**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE UM FITOPLASMA DO
GRUPO 16SrIII EM PLANTAS DE MAÇÃ COM SINTOMAS DE LENHO
MOLE**

LUIZ FERNANDO CALDEIRA RIBEIRO

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

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro – 2003

**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE UM FITOPLASMA DO
GRUPÔ 16SrIII EM PLANTAS DE MAÇÃ COM SINTOMAS DE LENHO
MOLE**

LUIZ FERNANDO CALDEIRA RIBEIRO
Engenheiro Agrônomo

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

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

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro – 2003

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

Ribeiro, Luiz Fernando Caldeira
Detecção e identificação molecular de um fitoplasma do grupo 16SrIII em plantas de maçã
com sintomas de lenho mole / Luiz Fernando Caldeira Ribeiro. -- Piracicaba, 2003.
51 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.
Bibliografia.

1. Fitoplasma 2. Lenho mole 3. Maçã 4. Superbrotamento I. Título

CDD 634.11

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

Em reconhecimento aos meus pais José e Maria pelo esforço e carinho que dedicaram para minha formação pessoal e profissional,

À minha irmã Fernanda, que nas horas difíceis me apoiou e torceu por mim,

À minha companheira Patricia, pelo seu constante incentivo, companheirismo, apoio e amor,

DEDICO

O SENHOR é o meu pastor; nada me faltará. Ele me faz repousar em pastos verdejantes. Leva-me para junto das águas de descanso; refrigera-me a alma. Guia-me pelas veredas da justiça por amor do seu nome. Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal nenhum, porque tu estás comigo; o teu bordão e o teu cajado me consolam. Preparas-me uma mesa na presença dos meus adversários, unges-me a cabeça com óleo; o meu cálice transborda. Bondade e misericórdia certamente me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na Casa do SENHOR para todo o sempre.

(Salmos 23: 1-6)

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos às seguintes instituições e pessoas que colaboraram para a execução do presente trabalho:

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela formação profissional; Ao Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola pela oportunidade, por toda a estrutura e assistência necessárias à realização desse trabalho;

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

Ao Professor Dr. Ivan Paulo Bedendo pela orientação, amizade, apoio e incentivo em todos os momentos;

À pesquisadora Rosa Maria Valdebenito Sanhueza, da EMBRAPA Uva e Vinho, pelo envio das amostras de maçã;

A todos os professores do Setor de Fitopatologia da ESALQ pela amizade e ensinamentos transmitidos;

Aos funcionários Heloísa, Marise, Rodolfo, Edivaldo, Pedro, Fernanda, Jeferson e Marina, do Setor de Fitopatologia, pela amizade e presteza no auxílio solicitado;

Aos companheiros do laboratório de Fitopatologia Molecular Adriana, Ana Paula, Raquel e Jorge pelos bons momentos compartilhados e pelos cafés tomados;

Aos colegas do curso do PPG em Fitopatologia pela amizade, apoio e ensinamentos;

Aos Senhor Armando e Dona Detinha, por me recebem de braços abertos em sua casa e sempre me apoiarem. O meu sincero Obrigado;

Aos amigos do Tabajara Vila PG pelas alegrias, glórias e companheirismo;

À Prefeitura do Campus “Luiz de Queiroz”, em especial a CAVE, que possibilitou a permanência na Vila da Pós-Graduação, durante dois anos, e aos colegas da Vila pelo convívio;

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
SUMMARY.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Produção de maçã no Mundo e no Brasil.....	4
2.2 Lenho mole da macieira.....	5
2.2.1 Aspectos históricos.....	5
2.2.2 Sintomatologia.....	6
2.2.3 Etiologia.....	7
2.2.4 Controle.....	9
2.3 Fitoplasma e doenças de plantas.....	9
2.4 Diagnose de doenças associadas a fitoplasmas.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Coleta de amostras de maçã.....	16
3.2 Extração de DNA.....	16
3.3 Condições de PCR para detecção do fitoplasma.....	18
3.4 Identificação de fitoplasma por PCR.....	19
3.5 Análise de RFLP.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Detecção de fitoplasma por PCR.....	22

4.2 Identificação de fitoplasma por PCR.....	28
4.3 Identificação de fitoplasma através da técnica de RFLP.....	31
5 CONCLUSÕES.....	42
ANEXOS.....	43
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	45

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>1 Análise dos produtos de PCR duplo, conduzidos com os pares de oligonucleotídeos universais, mF2/mR1 e F2n/R2, para amostras de ramos coletadas em três plantas de maçã da região de Vacaria/RS. M – Marcador Molecular 1kb Ladder; Ch – Amostra de planta de chuchu com superbrotamento; Mi – Amostra de planta de milho com enfezamento vermelho; Vi – Amostra de vinca com superbrotamento; Ms – Amostra de planta de maçã sadia; Ag – Água destilada-deionizada; P1 – Planta 1; P2 – Planta 2 e P3 – Planta 3.....</p>	26
<p>2 Análise dos produtos de PCR duplo, conduzidos com os pares de oligonucleotídeos universais, mF2/mR1 e F2n/R2, para amostras de raízes coletadas em três plantas de maçã da região de Vacaria/RS. M – Marcador Molecular 1kb Ladder; Ch – Amostra de planta de chuchu com superbrotamento; Mi – Amostra de planta de milho com enfezamento vermelho; Ms – Amostra de planta de maçã sadia; P1 – Planta 1; P2 – Planta 2 e P3 – Planta 3.....</p>	27

- 3 Análise dos produtos de PCR duplo, conduzidos com os pares de oligonucleotídeos específicos para o grupo 16SrIII, para amostras de maçã provenientes da região de Vacaria/RS. M – Marcador Molecular 1Kb Ladder; Ch – Planta de chuchu com superbrotamento; Ms – Amostra de planta de maçã sadia; P1 – Planta 1; P2 – Planta 2 e P3 – Planta 3..... 30
- 4 Produtos da digestão enzimática obtidos com *Kpn* I. Análise dos produtos de PCR duplo conduzidos com os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, utilizando DNA extraídos de plantas de maçã com sintomas de lenho mole, coletados na região de Vacaria, RS. Colunas: Ch – amostra de chuchu; 1, 2 e 3 – amostras de maçã obtidas das plantas 1, 2 e 3; M – padrão molecular (cima para baixo): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 e 72..... 34
- 5 Produtos da digestão enzimática obtidos com *Mse* I. Análise dos produtos de PCR duplo conduzidos com os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, utilizando DNA extraídos de plantas de maçã com sintomas de lenho mole, coletados na região de Vacaria, RS. Colunas: Ch – amostra de chuchu; 1, 2 e 3 – amostras de maçã obtidas das plantas 1, 2 e 3; M – padrão molecular (cima para baixo): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 e 72..... 35

- 6 Produtos da digestão enzimática obtidos com *Rsa* I. Análise dos produtos de PCR duplo conduzidos com os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, utilizando DNA extraídos de plantas de maçã com sintomas de lenho mole, coletados na região de Vacaria, RS. Colunas: Ch – amostra de chuchu; 1, 2 e 3 – amostras de maçã obtidas das plantas 1, 2 e 3; M – padrão molecular (cima para baixo): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 e 72..... 36
- 7 Produtos da digestão enzimática obtidos com *Sau* 3AI. Análise dos produtos de PCR duplo conduzidos com os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, utilizando DNA extraídos de plantas de maçã com sintomas de lenho mole, coletados na região de Vacaria, RS. Colunas: Ch – amostra de chuchu; 1, 2 e 3 – amostras de maçã obtidas das plantas 1, 2 e 3; M – padrão molecular (cima para baixo): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 e 72..... 37
- 8 Produtos da digestão enzimática obtidos com *Alu* I. Análise dos produtos de PCR duplo conduzidos com os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, utilizando DNA extraídos de plantas de maçã com sintomas de lenho mole, coletados na região de Vacaria, RS. Colunas: Ch – amostra de chuchu; 1, 2 e 3 – amostras de maçã obtidas das plantas 1, 2 e 3; M – padrão molecular (cima para baixo): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 e 72..... 38

- 9 Produtos da digestão enzimática obtidos com *Hinf* I. Análise dos produtos de PCR duplo conduzidos com os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, utilizando DNA extraídos de plantas de maçã com sintomas de lenho mole, coletados na região de Vacaria, RS. Colunas: Ch – amostra de chuchu; 1, 2 e 3 – amostras de maçã obtidas das plantas 1, 2 e 3; M – padrão molecular (cima para baixo): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 e 72..... 39
- 10 Produtos da digestão enzimática obtidos com *Hpa* II. Análise dos produtos de PCR duplo conduzidos com os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, utilizando DNA extraídos de plantas de maçã com sintomas de lenho mole, coletados na região de Vacaria, RS. Colunas: Ch – amostra de chuchu; 1, 2 e 3 – amostras de maçã obtidas das plantas 1, 2 e 3; M – padrão molecular (cima para baixo): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 e 72..... 40
- 11 Produtos da digestão enzimática obtidos com *Hha* II. Análise dos produtos de PCR duplo conduzidos com os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, utilizando DNA extraídos de plantas de maçã com sintomas de lenho mole, coletados na região de Vacaria, RS. Colunas: Ch – amostra de chuchu; 1, 2 e 3 – amostras de maçã obtidas das plantas 1, 2 e 3; M – padrão molecular (cima para baixo): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 e 72..... 41

