**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Amarelos da videira: identificação e análise filogenética dos fitoplasmas,
transmissão dos agentes causais e otimização da diagnose**

Raquel de Cássia Neroni

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2009**

Raquel de Cássia Neroni
Engenheiro Agro nomo

**Amarelos da videira: identificação e análise filogenética dos fitoplasmas,
transmissão dos agentes causais e otimização da diagnose**

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2009

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

Neroni, Raquel de Cássia

Amarelos da videira: identificação e análise filogenética dos fitoplasmas, transmissão dos agentes causais e otimização da diagnose / Raquel de Cássia Neroni. - - Piracicaba, 2009.
96 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Controle fitossanitário 2. Diagnose foliar 3. Doenças de plantas 4. Filogenia 5.
Fitoplasmas 6. Mollicutes 7. Uva I. Título

CDD 634.8
N452a

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

Aos meus pais, Antônio e Marta,
Por todo amor, dedicação e apoio
DEDICO.

Ao meu namorado Eduardo,
pelo amor, compreensão e companheirismo,
E à minha irmã Rafaela,
OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força concedida, porque sem Ele nada é possível.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Setor de Fitopatologia pela estrutura e oportunidade oferecidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq pela bolsa de doutorado concedida.

Ao Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo pela orientação, confiança e compreensão.

Ao pesquisador do Instituto Agronômico de Campinas, Dr. Hugo Kuniyuki pela sempre gentil atenção, pelo fornecimento das plantas e pela realização das enxertias.

Ao pesquisador do Instituto Biológico de São Paulo, Dr. Ricardo Harakawa pelo sequenciamento das amostras.

À Valentina de Fátima De Martin pela ajuda no sequenciamento das amostras.

Aos amigos do laboratório de Procariotos Fitopatogênicos Bárbara, Isolda, Renata Brito, Eliane, Ana Paula, Daniela, Luciano, Luiz Fernando, Maria Cristina, Renata Lanza e Renata Bocci.

Aos amigos do laboratório de Virologia Vegetal pela amizade e coleguismo.

A todos os funcionários e professores do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 DESENVOLVIMENTO.....	21
2.1 Revisão Bibliográfica.....	21
2.1.1 A cultura da videira: taxonomia, origem e morfologia.....	21
2.1.2 Importância econômica da videira.....	22
2.1.3 Fisiologia da videira.....	24
2.1.4 Aspectos fitossanitários da viticultura.....	25
2.1.5 Fitoplasmas como agentes patogênicos de plantas.....	27
2.1.6 Amarelos da videira.....	30
2.1.7 Controle dos amarelos da videira.....	33
2.2 Material e Métodos.....	35
2.2.1 Detecção de fitoplasmas em videiras em diferentes fases fenológicas.....	35
2.2.1.1 Coleta de material vegetal em plantas de videira.....	35
2.2.1.2 Extração de DNA total.....	38
2.2.1.2.1 Extração rápida	38
2.2.1.2.2 Extração completa.....	39
2.2.1.2.3 Extração com kit comercial DNeasy ®Plant Mini kit (Qiagen).....	40
2.2.2 Purificação do DNA total.....	41
2.2.3 Detecção de fitoplasmas por duplo PCR.....	41
2.2.4 Identificação de fitoplasmas por PCR.....	42
2.2.5 Eletroforese em gel de agarose.....	43
2.2.6 Identificação de fitoplasmas por análise de RFLP.....	43
2.2.7 Sequenciamento genômico do 16S rDNA do fitoplasma.....	44
2.2.8 Clonagem.....	44
2.2.9 Análise filogenética e de sítios putativos de restrição.....	47

2.2.10 Teste de transmissão por enxertia.....	49
2.3 Resultados e discussão.....	52
2.3.1 Detecção de fitoplasmas em videiras em diferentes fases fenológicas através de duplo PCR.....	52
2.3.2 Identificação de fitoplasmas por PCR.....	58
2.3.3 Identificação através de RFLP.....	62
2.3.4 Sequenciamento e análise putativa dos sítios de restrição.....	70
2.3.5 Análise filogenética.....	74
2.3.6 Transmissão através de enxertia.....	76
3 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICES.....	93

RESUMO

Amarelos da videira: identificação e análise filogenética dos fitoplasmas, transmissão dos agentes causais e otimização da diagnose

Fitoplasmas são procariotos sem parede celular, pertencentes à classe dos Mollicutes, que habitam os vasos de floema e causam doenças de relevância econômica em uma ampla gama de espécies vegetais. A videira (*Vitis* sp) é a terceira fruteira mais cultivada no mundo e apresenta elevada importância econômica no Brasil. Aspectos fitossanitários se constituem em fatores limitantes da produção, com destaque para as doenças causadas por fitoplasmas, denominadas de amarelos. Essas doenças estão amplamente disseminadas nos continentes europeu e americano, ocorrendo em tradicionais países produtores. Plantas exibindo sintomas característicos da doença têm sido também observadas em cultivos comerciais localizados em algumas áreas do território brasileiro. Visando investigar este tipo de doença, plantas sintomáticas foram amostradas em parreiras comerciais dos Estados de São Paulo e Paraná e mantidas em casa de vegetação. O presente estudo visou demonstrar a associação entre fitoplasmas e os amarelos, identificar e analisar filogeneticamente os fitoplasmas detectados, demonstrar sua transmissão para plantas sadias e determinar o melhor estágio fenológico da planta para amostragem de tecidos, para confirmação da diagnose. Para isto, durante 45 meses, amostras foram coletadas de plantas doentes envasadas sendo usado o método de PCR, análise de RFLP, sequenciamento das bases nucleotídicas e enxertia de tecidos entre plantas de videira. Os produtos amplificados em PCR evidenciaram a presença de fitoplasmas em todas as plantas portadoras de amarelos. Estes fitoplasmas foram identificados como representantes dos grupos 16SrI-B e 16SrIII, os quais ocorreram em infecções simples ou mistas. Os fitoplasmas apareceram em todas as fases de desenvolvimento da planta, porém com maior frequência nas amostras coletadas no estágio fenológico correspondente à brotação de ramos e aparecimento de folhas novas. Esta fase se mostrou a mais indicada para as amostragens, visando à detecção de fitoplasmas para fins de diagnose. A transmissão dos fitoplasmas por enxertia foi alta, demonstrando que estes são os agentes causais da doença e que inspeções devem ser adotadas como medida de controle para evitar sua disseminação via material de propagação vegetativa.

Palavras-chaves: Fitoplasma; Mollicutes; Diagnose; Videira; Amarelos

ABSTRACT

Grapevine yellows: identification and phylogenetic analyses of the phytoplasmas, transmission of the causal agents and diagnosis optimization

Phytoplasmas are wall-less prokaryotes, phloem-limited plant pathogens, belonging to Mollicute class. They are agents of diseases that cause serious damage to a diversity of cultivated species. Grapevine (*Vitis* sp) is the third most cultivated fruit crop in the world and it has high economical impact in Brazil. Phytosanitary aspects are important production constraint factors, especially regarding diseases caused by phytoplasmas, which are generally known as grapevine yellows. These diseases are widely spread throughout main producer countries, located in Europe and North America. Plants exhibiting typical symptoms of the disease have also been observed in crops located in some areas of Brazilian territory. In order to investigate this kind of malady, symptomatic plants were sampled from commercial vineyards located in the States of São Paulo and Paraná, Brazil and kept in greenhouse conditions. The present study aimed to: demonstrate the association between phytoplasmas and yellows; identify and analyse phylogenetically the detected phytoplasmas; demonstrate their transmission to healthy plants and determinate optimal phenological stage for phytoplasma detection to diagnosis confirmation. Samples were collected from diseased plotted plants grown during 45 months. PCR method, RFLP analyses, sequencing of nucleotide bases from 16S rRNA, and grafting technique were used in this study. Amplified genomic fragments revealed the presence of phytoplasmas in all plants with symptoms of yellows. Those phytoplasmas were identified as representatives of the groups 16SrI-B and 16SrIII, occurring in simple and mixed infections. Phytoplasmas were detected in all phenological stages evaluated, but they occurred with high frequencies in material collected during budburst. These stage may be considered as the most indicated for sampling to confirm diagnosis based on symptomatology. Phytoplasmas transmission by grafting of healthy scion grafts onto infected rootstocks was high, demonstrating that they are the disease agents and inspection is a control practice that must be adopted to prevent their dissemination through propagative material.

Keywords: Phytoplasma; Mollicutes; Diagnosis; Grapevine yellows

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Sintomas do tipo amarelo apresentados por videiras da variedade ‘Benitaka’ cultivada no Brasil. Planta exibindo amarelecimento e enrolamento do limbo foliar (Fotos cedidas pelo Dr. Hugo Kuniyuki).....53
- Figura 2- Sintomas do tipo amarelo apresentados por folhas de videiras da variedade ‘Benitaka’ cultivada no Brasil. Folhas exibindo amarelecimento e enrolamento do limbo foliar, e necrose das nervuras (Fotos cedidas pelo Dr. Hugo Kuniyuki).....54
- Figura 3- Amplificação do 16S rRNA de fitoplasmas presentes em plantas de videira, através de duplo PCR com os iniciadores universais P1/Tint e F2n/R2. M= marcador molecular 1 Kb ladder; Colunas 1 a 5= amostras de videira, sendo 1= Brasil (MV1781), 2= Benitaka (LD1587) planta 2, 3= Brasil (TP1780) planta 1, 4= Benitaka (LD1587) planta 1 e 5= Brasil (TP1780) planta 2; Vs= padrão negativo planta de videira sadia; Ag= padrão negativo água; Mi= padrão positivo milho; Ch= padrão positivo chuchu..... 56
- Figura 4- Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas presentes em plantas de videira, através de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint e R16(I)F1/R1 para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrI. M= marcador molecular 1 Kb ladder; Colunas 1 a 5= amostras de videira, sendo 1= Brasil (MV1781), 2= Benitaka (LD1587) planta 2, 3= Brasil (TP1780) planta 1, 4= Benitaka (LD1587) planta 1 e 5= Brasil (TP1780) planta 2; Mi= padrão positivo milho; Ch= padrão positivo chuchu.....61
- Figura 5- Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas presentes em plantas de videira, através de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint e R16(III)F2/R1 para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrIII. M= marcador molecular 1 Kb ladder; Colunas 1 a 5= amostras de videira, sendo 1= Brasil (MV1781), 2= Benitaka (LD1587) planta 2, 3= Brasil (TP1780) planta 1, 4= Benitaka (LD1587) planta 1 e 5= Brasil (TP1780) planta 2; Mi= padrão positivo milho; Ch= padrão positivo chuchu.....61

Figura 6- Análise de RFLP do gene 16S rRNA de fitoplasmas do grupo 16SrI detectados em plantas de videira, utilizando as enzimas *AluI*, *KpnI*, *RsaI* e *MseI*. M= marcador molecular Φ X174RFHaeIII; Colunas 1 a 4= amostras de videira, sendo 1= Brasil (MV1781), 2= Benitaka (LD1587) planta 2, 3= Brasil (TP1780) planta 1 e 4= Benitaka (LD1587) planta 1; Mi= padrão positivo milho.....64

Figura 7- Análise de RFLP do gene 16S rDNA de fitoplasmas do grupo 16SrI detectados em plantas de videira, utilizando as enzimas *HinfI*, *MboI*, *HpaII* e *HhaI*. M= marcador molecular Φ X174RFHaeIII; Colunas 1 a 4= amostras de videira, sendo 1= Brasil (MV1781), 2= Benitaka (LD1587) planta 2, 3= Brasil (TP1780) planta 1 e 4= Benitaka (LD1587) planta 1; Mi= padrão positivo milho.....64

Figura 8- Análise de RFLP do gene 16S rDNA de fitoplasmas do grupo 16SrIII detectado em plantas de videira, utilizando as enzimas *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI*, *MboI*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaII* e *Bsh* 12361. M= marcador molecular Φ X174RFHaeIII; Coluna 2= amostra de videira Benitaka (LD1587) planta 2; Ch= padrão positivo chuchu.....67

Figura 9-Análise putativa de sítios de restrição do 16S rDNA do fitoplasma associado ao amarelo da videira com as mesmas enzimas utilizadas para a análise de RFLP. A: sequência do fitoplasma associado ao amarelo da videira (amostra 1); B: sequência do fitoplasma associado ao amarelo da videira (amostra 3); C: sequência do fitoplasma associado ao amarelo da videira (amostra 4); D: sequência do fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho, representante do grupo 16SrI-B (nº acesso: AY265208).....71

Figura 10- Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição com as mesmas enzimas utilizadas para a análise enzimática de RFLP. A = fitoplasma associado ao amarelo da videira (amostra 1); B= fitoplasma associado ao amarelo da videira (amostra 3); C= fitoplasma associado ao amarelo da videira (amostra 4); D= fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho, representante do subgrupo 16S rI-B.....73

Figura 11- Árvore filogenética construída com representantes de 16 diferentes grupos de fitoplasma, 6 subgrupos representantes do grupo 16SrI, o procarioto *Acholeplasma laidlawii* e os fitoplasmas da videira (amostras 1, 2 e 4). Os números nos ramos representam valores de confiança baseados no “Bootstrapping”75

Figura 12- Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas presentes em plantas de videira, enxertadas em março de 2003, através de duplo PCR com os iniciadores universais P1/Tint e F2n/R2. M= marcador molecular 1 Kb ladder; Colunas 2 a 7= amostras de videira, sendo 2= Baco 22A (gema verde)/Brasil (MV1781), 3= Baco 22A (garfo verde)/Brasil (TP1780) , 4= Baco 22A (gema verde)/Brasil (TP1780), 6= Baco 22A (gema verde)/Brasil (MV1775) e 7= Baco 22A (garfo verde)/Benitaka (LD1587); Vs= padrão negativo planta de videira sadia; Ag= padrão negativo água; Mi= padrão positivo milho; Ch= padrão positivo chuchu.....78

Figura 13- Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas presentes em plantas de videira, enxertadas em março de 2003, através de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint e R16(I)F1/R1 para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrI. M= marcador molecular 1 Kb ladder; Colunas 2 a 7= amostras de videira, sendo 2= Baco 22A (gema verde)/Brasil (MV1781), 3= Baco 22A (garfo verde)/Brasil (TP1780), 4= Baco 22A (gema verde)/Brasil (TP1780), 6= Baco 22A (gema verde)/Brasil (MV1775) e 7= Baco 22A (garfo verde)/Benitaka (LD1587); Vs= padrão negativo planta de videira sadia; Ag= padrão negativo água; Mi= padrão positivo milho; Ch= padrão positivo chuchu79

Figura 14- Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas presentes em plantas de videira, enxertadas em março de 2003, através de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint e R16(III)F2/R1 para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrIII. M= marcador molecular 1 Kb ladder; Colunas 2 a 7= amostras de videira, sendo 2= Baco 22A (gema verde)/Brasil (MV1781), 3= Baco 22A (garfo verde)/Brasil (TP1780), 4= Baco 22A (gema verde)/Brasil (TP1780), 6= Baco 22A (gema verde)/Brasil (MV1775) e 7= Baco 22A (garfo verde)/Benitaka (LD1587); Vs= padrão negativo planta de videira sadia; Ag= padrão negativo; água Mi= padrão positivo milho; Ch= padrão positivo chuchu

.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação das plantas de videira amostradas entre os anos de 2005 e 2008 e testadas para a presença de fitoplasmas em diferentes tecidos em função do ciclo fenológico e suas procedências.....	36
Tabela 2- Datas de coleta de material vegetal para testes de detecção de fitoplasmas por duplo PCR e partes da planta amostrada em função da fase fenológica	37
Tabela 3- Sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA representantes de fitoplasmas dos 16 grupos e de subgrupos do grupo 16SrI, depositadas no GeneBank e usadas no presente trabalho para construção da árvore filogenética.....	48
Tabela 4- Plantas sadias e infectadas por fitoplasmas usadas como fonte de material para os testes de enxertia.....	50
Tabela 5- Teste de transmissão de fitoplasmas por enxertia usando material sadio como enxerto para brotação e desenvolvimento em planta doente (porta-enxerto).....	51
Tabela 6- Teste de transmissão de fitoplasmas por enxertia usando material doente como enxerto para brotação e desenvolvimento em planta sadia (porta-enxerto).....	51
Tabela 7- Detecção de fitoplasmas em plantas de videira, através de duplo PCR com iniciadores universais (mF2/R1, P1/P7 ou P1/Tint e F2n/R2) em diferentes épocas de coleta, estabelecidas de acordo com as fases fenológicas da planta.....	55
Tabela 8- Identificação de fitoplasmas presentes em amostras de videira, através de duplo PCR conduzido com os iniciadores universais e específicos para a classificação destes agentes nos grupos 16SrI e 16SrIII.....	59

Tabela 9- Comparação entre os padrões de restrição obtidos por RFLP, do fitoplasma detectado em plantas de videira (1, 2, 3 e 4) com outros fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrI.....	63
Tabela 10- Comparação entre os padrões de restrição obtidos por RFLP do fitoplasma detectado em planta de videira (2) com outros fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII.....	66
Tabela 11- Resultados do teste de transmissão de fitoplasmas por enxertia usando material sadio como enxerto para brotação e desenvolvimento em planta doente (porta-enxerto).....	78
Tabela 12- Resultados do teste de transmissão de fitoplasmas por enxertia usando material doente como enxerto para brotação e desenvolvimento em planta sadia (porta-enxerto).....	79

1 INTRODUÇÃO

A videira (*Vitis* spp) é cultivada no mundo todo e vem ganhando importância no cenário econômico brasileiro, tanto em função do substancial aumento da produção de vinho, como no consumo da fruta fresca. A condução da cultura envolve tecnologias modernas e os aspectos fitossanitários têm merecido atenção especial por parte de produtores e técnicos.

Dentre as doenças mais relevantes para a cultura está uma doença genericamente denominada de “amarelos da videira” (‘Grapevine yellows’), causada por fitoplasmas. Os amarelos da videira são economicamente importantes, presentes principalmente na Europa e em países como Estados Unidos, Austrália, Israel, entre outros. No Brasil, sintomas similares aos relatados para esta doença foram observados em plantas de videira cultivadas nos Estados de São Paulo e Paraná. A observação de plantas sintomáticas levou a suspeita da ocorrência da doença. Análises de laboratório conduzidas na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP detectaram a presença de fitoplasmas associados a plantas doentes, demonstrando a ocorrência de amarelos no Brasil.

Em razão da importância dos amarelos em outros países e da sua ocorrência nestes dois estados brasileiros, o presente trabalho foi proposto para investigar alguns aspectos relacionados à doença. Assim, os objetivos compreenderam: otimizar o método de diagnose com base em técnicas moleculares, através da determinação do órgão da planta e do estágio fenológico mais propícios para coleta de amostras; demonstrar a patogenicidade do agente através da transmissão via enxertia de tecidos; identificar e analisar filogeneticamente os fitoplasmas detectados, relacionando-os com outros presentes em outras partes do mundo.

As pesquisas com fitoplasmas vêm sendo incrementadas no Brasil e os conhecimentos sobre esta importante doença da videira poderá contribuir para aumentar os conhecimentos sobre o papel destes patógenos no agroecossistema tropical.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 A cultura da videira: taxonomia, origem e morfologia

A videira é uma planta perene, lenhosa, caducifolia e sarmentosa pertencente à família *Vitaceae*, gênero *Vitis*. A família *Vitaceae* possui 11 gêneros e aproximadamente 450 espécies. O gênero *Vitis* é o mais importante e abrange cerca de 50 espécies conhecidas, sendo algumas silvestres. Deste total, aproximadamente, 35 espécies apresentam algum valor econômico para cultivo ou para fins de melhoramento genético. Duas espécies se destacam *Vitis vinifera* L., conhecida como produtora de uvas finas, e *Vitis labrusca* L., produtora de uvas rústicas (SIMÃO, 1998).

As videiras rústicas apresentam como centro de origem as regiões de clima temperado úmido dos Estados Unidos da América, sendo também denominadas de videiras americanas. São chamadas de rústicas pela maior resistência a algumas doenças e menor exigência nos tratamentos culturais. Já a videira européia (*V. vinifera* L.) é originária da Ásia Central, de regiões que possuem clima típico mediterrâneo, caracterizado pelo verão seco e inverno chuvoso.

