planta** v.3, p.1-27, 1995.
- DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Revise subgroup classification of group 16SrV phytoplasmas and placement of flavescence dorée-associated phytoplasmas in two distinct subgroups. **Plant Disease**, v.85, p.790-797, 2001.
- DAVIS, R.E.; JOMANTIENE, R.; DALLY, E.L.; WOLF, T.K. Phytoplasmas associated with grapevine yellows in Virginia belong to group A (tomato big bud phytoplasma subgroup), and group 16SrIII, new subgroup I. **Vitis**, v.37, p.131-137, 1998.
- DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.-M.; HABILI, N. “*Candidatus* Phytoplasma australiense”, a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.262-269, 1997.

- DEL SERRONE, P.; BARBA, M. Importance of the vegetative stage for phytoplasma detection in yellow-diseased grapevines. **Vitis**, v. 35, p. 101-102, 1996.
- DENG, S.; HIRUKI, C. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. **Journal of Microbiological Methods**, v.14, p.53-61, 1991.
- DOI, Y.; TERANAKA, M.; YORA, K.; ASUYAMA, H. Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches'broom, aster yellows, or paulownia witches'broom. **Phytopathological Society of Japan**, v.33, p.259-266, 1967. **Phytopathological Society of Japan**, v.33, p.259-266, 1967.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **AGRIANUAL 2004**: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo, p.488-496, 2004.
- GALLOTTI, G.J.M.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SONEGO, O.R. Controle das doenças da videira. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas fruteiras v.2.**, p. 939-1023, 2002.
- GREEN M.J.; THOMPSON D.A.; MACKENZIE D.J. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. **Plant Disease**, v.83, p.482-485, 1999.
- GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.-M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primers pairs. **Phytopathology Mediterranea**, v.35, p.144-151, 1996.
- HENSON, J.M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant diseases diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v.31, p. 81-109, 1993.

- JOHN, M.E. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.2381, 1992.
- KITAJIMA, E.W. Enfermidade de plantas associadas a organismos do tipo micoplasma. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.2, p.153-174, 1994.
- KITAJIMA, E.W. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1986-1993). **Fitopatologia Brasileira**, Supl. esp., 1995.
- KUNIYUKI, H. Viroses da videira. In: CORRÊA, L. S.; BOLIANI, A.C. **Cultura de uvas de mesa do plantio à comercialização**. Ilha Solteira: Ed. Algraf, 2001, p.221-235.
- LEE, I.M.; DAVIS, R.E.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, v.54, p.221-255, 2000.
- LEE, I.M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; HAMMOND, R.W.; DAVIS, R.E. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested PCR assay to detect mixed MLO infections in a single host plant. **Phytopathology**, v.84, p.559-566, 1994.
- LEE, I.M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; DAVIS, R.E.; BARTOSZIK, I.M. Revised classification scheme of phytoplasma based on RFLP analyses of 16S rDNA and ribosomal protein gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.1153-1169, 1998.
- LEE, I.M.; DAVIS, R.E.; SINCLAIR, W.A.; DEWITT, N.D.; CONTI, M. Genetic relatedness of mycoplasma-like organisms detected in *Ulmus* spp. in the United States and Italy by means of DNA probes and polymerase chain reactions. **Phytopathology**, v.83, p.829-833, 1993.

- MARTINI, M.; MURARI, E. Identification and epidemic distribution of two flavescence dorée-related phytoplasmas in Veneto (Italy). **Plant Disease**, v.83, p.925-930, 1999.
- McCOY, R.E.; CAUDWELL, A.; CHANG, C.J.; CHEN, T.A.; CHIYKOWSKI, L.N.; COUSIN, M.T.; DALE, J.L.; LEEUW, G.T.; GOLINO, D.A.; HACKETT, K.J.; KIRKPATRICK, B.C.; MARWITZ, R.; PETZOLD, H.; SINHA, R.C.; SUGIURA, M.; WHITCOMB, R.F.; YANG, I.L.; ZHU, B.M.; SEEMULLER, E. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: WHITCOMB, R.F.; TULLY, J.G. **The Mycoplasmas**, v. 5, p.545-640, 1989.
- MONTANO, H.G.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; PIMENTEL, J.P.; BRIOSO, P.S.T. Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. **Plant Disease**, v.84, p.429-436, 2000.
- MONTANO, H.G.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L.; HOGENHOUT, S.; PIMENTEL, J.P.; BRIOSO, P.S.T. Candidatus Phytoplasma brasiliense, a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p. 1109-1118, 2001.
- ORENSTEIN, S.; ZAHAVI, T.; WEINTRAUB, P.G. Survey of the distribution of phytoplasma in wine grapes in the Golan Heights, Israel and development of specific primers. **Vitis**, v.40, p.219-223, 2001.
- PEARSON, R.C.; POOL, R.M.; GONSALVES, D.; GOFFINET, M.C. Occurrence of flavescence dorée-like symptoms on "White Riesling" grapevines in New York, USA. **Phytopathology Mediterranea**, v.24, p.82-87, 1985.

PRINCE, J.P.; DAVIS, R.E.; WOLF, T.K.; LEE, I.-M.; MORGEN B.D.; DALLY, E.L.; BERTACCINI, A.; CREDI, R.; BARBA, M. Molecular detection of diverse mycoplasmalike organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. **Phytopathology**, v.83, p.1130-1137, 1993.

SCHAFF, D.; LEE, I.M.; DAVIS, R.E. Sensitive detection and identification of mycoplasmalike organisms by polymerase chain reaction. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v.186, p.1502-1509, 1992.

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

SIMÃO, S. **Tratado de Fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 760p.

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