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Resultados de PCR duplo, conduzidos com oligonucleotídeos universais, mF2/mR1 e F2n/R2, para amostras obtidas de plantas de maçã exibindo sintomas de lenho mole, coletadas na região de Vacaria/RS durante o ano de 2000.....	23

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE UM FITOPLASMA DO GRUPO 16SRIII EM PLANTAS DE MAÇÃ COM SINTOMAS DE LENHO MOLE

Autor: LUIZ FERNANDO CALDEIRA RIBEIRO

Orientador: Prof. Dr. IVAN PAULO BEDENDO

RESUMO

Entre os problemas fitossanitários da maçã (*Malus spp*) estão o superbrotamento e o lenho mole, doenças associadas a fitoplasma. Para o caso do lenho mole, ainda não é totalmente aceito que um fitoplasma seja o agente causal. No entanto, vários trabalhos, usando microscopia eletrônica e enxertia de tecidos, têm apontado para a natureza fitoplasmática da doença. Mais recentemente, um fitoplasma do grupo 16Srl foi detectado em plantas de maçã cultivadas no Canadá e na República Checa. No Brasil, o lenho mole ocorre em vários estados do sul do país, sendo que pesquisas conduzidas com microscopia eletrônica e testes biológicos de transmissão por enxertia também têm evidenciado um possível fitoplasma associado à doença. O objetivo do presente trabalho foi contribuir para o conhecimento da etiologia destas doenças. Para isto,

três plantas de maçã com sintomas de lenho mole, cultivadas em pomar instalado na região de Vacaria/RS, foram amostradas visando a detecção de fitoplasma, bem como a sua identificação e posterior classificação. Para detecção, foi empregada a técnica de PCR duplo com os oligonucleotídeos R16mF2/mR1 e R16F2n/R2. A identificação foi através de PCR com os oligonucleotídeos R16(III) F2/R1 e da técnica de RFLP com as enzimas de restrição *AluI*, *HhaI*, *KpnI*, *HinfI*, *HpaII*, *MseI*, *RsaI* e *Sau3AI*. Os resultados mostraram a presença de fitoplasma em 29 das 54 amostras coletadas durante o ano de 2000. As amostras de ramos e raízes coletadas no período de janeiro – abril e setembro – outubro apresentaram consistentemente fitoplasma em seus tecidos. Nas amostras colhidas em junho – agosto não houve detecção do microrganismo. A identificação molecular revelou que o fitoplasma presente em plantas sintomáticas pertencia ao grupo 16SrIII, sendo os resultados de PCR confirmados pela aplicação de RFLP. As análises de RFLP permitiram também determinar que este fitoplasma é, possivelmente, um membro do sub-grupo B. A constatação de um fitoplasma de grupo 16SrIII associado ao lenho mole em plantas de maçã cultivadas no Brasil, reforça as evidências relatadas em outros trabalhos, de que um fitoplasma seja o agente causal da doença. O fato de um fitoplasma diverso do grupo 16SrI estar associado ao lenho mole no Brasil pode ser justificado pela diversidade destes mollicutes, em função da região geográfica e da variedade do hospedeiro.

**DETECTION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF A
PHYTOPLASMA OF THE GROUP 16SRIII IN APPLE PLANTS
WITH RUBBERY WOOD SYMPTOMS**

Author: LUIZ FERNANDO CALDEIRA RIBEIRO

Adviser: Prof. Dr. IVAN PAULO BEDENDO

SUMMARY

The proliferation and rubbery wood diseases which are associated with phytoplasma are some of the diseases that occur in apple trees (*Malus* spp). In the case of rubbery wood disease, phytoplasma is not totally accepted as its causal agent. However, several researches by using electron microscopy and tissue grafting, have been able to show the phytoplasma associated with that disease. Recently, a phytoplasma from group 16Srl was detected in apple plants grown in Canada and Czech Republic. In Brazil, rubbery wood occurs in several states of the south region. Results obtained through electron microscopy and transmission biological tests using grafting have shown a possible phytoplasma associated to the disease. The purpose of the present work was to contribute for the knowledge of that disease aetiology. Thus tissue samples from three apple plants exhibiting rubbery wood symptoms, grown at an orchard installed in

the region of Vacaria/RS, were obtained for phytoplasma detection, identification and classification. Nested PCR technique with R16mF2/mR1 and R16F2n/R2 primers was employed to detect phytoplasma. PCR with R16(III) F2/R1 primers and RFLP technique with the restriction enzymes *Alu I*, *Hha I*, *Kpn I*, *Hinf I*, *Hpa II*, *Mse I*, *Rsa I* and *Sau 3AI* were used to phytoplasma identification. The results showed that phytoplasma occurred in 29 of the 54 samples collected in the year of 2000. Branches and root samples obtained from January to April and from September to October exhibited phytoplasma in their tissues. In tissue samples collected from June to August, the microorganism has not been detected. The molecular identification revealed that the phytoplasma from symptomatic plants belonged to the group 16SrIII and the PCR results were confirmed by RFLP technique. Based upon the RFLP analyses it can be suggested that this phytoplasma is a member of the sub-group B. The occurrence of a phytoplasma of group 16SrIII associated to rubbery wood in apple plants grown in Brazil, reinforces the evidences related in other works, that a phytoplasma is the causal agent of that disease. The fact that a phytoplasma different from 16SrI group is associated to rubbery wood diseases in Brazil can be justified for the diversity of these mollicutes, due to geographical area and host.

1 INTRODUÇÃO

Doenças causadas por fitoplasmas têm provocado danos relevantes para várias espécies vegetais cultivadas em diferentes continentes. Apesar da diversidade de espécies hospedeiras, nas rosáceas como macieira, pereira e pessegueiro estas doenças têm se manifestado provocando impacto em relação aos danos, tanto na Europa como na América do Norte.

Doenças associadas a fitoplasmas no Brasil ainda são pouco conhecidas. Este fato pode ser atribuído ao pouco conhecimento dos técnicos e agricultores sobre fitoplasmas como agentes causais de doenças de plantas. Assim, é comum atribuir-se a outras causas as moléstias de etiologia fitoplasmática. Isto é justificável, em função de que os sintomas exibidos por plantas infectadas por estes patógenos podem ser facilmente confundidos com aqueles ocasionados por vírus, distúrbios genéticos e fatores abióticos, como desbalanços nutricionais e anomalias provocadas por herbicidas.

No caso de fruteiras de clima temperado cultivadas no Brasil, a ocorrência de doenças associadas a fitoplasmas se reveste de particular interesse, pois praticamente todos os materiais aqui cultivados foram importados justamente de países do hemisfério norte, onde estas doenças se constituem em problemas sérios. Como estas espécies são propagadas vegetativamente e os fitoplasmas podem ser disseminados juntamente com material propagativo é alta

a probabilidade destes agentes terem sido introduzidos juntamente com materiais vegetais.

Especificamente em relação à macieira, duas importantes doenças associadas a fitoplasmas são conhecidas em vários países, sendo elas o superbrotamento e o lenho mole. Conhecido há mais de cinquenta anos como uma doença comum em pomares de maçã, somente em tempos mais recentes tem sido demonstrado que um fitoplasma está associado ao lenho mole. Pesquisas, usando transmissão por enxertia, visualização ao microscópio eletrônico e detecção por técnica molecular têm apontado um fitoplasma como possível agente causal desta doença. A caracterização molecular deste agente indicou que o mesmo é um representante do grupo 16Srl da atual classificação aceita para fitoplasmas.

Investigações conduzidas com macieiras cultivadas em território brasileiro, usando microscopia eletrônica e testes de transmissão por união de tecido, também têm revelado a possível associação de um fitoplasma com plantas exibindo sintomas de lenho mole. No entanto, ainda não foi feita nenhuma confirmação usando técnicas moleculares. A sua detecção e caracterização molecular permitiriam dar mais um passo em direção à comprovação de sua ocorrência em material de maçã cultivado em nossas condições.

