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

**Amarelo da ameixeira: caracterização molecular do fitoplasma e
modelo de colonização do hospedeiro**

Daniela Flôres

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2013**

Daniela Flôres
Engenheira Agrônoma

Amarelo da ameixeira: caracterização molecular do fitoplasma e modelo de colonização do hospedeiro

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

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2013**

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

Flôres, Daniela

Amarelo da ameixeira: caracterização molecular do fitoplasma e modelo de colonização do hospedeiro / Daniela Flôres. - Piracicaba, 2013.
65 p: il.

Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Amarelo 2. Ameixeira 3. Fitoplasmas 4. Identificação molecular 5. Mollicutes
I. Título

CDD 634.22
F634a

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

*“Enquanto estiver vivo, viva o melhor que puder.
Nunca pare. Não se detenha. Insista um pouco mais.
Continue, mesmo quando todos esperam que desista.
Não se acomode por medo ou por sentir-se confortável.
Tenha sempre algo pelo que lutar. E lute com todas as forças.
Faça com que em vez de pena, tenham respeito por você.
Faça com que o vejam como um vencedor em tudo”.*
(Inspirado no texto de **Madre Teresa de Calcutá**)

*Aos meus pais João e Isabel, meu PORTO SEGURO
As minhas amigas Ana e Thays por me ampararem em todos os momentos*
DEDICO.

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, pela colaboração em minha formação e pela amizade. Pelo ser humano que ele é, o qual eu admiro muito.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo pela orientação, pelas sugestões e principalmente pela atenção.

A Dra. Maria Cândida Gasparotto pelas correções e sugestões durante a análise dos resultados.

Ao Prof. Dr. Leandro José Dallagnol pela atenção e ajuda na análise estatística dos dados.

As alunas do Laboratório de Genética Molecular, Thayne Munhoz Ramos pelos primeiros ensinamentos de qPCR e a Thais Galhardo por toda ajuda no laboratório e amizade.

Aos amigos do laboratório de Procariotos Fitopatogênicos, Evandro, Elizeu, Pedro, Thays e Ticyana.

Aos amigos do laboratório de Virologia Vegetal, Débora, Pedro e Viviana pelo bom convívio e amizade.

Ao funcionário Edivaldo Buriola pela ajuda e amizade.

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

Aos meus amigos em especial Ana Paula de Oliveira Amaral Mello, Deborah Sansini, Evandro Ganem Junior, Isolda Haas, Maria Cândida Gasparotto, Thais Dias Martins, Thays Benites Camargo Pereira, Ticyana Banzato e Natália Canova, pelos bons momentos juntos e pelo carinho.

Ao Prof. Dr. José Otávio Machado Menten pela amizade e incentivo constante.

À minha Família pela formação, educação, amor e pela compreensão em todos os momentos.

Obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 DESENVOLVIMENTO.....	19
2.1 Revisão Bibliográfica	19
2.1.1 A cultura da ameixeira.....	19
2.1.2 Exigências climáticas e ciclo da cultura	20
2.1.3 Fitoplasmas.....	21
2.1.4 Fitoplasmas em <i>Prunus</i> sp.....	22
2.1.5 Colonização e concentração do fitoplasma em plantas lenhosas	25
2.1.6 PCR em tempo real (qPCR)	27
2.2 Material e métodos	27
2.2.1 Ensaio 1: Caracterização molecular de fitoplasma em ameixeira	27
2.2.1.1 Coleta de material vegetal	27
2.2.1.2 Extração de DNA total	29
2.2.1.3 Detecção de fitoplasma e condições de PCR.....	30
2.2.1.4 Identificação de fitoplasma por PCR.....	31
2.2.1.5 Clonagem e sequenciamento do 16S rDNA do fitoplasma	31
2.2.1.6 Análise das sequências do 16S rDNA do fitoplasma	34
2.2.2 Ensaio 2: Colonização de ameixeiras por fitoplasma.....	35
2.2.2.1 Montagem do ensaio e coleta das amostras.....	35
2.2.2.2 Extração, quantificação e padronização do DNA total.....	36
2.2.2.3 PCR em tempo real.....	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1 Ensaio 1: Caracterização molecular de fitoplasma em ameixeira	39
3.1.1 Detecção de fitoplasma por PCR.....	39
3.1.2 Identificação de fitoplasma por PCR.....	41
3.1.3 Análise das sequências do 16S rDNA do fitoplasma	43
3.2 Ensaio 2: Colonização de ameixeiras por fitoplasma.....	47
3.2.1 Eficiência dos <i>primers</i> para detecção do fitoplasma por qPCR	47
3.2.2 Colonização de ameixeiras por fitoplasma.....	48

4 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE	62

RESUMO

Amarelo da ameixeira: caracterização molecular do fitoplasma e modelo de colonização do hospedeiro

No Brasil, o cultivo de ameixeira tem atingido significativa importância econômica em termos de rentabilidade. Embora rentável, a cultura exige cuidados constantes em relação aos danos provocados por doenças. Entre elas, o ‘amarelo’, causado por fitoplasmas, tem se mostrado como uma doença de relevância nos países produtores desta fruta. Em pomares comerciais localizados em Paranapanema-SP, foram observadas ameixeiras (*Prunus salicina*) exibindo sintomas típicos de ‘amarelos’, caracterizados por superbrotamento de ramos, redução no comprimento de entrenós, além de amarelecimento, deformação e redução do limbo foliar. Com objetivo de identificar o fitoplasma e determinar o modelo de colonização do hospedeiro pelo patógeno foi desenvolvido o presente estudo. Para isto, em três pomares, foram amostradas plantas sintomáticas, assintomáticas e sadias, pertencentes às variedades Gulfblaze e Azteca. O DNA total foi extraído de folhas e ramos e usado em duplo PCR com os iniciadores R16mF2/mR1 e R16F2n/R2, visando a detecção do fitoplasma. Os resultados confirmaram a presença de fitoplasma pela amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 kb do gene 16S rRNA. Os produtos de PCR gerados por dez isolados de fitoplasmas de cada variedade foram clonados e três clones de cada isolado foram sequenciados. Uma vez que nenhum polimorfismo foi encontrado, uma sequência consenso foi selecionada para cada isolado e um isolado foi escolhido como representativo para cada variedade. Estas sequências foram designadas por PIY-BR01 e PIY-BR02, com 1.246 pb, e depositadas no *GenBank* sob os números de acesso KF499086 e KF499087, respectivamente. A sequência do 16S rRNA do fitoplasma da ameixeira apresentou 100% de identidade com o fitoplasma representante do grupo 16SrI-B (AY265208). A análise de RFLP virtual e o cálculo do coeficiente de similaridade, permitiram classificar o fitoplasma da ameixeira no grupo 16SrI-B. A análise filogenética revelou que o mesmo está estritamente relacionado ao subgrupo 16SrI-B. No estudo da colonização das plantas pelo patógeno, amostras da copa e raiz foram coletadas mensalmente, durante um ano, de plantas infectadas das variedades Gulfblaze e Azteca. O DNA total foi extraído e submetido ao PCR em Tempo Real com os iniciadores UniRNAForward/UniRNAReverse, para quantificar o fitoplasma nos tecidos do hospedeiro. O fitoplasma foi detectado tanto em amostras de copa como de raiz, em todas as árvores infectadas de ambas as variedades. A concentração do mesmo nos tecidos vegetais variou de $5,77 \times 10^5$ a $1,93 \times 10^9$ e $6,18 \times 10^5$ a $3,92 \times 10^9$ N^ocópias/100 ng de DNA total, na copa e na raiz, respectivamente. O experimento mostrou uma flutuação sazonal na concentração do fitoplasma, sendo as maiores concentrações encontradas no verão, embora o fitoplasma tenha permanecido na parte aérea do hospedeiro mesmo no período mais frio, que compreende a fase de dormência da planta. Com base nestes resultados, ficou evidente que as amostras retiradas da copa e coletadas durante o período mais quente do ano são as mais adequadas para os procedimentos de detecção do fitoplasma, visando confirmar a diagnose feita com base na sintomatologia.

Palavras-chave: Amarelo; Ameixeira; Fitoplasmas; Identificação molecular; Mollicutes

ABSTRACT

Plum yellow: molecular characterization of the phytoplasma and colonization model of the host

In Brazil, the cultivation of plum trees has achieved significant economic importance in terms of profitability. Although profitable, the culture demands attention in relation to damages provoked by diseases. Among them, the 'yellow', caused by phytoplasmas, is a relevant disease present in the plum producing countries. In commercial orchards located in Paranapanema-SP region, were observed plum trees (*Prunus salicina*) exhibiting typical symptoms of 'yellow', characterized by intense shoot proliferation, shortened internodes, generalized yellowing, leaf malformation and small leaves. The present study was conducted in order to identify the phytoplasma associated with symptomatic plants and determine the pattern of host colonization by the pathogen. Therefore, were sampled symptomatic, asymptomatic and healthy plants of the varieties Gulfblaze and Azteca, grown in three commercial orchards. Total DNA was extracted from leaves and shoots and submitted to nested PCR primed with R16mF2/mR1 and R16F2n/R2, in order to detect phytoplasma. The results confirmed the presence of phytoplasma by amplification of DNA fragments of 1.2 kb from 16S rRNA gene. The PCR products generated by ten phytoplasma isolates of each variety were cloned and three clones of each isolate were sequenced. Since no polymorphism was found, a consensus sequence was selected for each isolate and an isolate was chosen as representative for each variety. These sequences were designated by PIY-BR01 and PIY-BR02, with 1,246 bp, and deposited in *GenBank* under the accession numbers KF499086 and KF499087, respectively. The sequence of the 16S rRNA of the phytoplasma founded in plum trees showed 100% identity with the phytoplasma representative of 16SrI-B group (AY265208). The virtual RFLP analysis and the calculation of the similarity coefficient, allowed classify the phytoplasma present in plum trees as a member of 16SrI-B group. Phylogenetic analysis supported that this phytoplasma is closed related to the 16SrI-B subgroup. In the study about plant colonization, the samples from leaves, shoots and root were monthly collected, for one year, from the infected plants of the varieties Gulfblaze and Azteca. Total DNA was extracted and submitted to the Real Time PCR with *primers* UniRNAForward/UniRNAReverse, in order to quantify phytoplasma in host tissues. The phytoplasma was detected in both aerial parts and roots in all infected trees of the two varieties. The concentration of the pathogen in plant tissues ranged from 5.77×10^5 to 1.93×10^9 and 6.18×10^5 to 3.92×10^9 N°copies/100ng total DNA in aerial parts and roots, respectively. The experiment showed a seasonal fluctuation in the concentration of the phytoplasma in plants, with the highest concentrations found in summer, although the phytoplasma have remained in the shoots of the host even in the coldest period, comprising the dormant phase of the plant. Based on these results, it was evident that the samples collected from the aerial parts and during the hottest period of the year are the most appropriate for detection of phytoplasma to confirm the diagnosis based on symptomatology.

Keywords: Yellow; Plum; Phytoplasma; Molecular identification; Mollicutes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Localização dos pomares I e II em Paranapanema-SP (Google)..... 29
- Figura 2 - Sintomas de infecção por fitoplasmas em ameixeira: A. Planta com superbrotamento (à esquerda) e planta sadia (à direita), B. Sintomas de redução de tamanho foliar (à esquerda) e planta sadia (à direita), C. Sintomas de clorose e retorcimento de folhas; D. Sintomas no campo 29
- Figura 3 - Amostragem de material vegetal para estudo da colonização de ameixeira pelo fitoplasma associado ao amarelo. A letra C corresponde a copa e R a raiz (R1 e R2 lados opostos do sistema radicular) 35
- Figura 4 - Representação da detecção de fitoplasmas em amostras sintomáticas de ameixeira coletadas em Paranapanema-SP por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 Kb na reação de duplo PCR conduzido com os iniciadores mF2/mR1 e R16F2n/R2. Colunas de 1 a 6 = fragmentos de DNA amplificados de plantas sintomáticas de ameixeira; Coluna 7 = ausência de fragmento de DNA do patógeno em ameixeira sadia; Coluna Mi= Fragmento de DNA amplificado de planta de milho usada como padrão positivo; Coluna H = água usada como controle negativo; Coluna M= marcador molecular (1kb Ladder)..... 40
- Figura 5 - Representação da identificação do fitoplasma presente em amostras sintomáticas de ameixeira por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,1 Kb na reação de duplo PCR conduzido com os primers mF2/mR1 e R16(I)F2/R16(I)R1. Colunas de 1 a 3 = Fragmentos de DNA extraído de plantas sintomáticas de ameixeira; Coluna 4 = ausência de fragmento de DNA do patógeno em ameixeira sadia; Coluna Mi= Fragmento de DNA amplificado de planta de milho usada como padrão positivo; Coluna M= marcador molecular (1kb Ladder). 42