Em 1532, com a chegada de Martim Afonso de Souza ao Brasil, foram introduzidas as primeiras videiras através da capitania de São Vicente-SP, trazidas da Ilha da Madeira. Porém, a videira não prosperou no úmido e quente litoral paulista. O primeiro indício da implantação da viticultura no Rio Grande do Sul data de 1626, quando um padre jesuíta, vindo de Buenos Aires, fundou a primeira missão da ordem. Antes disso, a cultura da videira na região teria sido impossível, pois os homens que a desbravaram não tinham interesse pela agricultura (ROBERTO et al., 2008). As videiras americanas chegaram ao Brasil na década de 1830, mas, foi a partir de 1890 que ocorreu uma grande expansão do seu cultivo devido ao interesse dos imigrantes italianos que chegavam ao Estado de São Paulo.

As plantas de videira possuem raiz, caule, ramos, folhas, gavinhas, flores, frutos e sementes. As raízes têm como função fixar a planta ao solo, absorver e conduzir água e nutrientes do solo à parte aérea e, em condições normais, acumulam amido no final do ciclo vegetativo (verão e outono), que será utilizado pela planta na primavera seguinte para o desenvolvimento inicial dos brotos. O caule recebe o nome de cepa e é recoberto por uma casca, chamada de

ritidoma, que se destaca em forma de lâminas, sem cair totalmente, assumindo uma superfície rugosa. Os ramos são hastes longas, flexíveis e têm origem anualmente de gemas deixadas após a poda, apresentando características próprias das variedades. As folhas possuem forma variada de acordo com a espécie e cultivar, são divididas em pecíolo e limbo, possuem cinco nervuras principais e, no outono, caem naturalmente da planta. A gavinha é um órgão filamentoso, de aspecto mole e quebradiço quando novo e excessivamente duro quando maduro, com função de sustentação da planta. As flores são pequenas, de cor verde-clara, estão reunidas em inflorescências e a maioria das variedades cultivadas que possuem sementes têm flor hermafrodita ou completa. Os frutos possuem normalmente quatro sementes no interior da polpa, são denominados bagas e o conjunto de bagas forma o cacho. As sementes são periformes, com casca dura, rica em tanino e apresentam um embrião pequeno rodeado por uma amêndoa ou endosperma rica em substâncias oleosas (SIMÃO, 1998; ROBERTO et al., 2008).

2.1.2 Importância econômica da videira

A produção mundial de uvas apresentou um período de crescimento acelerado entre as décadas de 60 e 80, passando de 42,9 milhões de toneladas no início da década de 60 para 66,5 milhões de toneladas em 1980. Após esse período, a produção se estabilizou devido à redução de área e de produção nos maiores países produtores e ao aumento da produção em países menos tradicionais no cultivo (KISHINO; GENTA; ROBERTO, 2007). No mundo todo, são mais de nove milhões de hectares plantados, o que faz com que a uva só perca em importância para citros e banana (POMMER, 2002). Na Europa, vários países cultivam a videira em grandes extensões e o melhoramento da cultura é uma das mais importantes áreas de desenvolvimento tecnológico, atendida por grande número de universidades e instituições. O maior produtor mundial é a Itália, com 8,33 milhões de toneladas, seguida pela França, Espanha, China e Estados Unidos com 6,69, 6,40, 6,10 e 5,75 milhões de toneladas, respectivamente (Food and Agriculture Organization of the United Nations- FAOSTAT, 2009). O Brasil possui pequena importância no mercado mundial, ocupando a décima primeira posição, com 1,25 milhões de toneladas produzidas em 2006. A área plantada é modesta, totalizando 75.354 ha em 2006 (FAOSTAT, 2009), concentrados principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Bahia e Paraná são os principais produtores (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2008).

Diferentemente de seus concorrentes no mercado mundial, que possuem condições ambientais excelentes para o cultivo da videira, o Brasil, apesar da diversidade climática, não apresenta as condições ideais para o cultivo. Em regiões de clima bem definido, as fases do ciclo da videira acompanham as variações estacionais, com brotação ocorrendo na primavera e queda de folhas no outono. O clima do tipo mediterrâneo apresenta as melhores condições para o desenvolvimento da videira, motivo pelo qual a maioria dos vinhedos mundiais está instalada em áreas com esse clima. A planta cresce e se desenvolve melhor em regiões com verão longo, seco e moderadamente quente, e com inverno frio para satisfazer as necessidades de repouso vegetativo. Segundo Manica e Pommer (2006), no Brasil, as zonas de maior produção de videira, caracterizadas com condições próximas ao ótimo, estão no sul do país, principalmente no Rio Grande do Sul e Santa Catarina. No entanto, o excesso de chuvas no verão é um fator desfavorável, o qual foi contornado pelos produtores através do emprego de técnicas e variedades diferentes do cultivo tradicional na Europa. No Rio Grande do Sul, cerca de 80% da produção é de uvas americanas ou rústicas, sendo a variedade ‘Isabel’ aquela de maior expressão. A maior parte da produção é destinada à elaboração de vinhos, sucos e derivados, sendo uma pequena parte, especialmente de uvas americanas como ‘Niágara Rosada’ e ‘Isabel’, destinada ao mercado para consumo *in natura*. Este Estado produz cerca de 330 milhões de litros anuais de vinhos e mostos, o que representa 95% da produção nacional, concentrada principalmente na Serra Gaúcha, com mais de 30 mil hectares plantados. A viticultura é praticada em pequenas propriedades, com mão-de-obra familiar.

São Paulo é considerado um centro produtor importante, destacando-se as regiões de Jundiaí e São Roque, que possuem excesso de chuvas no verão e temperaturas elevadas na primavera. O Estado é o maior produtor brasileiro de uvas finas de mesa com 11.600 ha plantados. A produção de uvas finas é baseada na variedade ‘Itália’ e nas suas mutações ‘Rubi’, ‘Benitaka’ e ‘Brasil’, além das variedades introduzidas como ‘Red Globe’ e ‘Centennial Seedless’. A região de São Roque concentra a produção de uvas destinadas à vinificação, com predomínio das variedades americanas e híbridas com destaque para ‘Seibel 2’ e ‘Isabel’.

Atualmente, a videira tem sido cultivada com sucesso no Vale do Rio São Francisco, em clima semi-árido, nas proximidades de Petrolândia e Petrolina-PE. São cerca de 8.000 ha distribuídos entre os Estados de Pernambuco e Bahia. A viticultura é composta por pequenos produtores vinculados a projetos de irrigação, associados em cooperativas, e de médios e grandes

produtores que atuam em escala empresarial. É uma viticultura voltada à produção para consumo *in natura* e exportação, com predominância da variedade ‘Itália’. Nessa região, o repouso vegetativo ocorre na época seca e o manejo da irrigação, aliado ao clima quente, permite ao produtor obter duas colheitas sucessivas no mesmo ano. Nesse clima de alta temperatura e baixa umidade relativa, só as variedades de *Vitis vinifera* prosperam e a irrigação é obrigatória. O pólo Juazeiro-Petrolina é a principal região exportadora de uva de mesa do Brasil.

O Estado do Paraná possui três regiões onde a videira é cultivada com caráter lucrativo. A primeira localizada no centro do estado, no entorno da capital Curitiba; a segunda ao sul do estado, na fronteira com Santa Catarina; e a terceira fica ao norte e oeste do estado, na região de Londrina, onde aparece uma viticultura de alto nível, com apurada técnica, feita por agricultores de origem japonesa (SOUSA, 1996).

2.1.3 Fisiologia da videira

Nas regiões de clima temperado, a videira apresenta, anualmente, períodos alternados e bem definidos de vegetação ativa e de repouso vegetativo. Nessas condições climáticas, o ciclo vegetativo começa com a brotação da gema e termina com a queda da folha (REYNIER, 1989). O período em que a planta fica totalmente desfolhada no outono-inverno é chamado de repouso vegetativo ou dormência.

A duração do ciclo vegetativo varia em função do local e cada cultivar necessita de um número específico de dias para completá-lo. Já o ciclo reprodutivo ocorre simultaneamente e de forma interdependente com o ciclo vegetativo, começando com a brotação e terminando com a maturação completa do fruto. A videira repete anualmente os ciclos vegetativo e reprodutivo, que a caracteriza como planta perene de folhas decíduas. Galet (1983) descreve o desenvolvimento da videira como uma sucessão de ciclos, a saber: vegetativo (do “choro” à desfolha); crescimento (da brotação à paralisação do crescimento); reprodutivo (do florescimento à maturação da baga); amadurecimento dos tecidos (da paralisação do crescimento à maturação dos ramos); e repouso (compreendido entre dois ciclos vegetativos). Para as condições brasileiras o período de crescimento vegetativo vai de setembro/outubro (brotação) até o final de janeiro, início de fevereiro, quando se verifica a diminuição do crescimento das brotações. A floração e a frutificação vão de outubro à metade de novembro. O crescimento das bagas vai da metade de janeiro a fevereiro/março, ou mais tarde nos climas frios. O período de elaboração ou armazenamento vai de fevereiro a maio/junho, quando caem as folhas. A dormência ocorre de

maio/junho a setembro/outubro, quando começa a brotação. A duração dos ciclos pode ser antecipada ou retardada em função da variedade, porta-enxerto e do ambiente em que a cultura está instalada.

A dormência é caracterizada pela inatividade fisiológica e ausência de crescimento visual da planta, porém, as atividades metabólicas continuam com intensidade reduzida (PETRI et al., 1996). Após o período de dormência, a videira reinicia a atividade do sistema radicular por ação da elevação da temperatura do solo. O período de crescimento tem início com um fenômeno típico da videira que recebe o nome popular de “choro” (exsudação da seiva), sendo este consequência do rápido aumento do ritmo de absorção de água pelo sistema radicular. No início, a fase de crescimento se deve exclusivamente à quantidade de reservas armazenadas. Ocorre a reativação das gemas e a brotação dos ramos. Depois são os órgãos verdes, principalmente as folhas, que através da fotossíntese proporcionam a seiva elaborada para o desenvolvimento da videira. Nessa fase, ocorrem o crescimento dos ramos e o desenvolvimento dos frutos. O período de crescimento vai da brotação até praticamente a mudança da cor das uvas, quando brotos e raízes deixam de se alongar e a planta pára de crescer. O amadurecimento dos tecidos e acúmulo de reservas vão do final do crescimento dos ramos até a queda das folhas, fazendo parte do período fisiologicamente ativo da videira. Esta fase acontece concomitante à maturação dos cachos e ocorrem a lignificação e a maturação dos ramos do ano. Após a colheita, a maioria dos fotossintetizados se move das folhas para outras partes da planta. Todos os tecidos lenhosos de armazenamento se tornam drenos, e as raízes apresentam um período de crescimento.

2.1.4 Aspectos fitossanitários da viticultura

Diversas doenças atacam a videira podendo provocar grandes perdas e, mesmo, limitar a viticultura em regiões tropicais, caso medidas adequadas de controle não sejam adotadas. As doenças fúngicas são as mais prevalecentes e causam os maiores danos, tanto que a omissão das medidas de controle pode acarretar perdas totais (GALLOTTI; GRIGOLETTI JÚNIOR; SONEGO, 2002). A suscetibilidade das cultivares plantadas, as condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento de patógenos além do manejo inadequado da cultura fazem com que o cultivo da videira só se viabilize com a aplicação de fungicidas, aumentando os custos de produção, os riscos de intoxicação dos trabalhadores e de contaminação do ambiente. O programa de controle de doenças efetuado em regiões tropicais envolve cerca de 35 pulverizações em cultivares de uvas rústicas, representando em torno de 20% dos custos operacionais totais da

cultura (NAVES; PAPA, 2008). Um bom método de controle deve aliar eficiência e capacidade de manter um custo de produção competitivo no mercado. Dessa forma, o uso de material de propagação sadio, o manejo correto da cultura, adubação equilibrada e controle de pragas e plantas invasoras devem ser adotados em conjunto com o uso de fungicidas. O conhecimento dos patógenos importantes para as diferentes variedades de videira, os estádios de maior suscetibilidade, a influência das condições climáticas sobre os patógenos e as plantas e o uso adequado dos fungicidas empregados em cada situação são de fundamental importância para o estabelecimento de um programa de controle racional, tornando os tratamentos mais eficientes, reduzindo assim os custos de produção e os riscos de contaminação do ambiente (NAVES et al., 2009).

As variedades americanas e híbridas são menos suscetíveis às doenças que as variedades de uvas européias, no entanto, em regiões tropicais estão sujeitas a doenças como míldio, oídio, ferrugem, antracnose, entre outras. O míldio (*Plasmopara viticola*) é uma das principais doenças da videira no Brasil, pode causar perdas de até 100% na produção e as uvas européias são mais suscetíveis que as americanas e híbridos. A ferrugem da videira (*Phakopsora euvitis*) é uma doença com grande potencial de disseminação, foi constatada pela primeira vez no Brasil em 2001 na região norte do Paraná, e atualmente está disseminada por todas as regiões vitícolas do país, ocorrendo principalmente em áreas tropicais e subtropicais. Nesses locais, a severidade da doença parece ser maior que nas regiões de clima temperado e as variedades americanas e híbridas parecem ser mais suscetíveis que as variedades européias. O oídio (*Uncinula necator*) raramente apresenta alta severidade no Brasil devido ao fato de as condições climáticas não serem, em geral, favoráveis ao desenvolvimento do fungo, principalmente no sul do país, e também porque a grande maioria dos vinhedos é constituída de variedades americanas, que apresentam maior resistência à doença. A antracnose (*Elsinoe ampelina*) ataca todos os órgãos verdes da planta, causando queda na produtividade e perda do valor comercial da uva em decorrência de manchas nos frutos, sendo as uvas americanas menos resistentes que as uvas européias.

Além das doenças fúngicas, podem ocorrer também viroses e doenças causadas por bactérias. A principal bacteriose constatada no Brasil é o cancro bacteriano da videira (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*), observada pela primeira vez em 1998, em vinhedos da região do Vale do São Francisco. Esta doença encontra-se restrita ao nordeste brasileiro e,

embora ainda não seja conhecida nas demais regiões vitícolas, tem uma importância potencial, visto que de modo geral as variedades de *Vitis vinifera* são suscetíveis. O patógeno é transmitido principalmente através do material propagativo infectado e por meio de ferramentas utilizadas nas operações de desbrota, poda, raleio de bagas e colheita.

Na videira são conhecidas cerca de cinquenta doenças consideradas de origem viral, no entanto, estas nem sempre despertam a preocupação dos viticultores, talvez por desconhecimento dos sintomas ou mesmo por seus efeitos mais graves aparecerem a médio ou longo prazo. A propagação vegetativa da videira por estacas (pé franco) ou pela enxertia (muda enxertada) e a produção da muda pelo viticultor, usando material vegetativo do seu próprio vinhedo ou de vinhedos vizinhos, sem o conhecimento do estado sanitário das plantas, tem favorecido a disseminação das viroses e o aparecimento de doenças complexas, pelo acúmulo de diferentes vírus numa mesma planta (NAVES; PAPA, 2008). As principais viroses da videira já foram constatadas no Brasil e caracterizam-se por induzir a degeneração lenta e gradual das plantas, menor longevidade produtiva e perdas quantitativas e qualitativas, porém, nenhuma delas pode ser considerada fator limitante para a cultura. As principais viroses são o enrolamento da folha da videira (*Grapevine leafroll-associated virus*-GLRaV), o mosaico das nervuras (*Grapevine fleck virus*- GFkV) e o complexo do lenho rugoso (“grapevine rugose wood”). Segundo Amorim e Kuniyuki (2005), o controle das viroses da videira exige a adoção de medidas preventivas como o emprego de material propagativo sadio para variedades de copa e de porta-enxerto, evitando, assim, que os vírus sejam disseminados e se acumulem em novas plantas. Em São Paulo e Rio Grande do Sul, existem programas que visam à obtenção de clones sadios das variedades mais importantes para a viticultura brasileira e a formação de matrizes livres de vírus para fornecimento de material propagativo sadio aos viticultores.

2.1.5 Fitoplasmas como agentes patogênicos a plantas

Os fitoplasmas foram descobertos em 1967 por um grupo de pesquisadores japoneses que observavam em microscópio eletrônico tecidos de plantas doentes de batata, amora e rainha margarida exibindo sintomas do tipo amarelo (DOI et al., 1967). Por décadas, as doenças genericamente conhecidas como amarelos foram atribuídas aos vírus, até que a constante presença desses organismos no floema de plantas com amarelos e sua ausência no floema de plantas sadias permitiu que fosse feito o reconhecimento dos fitoplasmas como agentes causais de

enfermidades de plantas. Na década de oitenta, muitas doenças já eram atribuídas a esses patógenos, como o superbrotamento da batata, o nanismo do arroz e o amarelecimento letal do coqueiro (McCOY et al., 1989). Inicialmente, esses microrganismos foram chamados de MLOs (“Mycoplasma Like Organisms”), por serem semelhantes aos já conhecidos micoplasmas patogênicos aos animais e, em 1994, o termo fitoplasma passou a ser empregado para designá-los (SEARS; KIRKPATRICK, 1994). Desde a sua descoberta em 1967, centenas de doenças associadas aos fitoplasmas já foram relatadas. Novas epidemias ocorrem de tempos em tempos e um grande número de novos fitoplasmas foi identificado nos últimos anos (LEE; GUNDERSEN-RINDAL; BERTACINI, 1998a).

Fitoplasmas pertencem à classe Mollicutes, são procariotos unicelulares de aproximadamente 500 nm de diâmetro, sem parede celular e sem forma definida (pleomórficos). São parasitas obrigatórios de plantas e insetos. Habitam e se multiplicam nos vasos de floema das plantas e na hemolinfa de insetos vetores (BERTACCINI, 2007). As reduções ocorridas em seu genoma, em função da evolução, resultaram na perda da maioria das rotas metabólicas, incluindo aquelas para síntese de ATP, aminoácidos e nucleotídeos (BAI et al., 2006; OSHIMA et al., 2004), não sendo possível o seu isolamento em meio de cultura, fator que dificulta os estudos das doenças associadas a estes patógenos. No entanto, funções necessárias para a sobrevivência no floema e para a colonização de tecidos de insetos vetores foram mantidas (FIRRAO; GARCIA-CHAPA; MARZACHI, 2007). São sensíveis aos antibióticos do grupo das tetraciclina. Em condições naturais, sua transmissão é feita por insetos vetores, principalmente cigarrinhas, da Ordem Hemiptera (famílias Cixiellidae e Fulgoroidea) e por psílidos, que se alimentam no floema das plantas (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006). São patógenos de plantas que causam danos em diversas culturas no mundo todo. As perdas variam da redução parcial da produção e da qualidade até perda total (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000).

As plantas infectadas por fitoplasmas exibem uma série de sintomas que sugerem distúrbios no balanço hormonal. Os sintomas típicos incluem virescência (aparecimento de flores verdes e perda da pigmentação normal da flor), filodia (formação de folhas no lugar das flores), esterilidade de flores, superbrotamento de ramos originando o sintoma conhecido por vassoura de bruxa, estiolamento de ramos, enfezamento generalizado da planta (flores e folhas pequenas, internódios curtos), descoloração de folhas e ramos, encarquilhamento de folhas, necrose do floema, crescimento dos ramos com aspecto de roseta e declínio generalizado da planta

caracterizado pela morte descendente do ponteiro dos ramos, enfezamento e amarelecimento ou avermelhamento não sazonal das folhas. Os sintomas induzidos nas plantas doentes variam de acordo com o fitoplasma e com o estágio de infecção (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000).

A lista de doenças causadas por fitoplasmas vem aumentando e, em certos casos, a ocorrência do patógeno torna-se fator limitante para a produção de determinadas culturas em praticamente todas as regiões do mundo (McCOY et al., 1989; LEE; DAVIS, 1992). Como exemplos, citam-se os fitoplasmas do grupo ‘Aster Yellows’, responsáveis por grandes perdas em olerícolas e ornamentais como a alface, a cenoura e o gladiolo, na América do Norte e em partes da Europa; o amarelo e a doença “X” do pessegueiro responsáveis por perdas significativas em pomares comerciais instalados nos Estados Unidos; os amarelos da videira de relevante importância em países da Europa, da América do Norte e da Austrália; o superbrotamento da batata e o enfezamento vermelho do milho causadores de sérios danos na produção destas culturas na América Central e do Sul (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). No Brasil, é grande a diversidade de plantas afetadas por fitoplasmas, incluindo vários gêneros e espécies de olerícolas, frutíferas, ornamentais e florestais. Algumas das doenças já relatadas são o enfezamento vermelho do milho (BEDENDO; DAVIS; DALLY, 2000) e do repolho (AMARAL-MELLO, 2007), o cálice gigante do tomateiro (AMARAL-MELLO et al., 2006), o superbrotamento do maracujazeiro (RIBEIRO; BEDENDO, 2007) e do chuchuzeiro (MONTANO et al., 2000), o lenho mole da macieira (RIBEIRO; BEDENDO; SANHUEZA, 2007) e a síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (SILVA, 2008).