Assim, o presente trabalho foi conduzido com amostras de plantas de maçã com sintomas típicos de lenho mole, cultivadas em pomares instalados no sul do Brasil, com os objetivos de:

- detectar fitoplasma através da técnica molecular de PCR, usando oligonucleotídeos específicos para esta finalidade;
- identificar molecularmente o fitoplasma associado ao lenho mole através das técnicas de PCR e RFLP;

- classificar o fitoplasma em um dos grupos atualmente existentes e compará-lo ao fitoplasma identificado em macieiras cultivadas em outros países.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de maçã no mundo e no Brasil

Típica espécie de clima temperado, a maçã (*Malus spp*) é de relevante importância econômica na fruticultura mundial, sendo superada, em valores econômicos somente pela banana e pelos citros. Alguns países produtores como a França e Itália, chegam a atingir uma produção anual de 2 milhões de toneladas. Na América Latina, destacam-se a Argentina e o Chile, tendo uma produção anual de aproximadamente 1 milhão de toneladas (Agrianual, 2003).

No Brasil, os maiores pomares de macieira encontram-se nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, que contribuem, respectivamente, com 55% e 40% da produção nacional. A área colhida na safra 2002 foi de 31.070 hectares, que contribuiu para uma produção de 857.824 toneladas (Agrianual, 2003).

O consumo de maçã na Europa varia entre 20 a 30Kg per capita/ano, enquanto no Brasil, em 2002, foi consumido menos de 1Kg per capita/ano. Esta situação é reflexo do baixo poder aquisitivo de boa parte da população e do menor preço de venda das frutas tropicais como a banana e a laranja.

2.2 Lenho mole da macieira

2.2.1 Aspectos históricos

Dentre os problemas sanitários da cultura da maçã, estão relacionados o superbrotamento (“apple proliferation” – AP) comprovadamente associado a um fitoplasma, e o lenho mole (“apple rubbery wood” – ARW) provavelmente associado a um fitoplasma.

O lenho mole tem ampla distribuição na Europa existindo registros de sua ocorrência na Itália (Lee et al., 1996), República Checa (Bertaccini et al., 1998), França (Lemoine, 1986) e Hungria (Del Serrone et al., 1998). Existem ainda relatos na Índia, África do Sul, Austrália, México, Estados Unidos, Canadá e Ásia (Lemoine & Thibault, 1989; Ferire & Camelatto, 1994). Na França, existem relatos de incidência da doença da ordem de 25 a 30%, enquanto na Nova Zelândia, a ocorrência da doença chega a atingir, em alguns pomares, cerca de 75% das plantas cultivadas (Bleicher, 1997).

No Brasil, no início da década de oitenta, foi realizado um levantamento dessa doença nos pomares dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. A doença foi constatada em todos os estados, sendo mais freqüente na cultivar Gala, na qual a incidência chegou a atingir índices de 50% (Betti & Kitajima, 1981).

O lenho mole já foi relatado no Estado de São Paulo e apresenta a característica de ocorrer sem produzir sintomas nas condições climáticas do estado (Betti & Müller, 1982). No entanto, no município de Capão Bonito, onde o frio é mais acentuado, ocorreu

uma alta incidência de plantas apresentando sintomas típicos de lenho mole (Betti et al. 1986).

Em decorrência da produção de mudas sem certificação, pela prática de enxertia de materiais de procedência duvidosa e ausência de sintomas para a detecção visual, é provável que o agente causal do lenho mole esteja disseminado de forma mais expressiva do que aquela relatada.

2.2.2 Sintomatologia

Devido a alteração que ocorre na formação de lignina, a haste central e principalmente os ramos se apresentam extremamente flexíveis e facilmente dobráveis. Nas porções amolecidas geralmente ocorre uma alteração da cor da casca para tons acinzentados e no lenho, as áreas afetadas exibem coloração marrom (Betti & Kitajima, 1981). São comuns os sintomas de encurtamento de internódios, formação de ramos achatados, redução do crescimento da ordem de 50%, visualizados em plantas de dois anos de idade. Em estádios mais adultos da planta, pode ocorrer redução do tamanho do fruto. A redução na produção pode variar entre 25 a 50%, enquanto o vigor da planta pode ser reduzido de 10% a 50% (Bleicher, 1997).

Os sintomas são mais severos e mais visíveis na fase aguda da infecção, em plantas de pomares instalados em regiões de clima mais frio e nos anos com invernos rigorosos. Estes sintomas tendem a desaparecer na sua fase crônica, que ocorre no intervalo de temperatura entre 18°C e 20°C (Zawadzka & Guzewska, 1986).

Nas regiões de clima mais quente e em casa de vegetação, não se observou a ocorrência de sintomas, mesmo em testes conduzidos com cultivares indicadoras (Betti & Müller, 1982; Ferire & Camelatto, 1994).

2.2.3 Etiologia

A doença foi relatada pela primeira vez na Inglaterra na década de quarenta (Souza & Panish, 1992). Inicialmente, devido às características da doença e à forma de transmissão do possível agente causal, acreditava-se que o lenho mole fosse de etiologia viral. Entretanto, tentativas de demonstrar a ocorrência de vírus não obtiveram sucesso (Bleicher, 1997) e, utilizando-se a técnica de microscopia eletrônica, foi confirmada a associação de fitoplasma com os sintomas de lenho mole em plantas coletadas na Europa (Beakbane et al, 1971).

No Brasil, amostras das variedades Gala, Golden pur e Einshemer foram coletadas em pomares localizados nos estados de Santa Catarina e São Paulo. Esses materiais foram estabelecidos, diretamente em vasos através de enxertia de gema em plântulas de macieira e mantidos em condições de telados (Betti & Müller, 1982). Após a brotação, amostras de folhas foram processadas para a microscopia eletrônica. Nas plantas sintomáticas foram detectados, no interior do floema, filamentos alongados intercalados formando estruturas reticuladas evidenciando a presença de fitoplasma. Em plantas assintomáticas foi observado somente a proteína P, que

consiste num componente fibrilar normal do floema. (Vega et al., 1981).

Souza & Parish (1982), trabalhando com plantas sintomáticas coletadas no sul do país, observaram a presença de corpúsculos pleomórficos no floema, através do emprego da técnica DAPI (4' – 6' – diamidino – 2 – phenylindole).

A demonstração de que a doença é de natureza infecciosa também foi feita através de testes biológicos, através da união de tecidos de plantas suspeitas de infecção com plantas indicadoras (Betti et al., 1982). As variedades Lord Lambourne, Gala e Golden Delicious são recomendadas como indicadoras, tendo sido empregadas em diversos trabalhos visando evidenciar a ocorrência do organismo associado ao lenho mole (Betti & Kitajima, 1981, Betti, 1982, Betti et al., 1982, Bleicher, 1997). Até o momento, nenhum inseto vetor foi relatado como agente transmissor (Bleicher, 1997).

Testes de detecção conduzidos na Europa, através da técnica de PCR simples, levaram à conclusão de que a doença não estava associada a fitoplasma, pois os resultados obtidos foram negativos para as plantas que exibiam sintomas da doença (Poggi-Pollini et al., 1995). No entanto, experimento conduzido com amostras provenientes do Canadá e da República Checa (Bertaccini et al., 1998) confirmou a presença de um fitoplasma do grupo 16SrI em plantas com sintomas de lenho mole. A detecção foi conduzida com os pares universais R16F1/R0 e R16F2/R2 usados em PCR duplo. A determinação de grupo foi realizada através do emprego de PCR usando o par de oligonucleotídeos 16S(I) F1/R1, específicos para fitoplasmas do grupo 16SrI. Através da técnica de RFLP foi confirmada

a identificação de um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrI, nas amostras de plantas de maçã.

2.2.4 Controle

A fiscalização constante e o uso de mudas comprovadamente sadias são medidas recomendadas para evitar que a doença seja introduzida em regiões produtoras ainda indenens. Em plantios onde a doença já ocorre, recomenda-se a inspeção periódica da cultura e a erradicação das plantas doentes.

Em testes de aplicação de oxitetraciclina em plantas doentes ocorreu a remissão temporária de sintomas. Entretanto, uma vez cessado o tratamento, os sintomas da doença reapareceram. O controle com antibiótico tem maior efetividade em plantas jovens, no início da infecção, do que em plantas adultas (Bleicher, 1997).

O plantio da variedade Golden Delicious tem sido recomendado na instalação de novos pomares, pois essa variedade tem se mostrado mais resistente ao lenho mole (Lemoine & Michelesi, 1997).

2.3 Fitoplasma e doenças de plantas

Doi et al. (1967) ao observarem tecidos de plantas apresentando sintomas do grupo "amarelo", em microscópio eletrônico, verificaram a ocorrência de corpúsculos arredondados e pleomórficos nos vasos do floema. Inicialmente, os fitoplasmas foram

denominados de organismos semelhantes aos micoplasmas (MLOs) em razão de serem morfológicamente similares aos micoplasmas ocorrentes em animais, já conhecidos desde o início do século XX. A partir de 1994, os MLOs passaram a ser designados por fitoplasmas (Davis, 1995b).

Fitoplasmas são organismos procariotos, unicelulares, sem parede celular e não cultiváveis em meio de cultura (Bedendo, 1995). Internamente sua ultraestrutura compreende grânulos densos, semelhantes aos ribossomos, e áreas contendo filamentos de DNA (Agrios, 1988).