- Figura 6 - Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição com as 17 enzimas de acordo com Wei et al. (2007). PIY-Br01 e PIY-Br02 = fitoplasma da ameixeira; 16SrI-B= fitoplasma associado ao Enfezamento do milho 45
- Figura 7 - Árvore filogenética construída com representantes dos diferentes subgrupos de fitoplasmas dentro do 16SrI, representantes de diferentes grupos que ocorrem em *Prunus* sp. (16SrIII, 16SrVII, 16SrIX, 16SrX e 16SrXII), o procarioto *Acholeplasma laidlawii* e os dois fitoplasmas identificados em ameixeiras (amostras: PIY-Br01 e PIY-Br02). Os números nos ramos representam valores de confiança baseados no “Bootstrapping” 46
- Figura 8 - Curva de dissociação (melt curve) para o par de iniciadores UniRNAForward/UniRNAReverse, usado para detecção do fitoplasma presente em árvores infectadas de ameixeira, usando a técnica de PCR quantitativo 48
- Figura 9 - Teste de especificidade dos primers UniRNAForward/UniRNAReverse com isolados de fitoplasma do grupo 16SrI-B. Colunas 1 a 4 – amostras de DNA do fitoplasma do milho, colunas 5 a 8 – amostras de DNA do fitoplasma de plantas de ameixeira infectadas, coluna 9 – controle negativo (planta sadia de vinca), M – marcador peso molecular (1 kb DNA plus ladder) 48
- Figura 10 - Log do número de cópias de fitoplasma detectadas em 100ng de DNA total de ameixeira (Variedade Golfblaze) via qPCR durante 12 meses de avaliação, para copa e raiz. As barras representam o erro padrão da média 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais grupos de fitoplasmas relatados em <i>Prunus</i> sp.	23
Tabela 2 - Localização e principais características dos pomares de ameixeira sintomáticas amostrados em Paranapanema-SP	28
Tabela 3 - Detecção do fitoplasma associado ao amarelo da ameixeira em árvores de ameixeira amostradas em três pomares localizados na região de Paranapanema-SP	40
Tabela 4 - Comparação dos coeficientes de similaridade calculados para os fitoplasmas detectados nas amostras PIY-Br01 e PIY-Br02 de ameixeira com outros fitoplasmas pertencentes a diversos subgrupos do grupo 16SrI	45
Tabela 5 - Concentração do fitoplasma (média de quatro árvores) em tecidos foliares e radiculares de ameixeira em distintas épocas do ano. *Nº cópias do fitoplasma/100 ng de DNA total.....	50
Tabela 6 - Análise da variância dos efeitos da variedade (Var), parte da planta (copa ou raiz – C/R) e época de amostragem (EP) na concentração do patógeno	51
Tabela 7 - Influência da época de amostragem e parte da planta (copa ou raiz) na concentração do patógeno nos tecidos do hospedeiro	52

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o cultivo da ameixeira tem atingido significativa importância econômica para a agricultura praticada em regiões de clima temperado e subtropical, tanto em termos de rentabilidade, estimada em US\$ 5.200 por hectare, como em geração de empregos no campo, por exigir mão de obra intensiva. O mercado tem se mostrado altamente favorável, sendo comercializadas aproximadamente 65 mil toneladas de ameixa por ano. Além disto, o cenário é francamente promissor para expansão da cultura no país, uma vez que 50% da demanda nacional são provenientes da importação da fruta produzida em outros países. Em razão do enorme potencial econômico, políticas de desenvolvimento regional têm sido implantadas para estimular o plantio da ameixeira nas regiões favoráveis às suas exigências climáticas. Os principais polos produtores estão localizados nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Paraná e Minas Gerais.

Nos grandes centros mundiais produtores de fruteiras de caroço, as quais compreendem o gênero *Prunus*, incluindo a ameixeira, os fitoplasmas são reconhecidos como importantes agentes de doença, causando perdas expressivas na produção. A maioria das espécies de ameixeira cultivadas no Brasil é exótica e foi introduzida a partir de material propagativo originário destes centros, levando, portanto, a suspeita da ocorrência de fitoplasmas em pomares instalados no território brasileiro.

A diagnose de doenças associadas aos fitoplasmas é dificultada pela distribuição irregular destes agentes no floema de plantas infectadas, baixa concentração nos tecidos do hospedeiro (especialmente em espécies lenhosas) e variações no título de acordo com a época do ano e o órgão vegetal colonizado. Para solucionar estas dificuldades, várias ferramentas têm sido desenvolvidas, destacando-se o protocolo de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR), com o uso de *primers* específicos.

Recentemente, ameixeiras apresentando sintomas típicos de infecção por fitoplasmas, como superbrotamento de ramos, redução de entrenós, amarelecimento, deformação e redução do tamanho de folhas foram observadas em campos comerciais localizados em Paranapanema-SP.

Buscando-se confirmar a hipótese da ocorrência de fitoplasmas em ameixeira no Brasil e considerando a necessidade de se aumentar os conhecimentos sobre a etiologia da doença, foi desenvolvido o presente trabalho, com dois ensaios distintos, com os seguintes objetivos: (i) confirmar a diagnose baseada nos sintomas, identificar

molecularmente e classificar os fitoplasmas presentes nas plantas com base no sequenciamento do gene 16S rDNA; (ii) analisar a colonização de plantas de ameixeira por fitoplasmas em distintos estádios fenológicos, ocorrentes de acordo com a estação do ano, por meio de análise de PCR em tempo real.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 A cultura da ameixeira

A cultura da ameixa vem se tornando expressiva, em termos econômicos, para regiões brasileiras de clima temperado e subtropical. Duas espécies principais são exploradas comercialmente no Brasil, uma delas *Prunus salicina* Lind, cultivada em maior escala e conhecida como ameixa japonesa e a outra, *Prunus domestica* (L), plantada em menor escala e chamada de ameixa europeia. Os principais polos produtores estão localizados nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Paraná e Minas Gerais (CASTRO; CAMPOS, 2003).

Em termos mundiais, a China é o maior produtor, com aproximadamente 51% da produção, seguida pela Sérvia com 5,1%, Romênia com 5% e os Estados Unidos com 4,9%. Na América Latina, o Chile destaca-se como o maior produtor, seguido pela Argentina. O Brasil não aparece nas estatísticas mundiais (FAOSTAT, 2013). O mercado brasileiro de comercialização desta fruta é de aproximadamente 65 mil toneladas por ano, sendo que praticamente a metade desta demanda é suprida pela importação do produto de países como Argentina, Espanha e Chile (MÜLLER, 2013). No ano de 2012, aproximadamente 33 mil toneladas de ameixa foram comercializadas somente no CEAGESP-SP (FNP, 2013).

O cultivo da ameixa, no Brasil, é uma atividade de alta rentabilidade para os produtores, estimada em US\$ 5.200 por hectare, além de estar relacionada com a geração de empregos no campo, por exigir mão de obra especializada e contínua (CASTRO; CAMPOS, 2003; BUAINAIN; BATALHA, 2007). Inicialmente, a cultura foi implantada em áreas geográficas de clima mais frio, localizadas nos estados do sul do país, expandindo-se, posteriormente, para regiões de clima mais ameno, encontradas nos estados do sudeste (CASTRO et al., 2008). As condições de mercado têm sido altamente favoráveis à comercialização, havendo espaço para o crescimento da produção nacional, uma vez que 50% da demanda são cobertas pela importação da fruta produzida em outros países (KIST et al., 2012). Em razão do enorme potencial econômico, políticas de desenvolvimento regional têm sido implantadas para apoiar e incentivar o desenvolvimento da cultura nas regiões favoráveis às suas exigências climáticas (MÜLLER, 2013). Apesar do papel relevante da ameixa entre as frutas

temperadas produzidas no Brasil e o cenário francamente promissor para sua expansão, problemas fitossanitários têm exigido muita atenção por parte dos produtores. Entre eles destaca-se a escaldadura das folhas, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* que provoca danos significativos, chegando a se constituir em fator limitante da produção (MÜLLER, 2013).

O Brasil possui a maior biodiversidade de espécies do mundo (cerca de 20%), no entanto, a maioria dos produtos que fazem parte da alimentação dos brasileiros, como o arroz, o feijão, o trigo e o milho são de origem exótica. As duas espécies mais plantadas de ameixeira no Brasil são originárias de outras regiões do mundo. Acredita-se que *P. salicina* seja originária do Extremo Oriente, embora conhecida como ameixa japonesa e, *P. domestica* seja nativa de regiões do Cáucaso, da Turquia e da Pérsia (CASTRO; CAMPO, 2003). É reconhecido que a prática de introdução de materiais propagativos oriundos de distintas regiões geográficas do mundo é um fator de risco para a agricultura praticada no país que recebe este material. As espécies de ameixeira aqui cultivadas são exemplos desta prática, a qual pode ser responsável pela entrada de pragas e doenças exóticas associadas ao material introduzido.

2.1.2 Exigências climáticas e ciclo da cultura

Neste estudo, duas cultivares de ameixeira japonesa foram utilizadas, a cultivar Gulfblaze e a Azteca. A Gulfblaze é altamente produtiva, os frutos são grandes (massa média de 80 g), atraentes e pouco aromáticos, amadurecem normalmente entre 10 e 30 de outubro. Os frutos maiores atingem entre 100 e 120 g, correspondendo a cerca de 20% da produção do pomar (BARBOSA et al., 2001). Essa cultivar é considerada de baixa exigência de frio (400 horas), floração precoce (anterior a 25/08) e maturação precoce (anterior a 30/11) (MONTEIRO et al., 2004). A cultivar “Azteca” é de origem mexicana, porém não foi lançada no México, e como se adaptou bem no Brasil, vem sendo cultivada em Paranapanema-SP. Esta cultivar tem o mesmo ciclo da Gulfblaze, de 110 dias, seguindo as seguintes fases em dias: floração (30 dias), frutificação (15 dias), endurecimento do caroço (20 dias), crescimento do fruto (45 dias), pré-colheita (10 dias) e colheita (20 dias) (Fernando Mascaro, SIGMA Agropesquisa, Paranapanema, SP, Brasil, informação pessoal).

De acordo com Monteiro et al. (2004), as fruteiras de caroço passam por 11 estádios fenológicos: gema dormente, gema inchada, botão rosado, botão aberto, plena

floração, queda de pétalas, formação de frutos, crescimento de frutos, maturação de frutos, queda de folhas e dormência.

O ciclo vegetativo das fruteiras de caroço (MONTEIRO, 2004) compreende as seguintes fases: dormência (junho a julho); mobilização das reservas (agosto); brotação (setembro); floração (outubro); frutificação (novembro a janeiro); maturação dos frutos (final de janeiro a final de maio); queda de folhas (final de maio). A planta está em crescimento de setembro a março, de abril a junho a planta começa a formação de reservas e a partir de junho, entra em dormência até a nova brotação em setembro.

2.1.3 Fitoplasmas

Fitoplasmas são organismos procariotos, unicelulares, com alto grau de pleomorfismo devido à ausência de parede celular (LEE et al., 2000). Estes procariotos podem colonizar ativamente os tecidos de plantas e de insetos vetores. Sua associação com doenças de plantas foi primeiramente demonstrada em 1967, em plantas de rainha margarida que apresentavam anomalias conhecidas como ‘amarelos’ (DOI et al., 1967). Durante o processo de doença, o patógeno se desenvolve nos vasos do floema, distribuindo-se de forma sistêmica pela planta (DAVIS; LEE, 1991).

Apesar dos avanços, diversos aspectos relacionados às doenças associadas a estes procariotos não foram ainda suficientemente esclarecidos. Assim, a epidemiologia destas doenças é pouco conhecida, a gama de hospedeiros naturais e os insetos vetores da maioria dos fitoplasmas não foram ainda determinados, o papel das variações populacionais não está elucidado, o efeito da infecção mista de fitoplasmas é totalmente desconhecido e os mecanismos de defesa das plantas contra o patógeno não são ainda bem compreendidos (LEE et al., 2000). Plantas infectadas por fitoplasmas exibem sintomas que indicam distúrbios no balanço hormonal do hospedeiro. Sintomas típicos incluem presença de clorose (amarelecimento), superbrotamento de ramos, enfezamento generalizado da planta (redução do tamanho de folhas, ramos, flores e frutos), avermelhamento foliar, necrose de floema e declínio, com consequente morte da planta (BEDENDO, 2011). A ação do patógeno pode variar de leve à severa, entretanto algumas espécies de plantas apresentam resistência ou tolerância (LEE; DAVIS; GUNDERSEN-RINDAL, 2000).

Baseado no gene 16S rDNA, os fitoplasmas são classificados em grupos e subgrupos (WEI et al., 2007). Apesar deste gene ser considerado o mais importante para fins de classificação, o gene *secY* vem sendo adotado mais recentemente para esta

mesma finalidade (LEE et al., 2010). Os fitoplasmas ainda não foram cultivados em meio de cultura, o que tem dificultado a determinação das suas características morfológicas e fisiológicas, resultando na impossibilidade de atender aos requisitos exigidos para sua classificação taxonômica, na forma binomial latina. Apesar disto, tem sido tentativamente classificados em espécies “*Candidatus*” (‘*Ca*’).