Apesar das dificuldades para demonstrar a patogenicidade desses organismos, algumas estratégias como a associação constante fitoplasmas-planta doente, a remissão de sintomas com uso de tetraciclina e a transmissão feita através de insetos vetores, planta parasita (*Cuscuta* spp) ou enxertia têm sido muito úteis.

No princípio, as doenças associadas à fitoplasmas eram diagnosticadas pelos sintomas e pela observação de tecidos doentes em microscópio eletrônico, sendo o primeiro sistema de classificação de fitoplasmas baseado em propriedades biológicas como sintomatologia da planta infectada, gama de plantas hospedeiras e relação com insetos vetores (CHIYOKOWSKI; SINHA, 1989; LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000). A microscopia eletrônica de transmissão, apesar de ser uma importante ferramenta para a detecção de fitoplasmas em plantas, é uma

técnica inviável como método de rotina devido ao custo elevado do equipamento e a exigência de mão-de-obra altamente qualificada, além de não permitir a sua identificação pela impossibilidade de diferenciação morfológica (BARROS, 1997). O uso de técnicas moleculares para detecção, identificação e classificação de fitoplasmas só foi possível após o sequenciamento da região 16S rRNA desses microrganismos (LIM; SEARS, 1989). O fato dos genes do rRNA ribossomal serem conservados nos procariotos e a existência de uma vasta base de dados com seqüências de nucleotídeos do 16S rDNA possibilitaram a adoção dessas novas tecnologias moleculares. Dessa forma, as técnicas de PCR (“Polymerase chain reaction”) e RFLP (“Restriction fragment length polymorphism”) passaram a ser usadas para detecção e identificação de fitoplasmas. A identificação feita por RFLP tem permitido a classificação de fitoplasmas em grupos (LEE et al., 1998b). Ainda, análise das seqüências do 16S rDNA permite estabelecer níveis de diversidade genética entre fitoplasmas e de suas relações filogenéticas com outros procariotos (BERTACCINI, 2007).

Atualmente, os fitoplasmas estão classificados em 17 grupos e mais de 40 subgrupos. A maioria das doenças relacionadas no mundo está associada aos fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI, 16SrIII, 16SrV, 16SrX, 16SrXI e 6SrXII. O grupo 16SrI reúne o maior número de fitoplasmas já identificados, sendo eles associados às doenças conhecidas como amarelos (‘Aster Yellows’- AY). Atualmente, existem 24 propostas de candidatos à espécie (*candidatus Phytoplasma* spp.) baseadas em análises de RFLP e seqüências do gene 16S rDNA (AROCHA et al., 2005; ; LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000; VALIUNAS; STANIULIS; DAVIS, 2006; LEE et al., 2006).

2.1.6 Amarelos da videira

Os amarelos da videira são doenças associadas aos fitoplasmas, conhecidas no mundo inteiro e que atacam espécies selvagens e cultivadas. A primeira doença do tipo amarelo a ser descrita em videira foi a flavescência dourada, relatada em 1954 no sudoeste da França (CAUDWELL, 1957). Doenças semelhantes começaram a ser observadas em outras regiões ou países da Europa, América do Norte, Ásia e Austrália, após o relato da flavescência dourada. Estas doenças do tipo amarelo já eram conhecidas na videira, mas sua etiologia era incerta. Este fato fez com que fossem frequentemente chamadas de flavescência dourada ou doenças semelhantes à flavescência dourada, por possuírem sintomas muito parecidos. O conhecimento da

etiologia dos amarelos e a diferenciação dos seus agentes causais foram possíveis graças a aplicação de técnicas mais avançadas baseadas no rDNA. Hoje, sabe-se que os amarelos da videira são um complexo de doenças semelhantes quanto à sintomatologia, porém, causadas por fitoplasmas molecularmente distintos, que variam em função da área geográfica (CAUDWELL, 1993). Estes amarelos compreendem doenças conhecidas como flavescência dourada, ‘bois noir’ (nomeada como ‘vergilbungskrankheit’ na Alemanha e ‘legno nero’ na Itália), ‘australian grapevine yellows’ e outros amarelos que induzem sintomas similares na videira e são relatados em diversas partes do mundo.

A flavescência dourada é a doença do tipo amarelo mais importante na videira e também a mais estudada. Está presente no sul da França, norte da Itália e da Espanha, Sérvia, Eslovênia e Suíça (OEPP/EPPO, 2007). É uma doença epidêmica, caracterizada pela rápida disseminação dentro do vinhedo devido à transmissão planta-a-plantas pela cigarrinha vetora *Scaphoideus titanus* Ball. Está claramente ligada à presença do seu vetor e também é transmitida através da enxertia. Os fitoplasmas associados à doença estão classificados no grupo 16SrV (‘Elm Yellows’-EY), subgrupos 16SrV-C (LEE et al., 1998b; MARTINI; MURARI, 1999; DAVIS; DALLY, 2001) e 16SrV-D (MARTINI; MURARI, 1999; DAVIS; DALLY, 2001). O subgrupo 16SrV-D tem sido detectado no norte da Itália (MARTINI; MURARI, 1999; BERTACCINI et al., 2001; BIANCO et al., 2003), França e Espanha (ANGELINI et al., 2001; TORRES et al., 2003) onde tem causado grandes epidemias. Já o subgrupo 16SrV-C está presente em outras áreas de produção como no nordeste da Itália e Sérvia (MARZACHI et al., 2001; DUDUK et al., 2004). O nome flavescência dourada é usado somente para a doença transmitida pela cigarrinha *S. titanus*.

A doença conhecida por ‘bois noir’ foi descrita pela primeira vez no leste da França, em 1961 por Caudwell e, anos depois, Gärtel relatou a doença conhecida por ‘vergilbungskrankheit’ na Alemanha, em 1965 (CAUDWELL, 1988). Estas doenças foram, desde o início, diferenciadas da flavescência dourada pela suscetibilidade das variedades, epidemiologia e principalmente pelo fato do vetor *S. titanus* não estar presente nos vinhedos onde as doenças ocorriam. Apesar da diversidade de nomes, o fitoplasma associado é o mesmo, pertencente ao grupo 16SrXII (‘Stolbur’), subgrupo 16SrXII-A (DAIRE et al., 1997). Mínima ou nenhuma diferença tem sido demonstrada entre os fitoplasmas encontrados na videira nesses países (DAIRE et al., 1997; ORENSTEIN; ZAHAVI; WEINTRAUB, 2001). ‘Bois noir’ é o amarelo da videira mais difundido, presente em todos os países da Europa e alguns outros. A doença é transmitida por

enxertia e pela cigarrinha *Hyalesthes obsoletus* Signoret. Esta cigarrinha se alimenta principalmente de espécies silvestres e daninhas, para as quais também transmite fitoplasmas. A alimentação na videira é rara, indicando que esta não é sua hospedeira principal. A transmissão acontece acidentalmente, por esse motivo a disseminação da doença é lenta e dificilmente acontece de uma planta para outra.

Na Austrália, três fitoplasmas diferentes têm sido associados aos amarelos da videira ('Australian grapevine yellows'). Análises de RFLP e de seqüências do 16S rRNA foram usadas para confirmar as identidades genéticas. As análises mostraram a estreita relação de um deles com o grupo 16SrXII ('stolbur') e com os fitoplasmas relatados na Alemanha infectando videiras. Davis e Sinclair (1998a) o classificaram no grupo 16SrXII subgrupo B, e hoje existe a proposta para que este se torne espécie ('*Candidatus* Phytoplasma australiense'). O segundo fitoplasma, chamado de 'tomato big bud', foi confirmado como membro do grupo 16SrII ('faba bean phyllody- FBP') e estes dois grupos ocorrem nas mesmas regiões (DAVIS; SCHNEIDER; GIBBS, 1997). O terceiro fitoplasma é chamado de 'buckland valley grapevine yellows phytoplasma'- BVGY, pertence ao grupo 16SrI, provavelmente formando um novo subgrupo. Está restrito a uma área limitada e sua epidemiologia sugere que a infecção da planta acontece tanto por transmissão aérea (indicando a presença de um vetor) como por plantio de material infectado (CONSTABLE et al., 2002), apesar da falta de identificação de um vetor potencial.

Outras doenças ao redor do mundo induzem sintomas similares na videira e também são conhecidas por amarelos. Estas doenças são transmitidas com dificuldade por enxertia, tem disseminação lenta e não têm vetores conhecidos. Nos Estados Unidos, fitoplasmas dos grupos 16SrI subgrupo A e 16SrIII subgrupo I têm sido relatados (DAVIS et al., 1998b). Estes dois grupos também são constantemente detectados infectando videiras em Israel (ORENSTEIN; ZAHAVI; WEINTRAUB, 2001). Fitoplasmas do grupo 16SrI são consistentemente detectados em videiras na Itália, muitas vezes junto com outro fitoplasma, caracterizando as infecções mistas. Neste país já foram relatados os subgrupos 16SrI-B e 16SrI-G (ALMA et al., 1996). Recentemente, fitoplasmas dos grupos 16SrI subgrupos B e C, 16SrVII subgrupo A e 16SrXII subgrupo A foram detectados em videiras com sintomas do tipo amarelo, em várias regiões do Chile (FIORI et al., 2007). No Brasil, fitoplasmas dos grupos 16SrI subgrupo B e 16SrIII também foram identificados em videiras (NERONI; BEDENDO; KUNIYUKI, 2006). Apesar de fitoplasmas pertencentes a estes grupos serem encontrados na videira cultivada em diferentes

partes do mundo, não existem evidências de que a doença possa ocorrer na forma de epidemia. Transmissões esporádicas desses fitoplasmas podem ocorrer sem consequências significativas do ponto de vista epidemiológico, no entanto, pesquisas são recomendadas caso ocorra alguma alteração importante em relação aos fatores de disseminação (BOUDON-PADIEU, 2003).

Os sintomas de amarelos na videira são similares àqueles relatados para as doenças associadas aos fitoplasmas de modo geral. A vitalidade da planta é afetada, a produção é reduzida e a qualidade das uvas decai em função da alta acidez e baixa concentração de açúcares. Ocorre a descoloração das folhas, com enrolamento para a página inferior acompanhado de amarelecimento nas variedades brancas e avermelhamento nas tintas; as folhas tornam-se rígidas, com aspecto quebradiço e as nervuras apresentam rachaduras; a baixa lignificação dos ramos, faz com que a planta fique com aspecto pendente; seca das inflorescências e murchamento das bagas causando redução na sua qualidade e quantidade; e declínio rápido das brotações (CAUDWELL, 1988). Todas as variedades de *Vitis vinifera* são suscetíveis aos amarelos, no entanto, em diferentes níveis. Os sintomas podem aparecer na planta toda ou apenas numa parte e a manifestação vai depender da variedade, do vigor da planta e do grau de infecção ocorrido. Algumas variedades como ‘Chardonnay’, ‘Cabernet Sauvignon’ e ‘Pinot Noir’, são altamente suscetíveis, enquanto outras conseguem se recuperar da flavescência dourada se forem protegidas contra a reinoculação. Algumas variedades de porta-enxerto têm-se mostrado tolerantes à flavescência dourada e, nesse caso, comportam-se como portadoras da doença (BOUDON-PADIEU, 2000). A expressão irregular de sintomas é conhecida para ‘bois noir’, dependendo principalmente das condições climáticas e também da cultivar.

2.1.7 Controle dos amarelos da videira

No caso das doenças causadas por fitoplasmas, o controle deve estar sempre voltado para a prevenção, evitando a entrada do patógeno em áreas livres da doença. A flavescência dourada é considerada como praga quarentenária A2 para países onde só o ‘bois noir’ ocorre ou os amarelos não estão presentes. Os outros amarelos da videira não representam risco fitossanitário significativo, uma vez que já ocorrem amplamente. Sua disseminação é difícil, tem importância econômica reduzida e os patógenos envolvidos são fitoplasmas do grupo ‘Aster Yellows’ amplamente distribuídos, inclusive em plantas selvagens e daninhas (OEPP/EPPO, 1983).

Como controle preventivo, o uso de material propagativo sadio é a principal medida recomendada. A instalação de viveiros de mudas deve ser feita em áreas onde a doença não ocorre, as plantas matrizes devem receber proteção intensa contra insetos vetores e passar por inspeções durante a estação de crescimento (OEPP/EPPO, 1990). É recomendado que as estacas dormentes passem pela termoterapia em água quente a 50°C por 45 minutos (CAUDWELL et al., 1997). Este procedimento tem se mostrado seguro e eficiente e é recomendado pelo 'International Board for Plant Genetic Resource' (FAO/IBPGR) para a movimentação segura de germoplasma de videira. As técnicas de cultura de tecidos, usadas rotineiramente para erradicação de vírus, também têm sido estudadas para uso na obtenção de material livre de fitoplasmas (PARMESSUR et al., 2002; CHALAK et al., 2005), porém os resultados obtidos até o momento não são conclusivos, exigindo mais estudos. Gribaudo et al., (2007) obtiveram cem por cento de material sadio micropropagado a partir de matriz contaminada pela flavescência dourada, porém para o fitoplasma do 'bois noir' os resultados foram insatisfatórios, sendo este detectado em grande parte do material micropropagado.

Um exemplo de sistema de controle preventivo bem estabelecido para os amarelos da videira é aquele adotado pelo Canadá. A partir de 2007, foram instauradas leis para importação de material de videira da França e Alemanha. Estas leis ajudam a proteger o país da introdução e disseminação dessas doenças pelos vinhedos. Para importação, são necessárias uma permissão oficial e um certificado fitossanitário de origem e o material propagativo deve proceder de viveiros ou clones aprovados; o material produzido nas zonas francesas de controle da flavescência dourada é proibido; é obrigatória a realização da termoterapia em água quente (50°C por um período mínimo de 35 minutos) antes da exportação, ou então, no Canadá, antes do plantio. O material que foi importado da França e Alemanha, antes de 2007, permanece sob quarentena, sendo monitorado para o aparecimento de sintomas pelos próximos anos (Ministry of Agriculture and Lands of British Columbia - AGF, 2006).

O atual conhecimento dos fitoplasmas causadores dos amarelos da videira, seus hospedeiros e vetores permite a adoção de diferentes estratégias de controle para estas doenças. Em áreas onde os amarelos estão presentes, o controle envolve o isolamento e remoção de plantas infectadas e sintomáticas, assim como o controle do vetor. No caso da flavescência dourada, a eliminação de plantas doentes ou de vinhedos abandonados é obrigatória. Já para os outros amarelos é necessária também a eliminação de plantas daninhas, que servem como fontes de

inóculo (BOUDON-PADIEU, 2003). No momento, o controle químico de vetores só é aplicável no caso de *S. titanus*, por este ser habitante permanente dos vinhedos europeus e seu ciclo de vida ser bem conhecido. Um programa de pulverizações com inseticidas foi estabelecido a partir de conhecimentos sobre a biologia da transmissão e é favorecido pelo ciclo univoltino do vetor (a cada ano apenas uma geração atinge a maturidade). As alternativas de controle consistem em eliminação de ovos pela queima de restos de poda, uma ou duas pulverizações com inseticidas um mês após o início da eclosão dos ovos e monitoramento das plantas para controle dos adultos. Na Europa não se conhecem predadores ou parasitóides naturais de *S. titanus*, resultando na ausência do controle biológico, porém nos Estados Unidos foram identificados três diferentes tipos de parasitóides de larvas e ovos, pertencentes às Ordens Hymenoptera e Diptera, que estão sendo testados na França para o controle desse vetor (NUSILLARD et al., 2003). No caso de *H. obsoletus*, o controle químico com inseticidas não é possível porque a espécie não permanece o tempo todo na cultura. Estudos mostram que o ciclo de vida de *H. obsoletus* é favorecido por solos rochosos infestados de plantas daninhas e a aração do solo dos vinhedos parece ser uma medida eficiente para redução da sua população, provavelmente devido à eliminação mecânica das ninfas. Em áreas onde há o controle do vetor, a poda das videiras pode ser adotada como medida complementar de controle. A incidência dos amarelos pode ser reduzida pela poda de ramos portando brotações sintomáticas, permanecendo a planta assintomática por muitos anos. No caso da flavescência dourada, a recuperação é menos significativa (BOUDON-PADIEU, 2000). A flavescência dourada é uma doença regulamentada na França desde 1987 e na Itália desde 2000. Na França, medidas obrigatórias de controle foram adotadas desde 2003 para a doença e seu vetor. Quando uma planta infectada é encontrada, faz-se uma área de quarentena ao seu redor por no mínimo dois anos. Todas as plantas infectadas são destruídas e o controle do vetor na área é feito através de pulverizações com inseticidas.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Detecção de fitoplasmas em videiras em diferentes fases fenológicas

2.2.1.1 Coleta de material vegetal em plantas de videira

Com o objetivo de determinar a melhor época para detecção de fitoplasmas em videiras, para fins de diagnose, foram selecionadas cinco plantas sabidamente infectadas por fitoplasmas,

provenientes de plantios comerciais localizados nos Estados de São Paulo e Paraná (Tabela 1). Estas plantas foram propagadas vegetativamente e mantidas em vasos, em casa-de-vegetação, durante o período compreendido entre abril de 2005 e dezembro 2008. As plantas foram adubadas, irrigadas e submetidas a controle de pragas periodicamente. As amostragens foram feitas a partir de diferentes partes da planta (folhas novas, maduras e senescentes e ramos verdes e dormentes) e variou de acordo com a fase do ciclo fenológico em que estas plantas se encontravam (brotação, maturação e dormência). As amostragens foram feitas independentemente da sintomatologia exibida pelas plantas, totalizando 15 coletas/planta, (Tabela 2).

Tabela 1- Relação das plantas de videira amostradas entre os anos de 2005 e 2008 e testadas para a presença de fitoplasmas em diferentes tecidos em função do ciclo fenológico e suas procedências

Número da planta	Variedade	Procedência
1	Brasil (MV1781)	Marialva-PR
2	Benitaka (LD1587) planta 2	Londrina-PR
3	Brasil (TP1780) planta 1	Tupi Paulista-SP
4	Benitaka (LD1587) planta 1	Londrina-PR
5	Brasil (TP1780) planta 2	Tupi Paulista-SP

As amostras foram submetidas ao processo de extração de DNA total para posterior uso em duplo PCR, visando a detecção de fitoplasmas. Como controle negativo foram amostradas folhas de uma planta de videira assintomática da variedade ‘Isabel’, cultivada em local diferente daqueles de origem das plantas doentes.

Tabela 2 - Datas de coleta de material vegetal para testes de detecção de fitoplasmas por duplo PCR e partes da planta amostrada em função da fase fenológica

Datas de coleta	Tipo de tecido vegetal amostrado			
	Folhas maduras	Folhas senescentes	Ramos dormentes	Folhas novas e ramos verdes
Coleta 1				
13/04/05	X			
Coleta 2				
10/07/05			X	
Coleta 3		X		
01/06/06				
Coleta 4			X	
25/06/06				
Coleta 5				X
02/08/06				
Coleta 6	X			
27/03/07				
Coleta 7		X		
13/06/07				
Coleta 8			X	
27/07/07				
Coleta 9				X
12/09/07				
Coleta 10				X
26/09/07				
Coleta 11	X			
23/01/07				
Coleta 12	X			
16/04/08				
Coleta 13		X	X	
14/08/08				
Coleta 14				X
13/10/08				
Coleta 15	X			
12/12/08				

2.2.1.2 Extração de DNA total

Para a extração do DNA total das amostras foram empregadas três metodologias, denominadas aqui como extração rápida (DOYLE; DOYLE, 1987), extração completa (LEE; HAMMOND; DAVIS, 1993) e extração com o kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) (GREEN; THOMPSON; MacKENZIE, 1999).

Quando as amostras eram compostas por folhas foram usadas somente as nervuras centrais, já para os ramos foi feita uma raspagem com escalpelo na região abaixo da casca, onde estavam os vasos de floema.

2.2.1.2.1 Extração rápida

Aproximadamente 0,2 g de material vegetal fresco foi macerado em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. O macerado obtido foi transferido para microtubos de 1,5 mL sendo adicionados 800 µL 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. Em cada tubo foram adicionados 600 µL de CIA (clorofórmio/álcool isoamílico 24:1) e centrifugou-se por 15 minutos a 14.000 rpm. A fase superior (aquosa) foi retirada e transferida para outro tubo de 1,5 mL, no qual foram adicionados 540 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos por uma noite a -20°C. No dia seguinte, fez-se a centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Foi adicionado 1 mL de etanol 80% ao precipitado incubando por um período de 10 minutos. Em seguida, o etanol foi descartado e esta operação foi repetida mais uma vez. Foram adicionados 500 µL de NaCl 1M ao precipitado e, em seguida, procedeu-se à incubação por 30 a 60 minutos a 4°C. Nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos foi realizada. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80% por 10 minutos e a operação foi repetida mais uma vez. O etanol foi descartado e os tubos foram mantidos abertos e invertidos sobre papel toalha para a secagem do precipitado. Após a secagem, o precipitado foi ressuscitado em 100 µL de água deionizada ou solução tampão 1X TE e armazenado a -20°C.