Anomalias no crescimento e desenvolvimento da planta sugerem a ocorrência de distúrbios de natureza hormonal (Lee & Davis, 1992; Davis, 1995b). Os sintomas decorrentes destes distúrbios podem se expressar na forma de clorose generalizada nas folhas, desenvolvimento de brotos (superbrotamento, perfilhamento), enfezamento da planta, clareamento das nervuras, redução dos internódios, deformação dos órgãos florais (cálice gigante, filodia e virescência) e tendência de crescimento vertical anormal (Kitajima & Costa, 1970).

Embora estes sintomas, isolados ou em associação, possam ser atribuídos a agentes infecciosos como vírus e bactérias fastidiosas, anomalia genética, distúrbios nutricionais e fatores do ambiente como compactação do solo e estresses de natureza diversa, a presença de fitoplasma tem sido detectada em plantas que apresentam estes tipos de sintomas.

Centenas de doenças estão associadas aos fitoplasmas (McCoy et al., 1989) e várias delas têm se mostrado altamente destrutivas, causando perdas relevantes em plantas de importância

agronômica. No âmbito mundial, destacam-se doenças como o enfezamento vermelho do milho e o amarelecimento letal do coqueiro e do pessegueiro nas Américas; os amarelos da videira, o superbrotamento da batata e o declínio da pereira na Europa; o nanismo do arroz e o superbrotamento do quiri e do sândalo na Ásia. Uma referência particular ao amarelo do pessegueiro, responsável pelo abandono de área tradicionalmente produtora do fruto nos estados do leste dos Estados Unidos da América (Scott et al., 1977; Davis, 1995b).

No Brasil, doenças como o superbrotamento do maracujazeiro, o superbrotamento da mandioca, o irizado do chuchuzeiro, o enfezamento vermelho do milho, o superbrotamento da soja, o cálice gigante do tomateiro, o declínio do caquizeiro e o superbrotamento do feijoeiro estão associados aos fitoplasmas (Kitajima, 1995). Além das espécies cultivadas, destaca-se a detecção de fitoplasma em diversas plantas silvestres e daninhas (Kitajima, 1995), aumentando sua importância na epidemiologia deste tipo de doença.

Entretanto, a epidemiologia de muitas doenças causadas por fitoplasmas é pouco conhecida; a gama de hospedeiros naturais e os insetos vetores da maioria dos fitoplasmas não foram ainda determinados; as taxas de mutação e o papel das variações populacionais dentro das espécies não estão esclarecidos, os efeitos da infecção causada por misturas de fitoplasmas (infecção mista) sobre o desenvolvimento da doença são totalmente desconhecidos e os mecanismos naturais de defesa de plantas contra o patógeno não são ainda compreendidos (Davis, 1995b).

2.4 Diagnose de doenças associadas a fitoplasmas

A diagnose, quando feita precocemente e de forma acurada, constitui-se num componente relevante para o sistema de manejo da doença (Miller & Martin, 1988). Seu reconhecimento é o primeiro passo para o controle, pois a partir do diagnóstico é possível selecionar o método de controle mais eficiente, objetivando diminuir ao máximo os prejuízos econômicos que possam ser causados pelos patógenos.

No caso específico das doenças associadas aos fitoplasmas, a diagnose baseada na expressão de sintomas nem sempre é confiável, podendo induzir a erros (Davis, 1995a). A similaridade existente entre os sintomas associados a esses mollicutes e aqueles provocados por patógenos de natureza viral; a difícil observação destes organismos nos tecidos das plantas doentes e a característica dos fitoplasmas de não serem cultiváveis em meio de cultura são fatores que dificultam sua diagnose. Devem ser considerados também os casos de plantas assintomáticas, as quais, mesmo sem exibirem sintomas podem ser portadoras desse procarioto (Davis, 1995a).

Outra dificuldade na detecção de fitoplasmas em plantas e insetos está, muitas vezes, relacionada com o baixo título destes organismos e com a distribuição desuniforme dos mesmos nas diferentes partes do hospedeiro (Lee & Davis, 1992). Estes fatores podem impedir sua detecção, dependendo da sensibilidade da técnica que está sendo empregada, dificultando uma diagnose segura. Isto é particularmente importante para a compreensão da epidemiologia de doenças, nas quais as plantas assintomáticas podem atuar como fonte de inóculo (Davis, 1995b).

A microscopia eletrônica, os testes sorológicos e as técnicas moleculares são recursos empregados para a detecção e identificação de fitoplasmas. A diagnose com base nos sintomas tem sido confirmada pela detecção do fitoplasma no floema, usando microscópio de transmissão eletrônica. No entanto, a utilização da microscopia eletrônica não permite a identificação do organismo detectado, sendo, portanto, uma técnica aplicada nos casos que requerem informações gerais a respeito da associação fitoplasma-doença (Harrison et al., 1996). Os fitoplasmas dificilmente são visualizados em microscópio óptico, contudo, é possível a observação dos mesmos utilizando métodos de coloração de ácido nucléico. (Deeley et al., 1979; Cousin, 1995).

O emprego de testes sorológicos como ELISA, dotELISA, imunomicroscopia e microscopia de imunofluorescência permitem a detecção e a diferenciação de isolados de fitoplasma associados à doença. (Lee & Davis, 1992). No entanto, a inexistência de um fator imunogênico puro, devido a dificuldade de purificar o patógeno, representa a maior limitação para a produção de antissoros policlonais, os quais normalmente apresentam baixos títulos e uma alta reação inespecífica com antígenos das plantas hospedeiras. Alguns dos problemas existentes com os antissoros policlonais foram contornados com o desenvolvimento dos antissoros monoclonais (Lin et al. 1985).

Vários relatos na literatura descrevem a eficiência e sensibilidade das sondas de DNA para detecção de fitoplasmas em hibridizações tipo "dot-blot" ou "southern-blot" (Harrison et al., 1996; Gundersen & Lee, 1996).

Os recentes avanços da biologia molecular e da biotecnologia estão sendo aplicados no desenvolvimento de ferramentas sensíveis, específicas e rápidas para a detecção de fitoplasmas. Dentre estas últimas, PCR (Polymerase Chain Reaction) e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) têm sido empregadas rotineiramente em laboratórios especializados no estudo destes organismos (Lee et al., 1993a).

A técnica ou método de PCR consiste na amplificação enzimática *in vitro* de fragmentos específicos de DNA, em progressão geométrica, visando a produção de milhões de cópias desta sequência. Os iniciadores derivados de sequências do gene 16S rDNA têm se mostrado altamente sensíveis para fins de detecção de fitoplasmas em plantas e insetos (Gundersen & Lee, 1996). Oligonucleotídeos universais e específicos para a detecção têm sido amplamente utilizados na comprovação de diagnoses em plantas presumivelmente infectadas por fitoplasmas (Davis, 1995b).

Os produtos de PCR podem ser observados através da técnica de eletroforese em gel de agarose. O fragmento de DNA, após a separação em gel de agarose, é corado com o brometo de etídio, corante fluorescente que se intercala entre os nucleotídeos na dupla hélice do DNA, e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

O processo de identificação é feito após a detecção e tem como objetivo classificar o fitoplasma em grupos pré-estabelecidos e aceitos pela comunidade internacional de bacteriologistas (Lee et al., 1998). A identificação desse procarioto pode ser realizada através da técnica de duplo PCR utilizando-se iniciadores específicos para os grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrIV e pela técnica de RFLP.

Na técnica de RFLP, as seqüências amplificadas nas reações de PCR são digeridas pelas enzimas de restrição, que são endonucleases que clivam fragmentos de DNA em locais específicos, reconhecendo seqüências específicas de 4 a 8 pares de bases (Lambais, 1995).

Os fragmentos de DNA amplificados e, posteriormente, digeridos pelas enzimas de restrição são analisados através da eletroforese em gel de poliacrilamida, corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de ultravioleta.

Cada fragmento amplificado do fitoplasma pode apresentar uma série de bandas específicas para uma determinada enzima. Esta série de bandas, resultante da digestão enzimática dos fragmentos de DNA, é chamada de perfil eletroforético. A comparação do perfil eletroforético apresentado por cada fitoplasma, para uma determinada enzima de restrição, com padrões existentes na literatura, permite determinar o grau de similaridade existente entre os mesmos (Lee et al., 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de amostras de macieiras

Amostras de ramos e raízes de plantas de maçã com idade de 11 anos da variedade Gala com porta enxerto EM-7 foram coletadas a partir de 3 plantas (P1, P2 e P3) exibindo sintomas semelhantes àqueles de lenho mole. O pomar amostrado estava implantado na região de Vacaria, no Estado do Rio Grande do Sul. As amostragens, em número de nove, foram realizadas em diferentes épocas do ano de 2000: janeiro, fevereiro, março, abril, junho, julho, agosto, setembro e outubro.