Como os fitoplasmas não são cultivados *in vitro*, a diagnose rotineira de doenças se baseia, principalmente, em técnicas moleculares. A técnica de PCR tem sido usada para detecção de fitoplasmas nos tecidos de plantas suspeitas de infecção. A associação desta técnica com a RFLP tem sido empregada para a identificação de fitoplasmas e sua classificação em grupos/subgrupos, bem como em espécies *Candidatus* (‘*Ca*.’), baseadas na região 16S rDNA. Alguns fatores dificultam a detecção destes patógenos e, consequentemente, a confirmação de diagnose, entre eles pode-se destacar a distribuição irregular de fitoplasmas na planta infectada, sua baixa concentração (especialmente em hospedeiros lenhosos) e as variações no título de acordo com a época do ano e o órgão vegetal que se constituem em sérios obstáculos para uma diagnose segura. Para solucionar estas dificuldades, várias ferramentas têm sido desenvolvidas, destacando-se o protocolo de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR), com o uso de *primers* específicos (GALETTI; MARZACHÌ, 2010). Esta técnica tem se mostrado bastante sensível, possibilitando maior confiabilidade na detecção de fitoplasmas, além de permitir sua quantificação nos tecidos doentes.

2.1.4 Fitoplasmas em *Prunus* sp.

Entre os agentes bióticos causadores de doenças em plantas, destacam-se os fungos, os vírus, os nematoides e as bactérias. Mais recentemente, os fitoplasmas, um grupo emergente de patógenos classificados dentro do reino das bactérias, vêm despertando a atenção de técnicos e pesquisadores. No Brasil, distintos fitoplasmas já foram relatados em associação com diversas doenças ocorrentes em numerosas culturas de relevância econômica, como milho, brócolis, maracujazeiro, couve-flor, mamoeiro, berinjela, repolho, tomateiro, mandioca, soja, citros, entre outras (MONTANO; CHUNHA JUNIOR; PIMENTEL, 2011).

Considerando as espécies ‘*Candidatus*’, oito delas já foram associadas ao gênero *Prunus*: ‘*Ca. P. prunorum*’ (grupo 16SrX-B), ‘*Ca. P. mali*’ (grupo 16SrX-A), ‘*Ca. P. pyri*’ (grupo 16SrX-C), ‘*Ca. P. asteris*’ (grupo 16SrI), ‘*Ca. P. aurantifolia*’ (grupo 16SrII), ‘*Ca. P. ziziphi*’ (grupo 16SrV), ‘*Ca. P. fraxini*’ (grupo 16SrVII), ‘*Ca. P.*

phoenicium' (grupo 16SrIX), *Ca. P. pruni*' (grupo 16SrIII) e '*Ca. P. solani*' (grupo 16SrXII) (CIEŚLIŃSKA, 2011). Na Tabela 1, estão descritos os fitoplasmas relatados, com seus hospedeiros e regiões de ocorrência.

Tabela1 - Principais grupos de fitoplasmas relatados em *Prunus* sp. (Adaptado de CIEŚLIŃSKA, 2011)

Grupos de Fitoplasma	Espécie	Hospedeiros	Relatos
16SrI	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma asteris'	Damasqueiro, ameixeira japonesa e européia, nectarineira, pessegueiro, cerejeira azeda e doce, abrunheiro e amendoeira	Itália, Espanha, República Checa e Lituânia
16SrII	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma aurantifolia'	Cerejeira doce	Irã
16SrIII	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma pruni'	<i>Prunus</i> sp.	América do Norte, Argentina
16SrV	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma ziziphi'	Cerejeira azeda, damasqueiro, cerejeira, pessegueiro	China, Itália, Índia e Polônia
16SrVII	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma fraxini'	<i>Prunus</i> sp.; cerejeira; pessegueiro	China e Itália
16SrIX	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma phoenicium'	Amendoeira, pessegueiro e nectarineira	Oriente Médio
16SrX	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali' (16SrX-A)	Macieira, ameixeira japonesa, pessegueiro, cerejeira doce, damasqueiro e nectarineira	Itália, República Checa, Eslovênia e Polônia
	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum' (16SrX-B)	<i>Prunus</i> sp.	Europa, Turquia e Azerbaijão
	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri' (16SrX-C)	Pereira, cerejeira doce e pessegueiro	Europa (Ex: Itália, Polônia, República Checa), América do Norte, Ásia Menor e Taiwan
16SrXII	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma solani'	Cerejeira	Itália
	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma australiense' (16SrXII-B)	Pessegueiro	Bolívia

Nos maiores centros mundiais produtores de frutas temperadas, as quais compreendem o gênero *Prunus*, incluindo a ameixeira, os fitoplasmas são reconhecidos como importantes agentes de doença.

Danos à produção causados pela doença conhecida como declínio da pereira ('*Ca. Phytoplasma pyri*') tem sido relatado na Europa, América do Norte, Ásia Menor e Taiwan. Em alguns estados dos EUA foi observada a redução de metade da produção de frutos e, na Itália, a morte de cerca de 50 mil árvores no final de 1940 (FOISSAC; WILSON, 2010).

No gênero *Prunus*, a ocorrência de perdas é frequente na Europa e na Ásia Menor, devido a infecção por '*Ca. Phytoplasma prunorum*', com a morte de aproximadamente 5% das árvores de damasqueiro por ano, no sul da França (FOISSAC; WILSON, 2010).

Na cultura da amendoeira, a doença conhecida como vassoura de bruxa (AlmWB) é relatada como altamente prejudicial a cultura e está associada com a presença de '*Candidatus Phytoplasma phoenicium*'. A doença foi inicialmente relatada no Líbano, em 2000, sendo responsável pela morte de mais de 100 mil amendoeiras no país (CHOUEIRI et al., 2001; ABOU JAWDAH et al., 2003, VERDIN et al., 2003).

O amarelo das fruteiras de caroço, causado por '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' é fator limitante na produção de damasco e ameixa japonesa nas principais áreas de cultivo da Europa, onde causa perdas econômicas significativas devido à alta mortalidade de árvores infectadas (JARAUSCH; JARAUSCH, 2010).

Peach yellow leaf roll (PYLR) é uma doença de etiologia fitoplasmática que ocorre na América do Norte, sendo descrita pela primeira vez em meados do século 20 e responsável por grandes perdas nas culturas de pessegueiro, no final de 1970 (PURCELL et al., 1981).

'*Candidatus Phytoplasma mali*', o agente causal da proliferação de ramos da macieira, foi relatado em pomares da Europa e Turquia, provocando redução no tamanho e peso de frutos, tornando-os impróprios para comercialização (FOISSAC; WILSON, 2010).

No Brasil, a legislação apresenta restrição quanto à introdução de material propagativo de algumas espécies de fruteiras temperadas, representadas por ameixeira, macieira, videira, pessegueiro e pereira. O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) considera como pragas quarentenárias A1: *Apple chat fruit phytoplasma*, *Apple proliferation phytoplasma*, *Grapevine flavescence dorée phytoplasma*, *Peach X-disease phytoplasma*, *Peach rosette phytoplasma*, *Peach yellows phytoplasma*, *Pear decline phytoplasma* (MAPA, 2013). '*Ca. Phytoplasma prunorum*', um fitoplasma de reconhecida importância para fruteiras de caroço, entre elas a

ameixeira, não consta na lista de pragas quarentenárias, mas devido a sua importância nos países em que ocorre deveria ser acrescentado.

Uma praga quarentenária é caracterizada por qualquer organismo de natureza animal e/ou vegetal que, estando presente em outros países ou regiões, mesmo sob controle permanente, constitua ameaça à economia agrícola do país ou região importadora (CUNHA et al., 2000). As pragas quarentenárias são classificadas em dois grupos: A1, onde se enquadram as pragas exóticas não presentes no país; A2, as pragas de importância econômica potencial, já presentes no país, porém apresentando disseminação localizada e submetidas a programa oficial de controle (MENDES et al., 2004). A entrada de organismos potencialmente nocivos em áreas do sistema produtivo pode resultar em danos à produção e consequente perda na lucratividade, restrição de mercados de exportação, aumento dos gastos com controle de doenças e pragas, impacto negativo em programas de manejo integrado da cultura, desequilíbrios ambientais, custos sociais e redução de fontes de alimentos para a população (BRASIL, 1995).

2.1.5 Colonização e concentração do fitoplasma em plantas lenhosas

Na maioria das espécies lenhosas decíduas, a colonização da parte aérea por fitoplasmas está sujeita a flutuações sazonais. Considerando que os fitoplasmas habitam os vasos de floema e, nessas espécies estes vasos localizados na parte acima do solo são degenerados no final do outono e início do inverno, estes microrganismos são, em quase todos os casos, eliminados da parte aérea durante o inverno (MARCONE, 2010). No entanto, o patógeno persiste nas raízes, onde os vasos permanecem intactos durante todo o ano. Na primavera, após o período de dormência das plantas, o patógeno pode recolonizar a parte aérea a partir das raízes, quando o novo floema está sendo formado.

Nesse sentido, em árvores de macieira (*Malus* spp.) e pereira (*Pyrus* spp.) afetadas pelas doenças conhecidas por proliferação de ramos da macieira (AP) e declínio da pereira (PD), o padrão de colonização dos agentes causais, ‘*Ca. Phytoplasma mali*’ e ‘*Ca. Phytoplasma pyri*’, foi estudado por vários anos por meio de microscopia de fluorescência (DAPI) e transmissão periódica por enxertia (SCHAPER; SEEMULLER, 1982). Levando em consideração que o patógeno depende de tubos de seiva funcionais, os fitoplasmas associados a AP e ao PD são, em quase todos os casos, eliminados da parte aérea durante o inverno. Por outro lado, o patógeno persiste nas raízes (MARCONE, 2010). Em contraste, Garcia-Chapa et al. (2003), utilizando duplo PCR e transmissão por enxertia em cultivares de pereira infectadas por ‘*Ca.*

Phytoplasma pyri', verificaram que o patógeno persistia na parte aérea da planta mesmo durante o inverno, diferentemente do que já havia sido relatado em outros trabalhos. Os autores sugeriram que esse resultado poderia ser explicado pelo clima mais quente presente na região do Mediterrâneo, onde o patógeno permaneceria por um longo período na parte aérea, diferentemente do que ocorre no centro da Europa.

Em relação a '*Candidatus Phytoplasma pronurum*', '*Candidatus Phytoplasma pyri*' e '*Candidatus Phytoplasma mali*', resultados obtidos por diversos autores são concordantes com a proposição de Garcia-Chapa et al. (2003), uma vez que estes fitoplasmas permanecem na parte aérea de ameixeira, damasqueiro, pereira e macieira durante o período de dormência, ao passo que os mesmos persistem durante o ano todo nas raízes (SEEMÜLLER et al., 1998; JARAUSCH et al., 1999; ERREA et al., 2002; WATERWORTH; MOCK, 1999).

Faltam estudos em longo prazo que forneçam dados sobre a influência da temperatura na distribuição e incidência de doenças causadas por fitoplasmas. Em geral, o aumento da temperatura favorece a multiplicação do patógeno. O aquecimento global pode influenciar a dinâmica populacional do inseto vetor, a interação patógeno-hospedeiro e a interação patógeno-vetor (FOISSAC; WILSON, 2010). Do lado do inseto vetor, eventos como tempestades ou mudanças nas condições de vento podem afetar a dispersão do inseto (FOISSAC; WILSON, 2010). Quando analisamos o patógeno, o aumento previsto da temperatura média no planeta pode aumentar a taxa de multiplicação do mesmo em plantas e insetos (FOISSAC; WILSON, 2010). No caso da planta infectada, o aumento na taxa de multiplicação do patógeno resultará em desenvolvimento precoce dos sintomas, e a maior concentração do patógeno, poderá aumentar a severidade da doença (FOISSAC; WILSON, 2010). Para o inseto, a multiplicação mais rápida do patógeno resultará em redução no período de latência, ou seja, mais rápido o inseto vai ser capaz de infectar uma planta sadia (FOISSAC; WILSON, 2010).

No Brasil, estudos foram realizados na cultura do milho para as doenças causadas por espiroplasma (enfezamento pálido) e fitoplasma (enfezamento vermelho), onde constataram que a incidência e os danos causados por essas doenças são influenciados pelo clima, principalmente por temperaturas elevadas, em torno de 27/18 °C e de 31/25°C (dia/noite) (NAULT, 1980; OLIVEIRA et al., 2005). Aparentemente, o fitoplasma necessita de temperaturas mais elevadas para sua multiplicação em relação ao espiroplasma. De acordo com Oliveira et al. (2009), pode-se dizer que os aumentos

da temperatura ambiente devido as mudanças climáticas nos anos futuros poderão proporcionar condições ambientais mais favoráveis aos danos pelo enfezamento causado por fitoplasma na cultura do milho.