Segue abaixo as especificações sobre o preparo da solução tampão 2X CTAB:

- **Tampão de extração 2X CTAB:** Foram pesados 2 g de CTAB, 8,18 g de NaCl, 0,74 g de EDTA, 1,57 g de Tris-HCl e 1,0 g de PVP. Os componentes foram dissolvidos em água deionizada completando o volume para 100 mL. O ajuste do pH foi feito para 8,0. No momento

do uso, antes de ser aquecido a 60°C, foi adicionado mercaptanol na proporção de 0,2 mL para cada 100 mL de tampão.

2.2.1.2.2 Extração completa

Cerca de 2 g de material vegetal fresco foi macerado em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. Ao macerado foram adicionados 14 mL de solução tampão de extração I. O material foi transferido para tubos de vidro com capacidade para 30 mL e centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 8 mL de solução tampão de extração II. Foram adicionados 160 µL de proteinase K, 880 µL de sarkosyl 10% e os tubos foram incubados em “banho-maria” a 55°C por 2 horas. A mistura foi centrifugada a 8.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, adicionaram-se 5,5 mL de isopropanol gelado e os tubos foram mantidos a -20°C por uma noite. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 8.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em uma mistura de 3 mL de solução tampão 1X TE, 75 µL de SDS 20% e 60 µL de proteinase K. O material foi incubado em “banho-maria” a 37°C por 1 hora e, em seguida, foram adicionados em cada tubo 525 µL de NaCl 5M e 420 µL de CTAB/NaCl, sendo feita uma nova incubação em “banho-maria” a 65°C por 10 minutos. À mistura, foi adicionada uma alíquota de 4 mL de CIA (clorofórmio/álcool isoamílico 24:1), sendo a mesma centrifugada a 6.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi removida para novos tubos, foram acrescentados mais 4 mL de CIA e centrifugou-se novamente a 6.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para novos tubos, foram adicionados 2 mL de fenol e 2 mL de CIA e novamente centrifugado a 6.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para novos tubos, acrescida de mais 4 mL de CIA seguida por centrifugação a 6.000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para novos tubos e foram acrescentados 2,5 mL de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -20°C por uma noite para precipitação dos ácidos nucleicos. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 8 mL de etanol 70% ao precipitado, mantendo os tubos a 4°C por 30 minutos. Fez-se uma nova centrifugação a 6.000 rpm por 10 minutos, descartando o sobrenadante. Os tubos foram invertidos sobre papel toalha para secagem da parte sólida. Após a secagem, os precipitados foram ressuspensionados em 200-300 µL de

solução tampão TE 1X. Fez-se a transferência da suspensão para microtubos de 1,5 mL e o DNA total extraído foi armazenado a -20°C .

Seguem abaixo as especificações sobre as soluções tampão usadas neste protocolo:

- **Tampão de extração I:** Foram pesados 5,42 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1,02 g de K_2HPO_4 , 25 g de sucrose, 0,375 g de BSA e 5,0 g de PVP. Os componentes foram dissolvidos em água destilada acertando o volume final para 250 mL. O tampão foi conservado em geladeira a 4°C . No momento do uso, foi adicionado ácido ascórbico na proporção de 0,53 g para cada 100 mL de tampão. O pH foi ajustado para 7,6.

- **Tampão de extração II:** Foram pesados 6 g de Tris-base, 7,3 g de NaCl e 18,6 g de EDTA. Os componentes foram dissolvidos em água destilada acertando o volume final para 500 mL. Acertou-se o pH para 8,0 e o tampão foi autoclavado.

- **Tampão TE IX:** Foram pesados 6,05 g de Tris-base e 1,86 g de EDTA. Foi feita a dissolução em água destilada acertando o volume final para 500 mL. O pH foi acertado para 8,0 e o tampão foi autoclavado.

2.2.1.2.3 Extração com kit comercial DNeasy ®Plant Mini kit (Qiagen)

Para a extração do DNA total usando o kit comercial foram seguidas as recomendações do fabricante.

Cerca de 1 g de material vegetal fresco foi macerado com nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. Uma parte do macerado foi transferida para microtubo de 1,5 mL (até atingir pouco menos da metade do microtubo) e ao macerado foram adicionados 400 μL do tampão AP1 (Qiagen) e 4 μL de RNase. Os tubos foram mantidos em “banho-maria” a 65°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 130 μL do tampão AP2 (Qiagen) e os tubos incubados a -20°C por 5 minutos. A mistura foi aplicada em uma coluna montada sobre tubo coletor e centrifugada por 5 minutos a 13.000 rpm. O líquido que passou pela coluna foi recolhido em um novo microtubo e foram adicionados 675 μL do tampão AP3 (Qiagen). Uma alíquota de 650 μL dessa mistura foi aplicada em outra coluna, a qual foi centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. O líquido que passou pela coluna foi descartado e a coluna contendo o DNA foi transferida para um novo microtubo. No centro da coluna foram adicionados 500 μL do tampão AW (Qiagen) e foi feita uma centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos para lavagem do DNA. A coluna foi transferida

para um novo microtubo para eluição do DNA com 100 µL de tampão AE (Qiagen). O DNA extraído foi armazenado a -20°C.

2.2.2 Purificação do DNA total

Após a extração do DNA total pelas metodologias rápida e completa, uma alíquota do produto obtido passou por um processo de purificação com o objetivo de melhorar a qualidade do DNA e, assim, aumentar a sensibilidade de detecção nos testes de PCR. Para a purificação, foi empregado um conjunto de reagentes pertencentes ao “Gene Clean Kit – BIO 101” (Vista/CA). O procedimento utilizado para a purificação seguiu as instruções do fabricante.

2.2.3 Detecção de fitoplasmas por duplo PCR

O DNA total de cada amostra, com ou sem purificação, foi usado nos testes de detecção por PCR. Em cada reação de PCR foi colocada uma alíquota de 1 µL de DNA sem diluição ou diluído em água deionizada (‘miliQ’) nas proporções de 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100.

Os iniciadores (“primers”) universais R16 mF2/mR1, P1/P7, P1/Tint e R16F2n/R2 foram empregados em duplo PCR. Na primeira reação, foi usado o par R16 mF1/mR1, P1/P7 ou P1/Tint sendo o produto amplificado diluído em água deionizada na proporção de 1:50 e usado como molde para a segunda reação com o par R16F2n/R2. Esse último par de iniciadores amplifica uma sequência determinada de aproximadamente 1,2 Kb do DNA genômico dos fitoplasmas, correspondente ao 16S rDNA.

As seqüências dos iniciadores utilizados encontram-se descritas abaixo:

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

R16 P7- 5’CGT CCT TCA TCG GCT CTT3’ (SMART et al., 1996)

R16 Tint- 5’TCA GGC GTG TGC TCT AAC CAG C3’ (SMART et.al., 1996)

R16 F2n- 5’GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG3’ (GUNDERSEN; LEE, 1996)

R16 R2- 5’TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G3’(GUNDERSEN; LEE, 1996)

Cada reação de PCR foi processada utilizando um volume final de 25 µL, contendo os seguintes componentes: 1 µL de extrato de DNA sem diluição ou diluído de cada amostra,

incluindo padrões positivos e negativos; 18,7 µL de água deionizada ('miliQ'); 0,5 µL de cada iniciador (na concentração de 20 pmol/µL); 2 µL de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo); 2,5 µL de solução tampão 10 X PCR e 0,17 µL de Amplitaq 5 U/µL. Para os iniciadores R16 mF2/mR1, P1/P7 e R16F2n/R2 o termociclador foi programado para 35 ciclos, compreendendo as etapas: 1 minuto a 94°C para desnaturação do ácido nucléico, 2 minutos a 50°C para o anelamento e 3 minutos a 72°C para a fase de extensão dos iniciadores. Tempos adicionais 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. Já para o par de iniciadores P1/Tint, o termociclador foi programado para 30 ciclos, sendo que cada ciclo compreendeu as etapas: 1 minuto a 94°C para a desnaturação, 1 minuto a 56°C para o anelamento e 2 minutos a 72°C para a extensão.

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

2.2.4 Identificação de fitoplasmas por PCR

A identificação de fitoplasmas por PCR foi feita a partir de produtos obtidos com os iniciadores universais usados na primeira reação de PCR. Os produtos da primeira reação foram diluídos em água deionizada ('miliQ') nas proporções de 1:30 ou 1:50 e submetidos à re-amplificação, empregando-se agora, os iniciadores específicos R16(I)F1/R1, R16(III)F2/R1 e R16(V)F1/R1, os quais permitem a identificação de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrV, respectivamente (LEE et al., 1994).

As reações de PCR foram processadas nas mesmas condições utilizadas para detecção com o uso dos iniciadores R16 mF2/mR1, P1/P7 e R16F2n/R2 descritas anteriormente. Os padrões positivos utilizados para cada grupo foram DNA de plantas de milho portadoras do fitoplasma do enfezamento vermelho para o grupo 16SrI, DNA de plantas de chuchu infectadas pelo fitoplasma do superbrotamento para o grupo 16SrIII e DNA de plantas de crotalária portadoras do fitoplasma do superbrotamento para o grupo 16SrV. Como padrões negativos foram usados DNA extraído de plantas sadias de videira e água deionizada ('miliQ') autoclavada.

As seqüências dos iniciadores específicos utilizados segue abaixo:

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

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

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

R16(III)R1- 5'TCC GAA CTG AGA TTG A 3'

R16(V)F1- 5'TTA AAA AGA CTT CTT CGG 3'

R16(V)R1- 5'TTC AAT CCG TAC TGA GAC TAC C 3'

2.2.5 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 ou TBE 0,5X. A corrida eletroforética se deu à voltagem constante de 65 V por 90 minutos. No princípio, a coloração dos géis foi feita através da imersão em uma solução de brometo de etídio por 10 minutos, seguida por uma lavagem em água destilada por mais 10 minutos. Posteriormente, o brometo de etídio foi substituído e a coloração passou a ser feita com o produto Sybr safe[®] 1% (Invitrogen). A observação dos fragmentos genômicos amplificados foi feita em transiluminador de luz ultravioleta e o padrão de peso molecular utilizado foi 1 Kb ladder (Life Technologies).

2.2.6 Identificação de fitoplasmas por análise de RFLP

As seqüências amplificadas com os iniciadores universais R16 F2n/R2, por duplo PCR, foram analisadas através do uso de diversas enzimas de restrição por RFLP. Uma alíquota de 5 µL de cada produto de PCR foi digerida, separadamente, por diferentes enzimas segundo as instruções dos fabricantes, durante um período de aproximadamente 27 horas a 37°C. As enzimas *AluI*, *Bsh* 12361, *HhaI*, *HinfI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI* e *RsaI* foram utilizadas na identificação dos fitoplasmas presentes nas amostras de videira e detectados pelo método de PCR.

Os produtos da digestão enzimática foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 5%. A corrida eletroforética foi processada usando tampão TBE 1X a uma voltagem inicial de 220 V por 5 minutos e, em seguida, uma voltagem constante de 150 V por 45 minutos. Os géis foram corados através de imersão em uma solução de Sybr safe[®] 1% (Invitrogen) por 30 a 40 minutos. Os fragmentos de DNA gerados foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

Os padrões utilizados para os grupos 16SrI e 16SrIII na análise de RFLP foram, respectivamente, os fragmentos correspondentes ao 16S rDNA dos fitoplasmas do enfezamento vermelho do milho e do superbrotamento do chuchu. Como marcador de peso molecular foi usado o Φ X174RFHaeIII (Invitrogen).

O perfil eletroforético obtido para cada fitoplasma foi comparado aos padrões existentes na literatura para a respectiva enzima de restrição (LEE et al., 1998b; DAVIS et al., 1998b; MONTANO et al., 2000; BARROS et al., 2002), visando determinar a que grupos de fitoplasmas pertenciam os fitoplasmas encontrados nas plantas de videira.

Seguem descritas abaixo as enzimas de restrição utilizadas na identificação dos fitoplasmas da videira e seus respectivos sítios de corte:

- *AluI*: AG▼CT
- *KpnI*: GGTAC▼C
- *MseI*: TT▼AA
- *RsaI*: GT▼AC
- *HhaI*: GCG▼C
- *HpaII*: C▼CGG
- *HinfI*: G▼ANTC
- *MboI*: ▼GATC
- Bsh 12361: CG▼CG

2.2.7 Sequenciamento genômico do 16S rDNA do fitoplasma

Os produtos amplificados pelo duplo PCR correspondentes às amostras 1, 2, 3 e 4 foram clonados em *Escherichia coli* com o objetivo de confirmar a identidade dos fitoplasmas encontrados na videira e verificar sua posição filogenética em relação a outros fitoplasmas conhecidos. Os fragmentos de 1,2 Kb clonados foram seqüenciados e, através das seqüências nucleotídicas do 16S rDNA obtidas, foram comparados entre si e com seqüências de outros fitoplasmas já identificados.

2.2.8 Clonagem

Para a clonagem em *E. coli*, uma quantia de 100 μ L dos produtos de PCR obtidos foi purificada utilizando o kit de purificação PureLink™ (Invitrogen), seguindo protocolo

recomendado pelo fabricante. Foi feita a quantificação estimada da concentração de DNA nas amostras aplicando 1 μL do DNA purificado com mais 3 μL do tampão de carregamento em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X, acrescido do corante Sybr safe[®] (Invitrogen). O gel foi submetido à corrida eletroforética por 60 minutos a 65 V. Os fragmentos de DNA purificado, de aproximadamente 1,2 Kb, foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta juntamente com o marcador Lambda DNA. Os produtos de PCR purificados com concentração de DNA estima superior a 200 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ foram mantidos a -20°C para posterior utilização na reação de sequenciamento.

Os produtos de PCR purificados foram ligados em vetor pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega). Para a ligação do DNA purificado ao vetor plasmidial, usaram-se microtubos de 1,5 mL mantidos no gelo. Em cada microtubo foram colocados 3 μL do DNA purificado, 1 μL do vetor (25 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 5 μL de tampão ligase 2X e 1 μL de T4 DNA ligase (3 U μL^{-1}), totalizando 10 μL de reação. A reação de ligação foi mantida em geladeira a 4°C por 12 horas. Após esse período, foi feita a transformação das células competentes. Uma alíquota de 2 μL da reação de ligação foi colocada em novos microtubos de 1,5 mL contendo 50 μL de células competentes de *E. coli*, estirpe DH5 α , preparadas conforme protocolo descrito por Aragão e Rech (1998).

Os microtubos foram mantidos no gelo por 30 minutos. Em seguida, foi feito o choque térmico incubando os microtubos em “banho-maria” a 42°C por 50 segundos e imediatamente transferindo-os para o gelo por 2 minutos. Na câmara de fluxo, foram adicionados 450 μL de meio SOC (1% tripton; 0,5% extrato de levedura; 8,5 mM de NaCl; 2,5 mM de KCl; 0,01 mM de MgCl_2 ; 0,02 mM de glicose e água destilada para completar o volume para 1000 mL) pré-aquecido a 37°C às células transformadas, e os microtubos permaneceram de 2 a 3 horas a 37°C em agitador moderado (ajustado para 200 rpm) para o crescimento das células transformadas. Após o período de crescimento, uma alíquota de 100 μL da suspensão bacteriana foi transferida para placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) (BERTANI, 1951; LURIA; BURROUS, 1957) acrescido de 200 μL de ampicilina (50 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 20 μL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosida) na concentração de 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ e 20 μL de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosida) na concentração de 50 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Os componentes X-gal e IPTG serviram para avaliar a atividade de β -galactosidase nos transformantes, permitindo diferenciá-los dos não-transformantes. Para cada microtubo transformado, foram feitas três placas. As placas foram mantidas por 12 horas em estufa a 37°C para o crescimento e

quantificação das colônias, permitindo assim a seleção das células transformadas com DNA plasmidial recombinante. As colônias recombinantes com o fragmento de DNA inserido no sítio de clonagem exibiram a cor branca (produzindo β -galactosidase não funcional), enquanto as colônias não recombinantes mostraram-se azuis (produzindo β -galactosidase funcional). Em câmara de fluxo, as placas foram abertas e foram selecionados três clones (colônias brancas, pequenas, translúcidas e o mais isoladas possível) para cada amostra clonada. Usando palitos estéreis, as colônias foram transferidas para tubos do tipo “Falcon” com capacidade para 50 mL contendo 10 mL de meio LB líquido. Os tubos foram mantidos em agitador ajustado para 200 rpm por 12 horas a 37°C para crescimento em meio líquido. Após as 12 horas, procedeu-se a extração do DNA plasmidial para dois clones de cada amostra clonada. O terceiro clone foi preservado em glicerol 50% e armazenado em ultra freezer, a -80°C.

A extração do DNA plasmidial foi feita usando o kit comercial Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante.

Antes do sequenciamento dos clones foi feita a confirmação desses no vetor plasmidial, através de uma reação de PCR com os iniciadores universais R16 F2n/R2 e de uma digestão enzimática com a enzima *EcoRI*. As condições para a reação de PCR foram as mesmas descritas no item 3.3. Para a digestão com a enzima *EcoRI*, foram usados 2 μ L de DNA plasmidial, 0,1 μ L da enzima, 1 μ L do tampão da enzima e 6,9 μ L de água deionizada (‘miliQ’). A digestão permaneceu em ‘banho-maria’ por 3 horas e em seguida foi corrida em gel de poliacrilamida por 45 minutos a 150 V com o marcador de peso molecular Φ X174RFHaeIII (Invitrogen).

Após a confirmação dos clones no vetor plasmidial, foi feita uma nova reação de PCR para um volume final de 100 μ L com o par de iniciadores M13F/M13R para o vetor pGEM T. O produto de PCR foi purificado com o kit de purificação PureLink[™] (Invitrogen) e corrido em gel de agarose 1% em tampão 0,5X TBE para quantificação estimada da concentração do DNA. Também foi aplicado no gel o marcador Lambda DNA. Foram encaminhadas para sequenciamento as amostras que apresentaram uma concentração estimada de DNA superior a 200 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

A reação de sequenciamento foi feita com 3 μ L de água deionizada (‘miliQ’) autoclavada, 2 μ L de Buffer 2,5X (Save Money, 1M Tris-HCl pH 9,0; 1M MgCl_2), 1 μ L de cada um dos iniciadores T7/SP6 na concentração de 5 $\text{pmoles} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 2 μ L de DYEnamic (GE) e 2 μ L de DNA de cada amostra clonada. O termociclador foi programado para 30 ciclos, compreendendo as etapas de desnaturação por 20 segundos a 95°C, anelamento por 15 segundos a 55°C e extensão

por 60 segundos a 60°C. Estes iniciadores flanqueiam o vetor pGEM T, tornando possível obter o DNA de interesse clonado no plasmídeo utilizado. A partir da reação de PCR foi feita a precipitação dos fragmentos utilizando 2 µL de sódio/EDTA, 60 µL de etanol 100% e centrifugação por 15 minutos a 14.000 rpm. Ao precipitado foram adicionados 150 µL de etanol 70% e feita uma nova centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi levado para secagem a 40°C por 10 minutos. As amostras amplificadas foram diluídas em 10 µL de Hi-Di Formamida e dispostas nas placas do sequenciador (ABI 3100-ABI Prism/Applied Biosystems).

2.2.9 Análise filogenética e de sítios putativos de restrição

As seqüências do gene 16S rDNA dos fitoplasmas associados ao amarelo da videira foram analisadas juntamente com as seqüências representativas de diversos grupos e subgrupos de fitoplasmas, depositadas no GeneBank (Tabela 3). As análises foram feitas com o auxílio de programas para construção (Bio Edit e PhredPhrap) e análise de seqüências (Multiple Sequence Alignment-CLUSTALW). Para elaboração das árvores filogenéticas, usou-se o método Neighbour-joining e o “Boostraping” foi processado por 1000 vezes. Os mapas de sítios putativos de restrição para as seqüências do 16S rDNA dos fitoplasmas encontrados na videira e dos fitoplasmas representativos de alguns subgrupos foram gerados com as mesmas endonucleases usadas na análise de RFLP, através do programa pDRAW3.2.