A partir de cada amostra foi obtido o DNA total para ser utilizado como molde nas reações de PCR.

3.2 Extração de DNA

A extração foi conduzida de acordo com a metodologia de Lee et al. (1993a). Triturou-se, separadamente, 2,0 g de material fresco de ramos e raízes em almofariz, utilizando-se nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados 15,0 mL de solução tampão de maceração (anexo 1) e deu-se continuidade à trituração do tecido. Centrifugou-se por 20 minutos a 20000g e descartou-se do sobrenadante. Ressuspendeu-se o precipitado em 8,0 mL de solução

tampão de extração (anexo 1), adicionando-se 160 μ L de proteínase K e 880 μ L de Sarkosyl 10%. O lisado foi incubado por duas horas a 55°C e centrifugado por 10 minutos a 7500g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 5,5 mL de isopropanol. Incubou-se o material a 20°C negativos por uma noite. Novamente realizou-se a centrifugação a 7500g por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspendido em 3,0 mL de solução tampão TE (anexo 1). Adicionou-se 75 μ L de SDS 20% e 60 μ L de proteinase K. Incubou-se por 30 minutos a 37°C. Adicionou-se 525 μ L de solução 5 M da NaCl e 420 μ L de CTAB/NaCl e incubou-se por 10 minutos a 65°C. Centrifugou-se por 5 minutos a 4000g e removeu-se a fase aquosa. Repetiu-se a extração com clorofórmio/álcool isoamílico; removeu-se a fase aquosa e adicionou-se igual volume de fenol/CIA. Levou-se para centrifugação por 5 minutos a 4000g, transferiu-se a fase aquosa para novo tubo e adicionou-se 250 μ L de isopropanol. Incubou-se a mistura por 30 minutos a 20°C negativos e centrifugou-se por 10 minutos a 10000g. Descartou-se o sobrenadante e cobriu-se o precipitado com etanol 70%. Manteve-se o material no gelo por 30 minutos. Realizou-se uma centrifugação por 10 minutos a 10000g. Em seguida, descartou-se o álcool e secou-se o precipitado. Suspendeu-se o precipitado em 200 μ L de solução tampão TE e centrifugou-se novamente por 5 minutos a 5000g. As suspensões foram transferidas para microtubos plásticos e armazenadas a -4°C.

3.3 Condições de PCR para detecção do fitoplasma

Para a detecção de fitoplasma foi realizada a amplificação de uma determinada sequência do DNA destes organismos. Oligonucleotídeos ("primers") universais para fitoplasmas, produzidos com base na sequência do 16S rDNA, foram empregados em duplo PCR. A suspensão de DNA obtida no processo de extração foi diluída na proporção 1:10 e 1:50 em água destilada-deionizada. As reações de PCR foram conduzidas com volume final de 25,0 µL, seguindo a metodologia de Lee et al. (1993b), possuindo os seguintes componentes: 19,0 µL de água deionizada-destilada; 0,5 µL de cada deoxinucleotídeos - solução 20 pmol/µL- (dCTP, dATP, dGTP, dTTP); 2,5 µL de tampão PCR; 0,15 µL de Amplitaq 5U/µL; 1,0 µL de DNA extraído da planta.

Os oligonucleotídeos universais para fitoplasmas R16mF1/mR1 foram utilizados na amplificação da sequência do 16S rDNA e os oligos R16F2n/R2 na re-amplificação do primeiro produto de PCR (Gundersen & Lee, 1996). Seguem as seqüências de bases de cada oligonucleotídeo: Oligonucleotídeos R16mF2/mR1 - R16mF2 – 5' cat gca agt cga acg a 3 e R16mR1 – 5' ctt aac ccc aat cat cga c 3'; Oligonucleotídeos R16F2N/R2 - R16F2N – 5'gaa acg act gct aag act gg 3' e R16R2 – 5'tga cgg gcg gtg tgt aca aac ccc g 3'.

Os produtos amplificados pelos iniciadores R16mF1/mR1 foram diluídos 50 vezes em água destilada-deionizada e utilizados como moldes em reações utilizando os iniciadores R16F2n/R2. As reações foram processadas em um aparelho termociclador automático programado para 35 ciclos, sendo que cada ciclo compreendeu: uma

etapa de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 3 minutos. Uma etapa inicial de 1 minuto a 94°C foi permitida antes do primeiro ciclo e uma etapa final de extensão a 72°C por 7 minutos, após o último ciclo. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%. Após coloração com brometo de etídeo, o gel foi observado em um transiluminador de luz ultravioleta.

O marcador molecular utilizado foi 1kb ladder. Como padrão positivo foi usado DNA total extraído de planta de chuchu apresentando superbrotamento, planta de milho com enfezamento vermelho e planta de vinca com superbrotamento. Como padrões negativos, foram utilizados DNA total extraído de plantas de maçã sadia e água destilada-deionizada.

3.4 Identificação de fitoplasma por PCR

Para a identificação, as amostras positivas amplificadas pelos iniciadores universais para fitoplasmas (R16mF2/mR1) foram diluídas 50 vezes em água destilada-deionizada. Na mistura da reação de PCR foram utilizados: 19,0 µL de água destilada-deionizada; 0,5 µL de cada iniciador para grupos específicos; 20 pmol/µL de mistura de deoxinucleotídeos (dCTP, dATP, dGTP, dTTP); 2,5 µL de tampão de PCR; 0,15 µL de Amplitaq 5U/µL; 1,0 µL da diluição do produto do primeiro PCR.

Para a identificação de grupos, 3 pares de oligonucleotídeos foram utilizados: R16(I) F1/R1; R16(III) F2/R1 e R16(V) F1/R1, os quais permitem identificar fitoplasmas dos grupos

16SrI, 16SrIII e 16SrV, respectivamente (Lee et al., 1993b). As seqüências dos oligonucleotídeos específicos são: Oligonucleotídeos específicos para o grupo 16SrI: R16(I)F1/R1 - R16(I)F1 – 5' taa aag acc tag caa tag g 3' e R16(I)R1 – 5' caa tcc gaa ctg aga ctg t 3'; grupo 16SrIII: R16(III)F2/R1 - R16(III)F2 – 5' aag agt gga aaa act ccc 3' e R16(III)R1 – 5' tcc gaa ctg aga tgg a 3' e grupo 16SrV: R16(V)F1/R1 - R16(V)F1 – 5' tta aaa aga ctt ctt cgg 3' e R16(V)R1 – 5' ttc aat ccg tac tga gac tac c 3'. Os padrões positivos para os grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrV, foram, respectivamente, amostras de plantas sintomáticas de milho, chuchu e crotalaria.

As reações foram processadas em um aparelho termociclador automático programado para 35 ciclos, sendo que cada ciclo compreendeu: uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 3 minutos. Uma etapa inicial de 1 minuto a 94°C foi permitida antes do primeiro ciclo e uma etapa final de extensão a 72°C por 7 minutos, após o último ciclo.

Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1%. Após coloração com brometo de etídeo, o gel foi observado em um transiluminador de luz ultravioleta. O padrão de peso molecular utilizado no gel de agarose foi o 1kb ladder.

3.5 Análise de RFLP

A identificação dos isolados também foi feita através da técnica de RFLP, com base nas análises das seqüências do 16SrDNA

amplificadas pelo PCR duplo e digeridas com endonucleases (Lee et al., 1998).

Após as amplificações dos fragmentos de 1,2 Kb obtidos de reações de PCR duplo, conduzido com os oligonucleotídeos universais (mF2/mR1 – F2n/R2), foi tomada uma alíquota de 4,0 µL, a qual foi digerida individualmente com cada enzima, por 30 horas a 36°C. As enzimas utilizadas para a identificação foram: *AluI*, *HhaI*, *KpnI*, *HinfI*, *HpaII*, *MseI*, *RsaI* e *SauIIA*.

Os produtos da digestão foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida (4,5%), seguida de coloração com brometo de etídeo e visualização em transiluminador de ultravioleta. O marcador molecular utilizado foi ΦX174RFHaeIII. O perfil eletroforético obtido para cada amostra foi comparado com os padrões existentes na literatura (Lee et al., 1993b e 1998), visando determinar a similaridade genética com outros fitoplasmas, bem como a sua classificação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Detecção de fitoplasma por PCR

As plantas amostradas apresentavam sintomas semelhantes àqueles descritos para o lenho mole. O sintoma predominante estava relacionado com a presença de ramos flexíveis. Testes conduzidos com PCR duplo, utilizando os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2 permitiram a detecção de fitoplasma em 29 das 54 amostras coletadas em 2000 (Tabela 1).