2.1.6 PCR em tempo real (qPCR)

Existem muitas evidências de que a concentração de fitoplasmas em plantas infectadas varia muito dependendo do hospedeiro. A alta concentração do patógeno ocorre em hospedeiros herbáceos como vinca, alface, salsa, tabaco e várias espécies do gênero *Brassica*. Geralmente, baixas concentrações são encontradas em hospedeiros lenhosos, em que a concentração do fitoplasma está muitas vezes abaixo do nível de detecção por meio de métodos microscópicos (BERGES et al., 2000).

Alguns fatores podem levar a maior dificuldade em determinar a presença de fitoplasma nas plantas suspeitas de infecção e consequentemente, comprometer sua correta diagnose. Entre estes fatores destacam-se a ocorrência de baixa concentração deste microrganismo nos tecidos vegetais, a sua distribuição variável na planta e as oscilações do título tanto em função do estágio fenológico do hospedeiro como da sazonalidade ambiental. Com a finalidade de aumentar a sensibilidade dos testes usados para a detecção, bem como quantificar o patógeno na amostra vegetal analisada, a técnica de PCR em tempo real vem se mostrando eficiente, fornecendo resultados mais confiáveis em relação a PCR tradicional (GALETTO; MARZACHÌ, 2010). Exemplos positivos da aplicação desta nova técnica são os protocolos rápidos, sensíveis e específicos atualmente usados para a diagnose de doenças relevantes como a proliferação de ramos da macieira, o declínio da pereira e os amarelos das fruteiras temperadas de caroço (BERGES; DALLA-VIA, 2004; JARAUSCH et al., 2004; GALETTO et al., 2005; TORRES et al., 2005; ALDAGHI et al., 2007; MARTINI et al., 2007; BISOGNIN et al., 2008).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Ensaio 1: Caracterização molecular de fitoplasma em ameixeira

2.2.1.1 Coleta de material vegetal

As amostras foram compostas por folhas e ramos, as quais, imediatamente após a coleta, foram acondicionadas em sacos plásticos e congeladas para análises

posteriores. As amostras foram obtidas de três pomares comerciais de ameixeira da espécie *P. salicina*, localizados no distrito de Holambra II, no município de Paranapanema, SP (Tabela 2 e Figura 1). Vinte e cinco ameixeiras sintomáticas, exibindo superbrotamento de ramos, redução no comprimento de entrenós, amarelecimento, deformação e redução do tamanho de folhas (Figura 2), foram amostradas nos pomares (I) e (II). Cinco plantas assintomáticas, que serviram como controles negativos, foram amostradas nos pomares (I), (II) e (III). No pomar (I) as ameixeiras tinham 15 anos e eram da variedade Gulfblaze, enquanto no pomar (II), as árvores de 7 anos pertenciam à variedade Azteca. O pomar (III) era formado por árvores matrizes de 20 anos, da variedade Golfblaze.

Em setembro de 2011, o pomar (I), com uma área de 3,5 ha apresentava aproximadamente 75% de árvores com sintoma de amarelo, sendo que algumas plantas também apresentavam sintomas de escaldadura. Os talhões amostrados estavam circundados por outros talhões de ameixeira, estufas para produção de flores e áreas de brejo. O pomar (II), abrangendo 2,3 ha, estava situado numa área isolada de outros pomares de ameixeira, sendo o único encontrado na região sem a presença de plantas com escaldadura, porém com sintomas expressivos de amarelo, com incidência de aproximadamente 80%. O pomar (III), ocupando 1,5 ha, também estava localizado em uma área isolada dos demais pomares e apresentava todas as plantas aparentemente sadias tanto para amarelo como para escaldadura.

Tabela 2 – Localização e principais características dos pomares de ameixeira sintomáticas amostrados em Paranapanema-SP

Fazenda	Latitude	Longitude	Altitude	Ano de Plantio
Pomar I	23° 27' 20,98"S	48° 53' 42,40"O	580 m	1998
Pomar II	23° 27' 45,66"S	48° 54' 57,34"O	628 m	2006

Figura 1 – Localização dos pomares I e II em Paranapanema-SP (Google)

Figura 2 - Sintomas de infecção por fitoplasmas em ameixeira: A. Planta com superbrotamento (à esquerda) e planta sadia (à direita), B. Sintomas de redução de tamanho foliar (à esquerda) e planta sadia (à direita), C. Sintomas de clorose e retorcimento de folhas; D. Sintomas no campo

2.2.1.2 Extração de DNA total

Para a etapa de extração de DNA foi adotado o protocolo do “kit” comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) (GREEN; THOMPSON; MacKENZIE, 1999). Neste caso, foram seguidas as recomendações do fabricante. Material vegetal de cada amostra (1,0 g) foi macerado em nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. Uma parte do macerado foi transferida para microtubo de 1,5 mL e ao macerado foram adicionados 400 μ L do tampão AP1 e 4 μ L de RNase. Os tubos permaneceram a 65°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 130 μ L do tampão AP2 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 20.800 g. O filtrado foi recolhido em um novo microtubo

e foram adicionados 675 μL do tampão AP3. Uma alíquota de 650 μL dessa mistura foi aplicada em nova coluna, a qual foi centrifugada a 6.800 g por 1 minuto. O filtrado 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 e foi feita uma centrifugação a 20.800 g por 2 minutos para lavagem do DNA. A coluna foi transferida para um novo microtubo para diluição do DNA com 100 μL de tampão AE. O DNA extraído foi armazenado a -20°C .

2.2.1.3 Detecção de fitoplasma e condições de PCR

O DNA total extraído de cada amostra foi diluído em diferentes concentrações (1:5, 1:10, 1:25, 1:50) em água deionizada autoclavada. Como controle negativo das reações de PCR foram utilizados o DNA extraído de plantas matrizes e a água. Os padrões positivos foram representados pelo DNA obtido de plantas de milho e chuchu, comprovadamente infectadas por fitoplasmas. Para a detecção de fitoplasmas foram utilizados os iniciadores universais R16mF2/mR1 e R16F2n/R2 (GUNDERSEN; LEE, 1996) em PCR duplo. O produto amplificado por R16mF2/mR1 foi usado na segunda reação, na qual foi empregado o par R16F2n/R2. Estes últimos iniciadores amplificam uma sequência nucleotídica de aproximadamente 1.2 Kb do DNA genômico dos fitoplasmas, correspondente ao 16S rDNA.

As sequências dos iniciadores utilizados encontram-se descritas a seguir:

R16 mF2- 5' CAT GCA AGT CGA ACG GA 3';

R16 mR1- 5' CTT AAC CCC AAT CAT CGA C 3';

R16 F2n- 5'GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG3';

R16 R2- 5'TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G3'.

Cada reação foi processada em um volume final de 25 μL , contendo: 1 μL de extrato de DNA diluído; 18,7 μL de água destilada deionizada; 0,5 μL de cada iniciador (concentração de 20 pmol. μL^{-1}); 2 μL de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo); 2,5 μL de solução tampão 10X PCR e 0,17 μL de Amplitaq 5U. μL^{-1} . Para os iniciadores R16mF2/mR1 e R16F2n/R2, foi usado um programa de 35 ciclos: 1 minuto a 94°C para a etapa de desnaturação do ácido nucléico, 2 minutos a 50°C para o anelamento dos iniciadores e 3 minutos a 72°C para a fase de extensão dos iniciadores, uma única etapa inicial de 1 minuto a 94°C e uma final de 7 minutos a 72°C .

Os produtos gerados pelo duplo PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TBE 0,5X. A corrida eletroforética foi conduzida com voltagem constante de 65V por 60 min. A coloração dos produtos amplificados foi feita com Sybr safe® (1%) e, em seguida, a visualização foi processada em transiluminador de ultravioleta. Como marcador molecular foi utilizado 1Kb Ladder (Life Technologies).

2.2.1.4 Identificação de fitoplasma por PCR

A identificação de fitoplasmas por PCR foi feita a partir de produtos obtidos com os iniciadores universais R16mF2/mR1 usados na primeira reação de PCR. Os produtos amplificados foram submetidos à re-amplificação, empregando-se, os iniciadores específicos R16(I)F1/R1 e R16(III)F2/R1, os quais permitem a identificação de fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI e 16SrIII, respectivamente (LEE et al., 1994).

As sequências dos iniciadores específicos seguem descritas 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'

As reações de PCR foram processadas nas mesmas condições utilizadas para detecção com o uso dos iniciadores R16mF2/mR1 e R16F2n/R2, descritas anteriormente. Os padrões positivos utilizados para cada grupo foram DNA de plantas de milho infectadas com o fitoplasma do enfezamento vermelho (grupo 16SrI) e DNA de plantas de chuchu infectadas pelo fitoplasma do superbrotamento (grupo 16SrIII). Os produtos gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TBE 0,5X, conduzida a 65V por 60 min. A coloração do gel foi feita com Sybr safe® (1%) e a visualização em um transiluminador UV. O marcador molecular foi 1Kb Ladder (Life Technologies).

2.2.1.5 Clonagem e sequenciamento do 16S rDNA do fitoplasma

Os produtos amplificados obtidos em duplo PCR foram purificados e clonados em *Escherichia coli*, usando o “kit” de clonagem pGEM-T Easy Vector System I (Promega). O processo de clonagem seguiu as seguintes etapas: purificação do produto de PCR de 1,2 Kb, quantificação do DNA amplificado, ligação do DNA ao plasmídeo,

transformação em *E. coli*, extração do DNA plasmidial e confirmação da inserção do fragmento. Os plasmídeos, cujo inserto do fitoplasma foi confirmado, foram enviados para a empresa *Macrogen* (Korea), para o sequenciamento de bases nucleotídicas.

a) Purificação: produtos de PCR foram purificados utilizando-se “kit” de purificação PureLink™ (Invitrogen), seguindo protocolo descrito pelo fabricante. Em um microtubo de 1,5mL foram adicionados 300 µL de tampão de captura (“binding buffer”) e 75 µL de produto do PCR obtido na reação com R16 F2n/R2. Após misturar a solução obtida com micropipeta (4 a 6 vezes), a mesma foi colocada em coluna (com filtro) acoplada ao tubo coletor e centrifugada a 17.900 g, a temperatura ambiente. O produto filtrado foi descartado. A coluna foi recolocada no tubo coletor e foram adicionados 650 µL de tampão de lavagem (“Wash buffer”). Nova centrifugação foi conduzida a 17.900 g, sendo o conteúdo do tubo coletor descartado e a coluna recolocada no mesmo tubo e submetida novamente a centrifugação a 20.800 g, por 3 minutos, para remover resíduos do tampão de lavagem. Essa mesma coluna foi colocada em um novo tubo e foram adicionados 50 µL de tampão de eluição ou água destilada deionizada. A coluna contendo o tampão de eluição e o DNA das amostras foi incubada a temperatura ambiente por 1 min. Após esse período foi feita a centrifugação a 17.900 g, por 2 min. Os produtos finais, correspondentes ao DNA purificado, foram armazenados a -20 °C, para posterior utilização na reação de clonagem.

b) Quantificação do DNA: Antes da reação da clonagem, foi estimada a concentração de DNA das amostras. Para isso, uma alíquota de 1 µL do DNA purificado juntamente com 3 µL de tampão de carregamento foi aplicado em gel de agarose 1%, em tampão TE 0,5X acrescido do corante Syber Safe (Invitrogen), e submetida à eletroforese. Os fragmentos de DNA purificados, de aproximadamente 1,2 Kb, foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta juntamente com o marcador Lambda DNA. Para a clonagem utilizou-se os produtos de PCR obtidos com R16F2n/R2 purificados, em uma concentração estimada de 500ng. A partir desse purificado foi feita a ligação em vetor pGEM®T Easy Vector System I (Promega), posteriormente clonado em *Escherichia coli* (estirpe DH5α) com choque térmico. A extração dos plasmídeos obtidos com a clonagem foi feita utilizando-se “kit” comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

c) Ligação: para a ligação do DNA purificado ao vetor plasmidial, com o uso do “kit” pGEM T Easy Vector System I (Promega), foram utilizados 3.0 µL do DNA purificado,

1 μL do vetor (25 ng. μL^{-1}), 5,0 μL de tampão ligase 2X e 1,0 μL de T4 DNA ligase (3 U. μL^{-1}), totalizando 10 μL da mistura para a ligação, que foi colocada em microtubo (1,5mL) e mantida por 12h a 4 °C. Após esse período, a ligação tornou-se pronta para ser transferida para células competentes de *E. coli*.