Tabela 3 - Sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA representantes de fitoplasmas dos 16 grupos e de subgrupos do grupo 16SrI, depositadas no GeneBank e usadas no presente trabalho para construção da árvore filogenética

Fitoplasma	Doença	(continua)	
		Nº de acesso GenBank	Referências
Amostra 1	Amarelo da videira		Presente estudo
Amostra 2	Amarelo da videira		Presente estudo
Amostra 3	Amarelo da videira		Presente estudo
Amostra 4	Amarelo da videira		Presente estudo
16SrI: Aster yellows			
I-A	Chrysanthemum yellows (AY)	AY180956	GenBank
I-B	Maise bushy stunt (MBS)	AY265208	LEE et al., (2004)
I-C	Clover phylody (CPH)	AF222065	LEE et al., (1998b)
I-D	Paulownia witches' broom (PaWB)	AY265206	LEE et al., (1998b)
I-E	Blueberry stunt (BBs)	AY265213	LEE et al., (1998b)
I-F	Apricot chlorotic leaf roll (ACLR-AY)	AY265211	SCHNEIDER et al., (1993)
16SrII: Peanut WB			
II-A	Peanut witche's broom (PnWB)	L33765	GUNDERSEN et al., (1994)
16SrIII: X-Disease			
III-A	Canada peach X-disease (CX)	L33733	GUNDERSEN et al., (1994)
III-B	Clover yellow edge (CYE)	AF175304	DAVIS; DALLY, 2001
III-E	Spiraca stunt (SP1)	AF190228	GenBank
III-F	Milkweed yellows (MW1)	AF510724	GenBank
III-G	Walnut witches' broom (MWB)	AF190226	GenBank
III-H	Poinsettia branch-inducing (PoiBI)	AF190223	GenBank
III-I	Virginia grapevine yellows (VGY)	AF060875	DAVIS et al., (1998b)
III-J	Chayote witches' broom (ChWB)	AF147706	MONTANO et al., (2000)
III-P	Dandelion virescence (Danvir)	AF370119	JOMANTIENE et al., (2002)
16SrIV:Coconut lethal yellows			
IV-A	Coconut lethal yellowing (LYJ-C8)	AF498307	HARRISON et al., (2002)
16SrV:Elm yellows			
V-A	Elm yellows (EY1)	AY197655	LEE et al., (2004)
16SrVI:Clover proliferation			
VI-A	Clover proliferation (CP)	AY390261	HIRUKI; WANG (2004)
16SrVII: Ash yellows			
VII-B	Erigeron witches' -broom (EriWB)	AY034608	BARROS et al., (2002)

Tabela 3 - Sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA representantes de fitoplasmas dos 16 grupos e de subgrupos do grupo 16SrI, depositadas no GeneBank e usadas no presente trabalho para construção da árvore filogenética

Fitoplasma	Doença	Nº de acesso GeneBank	(conclusão) Referências
16SrVIII: Loofah witche's broom			
VIII-A	Loofah witches' broom (LfWB)	AF353090	GenBank
16SrIX: Pigeon pea witche's broom group			
IX-A	Pigeon pea witches' broom (PPWB)	AF248993	MARTINI et al., (2007)
16SrX: Apple proliferation			
X-A	Apple proliferation (AP)	AJ542541	SEEMULLER; SCHNEIDER (2004)
16SrXI: Rice yellow dwarf			
XI-A	Rice yellow dwarf (RYD)	D12581	NAMBA et al., (1993)
16SrXII:Stolbur group			
XII-D	Hydrangea phyllody (JHP)	AB010425	SAWAYANAGI et al., (1999)
16SrXIII: Mexican Periwinkle virescence			
XIII-A	Mexican Periwinkle virescence (MPV)	AF248960	DAVIS; DALLY (2001)
16SrXIV:			
XIV-A	Bermudagrass white leaf (BGWL)	AF248961	DAVIS; DALLY (2001)
16SrXV: Hibiscus witches' broom group			
XV	Hibiscus witches' broom (HibWB26)	AF147708	MONTANO et al., (2001)
16SrXVII:			
	'Candidatus Phytoplasma caricae'	AY725234	AROCHA et al., (2005)
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	M23932	WEISBURG et al., (1989)

2.2.10 Teste de transmissão por enxertia

Para os testes de transmissão de fitoplasmas por enxertia, a fonte de material sadio foram plantas de videira européia obtidas a partir de sementes. Para assegurar a sanidade deste material, estas plantas foram submetidas a repetidos testes de PCR para detecção de fitoplasmas, realizados periodicamente. A fonte de material doente foram plantas de videira comprovadamente

infectadas por fitoplasmas, detectados através de testes de PCR realizados em trabalhos anteriores. A relação das plantas usadas nos testes de enxertia está indicada na Tabela 4.

Tabela 4 - Plantas sadias e infectadas por fitoplasmas usadas como fonte de material para os testes de enxertia

Plantas sadias	Plantas infectadas
Baco 22A	Brasil (MV1781)
Itália (seedling 01/1996)	Brasil (TP1780)
	Brasil (MV1775)
	Benitaka (LD1587)

As enxertias foram realizadas de duas formas diferentes, por borbulhia e garfagem. Na borbulhia, foram enxertadas gemas verdes no porta-enxerto e, na garfagem, foram usados ‘garfos’ de ramos verdes para enxertia no porta-enxerto.

Foram feitas duas combinações de enxertia de material sadio/doente para os testes de transmissão. Na primeira combinação (Tabela 5), o teste de transmissão do patógeno foi feito através da enxertia de material sadio (enxerto) em planta doente (porta-enxerto) e, na outra combinação (Tabela 6), foi feito o teste de transmissão inverso, ou seja, foi enxertado material doente (enxerto) em uma planta sadia (porta-enxerto). Para cada combinação foram feitas 11 enxertias, totalizando no final 22 plantas enxertadas.

A transmissão do patógeno foi avaliada através da manifestação de sintomas e por testes de PCR. Para as plantas que tiveram a enxertia de material sadio (enxerto) em planta doente, a avaliação foi feita no ramo que se desenvolveu a partir da enxertia. Já para as plantas que tiveram a enxertia de material doente em planta sadia (porta-enxerto), a avaliação foi feita no porta-enxerto. Os testes de PCR foram feitos periodicamente, de acordo com a disponibilidade de material vegetal. Nas amostragens das plantas enxertadas foram coletadas folhas de diferentes partes do ramo e folhas de diferentes partes do porta-enxerto, de acordo com o teste de transmissão realizado. Esse material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido, sendo retirada uma pequena alíquota para extração do DNA total, posteriormente usado nos testes de detecção por PCR. As plantas enxertadas foram mantidas em casa-de-vegetação, em vasos.

Tabela 5 - Teste de transmissão de fitoplasmas por enxertia usando material sadio como enxerto para brotação e desenvolvimento em planta doente (porta-enxerto)

Número da planta	Planta	Material enxertado	Data da enxertia
1	Baco 22A/Brasil (MV1781)	Garfo verde	14/03/2003
2	Baco 22A/Brasil (MV1781)	Gema verde	14/03/2003
3	Baco 22A/Brasil (TP1780)	Garfo verde	14/03/2003
4	Baco 22A/Brasil (TP1780)	Gema verde	14/03/2003
5	Baco 22A/Brasil (MV1775)	Garfo verde	14/03/2003
6	Baco 22A/Brasil (MV1775)	Gema verde	14/03/2003
7	Baco 22A/Benitaka (LD1587)	Garfo verde	14/03/2003
8	Baco 22A/Brasil (MV1781)	Gema verde	16/01/2007
17	Itália (seedling 01/1996)/Benitaka (LD1587)	Gema verde	16/01/2007
18	Itália (seedling 01/1996)/Brasil (TP1780)	Gema verde	14/03/2007
22	Baco 22A/Brasil (MV1781)	Garfo verde	10/10/2007

Tabela 6 - Teste de transmissão de fitoplasmas por enxertia usando material doente como enxerto para brotação e desenvolvimento em planta sadia (porta-enxerto)

Número da planta	Planta	Material enxertado	Data da enxertia
9	Brasil (TP1780)/Baco 22A	Gema verde	16/01/2007
10	Brasil (TP1780)/Baco 22A	Garfo verde	16/01/2007
11	Benitaka (LD1587)/Baco 22A	Garfo verde	16/01/2007
12	Benitaka (LD1587)/Baco 22A	Gema verde	20/03/2007
13	Brasil (MV1781)/Baco 22A	Garfo verde	16/01/2007
14	Brasil (MV1781)/Baco 22A	Gema verde	20/03/2007
15	Brasil (MV1781)/Baco 22A	Gema verde	20/03/2007
16	Brasil (MV1781)/Baco 22A	Gema verde	20/03/2007
19	Brasil (TP1780)/Itália (seedling 01/1996)	Gema verde	16/01/2007
20	Brasil (MV1781)/Itália (seedling 01/1996)	Gema verde	20/03/2007
21	Brasil (MV1781)/Itália (seedling 01/1996)	Garfo verde	16/01/2007

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Detecção de fitoplasmas em videiras em diferentes fases fenológicas através de duplo PCR

As cinco plantas mantidas em casa de vegetação apresentaram sintomas semelhantes àqueles relatados em outras regiões produtoras de uvas onde a doença ocorre. Estes sintomas foram caracterizados por descoloração e enrolamento marginal das folhas, avermelhamento ou amarelecimento do limbo e nervuras, aspecto quebradiço das folhas, lignificação irregular dos ramos, necrose e rachaduras das nervuras principais (CAUDWELL, 1988) (Figuras 1, 2 e 3). Os sintomas foram bastante evidentes e se tornavam mais intensos com a proximidade do período de dormência das plantas (outono-inverno), nem sempre ocorrendo simultaneamente. Vale ressaltar que, no outono, principalmente nas regiões de clima temperado, as folhas da videira apresentam amarelecimento ou avermelhamento, respectivamente, nas variedades brancas e tintas antes da queda (SIMÃO, 1998), sendo necessário observar outros sintomas da doença, como enrigecimento do limbo foliar e declínio rápido das brotações, para um diagnóstico mais apurado.

As porcentagens de detecção de fitoplasmas nas amostras foram de 54,0 e 51,5%, respectivamente, para as variedades ‘Brasil’ e ‘Benitaka’, ao longo do período de amostragem (Tabela 7). A presença de fitoplasmas nos tecidos amostrados foi demonstrada pela visualização de bandas de aproximadamente 1,2 Kb, em gel de agarose. As amostras de milho e chuchu, usadas como padrões positivos nas reações de PCR, também apresentaram bandas típicas de 1,2 Kb, enquanto nenhuma amplificação foi observada quando DNA extraído de planta sadia e água foram usados nas reações. A Figura 3 representa as amplificações obtidas com os iniciadores universais P1/Tint e F2n/R2 para as amostras de videira e para os padrões positivos e a ausência de amplificação para os padrões negativos.

Figura 1 - Sintomas do tipo amarelo apresentados por videiras da variedade ‘Benitaka’ cultivada no Brasil. Planta exibindo amarelecimento e enrolamento do limbo foliar (Fotos cedidas pelo Dr. Hugo Kuniyuki)

Garcia-Chapa et al. (2003) observaram que diferentes cultivares de pereira (*Pyrus communis* L.) apresentaram padrões distintos de detecção de fitoplasmas ao longo do tempo, o que poderia resultar de diferentes suscetibilidades às doenças associadas a estes patógenos. No entanto, ‘Brasil’ e ‘Benitaka’ são variedades obtidas por mutação somática da videira européia ‘Itália’, sendo muito similares, diferindo basicamente pela coloração das bagas (KISHINO e ROBERTO, 2007). Desta forma, é improvável que diferenças significativas sejam verificadas na flutuação da presença de fitoplasmas em seus tecidos, o que por si só facilitaria as recomendações quanto à época de coleta de amostras para fins de detecção.

Figura 2 - Sintomas do tipo amarelo apresentados por folhas de videiras da variedade 'Benitaka' cultivada no Brasil. Folhas exibindo amarelecimento e enrolamento do limbo foliar, e necrose das nervuras (Fotos cedidas pelo Dr. Hugo Kuniyuki)

Tabela 7 - Detecção de fitoplasmas em plantas de videira, através de duplo PCR com iniciadores universais (mF2/R1, P1/P7 ou P1/Tint e F2n/R2) em diferentes épocas de coleta, estabelecidas de acordo com as fases fenológicas da planta

Fase Fenológica da planta	Datas de coleta e parte da planta amostrada		Planta e número da amostra				
			Brasil (MV1781)	Benitaka (LD1587) planta 2	Brasil (TP1780) planta 1	Benitaka (LD1587) planta 1	Brasil (TP1780) planta 2
			Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Maturação	Coleta 1 13/04/05	Folhas maduras	X	X	+	X	X
Dormência	Coleta 2 10/07/05	Ramos dormentes	X	X	+	+	X
Dormência	Coleta 3 01/06/06	Folhas senescentes	+	-	+	+	+
Dormência	Coleta 4 25/06/06	Ramos dormentes	+	+	-	+	-
Brotação	Coleta 5 02/08/06	Folhas novas e ramos verdes	+	-	-	+	+
Maturação	Coleta 6 27/03/07	Folhas maduras	+	+	+	+	+
Dormência	Coleta 7 13/06/07	Folhas senescentes	+	-	+	-	-
Dormência	Coleta 8 27/07/07	Ramos dormentes	+	+	-	-	-
Brotação	Coleta 9 12/09/07	Folhas novas e ramos verdes	+	+	+	+	+
Brotação	Coleta 10 26/09/07	Folhas novas e ramos verdes	+	+	+	+	+
Maturação	Coleta 11 23/01/07	Folhas maduras	-	-	-	+	-
Maturação	Coleta 12 16/04/08	Folhas maduras	-	-	-	-	+
Dormência	Coleta 13 14/08/08	Folhas senescentes	-	-	-	-	-
		Ramos dormentes	-	-	-	+	-
Brotação	Coleta 14 13/10/08	Folhas novas e ramos verdes	-	-	+	-	-
Maturação	Coleta 15 11/12/08	Folhas maduras	-	+	+	-	+

X = planta não amostrada nesta data;

+ presença de fitoplasmas;

- ausência de fitoplasmas

Figura 3 - Amplificação do 16S rRNA de fitoplasmas presentes em plantas de videira, através de duplo PCR com os iniciadores universais P1/Tint e F2n/R2. M= marcador molecular 1 Kb ladder; Colunas 1 a 5= amostras de videira, sendo 1= Brasil (MV1781, 2= Benitaka (LD1587) planta 2, 3= Brasil (TP1780) planta 1, 4= Benitaka (LD1587) planta 1 e 5= Brasil (TP1780) planta 2; Vs= padrão negativo planta de videira sadia; Ag= padrão negativo água; Mi= padrão positivo milho; Ch= padrão positivo chuchu

Fitoplasmas foram detectados nas plantas sintomáticas em todas as fases fenológicas avaliadas (Tabela 7). A detecção por duplo PCR foi de 70%, 52% e 44%, respectivamente, durante a brotação pós-dormência, maturação e período de dormência, considerando-se o total de 73 análises realizadas durante o experimento. Durante o período de florescimento, em outubro de 2008, a detecção só foi evidenciada em 20% das amostras, e exclusivamente na variedade 'Brasil'.

Fitoplasmas foram detectados em todas as partes da planta amostradas, sendo que a porcentagem de detecção foi equivalente à porcentagem de detecção nas fases fenológicas em que as partes foram coletadas (folhas maduras 52%, folhas verdes e ramos verdes 70%, ramos dormentes 47% e folhas senescentes 40%). Green, Thompson e Mackenzie (1999) relataram que diversos tecidos vegetais podem ser empregados para a detecção de fitoplasmas em espécies frutíferas, entre eles raízes, lâminas de ramos e lenho dormentes, pecíolos e nervura central das folhas maduras e mesmo folhas jovens inteiras.

Neste trabalho, como já foi referida, a porcentagem de detecção foi variável em função das fases fenológicas ou do órgão vegetal considerado, no entanto em alguns períodos de amostragem não se constatou a presença do agente, mesmo sendo a planta comprovadamente portadora de fitoplasmas. Estudos de mesma natureza mostraram uma distribuição marcadamente irregular dos fitoplasmas em plantas frutíferas lenhosas que apresentam período de dormência, o que resulta em dificuldades para a detecção do patógeno (LEE et al., 1995; HEINRICH et al.,

2001). Outros fatores que podem dificultar a detecção de fitoplasmas são a sua baixa concentração nos tecidos vegetais, a presença de substâncias inibidoras ou oxidantes nas plantas tais como polifenóis e polissacarídeo, além de características inerentes aos métodos de extração e purificação do DNA. Neste último caso, pode ocorrer a formação de dímeros, bandas inespecíficas ou ainda falsos positivos pela reação com DNA de plastídeos e cloroplastos (HEINRICH et al., 2001; GREEN; THOMPSON; MacKENZIE, 1999; MARTÍN; TORRES, 2001). A técnica molecular utilizada também tem influência na detecção, fato que foi demonstrado em um trabalho no qual fitoplasmas só foram detectados em folhas de videira que apresentavam sintomas de flavescência dourada depois que as reações de PCR foram conduzidas com o emprego de um kit comercial (MARTÍN; TORRES, 2001).

O presente trabalho mostrou que a detecção de fitoplasmas foi menor em 2008 quando comparada com os demais anos (Tabela 7). Este tipo de resultado, embora contrário, também foi relatado por Constable, Gibb e Symons (2003), os quais observaram aumento na porcentagem de videiras infectadas de um ano para outro, sendo esse fenômeno atribuído à taxa de crescimento e renovação do floema, favorecendo a disseminação do patógeno dentro da planta.

A máxima porcentagem de detecção (100% das amostras) foi verificada para as amostras coletadas no início da primavera, no mês de setembro. Como mesmo dentro de uma fase fenológica há considerável variação de crescimento e condição fisiológica dos tecidos, este período talvez corresponda ao estágio ótimo para confirmação da presença de fitoplasmas em plantas afetadas pelos amarelos, nas regiões de São Paulo e Paraná. Del Serrone e Barba (1996), trabalhando com *Vitis vinifera* na Itália, consideraram que os tecidos mais apropriados para a detecção de fitoplasmas em videiras foram folhas e ramos maduros, coletados na fase de amadurecimento dos frutos. Os autores também reportaram reduzidos níveis de detecção durante a fase de florescimento, como observado neste trabalho, embora as taxas de detecção na Itália tenham sido baixas no início da primavera, provavelmente devido à influência do inverno mais rigoroso sobre a dormência das plantas. Estudo mais recente com videiras na Austrália, no entanto, relatou a presença de fitoplasmas associados aos amarelos de forma variável ao longo das estações do ano, sendo o início da primavera a fase mais apropriada para a amostragem de material vegetal para detecção (CONSTABLE; GIBB; SYMONS, 2003).

Contrariamente aos resultados obtidos para videira, em outras espécies de frutíferas temperadas perenes a taxa de detecção de fitoplasmas tem sido mais elevada durante o período de

dormência, reduzindo-se sensivelmente no início da primavera, após a brotação e reativação da translocação de seiva, sendo ramos dormentes o tecido amostral mais indicado (GARCIA-CHAPA et al., 2003). Jarausch, Lansac e Dosba (1999) detectaram fitoplasmas associados a amarelos na parte aérea de *Prunus* spp. desde o verão (pleno crescimento vegetativo e maturação) até a queda de folhas no outono, na França, em condições de campo. Contudo, folhas novas no início da primavera não possibilitaram a detecção dos fitoplasmas, persistentes apenas nas raízes dos porta-enxertos. Em pereira, fitoplasmas causando declínio foram constatados no floema de ramos e em folhas novas, especialmente durante o período de dormência e apenas ao final da primavera, respectivamente (ERREA; AGUELO; HORMAZA, 2002). Possível explicação para a baixa detecção de fitoplasmas durante certos períodos do ano seria a destruição de porções de floema formado na estação de crescimento anterior, o que resultaria na diminuição da concentração de fitoplasmas na planta; além disto, deve ser considerado o intervalo de tempo necessário para a passagem de fitoplasmas para as novas folhas em formação na estação de crescimento corrente. Se as condições de inverno forem brandas, o fitoplasma pode permanecer vivo em toda a planta, e não apenas no sistema radicular (JARAUSCH; LANZAC; DOSBA, 1999).