A presença de fitoplasma nos materiais amostrados foi evidenciada pela visualização de bandas, no gel de agarose, correspondentes a aproximadamente 1,2 kb, típicas para fitoplasmas quando se utiliza os referidos pares de oligonucleotídeos (Figuras 1 e 2). Bandas de 1,2 kb também foram visualizadas para os padrões positivos representados pelo chuchu, milho e vinca, porém nenhuma amplificação ocorreu para os padrões negativos constituídos por plantas sadias de maçã e pela água.

A detecção de fitoplasma em tecido de ramos praticamente se igualou à detecção em tecido de raízes. Portanto, para fins de diagnose pode-se sugerir o emprego de amostras de ramos, uma vez que as mesmas são mais fáceis de serem obtidas, causando menor injúria à planta, em relação à obtenção de amostras de raízes.

Tabela 1. Resultados de PCR duplo, conduzidos com oligonucleotídeos universais, mF2/mR1 e F2n/R2, para amostras obtidas de plantas de maçã exibindo sintomas de lenho mole, coletadas na região de Vacaria/RS durante o ano de 2000

Planta	Amostragem								
	Jan	Fev	Mar	Abr	Jun	Jul	Ago	Set	Out
PL1–RM	+	-	-	+	-	-	-	+	+
PL1–RZ	+	-	-	+	-	-	-	+	+
PL2–RM	+	+	+	+	-	-	-	+	+
PL2–RZ	+	+	-	+	-	-	-	+	+
PL3–RM	+	+	-	+	-	-	-	+	+
PL3–RZ	+	+	-	+	-	-	-	+	+
RM = Ramo			+ = Resultado Positivo						
RZ = Raiz			- = Resultado Negativo						

A detecção de fitoplasma foi altamente consistente para as amostras que se apresentaram como positivas, coletadas nas diferentes épocas do ano, exceção feita à amostragem realizada no mês de março (Tabela 1). A detecção de fitoplasma nos materiais amostrados nos períodos de janeiro-abril e setembro-outubro demonstrou o alto grau de associação deste molécula com os sintomas exibidos pelas plantas. Por outro lado, a ausência do fitoplasma nas amostras de ramos e raízes coletadas no período de junho-agosto pode ser atribuída a alguns fatores, os quais já foram relacionados em outros trabalhos de mesma natureza. Entre eles, a presença de inibidores na planta, a baixa concentração do patógeno nos tecidos vegetais e a distribuição desuniforme deste procarioto na planta. No

presente caso, a não detecção de fitoplasma parece estar mais relacionada com a ocorrência de substâncias que inibem a amplificação do fragmento alvo do microrganismo e, talvez, com a diminuição do título do microrganismo nos tecidos, dificultando a sua extração. Estes dois fatores podem estar relacionados com aspectos fisiológicos da macieira, os quais podem ser alterados ao longo do ano. O terceiro fator mencionado, aparentemente, pode ser descartado, pois as diversas amostras de ramos e raízes obtidos das mesmas plantas eliminaria a hipótese de amostrar partes vegetais livres de fitoplasma.

Embora as amostragens tivessem sido feitas ao longo de um único ano, e portanto, os resultados obtidos devessem ser confirmados, pode-se perceber que a diagnose da doença, usando PCR como complemento, pode ser comprometida dependendo da época do ano em que a amostra é obtida. Investigações visando a detecção de fitoplasma em outras espécies lenhosas, principalmente fruteiras de clima temperado como a videira, evidenciaram que a época de amostragem, em função do estágio fisiológico da planta, pode alterar os resultados dos testes de detecção (Del Serrone & Barba, 1996). Isto leva a interpretações errôneas quando se busca confirmar a diagnose feita com base nos sintomas, usando o teste molecular de PCR como complemento.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram a associação constante e consistente dos sintomas de lenho mole com a presença de fitoplasma nos tecidos das plantas que apresentavam este tipo de sintomatologia. Estes resultados são concordantes com aqueles relatados por Bertaccini et al. (1998), os quais constataram a presença de fitoplasma em tecidos de planta que apresentavam a

mesma doença. Em ambos os casos a mesma técnica de detecção foi utilizada, embora os oligonucleotídeos fosse diferentes. Resultados negativos quanto à associação fitoplasma-lenho mole (Poggi-Pollini et al., 1995) podem ser justificados pelo fato dos pesquisadores terem utilizados somente um par de oligonucleotídeos, numa reação de PCR simples. A técnica de PCR duplo, bem como o uso dos pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, usada para a detecção de fitoplasma (Gundersen & Lee, 1996), tem se mostrado muito mais sensível, quando comparado com aquelas que empregam PCR simples. Isto está refletido no uso rotineiro de PCR duplo, mesmo com o uso de oligonucleotídeos variados, nos trabalhos que visam complementar a diagnose feita com base nos sintomas.

Os resultados obtidos com o uso de PCR, tanto aqueles obtidos neste trabalho como aqueles obtidos no trabalho de Bertaccini et al. (1998), vêm se juntar aos resultados dos trabalhos conduzidos através de microscopia eletrônica e transmissão por união de tecidos, no sentido de demonstrar a associação lenho mole-fitoplasma. A observação de corpúsculos pleomórficos correspondentes de fitoplasmas nos vasos do floema de plantas que exibiam sintomas da doença feita em materiais coletados no Brasil (Betti & Kitajima, 1981) e em outros países é uma forte evidência da relação lenho mole-fitoplasma. Os testes positivos realizados através de enxertia, demonstraram a transmissibilidade do agente do lenho mole, reforçando a hipótese de associação entre fitoplasma e a doença (Betti et al., 1986; Betti et al., 1982). Assim, a evidência molecular da presença de fitoplasma em tecidos de plantas sintomáticas de maçã, fornecida pelo presente trabalho, é mais uma contribuição para o conhecimento da etiologia do lenho mole.

Figura 01 - Análise dos produtos de PCR duplo, conduzidos com os pares de oligonucleotídeos universais, mF2/mR1 e F2n/R2, para amostras de ramos coletadas em três plantas de maçã da região de Vacaria/RS

M – Marcador Molecular 1kb Ladder; Ch – Amostra de planta de chuchu com superbrotamento; Mi – Amostra de planta de milho com enfezamento vermelho; Vi – Amostra de planta de vinca com superbrotamento; Ms – Amostra de planta de maçã sadia; Ag – Água destilada-deionizada; P1 – Planta 1; P2 – Planta 2 e P3 – Planta 3

*1. Amostragem realizada em janeiro de 2000

*9. Amostragem realizada em outubro de 2000

Figura 02 - Análise dos produtos de PCR duplo, conduzidos com os pares de oligonucleotídeos universais, mF2/mR1 e F2n/R2, para amostras de raízes coletadas em três plantas de maçã da região de Vacaria/RS

M – Marcador Molecular 1kb Ladder; Ch – Amostra de planta de chuchu com superbrotamento; Mi – Amostra de planta de milho com enfezamento vermelho; Ms – Amostra de planta de maçã sadia; P1 – Planta 1; P2 – Planta 2 e P3 – Planta 3

*1. Amostragem realizada em janeiro de 2000

*9. Amostragem realizada em outubro de 2000

4.2 Identificação do fitoplasma detectado em amostras de maçã por PCR

Os testes conduzidos com duplo PCR, utilizando o par de oligonucleotídeos específicos para identificação de um fitoplasma, demonstraram a presença de fitoplasma do grupo 16SrIII (Figura 3). A presença do fitoplasma foi demonstrada através da visualização de bandas típicas, correspondentes a 0,8 kb. Fitoplasmas foram detectados nos controles positivos, representados por material de milho, chuchu e crotalaria identificados como representantes dos grupos 16SrI, 16SrIII e 16SrV, respectivamente (dados não apresentados). Estes resultados, obtidos com os pares de oligonucleotídeos específicos para a identificação de fitoplasmas de cada um dos grupos, demonstraram a validade dos testes, confirmando a ocorrência de um fitoplasma de grupo 16SrIII no material de maçã.

Fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI e 16SrV não foram constados nas amostras de plantas de macieira avaliadas, pois, nenhuma amplificação ocorreu quando os nucleotídeos específicos para a identificação de fitoplasmas dos referidos grupos foram empregados em PCR duplo. A tentativa de identificação de fitoplasma pertencentes aos grupos 16SrI e 16SrIII é justificável, pois estes dois grupos abrigam a maioria dos fitoplasmas conhecidos.

Um fitoplasma representante do grupo 16SrI ("aster yellow") foi identificado, também pelo uso de oligonucleotídeos específicos, em materiais com sintomas de lenho mole proveniente do Canadá e da República Checa (Bertaccini et al., 1998). Uma discussão mais específica sobre a presença de dois fitoplasmas distintos

causando os mesmos sintomas num mesmo hospedeiro foi feita na parte referente à identificação por RFLP (item 4.3).