d) Transformação: na etapa de transformação foram adicionados 2 a 3 μL do produto da ligação em 50 μL de células competentes de *E. coli*, estirpe DH5 α , preparadas conforme Hanahan (1983), sendo a mistura colocada no gelo por 30 min. Após esse período, as células contendo a ligação foram submetidas a choque térmico por incubação a 42 °C por 50 segundos e, imediatamente, colocadas no gelo por 2 min. A seguir, foram adicionados 450 μL de meio SOC (1% de triptona; 0,5% extrato de levedura; 8,5 mM NaCl; 2,5 mM de KCl; 0,01 mM MgCl₂; 0,02 mM de glicose e água para completar volume de 1000 mL) pré-aquecido a 37°C as células transformadas que ficaram incubadas a 37 °C por 3 horas em agitador (200 rpm). Após o período de crescimento, foram plaqueados 80 μL de uma suspensão de células transformadas em 20 ml de meio LB (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,25% de NaCl; 4% de ágar) acrescido de 20 μL de ampicilina (100 mg.mL⁻¹), 20 μL X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosida) na concentração de 50ng/ml e 20 μL IPTG (isopropil- β -D tiogalactopiranosida) concentração de 50 mg.mL⁻¹. Os componentes X-gal e IPTG serviram para avaliar a atividade da β -galactosidase nos transformantes, permitindo diferenciá-los dos não transformantes. A placa ficou mantida por 12h em estufa a 37 °C para a quantificação de colônias e 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 ficaram azuis (produzindo β -galactosidase funcional). Os clones selecionados foram transferidos para tubos tipo “Falcon” contendo meio LB líquido. Esses tubos foram incubados a 37°C, sob agitação moderada, por 12 horas para a extração do DNA plasmidial.

e) Extração de DNA plasmidial: Foram selecionados 3 clones para cada amostra clonada. Para dois deles foi feita a extração do DNA plasmidial, e um ficou preservado em glicerol (50%) e armazenado em freezer -80°C. As extrações dos plasmídeos para posterior sequenciamento foi feita com uso de “kit” comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

f) Confirmação da inserção do fragmento: antes do sequenciamento dos clones ou insertos obtidos, foi necessário fazer a confirmação desses no vetor plasmidial. Essa confirmação foi feita por PCR utilizando-se os iniciadores universais (SP6/T7) (MALEMBIC-MAHER et al., 2008) e digestão com a enzima *EcoR1*.

2.2.1.6 Análise das sequências do 16S rDNA do fitoplasma

As sequências foram analisadas utilizando-se programas computacionais para construção e análise (Bioedit, Phred phrap, MEGA e Multiple Sequence Alignment – CLUSTALW). Para editá-las foram usados os programas Phred phrap da Embrapa (<http://bioinformatica.cenargem.embrapa.br/phph/>) e Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

Todas as sequências editadas foram comparadas com as sequências de outros fitoplasmas depositadas no *GenBank*, possibilitando demonstrar o nível de identidade genética existente entre o fitoplasma presente nas amostras analisadas e os diferentes fitoplasmas conhecidos. Uma sequência consenso foi selecionada para cada amostra a partir de três clones sequenciados, sendo o fitoplasma encontrado em cada amostra considerado como um “isolado”.

A análise de restrição *in silico* e a plotagem em gel de RFLP virtual foram realizadas pelo programa pDRAW32 (<http://www.acaclone.com>), com base nas sequências nucleotídicas de todos os fitoplasmas representantes dos subgrupos do grupo 16SrI, cujas sequências estavam depositadas no *GenBank*, e as sequências obtidas a partir dos isolados encontrados em ameixeira (Figura 8). Cada sequência foi virtualmente digerida com as 17 enzimas de restrição e separadas em gel 3%, como recomendado por Wei et al (2007). Essas enzimas foram *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI* and *TaqI*. Os padrões de RFLP virtuais gerados foram comparados e os coeficientes de similaridade (F) calculados para cada par, usando a fórmula $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, reportada previamente (LEE et al., 1998; NEI; LI, 1979).

Uma árvore filogenética foi construída com as sequências de DNA pertencentes aos fitoplasmas classificados em grupos distintos relatados em *Prunus* sp., as sequências dos representativas dos subgrupos que constituem o 16SrI, as sequências dos isolados PIY-Br01 e PIY-BR02 e a sequência do procarioto *Acholeplasma laidlawii*. A árvore foi construída pelo método *Neighbour-joining* e o teste “Bootstrapping” foi processado 1000

vezes para assegurar a confiabilidade da posição dos ramos componentes da árvore, usando o software MEGA4 (<http://www.megasoftware.net/mega4/mega.html>).

2.2.2 Ensaio 2: Colonização de ameixeiras por fitoplasma

2.2.2.1 Montagem do ensaio e coleta das amostras

Foram utilizadas plantas de duas variedades, Gulfblaze, cultivadas no pomar (I) e Azteca, componentes do pomar (II) (Tabela 2). Amostras de quatro plantas doentes pertencentes a cada variedade foram coletadas mensalmente durante o período de um ano (setembro de 2011 a agosto de 2012). Assim, foi possível obter amostras representativas de todos os estádios fisiológicos da planta. Antes do início do ensaio, amostras de todas as plantas foram submetidas ao PCR convencional e PCR quantitativo, visando confirmar a presença do agente associado à doença em todas as plantas e avaliar a eficiência do PCR em tempo real para a detecção do patógeno. A cada mês foram tomadas duas amostras do sistema radicular, localizadas em partes opostas do mesmo e três amostras da parte aérea, compostas de folhas e ramos, retiradas da região basal, mediana e superior de cada árvore, correspondentes às partes localizadas a aproximadamente 1,0 m, 1,5 m e 2,0 m, respectivamente, em relação à superfície do solo (Figura 3).

Figura 3 - Amostragem de material vegetal para estudo da colonização de ameixeira pelo fitoplasma associado ao amarelo. A letra C corresponde a copa e R a raiz (R1 e R2 lados opostos do sistema radicular)

2.2.2.2 Extração, quantificação e padronização do DNA total

O DNA total foi extraído utilizando o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1990). O material vegetal de cada amostra (2g) foi macerado em nitrogênio líquido e colocado em microtubos de 1,5mL. Ao macerado foram adicionados 800 µL de tampão de extração 2X CTAB, acrescido de 2 µL de mercaptanol por mL de tampão, a 60°C. Os tubos foram mantidos a 65°C por 60 minutos. Em cada tubo foram colocados 600 µL de CIA (24:1) e o conteúdo foi centrifugado por 15 minutos a 20.800 g. Uma alíquota de 540 µL da fase superior aquosa foi transferida para novos microtubos de 1,5 mL e 540 µL de isopropanol pré-resfriado a -20°C foram acrescentados a mesma. A mistura foi mantida por uma noite a -20°C e, em seguida, submetida à centrifugação por 10 minutos a 20.800 g. Foi adicionado 1 mL de etanol 80% ao precipitado, o qual foi incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. O álcool foi descartado e o passo anterior foi repetido. Na sequência, foram adicionados 500 µL de NaCl 1M, sendo o precipitado dissolvido e incubado por 60 minutos a 4°C. Após esse período, nova centrifugação foi realizada por 10 minutos a 20.800 g. O precipitado obtido nos tubos foi lavado com 1 mL de etanol 80%, repetindo-se este passo por duas vezes. O etanol foi descartado e os tubos foram mantidos abertos e invertidos sobre papel toalha. Após a secagem, o precipitado foi suspenso em 100 µL de água deionizada e armazenado a -20°C.

- **Tampão de extração 2X CTAB:** Componentes: 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 pH foi ajustado para 8,0. No momento do uso foi adicionado mercaptanol na proporção de 0,2 mL/100 mL de tampão e a mistura foi aquecida a 60°C. O tampão foi preparado a cada 15 dias para manter a qualidade da extração.

A qualidade do DNA foi observada em gel de agarose 2% e a quantificação do mesmo foi feita em espectrofotômetro (Nanodrop 1000 Thermo Scientific, Wilmington, USA). A concentração padrão estabelecida para todas as amostras de DNA foi de 50 ng.

2.2.2.3 PCR em tempo real

O DNA total extraído das ameixeiras foi utilizado para quantificar o fitoplasma nos tecidos vegetais por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), usando-se o par de iniciadores UniRNAForward/UniRNAReverse (HREN et al., 2007). As reações foram realizadas em placas de 96 poços, em termociclador 7500 FAST (Applied

Biosystems), usando o kit Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA- US), conforme as recomendações do fabricante. Cada reação foi composta por 100 ng de DNA vegetal (2 µL de DNA padronizado a 50 ng), 12,5 µL de SuperMix (1X), 0,5 µL de cada iniciador (concentração de 10 pmol.µL⁻¹), 0,5 µL de ROX (50nM de uma solução referência interna de fluorescência) e 9 µL de água, totalizando um volume final de 25 µL. Foram realizadas duas réplicas da técnica de PCR para cada amostra. As condições de PCR foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. O DNA total extraído de uma planta matriz de ameixeira e a água foram utilizados como controles negativos.

A determinação da curva de diluição de DNA de fitoplasma foi realizada com o objetivo de relacionar os valores de Ct (*Threshold Cycle*) das reações de qPCR com diferentes concentrações de DNA puro do fitoplasma (plasmídeo), o que permite estimar a concentração de DNA de fitoplasma presente nas amostras de DNA de folhas e raízes de ameixeira. Portanto, a reação de qPCR foi conduzida como descrita anteriormente.

Na construção da curva padrão de diluição de DNA do fitoplasma representante do grupo 16SrI-B (enfezamento vermelho do milho), as concentrações utilizadas de DNA do patógeno foram 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 0,001 ng de DNA por reação. As reações foram realizadas em duplicatas.

Os valores de Ct foram primeiramente transformados para número de cópias de fitoplasma por 100 ng de DNA total, com base na curva padrão mencionada e na fórmula:

Número de cópias de fitoplasma por 100 ng de DNA total = [concentração de DNA do plasmídeo (g/µl)] / [(Tamanho do clone em pb x Peso médio de 1 pb DNA) × unidade de massa atômica (g/u)], onde o tamanho do clone é considerado a soma do peso molecular do plasmídeo + inserto, o peso médio de 1 pb de DNA é 649 e a massa atômica por unidade foi considerada $1,6605 \times 10^{-24}$ g/u (BARIC et al., 2011; APPLIED BIOSYSTEMS, 2009).

Esta variável foi utilizada em análises de comparação de médias pelo teste de Tukey. As análises de variância (ANOVA) foram realizadas no programa SAS versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio 1: Caracterização molecular do fitoplasma presente em ameixeira

3.1.1 Detecção por PCR

A detecção foi positiva em 19 das 25 plantas sintomáticas (76%) e em 2 das 5 plantas assintomáticas (40%) amostradas no pomar (I) (Tabela 3). No pomar (II), o fitoplasma foi encontrado nos tecidos de 21 das 25 plantas sintomáticas (85%) e em 3 das 5 plantas assintomáticas (60%) (Tabela 3). A presença de fitoplasmas nas amostras positivas foi revelada pela amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 Kb, visualizados na forma de bandas em géis de agarose. As amplificações obtidas a partir do DNA extraído de algumas amostras representativas das plantas coletadas em Paranapanema-SP estão apresentadas a seguir, na Figura 4. A obtenção de fragmentos genômicos de 1,2Kb é esperada, quando os iniciadores R16mF2/mR1 e R16F2n/R2 são utilizados nas reações de duplo PCR. Embora fitoplasmas fossem encontrados em plantas de pomares comerciais que não exibiam sintomas, nenhuma das cinco amostras assintomáticas provenientes de plantas matrizes evidenciou a ocorrência do fitoplasma nos seus tecidos (Tabela 3).

Amplificações de fragmentos genômicos de 1,2Kb também foram constatadas para o controle positivo, representado pelo DNA do fitoplasma associado ao enfezamento vermelho e presente em plantas de milho sabidamente infectadas. No entanto, nenhuma amplificação ocorreu quando o DNA de matrizes de ameixeira e a água foram usados nas reações de duplo PCR (Figura 4).

A suspeita inicial da presença de fitoplasmas nas árvores portadoras de sintomas foi confirmada pelos testes moleculares de detecção, os quais revelaram a associação constante do fitoplasma com a doença do tipo amarelo observado nas ameixeiras. Os resultados positivos obtidos em hospedeiros assintomáticos demonstraram que, apesar da ausência de sintomas externos, as árvores podem abrigar o fitoplasma. A não expressão de sintomas pode estar relacionada com a baixa concentração do fitoplasma nos tecidos vegetais, o que resulta em dificuldade para sua detecção. Além disto, a ausência de sintomas pode ser decorrente de infecção tardia dos hospedeiros, retardando o aparecimento de sintomas visíveis externamente. A ocorrência destas infecções latentes pode trazer implicações relacionadas à epidemiologia da doença, tais como subestimar a incidência de doença no campo ou mesmo uma provável atuação destas

plantas como locais de sobrevivência do agente ou fonte de inóculo para plantas ainda livres da doença.