2.3.2 Identificação de fitoplasmas por PCR

Após a primeira reação de PCR com os iniciadores universais mF2/R1, P1/P7 ou P1/Tint, os produtos foram diluídos na proporção de 1:30 ou 1:50 e foi conduzida a identificação molecular, através de duplo PCR, com o emprego de iniciadores específicos para os grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrV. Os resultados estão contidos na Tabela 8. A amplificação de fragmentos genômicos de 1,1 Kb e 0,8 Kb com os pares de iniciadores para os grupos específicos 16SrI e 16SrIII, respectivamente, está de acordo com o trabalho de Lee et al., (1994). Estes resultados evidenciaram que fitoplasmas pertencentes a estes grupos estão presentes nas plantas de videira avaliadas neste estudo.

Tabela 8 - Identificação de fitoplasmas presentes em amostras de videira, através de duplo PCR conduzido com os iniciadores universais e específicos para a classificação destes agentes nos grupos 16SrI e 16SrIII

Número da planta	Variedade	Procedência	Grupo Específico
1	Brasil (MV1781)	Marialva-PR	16SrI e 16SrIII
2	Benitaka (LD1587) planta 2	Londrina-PR	16SrI e 16SrIII
3	Brasil (TP1780) planta 1	Tupi Paulista-SP	16SrI e 16SrIII
4	Benitaka (LD1587) planta 1	Londrina-PR	16SrI
5	Brasil (TP1780) planta 2	Tupi Paulista-SP	16SrI e 16SrIII

Fitoplasmas do grupo 16SrI foram identificados em todas as cinco plantas submetidas ao teste de PCR com iniciadores específicos (Figura 4). Nas plantas 1, 2, 3, e 5 também foram identificados fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII, através da amplificação de fragmentos genômicos de aproximadamente 0,8Kb (Figura 5), evidenciando a ocorrência de infecção mista nestas plantas.

Os padrões positivos foram representados pelo fitoplasma do enfezamento vermelho do milho para o grupo 16SrI e pelo fitoplasma do superbrotamento do chuchuzeiro para o grupo 16SrIII, os quais também apresentaram resultados positivos, com a amplificação de fragmentos de 1,1 Kb e 0,8 Kb, respectivamente.

Nenhum fragmento do 16S rRNA de fitoplasma foi amplificado com os iniciadores específicos para fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrV, a partir das amostras de videira (dados não apresentados). Estes iniciadores foram usados em todas as amostragens devido ao fato de o agente causal da flavescência dourada ser classificado dentro do grupo 16SrV, como constataram diversos trabalhos (PRINCE et al., 1993; DAIRE et al., 1997; LEE et al., 1998b; MARTINI & MURARI, 1999; DAVIS & DALLY, 2001). Dessa forma, foi possível evidenciar que as plantas avaliadas não estavam infectadas por este fitoplasma.

Os testes de PCR para a identificação de fitoplasmas permitiram demonstrar a ocorrência de dois diferentes grupos de fitoplasmas associados aos sintomas do tipo amarelo nas videiras avaliadas. Também foi possível constatar a presença concomitante destes dois grupos na mesma planta hospedeira, fato conhecido por infecção mista. Lee, Davis e Gundersen-Rindal (2000) relataram que plantas e insetos vetores podem compartilhar dois ou mais tipos distintos de fitoplasmas e que infecções mistas em uma mesma planta são muito comuns, ocorrendo com

freqüência na natureza. As infecções mistas têm sido relatadas em várias espécies botânicas do mundo todo, entre elas, olerícolas como o tomate e o repolho (AMARAL MELLO et al., 2006; AMARAL MELLO, 2007), ornamentais como o lírio e a primavera (BERTACCINI et al., 2002; SILVA, 2008) e muitas espécies frutíferas. Lee et al. (1995) realizaram na Itália um trabalho investigativo de detecção de fitoplasmas em diversas fruteiras perenes que apresentavam sintomas de declínio e constataram a presença de infecções mistas em plantas de nectarina, ameixa japonesa, pêra e damasco pelos grupos 16SrI, 16SrIII, 16SrV e 16SrX. Bertaccini et al. (1998) relataram a presença conjunta de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrX em macieiras com sintomas de proliferação de ramos, provenientes do Canadá e da República Tcheca. Na videira, já foram encontradas infecções simultâneas por diferentes grupos e por subgrupos distintos de um mesmo grupo de fitoplasmas. Alma et al. (1996) confirmaram a ocorrência de infecções mistas em videiras pelos grupos 16SrI e 16SrV e pelos subgrupos 16SrI-B e 16SrI-G, na Itália. Orenstein, Zahavi e Weintraub (2001) detectaram os grupos 16SrI e 16SrIII em videiras na região de Golan Heights, em Israel, e Constable et al. (2003) relataram infecções mistas na Austrália.

Segundo Lee, Davis e Gundersen-Rindal (2000), o uso dos iniciadores universais específicos para identificação de fitoplasmas em reações de duplo PCR tem revelado que as plantas estão frequentemente infectadas por um fitoplasma predominante e por um ou mais fitoplasmas presentes em baixa concentração. No presente trabalho, o fitoplasma pertencente ao grupo 16SrI foi detectado com maior freqüência nas plantas de videira em relação ao fitoplasma do grupo 16SrIII. Outro fato constatado foi a detecção isolada do fitoplasma do grupo 16SrI em várias amostragens, enquanto que o fitoplasma do grupo 16SrIII sempre foi detectado em associação com o grupo 16SrI. Estes dados permitem dizer que, neste caso, o fitoplasma do grupo 16SrI provavelmente encontra-se nas plantas de videira de forma predominante e o grupo 16SrIII está presente em menor concentração, sendo detectado com menor freqüência.

Figura 4 - Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas presentes em plantas de videira, através de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint e R16(I)F1/R1 para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrI. M= marcador molecular 1 Kb ladder; Colunas 1 a 5= amostras de videira, sendo 1= Brasil (MV1781), 2= Benitaka (LD1587) planta 2, 3= Brasil (TP1780) planta 1, 4= Benitaka (LD1587) planta 1 e 5= Brasil (TP1780) planta 2; Mi= padrão positivo milho; Ch= padrão positivo chuchu

Figura 5 - Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas presentes em plantas de videira, através de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint e R16(III)F2/R1 para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrIII. M= marcador molecular 1 Kb ladder; Colunas 1 a 5= amostras de videira, sendo 1= Brasil (MV1781), 2= Benitaka (LD1587) planta 2, 3= Brasil (TP1780) planta 1, 4= Benitaka (LD1587) planta 1 e 5= Brasil (TP1780) planta 2; Mi= padrão positivo milho; Ch= padrão positivo chuchu

2.3.3 Identificação através de RFLP

As análises de RFLP foram conduzidas com os produtos de PCR amplificados pelos iniciadores universais P1/Tint na primeira reação e R16 F2n/R2 na segunda reação. Foram usados os isolados de fitoplasmas previamente identificados como membros dos grupos 16SrI e 16SrIII, através de PCR conduzido com os iniciadores específicos para estes grupos.

Para o fitoplasma do grupo 16SrI, as análises de RFLP foram realizadas com os produtos de PCR obtidos a partir de DNA extraído das plantas 1, 2, 3 e 4. Para todas as endonucleases usadas, os padrões eletroforéticos foram idênticos, sendo indistinguíveis entre si e dos padrões obtidos para o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho, representante do grupo 16SrI, subgrupo B (BEDENDO; DAVIS; DALLY, 2000), adotado como padrão neste trabalho (Figuras 6 e 7). As enzimas *KpnI* e *MseI* foram fundamentais para a identificação, pois o perfil gerado pela *KpnI* permitiu diferenciá-lo dos demais grupos de classificação, com exceção do representante do grupo 16SrXII, e o perfil gerado pela *MseI* demonstrou que o fitoplasma presente nas videiras pertence ao grupo 16SrI e não ao 16SrXII (Figura 6). As digestões com as enzimas *MseI*, *AluI* e *RsaI* geraram perfis coincidentes com aqueles exibidos por fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrI (Figura 6). Os perfis resultantes da digestão enzimática com *HpaII*, *HinfI* e *MboI* possibilitaram a confirmação dos resultados obtidos com as demais enzimas, determinando com segurança que o fitoplasma é representante do grupo 16SrI, porém, não permitiram a distinção ao nível de subgrupo (Figura 7 e Tabela 9).

A classificação do subgrupo foi definida com base nos perfis eletroforéticos fornecidos pelas enzimas *HhaI* e *MseI*. A comparação dos perfis revelou que o fitoplasma do grupo 16SrI presente nas videiras pertence ao subgrupo B (Figura 7 e Tabela 9), ao qual também é afiliado, de acordo com a classificação internacionalmente aceita para fitoplasmas (LEE et al., 1998b), o agente causal do enfezamento vermelho do milho. Na Tabela 9, estão representados por números os padrões de restrição obtidos para o fitoplasma detectado nas plantas 1, 2, 3 e 4 de videira e os padrões de alguns fitoplasmas típicos representantes do grupo 16SrI.

Tabela 9 – Comparação entre os padrões de restrição obtidos por RFLP, do fitoplasma detectado em plantas de videira (1, 2, 3 e 4) com outros fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrI

Padrões de restrição obtidos com as enzimas									
Fitoplasmas									
16SrI	Subgrupos	<i>AluI</i>	<i>MboI</i>	<i>HpaII</i>	<i>MseI</i>	<i>RsaI</i>	<i>HhaI</i>	<i>KpnI</i>	<i>HinfI</i>
1		1	1	1	1	1	2	1	1
2		1	1	1	1	1	2	1	1
3		1	1	1	1	1	2	1	1
4		1	1	1	1	1	2	1	1
AY ^a	(A)	1	1	1	1	1	1	1	1
MBS ^a	(B)	1	1	1	1	1	2	1	1
CPh ^a	(C)	2	1	1	2	1	1	1	1
PaWB ^a	(D)	1	1	1	3	1	2	1	1
BBs ^a	(E)	3	1	2	1	1	1	1	1
ACLR-AY ^b	(F)	4	1	3	4	2	1	2	1

Os números representam os diferentes tipos de padrões de restrição obtidos para as diversas endonucleases. Abreviações: AY= Aster yellows; MBS= Maize bushy stunt; CPh= Clover phyllody; PaWB= Paulownia witches'-broom; BBs= Blueberry stunt; ACLR-AY= Apricot chlorotic leaf. Letras sobrescritas: a= Lee et al. (1998b); b= Schneider et al. (1993)

Figura 6 - Análise de RFLP do gene 16S rRNA de fitoplasmas do grupo 16SrI detectados em plantas de videira, utilizando as enzimas *AluI*, *KpnI*, *RsaI* e *MseI*. M= marcador molecular Φ X174RFHaeIII; Colunas 1 a 4= amostras de videira, sendo 1= Brasil (MV1781), 2= Benitaka (LD1587) planta 2, 3= Brasil (TP1780) planta 1 e 4= Benitaka (LD1587) planta 1; Mi= padrão positivo milho

Figura 7 - Análise de RFLP do gene 16S rDNA de fitoplasmas do grupo 16SrI detectados em plantas de videira, utilizando as enzimas *HinfI*, *MboI*, *HpaII* e *HhaI*. M= marcador molecular Φ X174RFHaeIII; Colunas 1 a 4= amostras de videira, sendo 1= Brasil (MV1781), 2= Benitaka (LD1587) planta 2, 3= Brasil (TP1780) planta 1 e 4= Benitaka (LD1587) planta 1; Mi= padrão positivo milho

Para o fitoplasma do grupo 16SrIII, as análises de RFLP foram realizadas com os produtos de PCR obtidos a partir de DNA extraído da planta 2. Foi adotado como padrão o fitoplasma do superbrotamento do chuchu, conhecido representante do grupo 16SrIII, subgrupo J (MONTANO et al., 2000). Para as enzimas *KpnI*, *AluI*, *RsaI*, *MseI* e *MboI*, os perfis exibidos foram coincidentes com aqueles apresentados por fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII. Todas as enzimas utilizadas na análise geraram perfis eletroforéticos idênticos aos do chuchu (Figura 8), confirmando que o fitoplasma da videira também está afiliado ao subgrupo 16SrIII-J.

Na Tabela 10, os padrões de restrição obtidos para o fitoplasma do grupo 16SrIII encontrado na videira foram comparados aos padrões descritos na literatura (LEE et al., 1998b; MONTANO et al., 2000; JOMANTIENE et al., 2002; BARROS et al., 2002), com a finalidade de estabelecer o subgrupo ao qual este fitoplasma pertencia. A comparação dos perfis das enzimas *MseI*, *HhaI*, *RsaI*, *MboI* e *HinfI* excluiu a possibilidade do fitoplasma da videira estar afiliado aos subgrupos 16SrIII-A, 16SrIII-B, 16SrIII-C, 16SrIII-D, 16SrIII-E, 16SrIII-G, 16SrIII-H, 16SrIII-I, 16SrIII-R e 16SrIII-P, mas, não permitiu a diferenciação entre os subgrupos 16SrIII-F e 16SrIII-J. Para diferenciar estes dois subgrupos foi necessário utilizar a enzima *Bsh1236I*, e o perfil gerado demonstrou que o fitoplasma do grupo 16SrIII encontrado nas plantas de videira pertencia ao subgrupo 16SrIII-J, ao qual pertence o fitoplasma do superbrotamento do chuchu, usado como padrão (Figura 8).

Tabela 10 - Comparação entre os padrões de restrição obtidos por RFLP do fitoplasma detectado em planta de videira (2) com outros fitoplasmas afiliados ao grupo 16SrIII

Padrões de restrição obtidos com as enzimas										
Fitoplasmas										
16SrIII	Subgrupos	<i>Bsh</i>	<i>AluI</i>	<i>MboI</i>	<i>HpaII</i>	<i>MseI</i>	<i>RsaI</i>	<i>HhaI</i>	<i>KpnI</i>	<i>HinfI</i>
12361										
2		1	1	2	2	1	1	2	1	1
CX ^a	(A)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CYE ^a	(B)	1	1	2	2	1	1	1	1	1
PB ^a	(C)	2	1	2	2	2	1	2	1	1
GR1 ^a	(D)	3	1	2	2	3	1	2	1	1
SP1 ^a	(E)	1	1	1	1	1	1	3	1	1
MW1 ^a	(F)	2	1	2	2	1	1	2	1	1
WWB ^a	(G)	1	1	1	1	1	2	1	1	1
PoiBI ^b	(H)	4	1	1	1	1	1	1	1	1
VGY ^c	(I)	1	1	1	1	2	1	1	1	1
ChWB^d	(J)	1	1	2	2	1	1	2	1	1
DanVir ^e	(P)	---	1	---	2	1	1	2	1	2
CirWL ^e	(R)	---	1	---	2	1	1	4	1	1

Os números representam os diferentes tipos de padrões de restrição obtidos para as endonucleases. Abreviações: CX= Canadian X-disease; CYE= Clover yellow edge; PB= Pecan bunch; GR1= Golden rod yellows; SP1= Spirea stunt; MW1= Milkeed yellows; WWB= Walnut witches' broom; PoiBI= Poinsettia branch-inducing; VGY= Virginia grapevine yellows; ChWB= Chayote witches' broom; DanVir= Dandelion virescence; CirWL= Cirsium white leaf. Letras sobrescritas: a= Lee et al. (1998b); b= Davis (não publicado. Citado por BARROS et al., 2002); c= Davis et al. (1998b); d= Montano et al. (2000); e= Jomantiene et al. (2002)

Figura 8 - Análise de RFLP do gene 16S rDNA de fitoplasmas do grupo 16SrIII detectado em plantas de videira, utilizando as enzimas *AluI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI*, *MboI*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaII* e *Bsh* 12361. M= marcador molecular ΦX174RFHaeIII; Colunas 2= amostra de videira Benitaka (LD1587) planta 2; Ch= padrão positivo chuchu

Outros relatos de fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII associados aos amarelos da videira já foram feitos em diferentes partes do mundo. O grupo 16SrI já foi relatado em videiras nos Estados Unidos (PRINCE et al., 1993; DAVIS et al., 1998b), Israel (ORENSTEIN; ZAHAVI; WEINTRAUB, 2001), Itália (ALMA et al., 1996) e mais recentemente na Austrália (CONSTABLE et al., 2002) e Chile (FIORI et al., 2007). Fitoplasmas do grupo 16SrIII já foram identificados em regiões vitícolas dos Estados Unidos (PRINCE et al., 1993; DAVIS et al., 1998b) e de Israel (ORENSTEIN; ZAHAVI; WEINTRAUB, 2001).

Nos Estados Unidos, fitoplasmas dos subgrupos 16SrI-A e 16SrIII-I estão associados à doença denominada ‘Virginia grapevine yellows’ (DAVIS et al., 1998b). Na Itália, os subgrupos 16SrI-B e 16SrI-G já foram detectados em videiras (ALMA et al., 1996), sendo o subgrupo 16SrI-B consistentemente detectado, inclusive associado à fitoplasmas de outros grupos, como o 16SrV e o 16SrXII, causando infecção mista. Na Austrália, uma doença da videira chamada de ‘Buckland valley grapevine yellows phytoplasma’- BVGY está associada a um fitoplasma afiliado ao grupo 16SrI e que provavelmente pertence a um novo subgrupo (CONSTABLE et al., 2002). No Chile, fitoplasmas dos subgrupos 16SrI-B e 16SrI-C foram identificados recentemente em videiras com sintomas do tipo amarelo, em várias regiões do país (FIORI et al., 2007).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a ocorrência no Brasil dos mesmos grupos de fitoplasmas presentes em videiras nos Estados Unidos, Itália, Austrália e Chile. A viticultura brasileira é recente quando comparada aos países tradicionalmente produtores e desenvolveu-se a partir da introdução das variedades americanas, mais rústicas, e da multiplicação de clones de variedades originárias de países como Itália e França, onde os amarelos da videira estão presentes. Portanto, é possível que esta doença tenha chegado ao Brasil juntamente com os materiais aqui introduzidos. A disseminação do amarelo da videira para áreas onde a doença não ocorre é favorecida pela forma como a videira é propagada, vegetativamente a partir de estacas, sendo comum a produção de mudas através de enxertia, e é sabido que estes agentes podem ser disseminados por órgãos de propagação vegetativa, como estacas, tubérculos, rizomas e bulbos (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000).

A disseminação dos fitoplasmas também é realizada com muita eficiência por insetos vetores. Os fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrI podem ser transmitidos por mais de 30 espécies vetoras, presumivelmente polífagas, a mais de 200 espécies de plantas pertencentes a 45 famílias. Já os membros do grupo 16SrIII podem ser transmitidos por mais de 14 vetores para uma gama de 60 espécies de plantas, pertencentes a 13 famílias botânicas (LEE; GUNDERSEN-RINDAL; BERTACCINI, 1998a).

O fitoplasma do subgrupo 16SrI-B pertence ao grupo dos ‘Aster yellows’, amplamente distribuído no mundo todo, em muitas plantas hospedeiras e que abriga a maior diversidade de fitoplasmas (McCOY et al., 1989). No Brasil, o subgrupo 16SrI-B já foi relatado em outras culturas como o milho (BEDENDO; DAVIS; DALLY, 2000), a cana-de-açúcar (SILVA, 2008) e em ornamentais como a primavera (SILVA, 2008). Em nossas condições, até o momento, só se conhece a espécie vetora *Dalbulus maidis*, que transmite o subgrupo 16SrI-B na cultura do milho. Para as outras culturas onde este fitoplasma já foi detectado, como a cana-de-açúcar, a primavera e agora a videira, os insetos vetores não são conhecidos, sendo necessários mais estudos nesta área para verificar a presença e a identidade dos insetos vetores ou potenciais vetores. Segundo Lee, Gundersen-Rindal e Bertaccini (1998a), a gama de hospedeiros naturais de cada fitoplasma é determinada pelo número de espécies vetoras capazes de transmiti-lo e pelo comportamento alimentar desses vetores. O subgrupo 16SrI-B apresenta baixa especificidade quanto ao inseto vetor, sendo transmitido por 24 espécies de cigarrinhas, entre elas, a espécie *Macrostes fascifrons*, que é polífaga e em condições experimentais foi capaz de transmiti-lo, para 191

espécies de plantas hospedeiras, pertencentes a 42 famílias botânicas, mostrando como a especificidade deste fitoplasma quanto ao vetor e à espécie hospedeira são baixas (LEE et al., 1998a). Em condições experimentais, *D. maidis* foi capaz de transmitir o fitoplasma do subgrupo 16SrI-B presente no milho para as espécies daninhas capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea*), capim-colonião (*Panicum maximum*) e braquiária (*Brachiaria decumbens*), revelando que, esta espécie tem o potencial de promover a transmissão deste patógeno para outras espécies botânicas (HAAS, 2005).