Figura 03 - Análise dos produtos de PCR duplo, conduzidos com os pares de oligonucleotídeos específicos para o grupo 16SrIII, para amostras de maçã provenientes da região de Vacaria/RS

M – Marcador Molecular 1kb Ladder; Ch – Amostra de planta de chuchu com superbrotamento; Ms – Amostra de planta de maçã sadia; P1 – Planta 1; P2 – Planta 2 e P3 – Planta 3

*1. Amostragem realizada em janeiro de 2000

*9. Amostragem realizada em outubro de 2000

4.3 Identificação do fitoplasma detectado em amostras de maçã através da técnica de RFLP

Para a análise de RFLP foi escolhida uma amostra de cada planta com sintomas de lenho mole

A análise das amostras foi conduzida com oito enzimas de restrição, sendo elas: *AluI*, *HhaI*, *KpnI*, *HinfI*, *HpaII*, *MseI*, *RsaI* e *Sau3AI*, as quais são utilizadas para a classificação de fitoplasmas em grupos e subgrupos (Lee et al., 1998). Os perfis eletroforéticos do fitoplasma obtido para as diferentes enzimas de restrição foram comparados com aqueles disponíveis na literatura, com o objetivo de classificá-lo em alguns dos grupos e subgrupos atualmente existentes para classificação de fitoplasma.

Os três isolados de fitoplasma escolhidos para os testes de RFLP apresentaram perfis eletroforéticos idênticos para cada uma das enzimas de restrição. Assim, os três isolados foram indistinguíveis em relação as endonucleases consideradas individualmente.

A enzima *KpnI* não gerou perfil eletroforético para o fitoplasma presente nas amostras de maçã (Figura 4). Este resultado indicou que este fitoplasma não pertencia ao grupo 16SrI, o grupo que congrega a maioria dos fitoplasmas conhecidos.

Os produtos da digestão enzimática promovida com a enzima *MseI* deram origem a um perfil eletroforético típico de representantes do grupo 16SrIII (Figura 5). Este tipo de perfil permite separar os membros do grupo 16SrIII de todos os demais grupos. Assim, esta enzima praticamente definiu que o fitoplasma detectado nas amostras de maçã é um componente do grupo 16SrIII.

A enzima *RsaI* confirmou os resultados obtidos com a *MseI*. O tipo de perfil eletroforético produzido por esta enzima demonstrou que o fitoplasma da maçã se enquadra como um membro do grupo 16SrIII (Figura 6). Um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrII apresenta o mesmo perfil mostrado pelo fitoplasma da maçã quando se empregou *RsaI*. No entanto, com os resultados obtidos com *MseI* ficou evidenciado a distinção do perfil apresentado pelo fitoplasma da maçã daquele apresentado pelo fitoplasma do grupo 16SrII. Esta distinção foi confirmada pelo emprego da enzima *Sau3AI*, a qual gerou, para o fitoplasma da maçã, um perfil eletroforético diferente daquele apresentado pelo representante do grupo 16SrII (Figura 7).

A análise dos perfis eletroforéticos da digestão enzimática realizadas individualmente pelas endonucleases *Sau3AI*, *AluI*, *HinfI*, *HpaII* e *HhaI* mostram em todos os casos que o fitoplasma associado ao lenho mole da macieira pode ser classificado no grupo 16SrIII (Figuras 7, 8, 9, 10 e 11).

Quanto à classificação dos isolados detectados nas amostras de maçã ao nível de sub-grupo, os perfis eletroforéticos apontam para o sub-grupo B, com base na classificação publicada por Lee et al. (1998). O emprego de *MseI* permitiu separar os isolados do fitoplasma em estudo dos representantes dos sub-grupos C e D. Através dos perfis eletroforéticos gerados pela enzima *HhaI*, foi possível distinguir o fitoplasma da maçã daqueles pertencentes aos sub-grupos C, D, E, F e H. Finalmente, a análise dos produtos da digestão processadas por *HpaII* revelou que o fitoplasma em questão foi distinto dos membros dos grupos A e G. Assim sendo, ficou demonstrado que o perfil apresentado pelo fitoplasma associado ao lenho mole permite classificá-lo no sub-grupo B.

A identificação de um fitoplasma do grupo 16SrIII em macieiras cultivadas no Brasil e de um fitoplasma do grupo 16SrI em plantas coletadas no Canadá e na República Checa (Bertaccini et al., 1998) mostra que fitoplasmas distintos podem estar presentes num mesmo hospedeiro e associado a mesmo tipo de sintoma. Este tipo de ocorrência não é fato raro (Wang & Hiruki, 2001) e, quando ambos os fitoplasmas ocorrem simultaneamente na mesma espécie vegetal, constituem as chamadas infecções mistas (Davis, 1995; Lee et al., 1996). Seria interessante que houvesse disponibilidade de informações sobre a ocorrência e identificação de fitoplasma que estivesse associado ao lenho mole em plantas cultivadas em outros países europeus ou mesmo nos Estados Unidos da América. Alguns países europeus como França, Itália, Inglaterra e outros, e mesmo os Estados Unidos da América são locais de origem de diversas variedades de maçã introduzidas no território brasileiro. Este tipo de informação talvez pudesse explicar a ocorrência de um fitoplasma do grupo 16SrIII nas macieiras brasileiras.

Também é relevante lembrar que as amostras usadas neste trabalho foram obtidas de um único local (Vacaria/RS) e pertenciam a uma única variedade (Gala). É possível especular que em um levantamento mais amplo talvez pudessem ser encontrados fitoplasmas pertencentes a grupos diversos. Ainda, as condições brasileiras são distintas daquelas ocorrentes em países de clima temperado e isto poderia estar influenciando na predominância deste ou daquele grupo de fitoplasma, em função da região geográfica.

Figura 4 - Produtos da digestão enzimática obtidos com *Kpn* I. Análise dos produtos de PCR duplo conduzidos com os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de maçã com sintomas de lenho mole, coletados na região de Vacaria, RS. Colunas: Ch – amostra de chuchu; 1, 2 e 3 – amostras de maçã obtidas das plantas 1, 2 e 3; M – padrão molecular (cima para baixo): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 e 72

Figura 5 - Produtos da digestão enzimática obtidos com *Mse* I. Análise dos produtos de PCR duplo conduzidos com os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de maçã com sintomas de lenho mole, coletados na região de Vacaria, RS. Colunas: Ch – amostra de chuchu; 1, 2 e 3 – amostras de maçã obtidas das plantas 1, 2 e 3; M – padrão molecular (cima para baixo): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 e 72

Figura 6 - Produtos da digestão enzimática obtidos com *Rsa* I. Análise dos produtos de PCR duplo conduzidos com os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de maçã com sintomas de lenho mole, coletados na região de Vacaria, RS. Colunas: Ch – amostra de chuchu; 1, 2 e 3 – amostras de maçã obtidas das plantas 1, 2 e 3; M – padrão molecular (cima para baixo): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 e 72

Figura 7 - Produtos da digestão enzimática obtidos com *Sau* 3AI. Análise dos produtos de PCR duplo conduzidos com os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de maçã com sintomas de lenho mole, coletados na região de Vacaria, RS. Colunas: Ch – amostra de chuchu; 1, 2 e 3 – amostras de maçã obtidas das plantas 1, 2 e 3; M – padrão molecular (cima para baixo): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 e 72

Figura 8 - Produtos da digestão enzimática obtidos com *Alu* I. Análise dos produtos de PCR duplo conduzidos com os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de maçã com sintomas de lenho mole, coletados na região de Vacaria, RS. Colunas: Ch – amostra de chuchu; 1, 2 e 3 – amostras de maçã obtidas das plantas 1, 2 e 3; M – padrão molecular (cima para baixo): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 e 72

Figura 9 - Produtos da digestão enzimática obtidos com *Hinf* I. Análise dos produtos de PCR duplo conduzidos com os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de maçã com sintomas de lenho mole, coletados na região de Vacaria, RS. Colunas: Ch – amostra de chuchu; 1, 2 e 3 – amostras de maçã obtidas das plantas 1, 2 e 3; M – padrão molecular (cima para baixo): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 e 72

Figura 10 - Produtos da digestão enzimática obtidos com *Hpa* II. Análise dos produtos de PCR duplo conduzidos com os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de maçã com sintomas de lenho mole, coletados na região de Vacaria, RS. Colunas: Ch – amostra de chuchu; 1, 2 e 3 – amostras de maçã obtidas das plantas 1, 2 e 3; M – padrão molecular (cima para baixo): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 e 72

Figura 11 - Produtos da digestão enzimática obtidos com *Hha* I. Análise dos produtos de PCR duplo conduzidos com os pares de oligonucleotídeos mF2/mR1 e F2n/R2, utilizando DNA extraído de plantas de maçã com sintomas de lenho mole, coletados na região de Vacaria, RS. Colunas: Ch – amostra de chuchu; 1, 2 e 3 – amostras de maçã obtidas das plantas 1, 2 e 3; M – padrão molecular (cima para baixo): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 e 72.