Tabela 3 –Detecção do fitoplasma associado ao amarelo da ameixeira em árvores de ameixeira amostradas em três pomares localizados na região de Paranapanema-SP

Local de Coleta	Plantas Sintomáticas	Plantas Assintomáticas
	Plantas positivas/Plantas coletadas	Plantas positivas/Plantas coletadas
Pomar I	19/25	2/5
Pomar II	21/25	3/5
Pomar III	-	0/5

Figura 4 – Representação da detecção de fitoplasmas em amostras sintomáticas de ameixeira coletadas em Paranapanema-SP por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,2 Kb na reação de duplo PCR conduzido com os iniciadores mF2/mR1 e R16F2n/R2. Colunas de 1 a 6 = fragmentos de DNA amplificados de plantas sintomáticas de ameixeira; Coluna 7 = ausência de fragmento de DNA do patógeno em ameixeira sadia; Coluna Mi= Fragmento de DNA amplificado de planta de milho usada como padrão positivo; Coluna H = água usada como controle negativo; Coluna M= marcador molecular (1kb Ladder)

As ameixeiras doentes exibiam sintomas tipicamente induzidos por fitoplasmas, representados pelo aparecimento de ramos extranumerários, diminuição no comprimento dos entrenós, clorose ou amarelecimento foliar e deformação das folhas e redução da lâmina foliar. Este quadro sintomatológico era sugestivo de doença associada aos fitoplasmas, o que foi confirmado pela detecção molecular deste procarioto na maioria das plantas naturalmente infectadas, presentes nos dois pomares amostrados. Alguns dos sintomas observados nas plantas doentes de ameixeira utilizadas no presente estudo foram anteriormente relatados para algumas doenças associadas a fitoplasmas em espécies de *Prunus*, como por exemplo, superbrotamento e

clorose em macieira (BERTACCINI; DUDUK, 2009), clorose, redução foliar, encarquilhamento de folhas e encurtamento de entrenós em pessegueiro (FERNÁNDEZ et al., 2012)

3.1.2 Identificação de fitoplasmas por PCR

A amplificação de fragmentos de DNA de 1,1 Kb, típicos de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrI, foi obtida para todas as amostras positivas, quando as reações de PCR foram conduzidas com o par de iniciadores R16(I)F2/R16(I)R1. Estes resultados revelaram que um fitoplasma do grupo 16SrI está associado aos sintomas de amarelos exibidos pelas plantas de ameixa. Idênticos resultados foram obtidos nas reações de PCR nas quais o DNA de plantas de milho infectadas pelo fitoplasma do enfezamento foi usado como padrão positivo. Fragmentos em forma de bandas correspondentes às amplificações do DNA do fitoplasma encontrado em algumas amostras representativas de plantas de ameixa estão apresentados na Figura 5.

Contrariamente, não ocorreu amplificação a partir do DNA extraído de amostras de ameixeira nas reações de duplo PCR realizadas com o par de iniciadores R16(III)F2/R16(III)R1, evidenciando a ausência de fitoplasmas do grupo 16SrIII nas amostras analisadas (dados não mostrados). No entanto, foram gerados fragmentos esperados de 0,8 Kb para o controle positivo representado pelo DNA extraído de planta de chuchu, sabidamente infectado por fitoplasma confirmando a validade do teste.

Figura 5 – Representação da identificação do fitoplasma presente em amostras sintomáticas de ameixeira por meio da amplificação de fragmentos de DNA de 1,1 Kb na reação de duplo PCR conduzido com os *primers* mF2/mR1 e R16(I)F2/R16(I)R1. Colunas de 1 a 3 = Fragmentos de DNA extraído de plantas sintomáticas de ameixeira; Coluna 4 = ausência de fragmento de DNA do patógeno em ameixeira sadia; Coluna Mi= Fragmento de DNA amplificado de planta de milho usada como padrão positivo; Coluna M= marcador molecular (1kb Ladder)

No Brasil, fitoplasmas representantes do grupo 16SrI têm sido frequentemente identificados em alguns hospedeiros, incluindo milho (*Zea mays*), cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), videira (*Vitis vinifera*), primavera (*Bougainvillea spectabilis*) e buva (*Erigeron bonariensis*) (MONTANO; CHUNHA JUNIOR; PIMENTEL, 2011).

Em outras regiões do mundo, fitoplasmas do grupo 16SrI têm sido caracterizados em associação com diversas espécies de fruteiras temperadas. Assim, na Itália, fitoplasmas deste grupo foram encontrados em damasqueiro, nectarineira e ameixeira japonesa (LEE et al., 1998). Na Espanha foi relatado um fitoplasma do grupo 16SrI associado a uma doença conhecida como enrolamento clorótico da folha do damasqueiro (SCHNEIDER et al., 1993). Na República Tcheca, fitoplasmas deste grupo foram detectados em pessegueiro, damasqueiro, ameixeira européia, cerejeira doce e amendoeira (NAVRÁTIL et al., 2001; FIALOVÁ et al., 2004). Em cerejeira doce, os sintomas foram caracterizados principalmente por enfezamento, encarquilhamento de folhas e amarelecimento, enquanto em cerejeiras azedas, pela redução no tamanho das folhas, no vigor da árvore e sua consequente morte (NAVRÁTIL et al., 2001). Em cerejeira azeda, o mesmo tipo de agente foi relatado na Lituânia causando proliferação

de ramos, redução do tamanho de folhas e declínio da planta; neste caso, o fitoplasma foi identificado como pertencente ao subgrupo 16SrI-Q (VALIUNAS et al., 2009). Jomantiene et al. (2011) constataram a presença de um fitoplasma pertencente ao subgrupo 16SrI-C causando redução foliar e queda de folhas em cerejeira, também na Lituânia. Espécies de cigarrinhas dos gêneros *Macrostelles*, *Euscelis*, *Scaphytopius* e *Aphrodes* foram descritos como os principais vetores de fitoplasmas do grupo 16SrI, representado por ‘*Candidatus phytoplasma asteris*’ (CHIYKOWSKI, 1991; LEE et al., 2004).

Em razão da diversidade genética dos fitoplasmas e da diversidade de espécies hospedeira, representantes de grupos distintos do grupo 16SrI já foram relatados em associação com fruteiras do gênero *Prunus*. Neste caso, de acordo com Cieślińska (2011), membros dos grupos 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVII, 16SrIX, 16SrX-B, 16SrX-A, 16SrX-C e 16SrXII foram identificados em diversas espécies deste gênero, como apresentado na Tabela 1. Especificamente em ameixeira, ‘*Candidatus phytoplasma mali*’ (16SrX), agente causal da doença conhecida como *Apple Proliferation* foi relatado na Itália (LEE et al., 1995) e na Eslovênia (MEHLE et al., 2007).

A associação de diferentes fitoplasmas com a mesma doença e, por consequência, com o mesmo quadro sintomatológico, não se constitui em fato raro. Um exemplo clássico é a doença do tomateiro conhecida como “cálce gigante”, para a qual foram identificados diversos fitoplasmas em diferentes regiões do mundo. Fitoplasmas do grupo 16SrI foram relatados nos EUA; do grupo 16SrIII, no Brasil; do grupo 16SrVI na Jordânia; e dos grupos 16SrI, 16SrIII, 16SrV e 16SrXII na Itália (AMARAL MELLO et al., 2006). Outro exemplo é o amarelecimento foliar da cana-de-açúcar, em que fitoplasma do grupo 16SrI-A foi relatado em Cuba; grupo 16SrI-B no Brasil; grupo 16SrIII na África do Sul e grupos 16SrIII, 16SrI e 16SrIV nas Ilhas Maurício (SILVA, 2008).

3.1.3 Análise das sequências do 16S rDNA do fitoplasma

No total foram sequenciados dez isolados de cada pomar, sendo cada isolado representativo de uma amostra de planta. Três clones de cada isolado foram usados para o sequenciamento das bases nucleotídicas. As três sequências de 1,2 Kb, correspondentes aos três clones foram comparadas entre si e foi selecionada uma sequência consenso para cada um dos isolados, tomando-se por base a ausência de

polimorfismo. O alinhamento mostrou que a similaridade entre as sequências do 16S rDNA do fitoplasma presente em ameixeira e as sequências de outros fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrI foi de 99%.

Os padrões de RFLP produzidos na digestão *in silico* com 17 enzimas de restrição, de acordo com Wei et al. (2007), revelaram que os vinte isolados de ameixeira eram indistinguíveis entre si, considerando-se individualmente cada uma das enzimas de restrição. Com base na ausência de polimorfismo, duas sequências consensos de 1246 pb, designadas de PIY-Br01 e PIY-Br02, foram selecionadas para representar o fitoplasma associado com as ameixeiras amostradas nos pomares (I) e (II), respectivamente. Estas sequências foram depositadas no *GenBank*, onde receberam os números de acesso, KF499086 e KF499087, respectivamente.

Os padrões de restrição apresentados pelo fitoplasma do enfezamento do milho, representante do grupo 16SrI-B (AY265208), aqui utilizado como padrão positivo, foram indistinguível daqueles gerados pelos isolados representativos do fitoplasma encontrado nas amostras de ameixeira (Figura 6). O coeficiente de similaridade (F) determinado para estes fitoplasmas foi igual a 1, revelando completa identidade entre os mesmos (Tabela 4). Os valores dos coeficientes de similaridade calculados para o fitoplasma de ameixeira em relação aos representantes dos demais subgrupos do grupo 16SrI, variou de 0,87 a 1,00 (Tabela 4). Para que fitoplasmas sejam classificados em um mesmo subgrupo, o coeficiente de similaridade calculado entre eles deve ser maior que 0,97 (WEI et al., 2007). Usando-se este critério ficou demonstrado, no presente estudo, que o fitoplasma identificado em ameixeira é pertencente ao grupo 16SrI, subgrupo B, cujo representante é o fitoplasma do enfezamento do milho (*Maize bushy stunt phytoplasma*) (Tabela 4).

Figura 6 – Perfis gerados pela análise putativa dos sítios de restrição com as 17 enzimas de acordo com Wei et al. (2007). PIY-Br01 e PIY-Br02 = fitoplasma da ameixeira; 16SrI-B= fitoplasma associado ao Enfezamento do milho

Tabela 4 – Comparação dos coeficientes de similaridade calculados para os fitoplasmas detectados nas amostras PIY-Br01 e PIY-Br02 de ameixeira com outros fitoplasmas pertencentes a diversos subgrupos do grupo 16SrI

Subgrupos	A	B	C	D	E	F	K	L	M	O	P	Q	R	S	T	U	V	PIY-Br01	PIY-Br02
16SrI-A	1																		
16SrI-B	0,92	1																	
16SrI-C	0,91	0,94	1																
16SrI-D	0,94	0,97	0,9	1															
16SrI-E	0,92	0,93	0,92	0,91	1														
16SrI-F	0,87	0,87	0,89	0,86	0,87	1													
16SrI-K	0,9	0,92	0,91	0,89	0,91	0,92	1												
16SrI-L	0,89	0,97	0,9	0,94	0,9	0,86	0,89	1											
16SrI-M	0,88	0,96	0,93	0,96	0,89	0,84	0,89	0,93	1										
16SrI-O	0,87	0,87	0,8	0,84	0,84	0,75	0,81	0,84	0,83	1									
16SrI-P	0,92	0,94	0,93	0,91	0,93	0,94	1,00	0,91	0,9	0,81	1								
16SrI-Q	0,84	0,92	0,89	0,89	0,89	0,84	0,84	0,89	0,92	0,81	0,86	1							
16SrI-R	0,91	0,93	1,00	0,9	0,92	0,87	0,91	0,9	0,93	0,8	0,93	0,89	1						
16SrI-S	0,9	0,92	0,93	0,89	0,91	0,88	0,92	0,89	0,88	0,81	0,94	0,84	0,93	1					
16SrI-T	0,84	0,92	0,85	0,89	0,85	0,8	0,85	0,89	0,9	0,83	0,86	0,9	0,85	0,84	1				
16SrI-U	0,87	0,93	0,88	0,9	0,87	0,81	0,85	0,9	0,9	0,85	0,87	0,87	0,89	0,87	0,88	1			
16SrI-V	0,85	0,93	0,87	0,9	0,87	0,81	0,85	0,92	0,9	0,83	0,87	0,87	0,87	0,85	0,88	0,94	1		
PIY-Br01	0,92	1,00	0,94	0,97	0,93	0,87	0,92	0,97	0,96	0,87	0,94	0,92	0,93	0,92	0,92	0,93	0,93	1	1
PIY-Br02	0,92	1,00	0,94	0,97	0,93	0,87	0,92	0,97	0,96	0,87	0,94	0,92	0,93	0,92	0,92	0,93	0,93	1	1

A análise filogenética das sequências do 16S rDNA de fitoplasmas representantes de diversos grupos encontrados em espécies de *Prunus*, dos pertencentes aos grupos mais frequentemente relatados no Brasil, dos afiliados aos distintos subgrupos dentro do grupo 16SrI e do fitoplasma identificado em ameixeira (representado por dois isolados) confirmou os resultados revelados pelos coeficientes de similaridade. A árvore filogenética (Figura 7) mostra que o fitoplasma da ameixeira está

disseminação por insetos vetores polívoros, os quais possivelmente podem estar envolvidos com a transmissão do patógeno para uma gama de espécies de interesse econômico. Segundo LEE; GUNDERSEN-RINDAL; BERTACCINI (1998), a gama de hospedeiros naturais de cada fitoplasma é determinada pelo número de espécies vetoras capazes de transmiti-lo e pelo comportamento alimentar dos mesmos. Os fitoplasmas do grupo 16SrI apresentam baixa especificidade quanto ao inseto vetor, sendo transmitido por 24 espécies de cigarrinhas, entre elas, a espécie *Macrosteles fascifrons*. Esta espécie é polívora e em condições experimentais foi capaz de transmitir o patógeno a 191 espécies de plantas hospedeiras, de 42 famílias botânicas, mostrando que a especificidade deste fitoplasma em relação ao vetor e à espécie hospedeira são baixas (LEE et al., 1998).