O fitoplasma do subgrupo 16SrIII-J foi identificado primeiramente no Brasil por Montano et al. (2000), em plantas de chuchu e na espécie silvestre Melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.). Posteriormente, este fitoplasma foi detectado em plantas de abóbora com superbrotamento (MONTANO et al., 2006), de repolho com sintomas de enfezamento (AMARAL MELLO, 2007) e nas plantas ornamentais crista-de-galo e pluma-de-flamingo (*Celosia argentea* L. e *Celosia spicata* L., respectivamente) com malformação das folhas (ECKSTEIN, 2008). Aparentemente, sua ocorrência está limitada à América do Sul, sugerindo a presença de um ancestral comum (GALVIS; LEGIZAMÓN; GAITÁN, 2007). Em outros países, está associado a doenças como a tristeza do alho (*Allium sativum* L.), na Argentina (GALDEANO et al., 2004), o declínio do cinamomo (*Melia azedarach* L.), na Bolívia (HARRISON; BOA; CARPIO, 2003), e à doença do café (*Coffea arabica* L.) conhecida como “Coffee crispiness disease”-CCD, na Colômbia (GALVIS; LEGIZAMÓN; GAITÁN, 2007). Montano et al. (2000) cogitaram a hipótese de este fitoplasma ser uma nova linhagem ou uma espécie distinta dos demais fitoplasmas, por não ocorrer em outras partes do mundo. Os relatos atuais de detecção deste subgrupo têm confirmado a ocorrência de fitoplasmas restritos a esta região geográfica, geneticamente próximos, porém, em plantas hospedeiras diferentes e em locais relativamente distantes. Estes fatores mostram que o subgrupo 16SrIII-J está amplamente distribuído dentro da área geográfica onde ocorre e que a especificidade deste fitoplasma pela planta hospedeira é baixa. Dessa forma, culturas de introdução recente no continente, como o café e a videira, podem se tornar hospedeiras alternativas para esta linhagem de fitoplasmas, segundo a hipótese feita por Galvis, Legizamón e Gaitán (2007).

2.3.4 Sequenciamento e análise putativa dos sítios de restrição

Sequências consenso foram determinadas a partir do alinhamento das sequências obtidas para os clones do fitoplasma do grupo 16SrI, presente nas plantas de videira 1, 3 e 4, sendo o sequenciamento repetido por pelo menos 3 vezes.

As análises das sequências dos clones permitiram confirmar a identidade do fitoplasma como sendo representante do grupo 16SrI, como já havia mostrado os testes de PCR e as análises de RFLP. As seqüências, representadas por um fragmento de 1249 nucleotídeos para as amostras 1 e 3 (Apêndices A e B, respectivamente) e 1250 nucleotídeos para a amostra 4 (Apêndice C), juntamente com uma seqüência do fitoplasma do milho foram submetidas à análise putativa dos sítios de restrição e à análise filogenética. A análise dos sítios de restrição foi feita usando as mesmas enzimas utilizadas para a análise de RFLP.

A comparação entre o fitoplasma do grupo 16SrI associado ao amarelo da videira e o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho revelou que ambos possuem os mesmos sítios de restrição, para todas as enzimas que foram selecionadas (Figura 9). Os perfis virtuais que foram gerados mostraram-se idênticos para os dois fitoplasmas (Figura 10) e concordantes com os perfis obtidos nas análises de RFLP, realizadas a partir do DNA amplificado por PCR.

Os resultados da digestão virtual, feita a partir das seqüências clonadas, revelaram que o fitoplasma do grupo 16SrI presente nas amostras de videira é idêntico ao fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho e comprovaram que os resultados da análise de RFLP, usando enzimas de restrição são válidos e confiáveis.

O sequenciamento e a análise putativa dos sítios de restrição foram de fundamental importância, pois a identificação do fitoplasma do grupo 16SrI associado aos amarelos da videira foi confirmada e reforçada como pertencente ao subgrupo 16SrI-B.

Figura 9 - Análise putativa de sítios de restrição do 16S rDNA do fitoplasma associado ao amarelo da videira com as mesmas enzimas utilizadas para a análise de RFLP. A: sequência do fitoplasma associado ao amarelo da videira (amostra 1); B: sequência do fitoplasma associado ao amarelo da videira (amostra 3); C: sequência do fitoplasma associado ao amarelo da videira (amostra 4); D: sequência do fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho, representante do grupo 16SrI-B (nº acesso: AY265208) (conclusão)

Figura 10 - Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição com as mesmas enzimas utilizadas para a análise enzimática de RFLP. A = fitoplasma associado ao amarelo da videira (amostra 1); B= fitoplasma associado ao amarelo da videira (amostra 3); C= fitoplasma associado ao amarelo da videira (amostra 4); D= fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho, representante do subgrupo 16S rI-B

A sequência consenso determinada para o fitoplasma do grupo 16SrIII, obtida a partir do alinhamento dos clones do fitoplasma deste grupo presente na planta 2 de videira, não permitiu a confirmação da identidade deste fitoplasma como representante do grupo 16SrIII, subgrupo J, conforme mostraram os testes de PCR e as análises de RFLP. A sequência final obtida apresentou-se muito curta, com poucos nucleotídeos e também com baixa qualidade, mesmo após o sequenciamento ser repetido por diversas vezes.

Devido à má qualidade da sequência do fitoplasma de grupo 16SrIII, não foi possível realizar a análise dos sítios putativos de restrição e a simulação dos perfis virtuais, através do programa pDRAW 3.2, usando as mesmas endonucleases das análises de RFLP. Neste caso, são necessários novos sequenciamentos, feitos a partir de novas amostras, para obtenção de sequências consenso de boa qualidade, que permitam a realização deste tipo de análise.

2.3.5 Análise filogenética

As sequências nucleotídicas encontradas no fitoplasma da videira, representante do grupo 16SrI, apresentaram 99% de similaridade com as sequências representativas de diversos fitoplasmas afiliados a este grupo, depositadas no GenBank.

A árvore filogenética foi construída a partir de 26 sequências nucleotídicas, onde 16 sequências representaram diferentes grupos de fitoplasmas, 6 sequências corresponderam aos vários representantes de subgrupos do grupo 16SrI, 3 sequências corresponderam ao fitoplasma da videira e uma sequência correspondeu ao procarioto *Acholeplasma laidlawii*. A relação filogenética existente entre os fitoplasmas de diferentes grupos e o fitoplasma associado ao amarelo da videira pode ser observada na árvore filogenética gerada para esses organismos (Figura 11). Os valores de 1000 vezes do teste de “Bootstrapping” forneceram suporte confiável aos agrupamentos formados. O fitoplasma encontrado na videira mostrou-se distinto dos fitoplasmas afiliados aos demais grupos e se posicionou no ramo que agregou o fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho, representante do subgrupo 16SrI-B, e os diversos representantes dos subgrupos do grupo 16SrI.

Devido à má qualidade da sequência obtida para o fitoplasma do grupo 16SrIII encontrado na videira, não foi possível a construção da árvore filogenética para comparação deste fitoplasma com os demais grupos da classificação de fitoplasmas e com os subgrupos do grupo 16SrIII.

Figura 11 – Árvore filogenética construída com representantes de 16 diferentes grupos de fitoplasma, 6 subgrupos representantes do grupo 16SrI, o procarioto *Acholeplasma laidlawii* e os fitoplasmas da videira (amostras 1, 2 e 4). Os números nos ramos representam valores de confiança baseados no “Bootstrapping”

2.3.6 Transmissão através de enxertia

Todas as enxertias realizadas neste trabalho apresentaram sucesso, ou seja, brotação e crescimento dos enxertos.

A transmissão de fitoplasmas de porta-enxertos doentes para enxertos sadios foi comprovada em 70% das plantas, após 54 e 65 meses da enxertia realizada em março de 2003 (Tabela 11). As plantas que apresentaram resultados positivos para a transmissão manifestaram sintomas típicos dos amarelos da videira, como enrolamento, amarelecimento ou avermelhamento do limbo foliar, dependendo da variedade, e aspecto quebradiço das folhas, mais evidentes com a proximidade do período de dormência das plantas.

A transmissão foi confirmada pelos resultados positivos obtidos nos testes de detecção através de duplo PCR, realizados a partir de DNA extraído dos ramos provenientes da enxertia. A presença de fitoplasmas nos tecidos amostrados foi evidenciada pela visualização de bandas de aproximadamente 1,2 Kb, em gel de agarose. As amostras de milho e chuchu, sabidamente infectadas, usadas como padrões positivos nas reações de PCR, também apresentaram bandas típicas de 1,2 Kb, enquanto nenhuma amplificação foi observada para a planta de videira sadia e pela água, usadas como padrões negativos nas reações. A Figura 12 representa as amplificações obtidas com os iniciadores universais P1/Tint e F2n/R2 para as amostras de videira enxertadas e para os padrões positivos e a ausência de amplificação para os padrões negativos.

Para a enxertia realizada em janeiro e março de 2007, independentemente da condição inicial de contaminação entre o enxerto e o porta-enxerto, não foram detectados fitoplasmas nos tecidos novos até o presente momento (Tabelas 11 e 12).

A transmissão de fitoplasmas por enxertia depende de uma série de fatores distintos, tais como espécies ou variedades enxertadas, habilidade técnica do operador, época do ano, condições fisiológicas das plantas matrizes, distribuição e concentração do fitoplasma na planta ou ainda do período de latência do grupo específico de fitoplasma envolvido.

Os resultados obtidos para os testes de enxertia diferiram bastante, em termos de tempo para manifestação de sintomas e transmissão do patógeno, em relação a outras espécies botânicas relatadas na literatura. Garcia-Chapa (2004) enxertou gemas de pereira contaminadas pelo fitoplasma associado ao declínio da pereira sobre porta-enxertos sadios micropropagados e observou 88% e 33% de transmissão do fitoplasma, confirmados por detecção através de duplo PCR em folhas novas das mudas, respectivamente 18 e 5 meses após a enxertia, evidenciando

que esse processo de transmissão passa por período de latência. Enquanto no presente trabalho todas as enxertias resultaram em novas brotações, sendo a transmissão obtida tanto por gemas (100%) como por garfos sadios (50%), Boudon-Padieu (2000) relatou que a maioria das enxertias envolvendo propágulos contaminados resultou em ausência de brotação ou em plantas inviáveis, especialmente no caso de material infectado pela flavescência dourada.

O método de enxertia pode influenciar na transmissão de fitoplasmas, como demonstrado para macieira (*Malus X domestica* Borkh.). Transmissão de 100% foi obtida por enxertia lateral, em bisel, ou por encostia, enquanto foi reduzida a apenas 50% com o uso de borbulhia ou enxertia de placa (ALDAGHI et al., 2007). Os autores também relataram 60% de transmissão do fitoplasma associado à proliferação dos ramos da macieira, após enxertia de material de macieira infectada sobre vinca sadia, sendo que sintomas da doença foram observados em apenas dois meses após a enxertia.

Errea, Aguelo e Hormaza (2002) conseguiram transmitir fitoplasma do declínio da pereira por enxertia de placa, com gemas provenientes de sete cultivares, sabidamente contaminadas, sobre porta-enxertos de pereira de um ano de idade. A transmissão por enxertia obteve sucesso similar quando realizada nas fases fenológicas de brotação (primavera), maturação de frutos (verão) e período de dormência (inverno). Contudo, as taxas de transmissão foram baixas, inferiores a 50%, provavelmente devido à distribuição errática do patógeno. Boudon-Padieu (1999) também relatou que os amarelos da videira podem ser disseminados tanto por enxertos como por estacas contaminadas, no entanto, é possível que plantas assintomáticas sejam recuperadas mesmo a partir de matrizes infectadas. A autora afirma que a disseminação dos amarelos por mudas contaminadas é de elevado risco à viticultura, porém de difícil constatação, já que a maioria dos porta-enxertos de videira são hospedeiros tolerantes aos fitoplasmas, além de que a taxa de transmissão em *Vitis* spp. é muito variável (6 a 80% de eficiência).

A identificação dos fitoplasmas transmitidos de plantas doentes para sadias, no presente trabalho, foi feita com o emprego dos iniciadores para os grupos específicos 16SrI e 16SrIII, em duplo PCR. Os resultados evidenciaram a presença de fitoplasmas do grupo 16SrI em 80% e do grupo 16SrIII em 20% das plantas para as quais a transmissão foi positiva. A identificação destes fitoplasmas foi revelada pela visualização de bandas de 1,1Kb e de 0,8 Kb, respectivamente para os grupos 16SrI e 16SrIII, em gel de agarose (Figuras 13 e 14).

Figura 12 - Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas presentes em plantas de videira, enxertadas em março de 2003, através de duplo PCR com os iniciadores universais P1/Tint e F2n/R2. M= marcador molecular 1 Kb ladder; Colunas 2 a 7= amostras de videira, sendo 2= Baco 22A (gema verde)/Brasil (MV1781), 3= Baco 22A (garfo verde)/Brasil (TP1780), 4= Baco 22A (gema verde)/Brasil (TP1780), 6= Baco 22A (gema verde)/Brasil (MV1775) e 7= Baco 22A (garfo verde)/Benitaka (LD1587); Vs= padrão negativo planta de videira sadia; Ag= padrão negativo água; Mi= padrão positivo milho; Ch= padrão positivo chuchu

Tabela 11 – Resultados do teste de transmissão de fitoplasmas por enxertia usando material sadio como enxerto para brotação e desenvolvimento em planta doente (porta-enxerto)

Número da planta	Planta	Material enxertado	Data da enxertia	Resultado da transmissão
1	Baco 22A/Brasil (MV1781)	Garfo verde	14/03/2003	-
2	Baco 22A/Brasil (MV1781)	Gema verde	14/03/2003	+
3	Baco 22A/Brasil (TP1780)	Garfo verde	14/03/2003	+
4	Baco 22A/Brasil (TP1780)	Gema verde	14/03/2003	+
5	Baco 22A/Brasil (MV1775)	Garfo verde	14/03/2003	-
6	Baco 22A/Brasil (MV1775)	Gema verde	14/03/2003	+
7	Baco 22A/Benitaka (LD1587)	Garfo verde	14/03/2003	+
8	Baco 22A/Brasil (MV1781)	Gema verde	16/01/2007	-
17	Itália (seedling 01/1996)/Benitaka (LD1587)	Gema verde	16/01/2007	-
18	Itália (seedling 01/1996)/Brasil (TP1780)	Gema verde	14/03/2007	-
22	Baco 22A/Brasil (MV1781)	Garfo verde	10/10/2007	-

Tabela 12 – Resultados do teste de transmissão de fitoplasmas por enxertia usando material doente como enxerto para brotação e desenvolvimento em planta sadia (porta-enxerto)

Número da planta	Planta	Material enxertado	Data da enxertia	Resultado da transmissão
9	Brasil (TP1780)/Baco 22A	Gema verde	16/01/2007	-
10	Brasil (TP1780)/Baco 22A	Garfo verde	16/01/2007	-
11	Benitaka (LD1587)/Baco 22A	Garfo verde	16/01/2007	-
12	Benitaka (LD1587)/Baco 22A	Gema verde	20/03/2007	-
13	Brasil (MV1781)/Baco 22A	Garfo verde	16/01/2007	-
14	Brasil (MV1781)/Baco 22A	Gema verde	20/03/2007	-
15	Brasil (MV1781)/Baco 22A	Gema verde	20/03/2007	-
16	Brasil (MV1781)/Baco 22A	Gema verde	20/03/2007	-
19	Brasil (TP1780)/Itália (seedling 01/1996)	Gema verde	16/01/2007	-
20	Brasil (MV1781)/Itália (seedling 01/1996)	Gema verde	20/03/2007	-
21	Brasil (MV1781)/Itália (seedling 01/1996)	Garfo verde	16/01/2007	-

Figura 13 - Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas presentes em plantas de videira, enxertadas em março de 2003, através de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint e R16(I)F1/R1 para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrI. M= marcador molecular 1 Kb ladder; Colunas 2 a 7= amostras de videira, sendo 2= Baco 22A (gema verde)/Brasil (MV1781), 3= Baco 22A (garfo verde)/Brasil (TP1780), 4= Baco 22A (gema verde)/Brasil (TP1780), 6= Baco 22A (gema verde)/Brasil (MV1775) e 7= Baco 22A (garfo verde)/Benitaka (LD1587); Vs= padrão negativo planta de videira sadia; Ag= padrão negativo água; Mi= padrão positivo milho; Ch= padrão positivo chuchu

Figura 14 - Amplificação do 16S rDNA de fitoplasmas presentes em plantas de videira, enxertadas em março de 2003, através de duplo PCR com os iniciadores P1/Tint e R16(III)F2/R1 para identificação de fitoplasmas do grupo 16SrIII. M= marcador molecular 1 Kb ladder; Colunas 2 a 7= amostras de videira, sendo 2= Baco 22A (gema verde)/Brasil (MV1781), 3= Baco 22A (garfo verde)/Brasil (TP1780), 4= Baco 22A (gema verde)/Brasil (TP1780), 6= Baco 22A (gema verde)/Brasil (MV1775) e 7= Baco 22A (garfo verde)/Benitaka (LD1587); Vs= padrão negativo planta de videira sadia; Ag= padrão negativo água; Mi= padrão positivo milho; Ch= padrão positivo chuchu

3 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir:

- fitoplasmas estão associados a plantas de videira com sintomas de amarelos, encontradas em cultivos comerciais localizados nos Estados de São Paulo e Paraná.
- a identificação destes fitoplasmas revelou que os mesmos pertencem aos grupos 16SrI e 16SrIII.
- plantas portadoras de amarelos apresentaram infecção simples e também infecção mista, resultante da ocorrência simultânea de fitoplasmas distintos numa mesma planta.
- o fitoplasma do grupo 16SrI foi identificado como um representante do subgrupo 16SrI-B.
- o estágio fenológico correspondente à brotação de ramos e aparecimento de folhas novas se mostrou o mais indicado para a amostragem de material visando à detecção de fitoplasmas
- a transmissão de fitoplasmas por enxertia demonstrou que os mesmos são os agentes causais da doença e que há necessidade de inspeção cuidadosa do material vegetal usado para a propagação comercial da videira.

REFERÊNCIAS

- AGF- MINISTRY OF AGRICULTURE AND LANDS OF BRITISH COLUMBIA. Disponível em: <<http://agf.gov.bc.ca/cropprot/grapeipm/phytoplasma.htm>>. Acesso em: 11 jan. 2009.
- ALDAGHI, M.; MASSART, S.; STEYER, S.; LATEUR, M.; JIJAKLI, M.H. Study on diverse grafting techniques for their capability in rapid and efficient transmission of apple proliferation disease to different host plants. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, p. 381-382, 2007.
- 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**, Saint Paul, v. 80, p. 418-421, 1996.
- AMARAL MELLO, A.P.O. **Identificação de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença**. 2007. 64 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- AMARAL MELLO, A.P.O.; BEDENDO, I.P.; KITAJIMA, E.W.; RIBEIRO, L.F.C.; KOBORI, R. Tomato big bud associated with a phytoplasma belonging to group 16SrIII in Brazil. **International Journal of Pest Management**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 233-237, 2006.
- AMORIM, L.; KUNYUKI, H. Doenças da videira (*Vitis* spp.) In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2: Doenças das plantas cultivadas, cap. 70, p. 639-651.
- ANGELINI, E.; CLAIR, D.; BORGIO, M.; BERTACCINI, A.; BOUDON-PADIEU, E. Flavescence dorée in France and Italy. Ocorence of closely related phytoplasmas isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma, **Vitis**, Landau, v. 40, p. 79-86, 2001.
- ARAGÃO, F.J.L.; RECH, E.L. Isolamento de vetores para transformação direta In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.) **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBAPA CENARGEN, 1998. cap. 1, p. 17-34.
- AROCHA, Y.; LÓPEZ, M.; PIÑOL, B.; FERNANDEZ, M.; PICORNELL, B.; ALMEIDA, R.; PALENZUELA, I.; WILSON, M.R.; JONES, P. ‘*Candidatus* Phytoplasma graminis’ and ‘*Candidatus* Phytoplasma caricae’ two novel phytoplasmas associates with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 2451-2463, 2005.
- BAI, X.; ZHANG, J.; EWING, A.; MILLER, S.A.; JANCISO RADEK, A.; SHEVCHENKO, D.V.; TSUKERMAN, K.; VALUNAS, T.; LAPIDUS, A.; CAMPBELL, J.W.; HOGENHOUT, S.A. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, p. 3682-3696, 2006.

BARROS, T.S.L. **Fitoplasmas no Brasil: caracterização molecular via “polimerase chain reaction” and “restriction fragment length polymorphism”**. 1997. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 1997.

_____. **Caracterização molecular de Mollicutes fitopatogênicos no Brasil**. 2002. 105p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Detection and identification of the maize bushy stunt phytoplasma in corn plants in Brazil using PCR and RFLP. **International Journal of Pest Management**, London, v. 42, p. 73-76, 2000.