5 CONCLUSÕES

Um fitoplasma foi detectado de forma consistente, em amostras de plantas de maçã que apresentavam sintomas de lenho mole, usando-se a técnica de PCR duplo com oligonucleotídeos universais;

A identificação através de PCR, usando oligonucleotídeos específicos, permitiu determinar que o fitoplasma pertencia ao grupo 16SrIII;

A análise de RFLP, conduzida com oito enzimas de restrição, confirmou que o fitoplasma presente nas amostras de macieira pertencia ao grupo 16SrIII;

Ainda através da análise de RFLP foi possível determinar que o fitoplasma pertencia ao sub-grupo B;

Para fins de diagnose, tanto material de ramo como de raiz foram adequados para a realização dos testes de PCR, visando a detecção do fitoplasma.

ANEXOS

Composição das soluções para a extração de DNA

- Solução tampão de maceração

$K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ – 21,7 g; KH_2PO_4 – 4,1 g; Sacarose – 100 g; BSA (Bovine Serum Albumin) – 1,5 g; PVP – 10 (Poly Vinyl Pyrolidone) – 20 g; Água para completar o volume para um litro. Esterilização por filtração e manutenção a 4°C.

- Solução tampão de extração:

Tris-base – 6,0 g; NaCl – 7,3 g; EDTA – 18,6 g; pH - 8,0; Água para completar volume para 500 mL. Esterilização por autoclavagem e manutenção a temperatura ambiente.

- Solução tampão TE:

Tris-base – 60,5 g; EDTA – 18,6 g; pH – 8,0; Água para completar volume para 500 mL. Esterilização por autoclavagem e manutenção a temperatura ambiente.

REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA

AGRIANUAL: anuário da agricultura brasileira. Fnp Consultoria & Comércio São Paulo, 2003, p.370-377.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1997, p 457-462.

BEAKBANE, A. B., MISHRA, M. D. POSNETTE, A. F., SLATER, C. H. W. Mycoplasma-like organisms associated with chat fruit and rubbery wood disease of apple (*Malus domestica* Borkh), compared with those in strawberry with green petal disease. **Journal Gen Microbiology**, v.66 p.55-62, 1971.

BEDENDO, I. P. Micoplasma e espiroplasma. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H. AMORIM, L. **Manual de fitopatologia:** princípios e conceitos. 3. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, p.202-210.

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

- BETTI, J. A. Presença de lenho mole da macieira no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.8, p.29-31, 1982.
- BETTI J. A.; KITAJIMA, E. W. Lenho mole, uma doença da macieira no sul do Brasil semelhante ao "apple rubbery wood". **Summa Phytopathologica**, v.7, p.8-10, 1981.
- BETTI, J. A.; MULLER, G. W. Recuperação de plantas de macieira afetadas pelo lenho mole nas condições do estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.8, p.43-45, 1982.
- BETTI, J. A.; BLEICHER, J.; COSTA, A. S. Transmissão do lenho mole da macieira por união de tecidos. **Fitopatologia Brasileira**, v.7, p.538, 1982.
- BETTI, J. A.; CASTRO, J. L.; MULLER, G. W. Presença do agente causal do lenho mole em plantas sem sintomas de macieira no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.366, 1986.
- BLEICHER, J. Doenças da macieira e outras pomáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L. BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**, 3. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997, p.473-474.
- COUSIN, M. T. Phytoplasmes et phytoplasmoses. 2. Diagnostics et méthodes de lutte. **Phytoma**, v.472, p.26-30, 1995.

DAVIS, R. E. New perspectives on yellow diseases and their causal agents gained through molecular methods for pathogen detection and identification. **Summa Phytopathologica**, v.21, p.81-87, 1995a.

DAVIS, R. E. Fitoplasmas: fitopatógenos procarióticos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodes. **Revisão Anual de Patologia de Planta**, v.3, p.1-27, 1995b.

DEELEY, J.; STEVENS, W. A.; FOX, R. T. V. Use of dienes' stain to detect plant disease induced by mycoplasma-like organisms. **Phytopathology**, v.69, p.1169-1171, 1979.

DEL SERRONE; BARBA, M. Importance of the vegetative stage for phytoplasma detection in yellow-diseased grapevines. **Vitis**, v.5 n.2, p.101-102, 1996.

DEL SERRONE, P.; STARZA, S. Ia; KRYSTAI, L.; KOLBER, M; BARBA, M. Occurrence of apple proliferation and pear decline phytoplasmas in diseased pear trees in Hungary. **Journal Plant Pathology**, v.80, p.53-58, 1998.

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. **Annual Phytopathology Society Japanese**, v. 33, p.256-266, 1967.

FERIRE, C. J. S.; CAMELATTO, D. **A cultura da maçã**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 107 p.

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

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

KITAJIMA, E. W. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatadas de plantas no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Suplemento Especial, 92p. 1995.

KITAJIMA, E. W. & COSTA, A. S. Micoplasma: possível agente etiológico de certas moléstias de plantas. **Ciência e Cultura**, v.22, p.351-363, 1970.

LAMBAIS M. R. Biologia molecular e engenharia genética na fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H. AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**, 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, p.507-538.

- LEE, I. M.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E.; DAVIS, R. E.; BARTOSZYK, I. M. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.1153-1169, 1998.
- LEE, I. M.; DAVIS, R. E. Mycoplasmas which infect plants and insects. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R.N.; FINCH, L.R. & BASEMAN, J.B. **Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis**, Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992. p.378-390.
- LEE, I. M.; HAMMOND, R. W.; DAVIS, R. E. GUNDERSEN, D. E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. **Phytopathology**, v.83, p.834-842, 1993.
- LEE, I. M.; BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; GUNDERSEN, D.E. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees decline symptoms in Italy. **Phytopathology**, v.85, p.728-735, 1996.
- LEE, I. M.; DAVIS, R. E.; SINCLAIR, W. A.; De WITT, N.D.; CONTI, M. Genetic relatedness of mycoplasma-like organisms detected in *Ulmus* spp. in the United States and Italy by means of DNA probes and polymerase chain reactions. **Phytopathology**, v.83, p.829-833, 1993a.
- LEMOINE, J. Degeneration diseases of pear and apple trees. **Phytoma**, v.380, p.22-28, 1986.

LEMOINE, J. ; THIBAUT, B. Degeneration diseases of Asian pear tree Nashi and Li (pear vein yellows, pear necrotic spot, apple rubbery wood and apple stem grooving). **Phytoma**, v.407, p.44-46, 1989.

LEMOINE, J.; MICHELESI, J. C. Degeneration diseases in apple tree orchards. **Arboriculture Fruitiere**, v.44, n.509, p.43-48, 1997.

LIN, N. S.; HSU, Y. H.; HSU, H. I. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasmas-like organisms by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. **Phytopathology**, v.80, p.824-828, 1985.

McCOY, R. E.; CAUDWELL, A.; CHANG, C. J.; CHEN, T. A.; CHYKOWSKI, L. N.; COUSI, M. T.; DALE, J. L.; LEEUW, G. T.; GOLINO, D. A.; HACKETT, K. J.; KIRKPATRICK, B. C.; MARWITZ, R.; PETZOLD, H.; SINHA, R. C.; SUGIURA, M.; WHITCOMB, R. F.; YANG, I. L.; ZHU, B. M.; SEEMULLER, E. Plant diseases associated with mycoplasma-like organism. In: WHITCOMB, R. F & TULLY, J. G. **The mycoplasmas**, N.Y.: Academic Press, 1989. p.545-640.

MILLER, S. A.; MARTIN, R. R. Molecular diagnoses of plant disease. **Annual Review Phytopathology**, v.26, p.409-432, 1988.

POGGI POLLINI, C.; R.; GIUNCHEDI, FILIPPINI, G.; SEEMULLER, E.; VINDIMIAN, E. Etiological studies of apple rubbery wood diseases. **Acta Horticulturae**, v.386, p.503-505, 1995.

SCOTT, G.E.; ROSENKRANZ, E.E.; NELSON, L. R. Yield loss of corn due to corn stunt disease complex. **Agronomy Journal**, v.69, p.92-94, 1977.

SOUZA, C.H.; PARISH, C.L. Apple decline in Brazil. **Acta Horticulturae**, v.309, p.241-243, 1992.

VEGA, J.; BETTI, J. A.; COSTA, A. S. Estruturas filamentosas no floema de macieira "Gala" com sintomas de lenho mole. **Summa Phytopathologica**, v.7, p.10-11, 1981.

WANG, K.; HIRUKI, C. Molecular characterization and classification of phytoplasmas associated with conola yellows and a new phytoplasmas associated with dandelions. **Plant Diseases**, v.85, p.76-79, 2001.

ZAWADZKA, B.; GUZEWSKA, I. Influence of apple mosaic and apple rubbery wood diseases on storage disorders and fruit quality of Jonared, McIntosh and Spartan cultivars. **Fruit Science Reports**, v.13, p.185-191, 1986.