3.2 Ensaio 2: Colonização de ameixeiras por fitoplasmas

3.2.1 Eficiência dos *primers* para detecção do fitoplasma por qPCR

O par de iniciadores UniRNAForward/UniRNAReverse mostrou especificidade em relação ao fitoplasma encontrado nas árvores de ameixeira, nos ensaios preliminares onde se utilizou amostras de plantas sabidamente infectadas pelo patógeno (quatro amostras de plantas infectadas com o fitoplasma do milho e quatro plantas infectadas de ameixeira). As amostras usadas neste ensaio foram as mesmas utilizadas para determinação da curva de calibração. Esta especificidade pode ser visualizada pelo aparecimento de um único pico na curva de dissociação (Figura 8) e pela ausência de formação de dímeros. As reações de PCR amplificaram um fragmento de 73 pb, o qual é esperado para este patógeno (Figura 9) (HREN et al., 2007). O produto amplificado foi sequenciado e a análise da sequência de DNA confirmou que o fragmento amplificado correspondia a uma sequência nucleotídica encontrada em fitoplasma.

Figura 8 - Curva de dissociação (melt curve) para o par de iniciadores UniRNAForward/UniRNAReverse, usado para detecção do fitoplasma presente em árvores infectadas de ameixeira, usando a técnica de PCR quantitativo

Figura 9 – Teste de especificidade dos *primers* UniRNAForward/UniRNAReverse com isolados de fitoplasma do grupo 16SrI-B. Colunas 1 a 4 – amostras de DNA do fitoplasma do milho, colunas 5 a 8 – amostras de DNA do fitoplasma de plantas de ameixeira infectadas, coluna 9 – controle negativo (planta sadia de vinca), M – marcador peso molecular (1 kb DNA plus ladder)

3.2.2 Colonização de ameixeiras por fitoplasma

O patógeno foi detectado em todas as árvores sintomáticas amostradas, durante todo o período de estudo. A detecção foi possível nas diferentes partes da planta. Isso sugere que o patógeno persiste de um ano para outro infectando tanto a parte aérea como o sistema radicular do hospedeiro. Foi observada também uma alteração na concentração do fitoplasma, de uma estação a outra, evidenciando uma flutuação sazonal. Esses resultados revelaram a distribuição irregular do fitoplasma na planta infectada, além de variações na concentração do mesmo. Resultados similares foram anteriormente relatados para videira, onde estudos realizados para avaliar o efeito do

estádio vegetativo da planta em relação à detecção de fitoplasmas demonstraram diferenças em função do estágio fenológico e das partes da planta amostradas (DEL SERRONE; BARBA, 1996).

No presente trabalho, a concentração do fitoplasma na planta variou, na copa, de $5,77 \times 10^5$ a $1,93 \times 10^9$ e, na raiz, de $6,18 \times 10^5$ a $3,92 \times 10^9$ N^ocópias/100 ng de DNA total (Tabela 5). Neste caso, 100 ng de DNA total correspondem a 2g de tecido vegetal ou 2μL de DNA total. Os valores obtidos estão de acordo com aqueles já encontrados para fitoplasmas que infectam outras espécies de fruteiras temperadas. Assim, em macieira, a concentração de '*Candidatus Phytoplasma mali*' variou de 612 a $7,1 \times 10^6$ cópias de fitoplasma por reação (BARIC et al., 2011). Em ameixeira japonesa, a concentração de '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' variou de $9,7 \times 10^3$ a $3,0 \times 10^5$ células de fitoplasma por grama de tecido da planta (MARCONE et al., 2010). Em pereira, ameixeira e damasqueiro a concentração estimada de fitoplasmas variou de $9,7 \times 10^3$ a $3,0 \times 10^5$ fitoplasmas por grama de tecido (TORRES et al., 2005). Esta distribuição irregular dos fitoplasmas pode dificultar a diagnose, principalmente em plantas lenhosas, uma vez que restringe a detecção do patógeno nos tecidos sintomáticos do hospedeiro, como descrito em outros trabalhos. Em um destes trabalhos, conduzido com videira e pereira, espécies que apresentam período de dormência, foram reportadas as dificuldades na detecção do patógeno, decorrentes da distribuição e concentração desuniformes do patógeno na planta, em função do seu estágio fenológico (CHAPA et al., 2003). Apesar da alta sensibilidade da técnica de PCR, a confirmação da diagnose pelo método molecular pode ser comprometida pela distribuição irregular e baixa concentração do fitoplasma na planta (LEE; DAVIS, 1992).

A análise da variância dos efeitos de variedade, parte da planta (copa ou raiz) e época de amostragem, mostrou diferença significativa na concentração do patógeno para época de amostragem e parte da planta *versus* época de amostragem. Não houve diferença significativa quando se considerou o efeito das duas cultivares estudadas (Tabela 6).

Considerando as diversas épocas de amostragem, observou-se uma variação na concentração do patógeno ao longo de um ano de avaliação (Tabela 7). Os resultados mostraram a ocorrência de um padrão (modelo) de colonização do fitoplasma com uma maior concentração do patógeno no verão e uma redução da concentração no inverno (Tabela 5). Além disso, os resultados revelaram que o fitoplasma encontrado em ameixeira permaneceu na parte aérea da planta, mesmo no período de dormência do

hospedeiro, no entanto, sua concentração foi reduzida da escala de 10^9 para 10^5 cópias de fitoplasma (Tabela 5 e 7). Esses dados demonstraram que a estação de verão é a melhor época para a coleta das amostras visando à detecção do patógeno para fins de diagnose, devido a dois fatores, a presença de folhas na planta e a temperatura. No verão, a presença de folhas na parte aérea permitiu a multiplicação do patógeno, mas durante o inverno, as folhas caem e o patógeno reduziu sua multiplicação. Nesse caso, também ficou claro o efeito da época do ano na concentração do fitoplasma, sugerindo a influência da temperatura sobre a multiplicação do patógeno nos tecidos da planta. Em geral, o aumento da temperatura favorece a multiplicação e a sobrevivência do patógeno. Segundo relatos de Errea et al. (2002) e Garcia-Chapa et al. (2003), as temperaturas mais altas da região do mar Mediterrâneo favorecem a permanência de ‘*Ca. Phytoplasma pyri*’ por um período mais longo na parte aérea de pereira; em contraste, em temperaturas mais baixas, ocorrentes nas regiões centrais da Europa, o mesmo fitoplasma permanece na parte aérea da planta por um período mais curto. Além do efeito sobre o patógeno, a temperatura também tem influência sobre o hospedeiro, pois a manutenção da viabilidade dos vasos do floema da parte aérea é condição essencial para sobrevivência e multiplicação do fitoplasma nos tecidos vegetais (MARCONE, 2010). Assim, em regiões de inverno severo ocorre a eliminação dos vasos de floema, limitando a sobrevivência do patógeno. A temperatura também tem efeito em patossistemas tropicais, como o milho e fitoplasma agente causal do enfezamento vermelho (16SrI-B). No Brasil, estudos realizados na cultura do milho demonstraram que temperaturas mais elevadas, acima de 29°C , favorecem o fitoplasma causador do enfezamento vermelho do milho, levando ao aparecimento de sintomas mais severos nas plantas infectadas (OLIVEIRA et al., 2009).

Tabela 5 – Concentração do fitoplasma (média de quatro árvores) em tecidos foliares e radiculares de ameixeira em distintas épocas do ano. *N^o cópias do fitoplasma/100 ng de DNA total

Amostras	Época de Coleta											
	set/11	out/11	nov/11	dez/11	jan/12	fev/12	mar/12	abr/12	mai/12	jun/12	jul/12	ago/12
	Presença de Folhas						Ausência de Folhas					
Média Raiz	*1,97x10 ⁸	1,73x10 ⁹	3,92x10 ⁹	2,13x10 ⁷	6,14x10 ⁸	1,72x10 ⁷	6,58x10 ⁶	5,59x10 ⁶	9,78x10 ⁶	1,81x10 ⁶	7,44x10 ⁵	6,18x10 ⁵
Média Copa	*2,13x10 ⁸	1,93x10 ⁹	1,46x10 ⁹	1,96x10 ⁷	4,18x10 ⁸	1,6x10 ⁷	6,09x10 ⁶	4,53x10 ⁶	8,5x10 ⁶	1,51x10 ⁶	7,51x10 ⁵	5,77x10 ⁵

Tabela 6 - Análise da variância dos efeitos da variedade (Var), parte da planta (copa ou raiz – C/R) e época de amostragem (EP) na concentração do patógeno

Fontes de variação	df	F valores
Var	1	0,61 ^{ns}
C/R	1	0,05 ^{ns}
EP	11	108,06 [*]
Var × C/R	1	1,73 ^{ns}
Var × EP	11	0,56 ^{ns}
C/R × EP	11	5,90 [*]
Replicações	3	2,60 ^{ns}

^{ns} e ^{*} = não-significativo e significativo a 0,01% de probabilidade, respectivamente.

Quando se desdobrou a análise para cada época (mês) de amostragem e para a parte da planta analisada, observou-se que houve diferença significativa na concentração do fitoplasma entre copa e raiz, apenas nos meses de outubro e novembro. Em outubro, a concentração foi maior nas raízes ($1,93 \times 10^9$ N^ocópias de fitoplasma/100 ng de DNA total) e em novembro foi maior na copa ($3,92 \times 10^9$ N^ocópias de fitoplasma/100 ng de DNA total) (Tabela 7 e Figura 10). Diante disso, pode-se dizer que para fins de diagnose, as amostras de tecido podem ser retiradas tanto da copa como da raiz nos demais meses. No entanto, as folhas são mais indicadas para o processo extração de DNA total, por serem mais facilmente trabalhadas, sobretudo na etapa de maceração do tecido vegetal.

Figura 10 – Log do número de cópias de fitoplasma detectadas em 100ng de DNA total de ameixeira (Variedade Golfblaze) via qPCR durante 12 meses de avaliação, para copa e raiz. As barras representam o erro padrão da média

Tabela 7 - Influência da época de amostragem e parte da planta (copa ou raiz) na concentração do patógeno nos tecidos do hospedeiro

Época de amostragem	Concentração do fitoplasma (log N ^o cópias/100 ng de DNA total)		
	Copa	Raiz	P
Setembro	2,13x10 ⁸ cd	1,97x10 ⁸ b	0,6525
Outubro	1,93x10 ⁹ bc	1,73x10 ⁹ a	0,0001
Novembro	1,46x10 ⁹ a	3,92x10 ⁹ a	0,0001
Dezembro	1,96x10 ⁷ de	2,13x10 ⁷ bcd	0,5471
Janeiro	4,18x10 ⁸ b	6,14x10 ⁸ a	0,2299
Fevereiro	1,6x10 ⁷ ef	1,72x10 ⁷ bcd	0,8134
Março	6,09x10 ⁶ fg	6,58x10 ⁶ cd	0,4718
Abril	4,53x10 ⁶ fg	5,59x10 ⁶ cd	0,7681
Maio	8,5x10 ⁶ fg	9,78x10 ⁶ cd	0,8777
Junho	1,51x10 ⁶ gf	1,81x10 ⁶ cd	0,9249
Julho	7,51x10 ⁵ g	7,44x10 ⁵ cd	0,9709
Agosto	5,77x10 ⁵ g	6,18x10 ⁵ cd	0,7350

Para cada variável, significa que médias dentro de uma coluna seguida por diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes ($P = 0,05$), conforme determinado pelo teste de Tukey. Os valores de P em cada linha são do teste F em ANOVA.

Embora os resultados aqui obtidos sejam confiáveis e claros, seria necessária a continuidade deste estudo por maior período de tempo.