BERTACINI, A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. **Frontiers in Bioscience**, Bologna, v. 12, p. 673-689, 2007.

BERTACCINI, A.; KAMINSKA, M.; BOTTI, S.; MARTINI, M. Molecular evidence for mixed phytoplasma infection in lily plants. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 568, p. 35-41, 2002. Suplemento. Apresentado no INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIRUS DISEASES IN ORNAMENTALS, 10., 2002

BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; FRANOVA, J.; JANECKOVA, M.; HADIDI, A. Molecular detection of phytoplasmas in apple with rubbery wood symptoms. **Acta-Horticulturae**, The Hague, n. 472, p. 693-700, 1998.

BERTACCINI, A.; BOTTI, S.; MARTINI, M.; COLLA, R.; MAZZALI, G.; MAZIO, P.; POZZA, M.; MEGLIORALDI, S.; VINGIONE, M. La Flavescenza dorata in Emilia: caratterizzazione molecolare del ceppo in fase di diffusione. **L'informatore Agrario**, Verona, v. 47, p. 97-100, 2001.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 62, p. 293-300, 1951.

BIANCO, P.A.; QUAGLINO, F.; CASATI, P.; CALVI, M. Genetic variability and distribution of grapevine phytoplasmas of group 16SrV in Lombardia (Northern Italy). In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE (ICVG), 14, 2003, Lacorotondo. **Proceedings...** Lacorotondo: ICVG, 2003. p. 84.

BOUDON-PADIEU, E. **Grapevine phytoplasmas**. First internet conference on phytopatogenic mollicutes, 2000. Disponível em: <<http://www.uniud.it/phytoplasma/conf.html>>. Acesso em: 10 nov. 2008.

_____. The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE (ICVG), 14., 2003, Lacorotondo. **Proceedings...** Lacorotondo: ICVG, 2003. p. 47-53.

CAUDWELL, A. Deux années d'études sur la Flavescence dorée, nouvelle maladie grave de la vigne. **Annales de l'Amélioration des Plants**, Versailles, v. 12, p. 359-393, 1957.

_____. Bois Noir and Vergilbungkrankheit. Other grapevine yellows. In: PEARSON, R.C.; GOHEEN, A.C. (Ed.). **Compendium of grapevine diseases**. Saint Paul: American Phytopathology Society, 1988. p. 45-47.

CAUDWELL, A.; MARTELLI, G.P. Flavescence Dorée. In: MARTELLI, G. P. (Ed.) **Graft-transmissible diseases of grapevines: handbook for detection and diagnoses**. Rome: FAO, International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine, 1993. p. 97-102.

CAUDWELL, A.; LARRUE, J.; BOUDON-PADIEU, E.; McLEAN, G.D. Flavescence dorée elimination from dormant wood of grapevines by hot-water treatment. **Australian Journal of Grape and Wine Research**. Richmond, v. 3, p. 21-25, 1997.

CHALAK, L.; ELBITAR, A.; RIZK, R.; CHOUEIRI, E.; SALAR, P.; BOVÉ, J.M.. Attempts to eliminate '*Candidatus* phytoplasma phoenicum' from infected Lebanese almond varieties by tissue culture techniques combined or not with thermotherapy. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 112, p. 85-89, 2005.

CHIYKOWSKI, L.N.; SINHA, R.C. Differentiation of MLO disease by means of symptomatology and vector transmission. **Zentralblatt fuer Bakteriologie**, Stuttgart, v. 20, p. 280-287, 1989.

CONSTABLE, F.E.; GIBB, K.S.; SYMONS, R.H. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, p. 267-276, 2003.

CONSTABLE, F.E.; WHITING, J.R.; JONES, J.; GIBB, K.S.; SYMONS, R.H. The distribution of grapevine yellows disease associated with the Buckland valley grapevine yellows phytoplasma. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 65-73, 2002.

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-ribosomal DNA. **European Journal of Plant Pathology**, Heidelberg, v. 103, p. 507-514, 1997.

DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Revised subgroup classification of group 16SrV phytoplasmas and placement of flavescence dorée-associated phytoplasmas in two distinct subgroups. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 790-797, 2001.

DAVIS, R.E.; SINCLAIR, W.A. Phytoplasma identity and disease etiology, **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. 1372-1376, 1998a.

DAVIS, R.E.; JOMANTIENE, R.; DALLY, E.L.; WOLF, T.K. Phytoplasmas associated with grapevine yellows in Virginia belong to group 16SrI, subgroup A (tomato big bud phytoplasma subgroup), and group 16SrIII, new subgroup I, **Vitis**, Landau, v. 37, p. 131-137, 1998b.

DAVIS, R.I.; SCHNEIDER, B.; GIBB, K.S. Detection and differentiation of phytoplasmas in Australia, **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 48, p. 535-544, 1997.

DEL SERRONE, P.; BARBA, M. Importance of the vegetative stage for phytoplasma detection in yellow-diseased grapevines. **Vitis**, Landau, 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**, Amsterdam, 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. **Phytopathology Society of Japan**, Tokyo, v. 33, p. 259-266, 1967.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry**, New York, v. 19, p. 11-15, 1987.

DUDUK, B.; BOTTI IVANOVIC, M.; KRSTIC, B.; DUKIC, N.; BARTACCINI, A. Identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Serbia. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, p. 575-579, 2004.

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

ERREA, P.; AGUELO, V.; HORMAZA, J.I. Seasonal variations in detection and transmission of pear decline phytoplasma. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, p. 439-443, 2002.

FAO FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 10 jan. 2009.

FIORI, N.; PRODAN, S.; PALTRINIERI, S.; GAJARDO, A.; BOTTI, S.; PINO, A.M.; MONTEALEGRE, J.; BERTACCINI, A. Molecular characterization of phytoplasmas in Chilean grapevines. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, p. 331-332, 2007.

FIRRAO, G.; GARCIA-CHAPA, M.; MARCZACHI, C. Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. **Frontiers in Bioscience**, Bologna, v. 12, p. 1353-1375, 2007.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Uva. In: **AGRIANUAL 2008**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2008. p. 494-502.

GALDEANO, E.; TORRES, L.E.; MENEGUZZI, N.; GUZMÁN, F.; GOMEZ, G.C.; DOCAMPO, D.M.; CONCI, R. Molecular characterization of 16S Ribosomal DNA and phylogenetic analysis of two X-disease group phytoplasmas affecting China-tree (*Melia azedarach* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) in Argentina. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, p. 174-181, 2004.

GALET, P. **Précis de viticulture**. 4th ed. Montpellier: Déhan, 1983. 584 p.

GALLOTTI, G.J.M.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SONEGO, O. R. Controle das Doenças da Videira. In: ZAMBOLIM, L.; RIBEIRO do VALLE, F.X.; MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa: Suprema, 2002. v. 2, cap. 15, p. 939-1021.

GALVIS, C.A.; LEGIZAMÓN, J.E.; GAITÁN, A.L. Detection and identification of a group 16SrIII-related phytoplasma associated with coffee crispiness disease in Colombia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 3, p. 248-252, 2007.

GARCIA-CHAPA, M. **Detección, transmission y caracterización del fitoplasma asociado a la enfermedad del decaimiento del peral**. 2004. 133 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)- Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, 2004.

GARCIA-CHAPA, M.; MEDINA, V.; VIRUEL, M.A.; LAVIÑA, A.; BATLLE Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, p. 513-520, 2003.

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**, Saint Paul, v. 83, p. 482-485, 1999.

GRIBAUDO, I.; RUFFA, P.; CUOZZO, D.; GAMBINO, G.; MARZACHI, C. Attempts to eliminate phytoplasmas from grapevine clones by tissue culture techniques. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, p. 315-316, 2007.

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

GUNDERSEN, D.E.; LEE, I.-M.; REHNER, S.A.; DAVIS, R.E.; KINGBURY, D.T. Phylogeny of mycoplasma-like organism (Phytoplasma): a basis for their classification. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 176, p. 5244-5254, 1994.

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

HARRISON, N.A.; BOA, E.; CARPIO, M.L. Characterization of phytoplasmas detected in Chinaberry trees with symptoms of leaf yellowing and decline in Bolivia. **Plant Pathology**, London, v. 52, p. 147-157, 2003.

HARRISON, N.A.; MYRIE, W.; JONES, P.; CARPIO, M.L.; CASTILLO, M.; DOYLE, M.M.; OROPEZA, C. 16S rRNA interoperon sequence heterogeneity distinguishes strain populations of the palm lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 141, p. 183-193, 2002.

HEINRICH, M.; BOTTI, S.; CAPRARA, L.; ARTHOFER, W.; STROMMER, S.; HANZER, V.; KATINGER, H.; BERTACCINI, A.; MACHADO, M.L.C. Improved detection methods for fruit tree phytoplasmas. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 19, p. 169-179, 2001.

HIRUKI, C.; WANG, K. Clover proliferation phytoplasma: 'Candidatus Phytoplasma trifolii'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1349-1353, 2004.

JARAUSCH, W.; LANSAC, M.; DOSBA, F. Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p. 47-54, 1999.

JOMANTIENE, R.; DAVIS, R.E.; VALUINAS, D.; ALMINAITE, A. New group 16SrIII phytoplasma lineages in Lithuania exhibit rRNA interoperon sequence heterogeneity. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 507-517, 2002.

KISHINO, A.Y.; ROBERTO, S.R. Variedades-copa e porta-enxertos. In: KISHINO, A.Y.; CARVALHO, S.L.C. de (Ed.) **Viticultura tropical: o sistema de produção do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2007. cap. 4, p. 117-140.

KISHINO, A.Y.; GENTA, W.; ROBERTO, S.R. Aspectos econômicos da viticultura In: KISHINO, A.Y.; CARVALHO, S.L.C. de (Ed.) **Viticultura tropical: o sistema de produção do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2007. cap. 1, p. 13-33.

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

LEE, I.M.; DAVIS, R.E.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 221-255, 2000.

LEE, I.M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; BERTACCINI, A. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. 1359-1366, 1998a.

LEE, I.M.; HAMMOND, R.W.; DAVIS, R.E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 834-842, 1993.

LEE, I.M.; BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; GUNDERSEN, D.E. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 728-735, 1995.

- LEE, I.-M.; BOTTNER, K.D.; SECOR, G.; RIVERA-VARAS, V. 'Candidatus Phytoplasma americanum', a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1593-1597, 2006.
- 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 tgene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 1153-1169, 1998b.
- LEE, I.M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; HAMMOND, R.W.; DAVIS, R.E. Use of micoplasmalike organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested PCR assay to detect mixed MLO infections in a single host plant. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 559-566, 1994.
- LEE, I.M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; DAVIS, R.E.; BOTTNER, K.D.; MARCONE, C.; SEEMÜLLER, E. 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1037-1048, 2004.
- LIM, P.O.; SEARS, B.B. 16S rRNA sequence shows that plant-pathogenic "mycoplasmalike organisms" are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, p. 5901-5906, 1989.
- LURIA, S.E.; BORROUS, J.W. Hibridization between *Escherichia coli* and Shigelia. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 74, p. 461-476, 1957.
- MANICA, I.; POMMER, C.V. (Ed.). **Uva: do plantio a produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2006. 185 p.
- MARTÍN, M.P.; TORRES, E. Evaluación de métodos basados em la PCR para la detección del fitoplasma asociado a la enfermedad de la "Flavescencia dorada" en vid. **Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas**, Madrid, v. 27, p. 217-224, 2001.
- MARTINI, M.; MURARI, E. Identification and epidemic distribution of two flavescence dorée-related phytoplasmas in Veneto (Italy). **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 925-930, 1999.
- MARTINI, M.; LEE, I.-M.; BOTTNER, K.D.; ZHAO, Y.; BOTTI, S.; BERTACCINI, A.; HARRISON, N.A.; CARRARO, L.; MARCONE, C.; KLAN, J.; OSLER, R. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 2037-2051, 2007.
- MARZACHI, C.; BOARINO, A.; VISCHI, A.; PALERMO, S.; MORONE, C.; LORIA, A.; BOCCARDO, G. Flavescenza dorata, legno nero e giallume dell'astro nei vitigni del Piemonte sud orientale. **Informatore Fitopatologico**, Milan, v. 9, p. 58-64, 2001.

McCOY, R.E.; CAUDWELL, A.; CHANG, C.J.; CHEN, T.A.; CHYKOWSKI, 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.; SEEMÜLLER, E. Plant diseases associated with micoplasmalike organisms. In: WHITCOMB, R.F.; TULLY, J.G. (Ed.). **The mycoplasmas**. New York: Academic Press, 1989. v. 5, p. 545-640.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T.; PIMENTEL, J.P.; FIGUEIREDO, D.V.; CUNHA JUNIOR, J.O. Cucurbita moschata, new phytoplasma host in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, p. 226, 2006.

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**, Saint Paul, v. 84, p. 429-436, 2000.

NAMBA, S.; OYAIZU, H.; KATO, S.; IWANAMI, S.; TSUCHIZAKI, T. Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasmalike organisms. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, p. 461-467, 1993.

NAVES, R.L.; GARRIDO, L.R.; SÔNEGO, O.R.; KUHN, G.B. **Sistemas de produção de uvas rústicas para processamento em regiões tropicais do Brasil. Doenças e seu controle**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 11 jan. 2009.

NAVES, R. L.; PAPA, M.F.S. Doenças em cultivares de uvas rústicas em regiões tropicais. In: BOLIANI, A.C.; FRACARO, A.A.; CORRÊA, L.S. (Ed.) **Uvas rústicas: cultivo e processamento em regiões tropicais**. Jales: Universitária, 2008. cap. 10, p. 195-225.

NERONI, R.C.; BEDENDO, I.P. KUNIYUKI, H. Fitoplasmas associados com sintomas do tipo amarelo em videira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, p. 45, 2006. Suplemento.

NUSILLARD, B.; MALAUSA, J.C.; GIUGE, L.; MILLOT, P. Assessment of a two years study of the natural enemies fauna of *Scaphoideus titanus* Ball in its North American native area. In: EUROPEAN MEETING OF THE IOBC/wprs WORKING GROUP “INTEGRATED CONTROL IN VITICULTURE”, 2003, Volos. **Proceedings...** Volos: IOBC, 2003. p. 237-240.

OEPP/EPPO. **Grapevine flavescence dorée MLO**: data sheets on quarantine organisms n°. 94. 1983. (EPPO. Bulletin, 13). Disponível em: <http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Flavescence_doree/PHYP64_ds.pdf>. Acesso em: 09 jan. 2009.

_____. **Specific quarantine requirements**. Vilnius, 1990. 540 p. (EPPO. Technical Documents, 1008).

_____. **Grapevine flavescence dorée phytoplasma**. Vilnius, 2007. 542 p. (EPPO. Bulletin, 37).

- ORENSTEIN, S.; ZAHAVI, T.; WEINTRAUB, P. Distribution of phytoplasma in grapevines in Golan Heights, Israel, and development of a universal primer, **Vitis**, Landau, v. 40, p. 219-223, 2001.
- OSHIMA, K.; KAKIZAWA, S.; NISHIGAWA, H.; JUNG, H.Y.; WEI, W.; SUZUKI, S.; ARASHIDA, R.; NAKATA, D.; MIYATA, S.; UGAKI, M.; NAMBA, S. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. **Nature Genetics**, New York, v. 36, p. 27-29, 2004.
- PARMESSUR, Y.; ALJANABI, S.; SAUMTALLY, S.; DOORUN-SAUMTALLY, A. *Sugarcane yellow leaf virus* and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, p. 561-566, 2002.
- PETRI JÚNIOR, J.L.; PALLADINNI, L.A.; SCHUCK, E.; DUCROQUET, J.P.H.P.; MATOS, C.S.; POLA, A.C. **Dormência e indução de brotação de fruteiras de clima temperado**. Florianópolis: EPAGRI, 1996. 110 p. (EPAGRI. Boletim Técnico, 75).
- POMMER, C.V. Videira In: BRUCKNER, C.H. (Ed.) **Melhoramento de fruteiras de clima temperado**. Viçosa: UFV, 2002. p. 127-186.
- 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 mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 1130-1137, 1993.
- REYNIER, A. **Manual de viticultura**. Madrid: Mundi-Prensa, 1989. 382 p.
- RIBEIRO, L.F.C.; BEDENDO, I.P. Associação constante de um fitoplasma do grupo II com o superbrotamento da maracujazeiro cultivado em diversas regiões brasileiras. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 33. p. 60, 2007. Suplemento.
- RIBEIRO, L.F.C.; BEDENDO, I.P.; SANHUEZA, R.M.V. Evidência molecular da ocorrência de um fitoplasma associado ao lenho mole da macieira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 30-33, 2007.
- ROBERTO, S.R.; PEREIRA, F.M.; BOLIANI, A.C.; SILVA, A.C.C.da. Origem botânica e biologia da videira. In: BOLIANI, A.C.; FRACARO, A.A.; CORRÊA, L. de SOUZA (Ed.). **Uvas rústicas: cultivo e processamento em regiões tropicais**. Jales: Universitária, 2008. cap. 2, p. 30-50.
- SAWAYANAGI, T.; HORIKOSHI, N.; KANEHIRA, T.; SHINOHARA, M.; BERTACCINI, A.; COUSIN, M.T.; HIRUKI, C.; NAMBA, S. 'Candidatus Phytoplasma japonicum' a new phytoplasma taxon associated with Japanese hydrangea phyllody. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 49, p. 1275-1285, 1999.

SCHNEIDER, B.; AHRENS, U.; KIRKPATRICK, B.C.; SEEMÜLLER, E. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organism using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. **Journal of General Microbiology**, London, v. 139, p. 519-527, 1993.

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

SEEMÜLLER, E.; SCHNEIDER, B. ‘Candidatus Phytoplasma mali’, ‘Candidatus Phytoplasma pyri’ and ‘Candidatus Phytoplasma prunorum’, the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1217-1226, 2004.

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

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

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

SOUSA, J.S.I. Exame da viticultura brasileira por Estados. In: SOUSA, J.S.I. (Ed.). **Uvas para o Brasil**. Piracicaba: FEALQ, 1996. cap. 3, p. 93-155.

TORRES, E.; BOTTI, S.; RAJOLA, J.; BLANCO, V.; MARTIN, M.P.; BERTACCINI, A. Molecular characterization and geographical distribution of Flavescentia dorée phytoplasmas in Spain. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE STUDY OF VIRUS AND VIRUS-LIKE DISEASES OF THE GRAPEVINE (ICVG), 14., 2003, Lacorotondo. **Proceedings...** Lacorotondo: ICVG, 2003. p. 87-88.

VALIUNAS, D.; STANIULIS, J.; DAVIS, R.E. ‘Candidatus phytoplasma fragariae’, a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry, *Fragaria 6 ananassa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 277-281, 2006.

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

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

APÊNDICES

APÊNDICE A - Sequência parcial do gene 16S rDNA do fitoplasma associado à ao amarelo da videira, presente na amostra 1= Brasil (MV1781) planta 1

AAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGAC
CTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTA
AAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTG
GGACTGAGACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAA
TGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTA
AAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAAT
GAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGC
GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTAAATAAGTTTATGGTC
TAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAG
AGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACC
AGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGG
AGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTT
GGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACG
CAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGT
TTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTG
TAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACC
AGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTG
GGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATG
GCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCT
CAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGC
GAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTACGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCAAAT
CG

APÊNDICE B - Sequência parcial do gene 16S rDNA do fitoplasma associado à ao amarelo da videira, presente na amostra 3= Brasil (TP1780) planta 1

AAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGAC
CTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTA
AAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTG
GGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAA
TGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTA
AAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAAT
GAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGGCAAGC
GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTC
TAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAG
AGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACC
AGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAACGTT
GGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACG
CAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGT
TTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTG
TAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACC
AGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTG
GGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATG
GCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCT
CAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGC
GAATCAGCATGTTCGCGGTGAATACGTTTCGCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCAAAT
CG

APÊNDICE C - Sequência parcial do gene 16S rDNA do fitoplasma associado à ao amarelo da videira, presente na amostra 4= Benitaka (LD1587) planta 1

AAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGAC
CTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTA
AAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTG
GGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAA
TGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTA
AAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAAT
GAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGC
GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTAAATAAGTTTATGGTC
TAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAG
AGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACC
AGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACG
TTGGGTAAAACCAAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTA
CGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGT
TGTTTAATTTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAG
CTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC
TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTT
ACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAG
GTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACA
ATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACA
GTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAA
TCGCGAATCAGCATGTGCGGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTC
AAATCA