4 CONCLUSÕES

- Um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrI, subgrupo B está associado ao amarelo da ameixeira, nas plantas amostradas em campos localizados em Paranapanema, no Estado de São Paulo;

- O modelo de colonização das plantas de ameixeira infectadas por fitoplasma mostrou a existência de maior concentração do patógeno no verão e uma redução no inverno;

- O patógeno permaneceu na planta mesmo no período de dormência do hospedeiro. Como consequência, o uso de gemas dormentes para obtenção de mudas pode servir de fonte de inóculo primário da doença;

- Não foi constatada diferença significativa na concentração do fitoplasma entre as duas variedades avaliadas;

- O verão se mostrou como a melhor época para obtenção de amostras para fins de diagnose;

- Amostras da copa e da raiz se mostraram apropriadas para a detecção do fitoplasma, no entanto, as amostras foliares são mais indicadas pela facilidade de extração de DNA.

- A técnica de PCR em Tempo Real se mostrou eficiente e segura para a diagnose do fitoplasma encontrado em ameixeira, sendo sugerido o seu uso em laboratórios de inspeção quarentenária.

REFERÊNCIAS

- ABOU-JAWDAH, Y.; DAKHIL, H.; EL-MEHTAR, S.; LEE, I.M. 2003. Almond witches' broom phytoplasma; a potential threat to almond, peach, and nectarine. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 25, n. 1, p. 28-32, 2003.
- ALDAGHI, M.; MASSART, S.; ROUSSEL, S.; JIJAKLI, M.H. Development of a new probe for specific and sensitive detection of '*Candidatus Phytoplasma mali*' in inoculated apple trees. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 151, p. 251-258, 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.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Apostila. **Aplicações da PCR quantitativa em Tempo Real**. São Paulo, 2009. 51p.
- BARBOSA, W.; OJIMA, M.; CAMPO DALL'ORTO, F. A.; CASTRO, J. L.; NOVO, M. C. S. S.; VEIGA, R. F. A. Comportamento de sete cultivares de ameixeira em Capão Bonito (SP). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 108-111, 2001.
- BARIC, S.; DALLA-VIA, J. A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 57, p. 135-145, 2004.
- BARIC, S.; BERGER, J.; CAINELLI, C.; KERSCHBAMER, C.; LETSCHKA, T.; DALLA-VIA, J. Seasonal colonisation of apple trees by '*Candidatus Phytoplasma mali*' revealed by a new quantitative TaqMan real-time PCR approach. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 129, p. 455-467, 2011.
- BEDENDO, I.P. Fitoplasmas e espiroplasmas. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p. 255-270.
- BERGES, R.; ROTT, M.; SEEMULLER, E. Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, p. 1145-1152, 2000.
- BERTACCINI, A.; DUDUK, B. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. **Phytopathologica Mediterranea**, Firenze, v. 48, p. 355-378, 2009.
- BISOGNIN, C.; SCHNEIDER, B.; SALM, H.; GRANDO, M.S.; JARAUSCH, W.; MOLL, E.; SEEMULLER, E. Apple proliferation resistance in apomictic rootstocks and its relationship to phytoplasma concentration and simple sequence repeat genotypes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, p. 153-158, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Standard Regional Sobre Proteção Fitossanitária. Seção M. Medidas Fitossanitárias. Lista de Pragas de Importância Quarentenária. Comitê de Sanidade Vegetal do Cone Sul (COSAVE), dezembro de 1995. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 mar. 1996. Seção 1.

BUAINAIN, A.M.; BATALHA, M.O. **Cadeia produtiva de frutas**. Brasília: IICA; MAPA; SPA, 2007. v. 7. 102p.

CASTRO, L.A.S.; CAMPOS, A.D. Introdução. In: CASTRO, L.A.S. (Coord.). **Ameixa: produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 9-12. (Série Frutas do Brasil, 43).

CASTRO, L.A.S.; NAKASU, B.H.; PEREIRA, J.F.M. **Ameixeira: histórico e perspectivas do cultivo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 10p. (Circular Técnica, 70).

CHOUERI, E.; JREIJIRI, F.; ISSA, S.; VERDIN, E.; BOVE, J.; GARNIER, M. First report of a phytoplasma disease of almond (*Prunus amygdalus*) in Lebanon. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 802, 2001.

CHYKOWSKI, L.N. Vector-pathogen-host plant relationships of clover phyllody mycoplasma-like organism and the vector leafhopper *Paraphlepsius irroratus*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 13, n. 1, p. 11-18, 1991.

CIEŚLIŃSKA, M. Less common phytoplasmas infecting stone fruit trees. **Journal of Plant Protection Research**, Poznań, v.51, n. 4, p. 435-440, 2011.

CUNHA, M.M. da; SANTOS FILHO, H.P.; NASCIMENTO, A.S. do (Org.). Manga: fitossanidade. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. cap. 3, p. 25-47. il. (Frutas do Brasil, 6).

DAVIS, R.E.; LEE, I.M. Mycoplasma-like organisms as plant disease agents – a review. **ATCC. Quarterly Newsletter**, v.11, p.1-11, 1991.

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

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. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Ithaca, v. 12, p. 13-15, 1990.

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.

FAOSTAT. **Production-crops**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

FERNÁNDEZ, F.D.; GUZMÁN, F.A.; CURZEL, V.; BEJARANO, N.; CONCI, L.R. Detection and molecular characterization of a phytoplasma affecting *Prunus persica* L. in Jujuy, Argentina. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 35, n.4, p. 627-631, 2013.

FIALOVÁ, R.; NAVRÁTIL, M.; VÁLOVÁ, P.; LAUTERER, P.; KOCOUREK, F.; PONCAROVÁ-VORÁČKOVÁ, Z. Epidemiology of European stone fruit yellows phytoplasma in the Czech Republic. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 657, p. 483-487, 2004.

FNP CONSULTORIA & COMERCIO. Hortifrutícolas. In: _____. **Agrianual 2013**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2013. p. 313.

FOISSAC, X.; WILSON, M.R. Current and possible future distributions of phytoplasma diseases and their vectors. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. **Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors**. Wallingford: CAB International, 2010. chap. 17, p. 309-324, 2010.

GALETTO, L.; MARZACHÌ, C. Real-time PCR Diagnosis and Quantification of Phytoplasmas. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. **Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors**. Wallingford: CAB International, 2010. chap. 1, p. 1-18.

GALETTO, L.; BOSCO, D.; MARZACHI, C. Universal and group-specific real-time PCR diagnosis of fl avescence doree (16Sr-V), bois noir (16Sr-XII) and apple proliferation (16Sr-X) phytoplasmas from field-collected plant hosts and insect vectors. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 147, p. 191–201, 2005.

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

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

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

HREN, H.; BOBEN, J.; ROTTER, A.; KRALJ, P.; GRUDEN, K.; RAVNIKAR, M. Real time PCR tetection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 56, p.785-796, 2007.

JARAUSCH, B.; JARAUSCH, W. Psyllid vectors and their control. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. **Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors**. Wallingford: CAB International, 2010. chap. 14, p. 250-271.

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.

JARAUSCH, W.; PECCERELLA, T.; SCHWIND, N.; JARAUSCH, B.; KRCZAL, G. Establishment of a quantitative real-time PCR assay for the quantification of apple proliferation phytoplasmas in plants and insects. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 657, p. 415-420, 2004.

JOMANTIENE, R.; YHAO, Z.; LEE, I.M.; DAVIS, R.E. Phytoplasmas infecting sour cherry and lilac represent two distinct lineages having close evolutionary affinities with clover phyllody phytoplasma. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 130, n. 1, p. 97-107, 2011.

KIST, B.B.; VENCATO, A.C.; SANTOS, C.; CARVALHO, C.; REETZ, E.R.; POLL, H.; BELING, B.R. **Anuário brasileiro da fruticultura 2012**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2012. 128p.

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.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; BERTACCINI, A. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, n. 12, p. 1359-1366, 1998.

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.; 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.; BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; GUNDERSEN, D.E. Detection of multiply phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 6, p. 728-735, 1995.

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, 1998.

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

LEE, I.M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; DAVIS, R.E.; BOTTLNER, K.D.; MARCONE, C.; SEEMÜLLER, E. '*Candidatus Phytoplasma asteris*', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 4, p. 1037-1048, 2004.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Lista de Pragas Quarentenárias**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 26 mar. 2013.

MARCONE, C. Movement of Phytoplasmas and the Development of Disease in the Plant. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. **Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors**. Wallingford: CAB International, 2010. chap. 7 p. 114-131.

MARTINI, M.; LOI, N.; ERMACORA, P.; CARRARO, L.; PASTORE, M. A real-time PCR method for detection and quantification of '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' in its natural hosts. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 251-252, 2007.

MEHLE, N.; BRZIN, J.; BOBEN, J.; HREN, M.; FRANK, J.; PETROVIČ, N.; GRUDEN, K.; DREO, T.; ŽEŽLINA, I.; SELJAK, G.; RAVNIKAR, M. First report of '*Candidatus Phytoplasma mali*' in *Prunus avium*, *P. armeniaca* and *P. domestica*. **Plant Pathology**, London, v. 56, n. 4, p. 721, 2007.

MENDES, M.A.S.; FELIX, A.A.A.; SANTOS, M, de F.; HERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, A. (Ed). **Fungos quarentenários para o Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 325p.

MONTANO, H.G.; CUNHA JUNIOR, J.O.; PIMENTEL, J.P. Phytoplasmas in Brazil: an update. **Bulletim of Insectology**, Bologna, 64 (Supplement), S251-S252, 2011.

MONTEIRO, L.B.; MIO, L.L.M.; SERRAT, B.M.; MOTTA, A.C.V.; CUQUEL, F.L. **Fruteiras de caroço uma visão ecológica**. Curitiba: UPPR, 2004. 390p.

MÜLLER, C. **Xylella fastidiosa de ameixeira**: transmissão por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) e colonização de plantas hospedeiras. 2013. 105p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

NAULT, L.R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, n. 7, p. 659-662, 1980.

NAVRÁTIL, M.; VÁLOVÁ, P.; FIALOVÁ, R.; PETROVÁ, K.; FRÁNOVÁ, J.; NEBESÁŘOVÁ, J.; PONCAROVÁ-VORÁČKOVÁ, Z.; KAREŠOVÁ, R. Survey for stone fruit phytoplasmas in Czech Republic. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 550, p. 377-382, 2001.

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

OLIVEIRA, E.; SANTOS, J.C.; MAGALHÃES, P.C.; CRUZ, I. **Mudanças climáticas poderão favorecer doença causada por fitoplasma na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 4p. (Circular Técnica, 126).

OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M.; MAGALHÃES, P.C.; ANDRADE, C.L.T.; HOGENHOUT, S. Spiroplasma and phytoplasma infection reduce kernel production, and nutrient and water contents of several but not all maize cultivars. **Maydica**, Bergamo, v. 50, p. 171-178, 2005.

PURCELL, A.H.; NYLAND, G.; RAJU, B.C.; HERINGER, M.R. Peach yellow leaf roll epidemic in northern California: effects of peach cultivar, tree age, and proximity to pear orchards. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 65, p. 365-368, 1981.

SCHAPER, U.; SEEMULLER, E. Condition of the phloem and persistence of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 736-742, 1982.

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

SEEMÜLLER, E.; SCHAPER, U.; ZIMBERMANN, E. Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Rostock, v. 91, p. 371-382, 1984.

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. 98p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

TORRES, E.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; MONTON, C.; MARTIN, M.P. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 19, p. 334-340, 2005.

VALIŪNAS, D.; JOMANTIENE, R.; DAVIS, R.E. Phytoplasmas detected in cultivated fruit plants in Lithuania. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 139-140, 2007.

VALIŪNAS, D.; JOMANTIENE, R.; DAVIS, R.E. Establishment of a new phytoplasma subgroup, 16SrI-Q, to accommodate a previously undescribed phytoplasma found in diseased cherry in Lithuania. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 91, n. 1, p. 71-75, 2009.

VARGA, K.; KÖLBER, M.; EMBER, I.; ERDŐS, Z.; BIRÓ, E.; PALTRINIERI, S.; MARTINI, M.; BERTACCINI, A. Identification of phytoplasmas infecting sour cherry in Hungary. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 550, p. 383-388, 2001.

VERDIN, E.; SALAR, P.; DANET, J.L.; CHOUEIRI, E.; JREIJRI, F.; EL ZAMAR, S.; GÉLIE, B.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. '*Candidatus* Phytoplasma phoenicium' sp. nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, n. 3, p. 833-838, 2003.

WATERWORTH, H.E.; MOCK, R. An assessment of nested PCR to detect phytoplasmas in imported dormant buds and internodal tissues of quarantined tree fruit germplasm. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 1047-1050, 1999.

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

APÊNDICE

>Sequência parcial do gene 16S rDNA do fitoplasma presente na amostra PIY-Br01

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTT
AAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTT
AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGA
GGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCG
CGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATA
AATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAAC
TATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGGGTTCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGC
AATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGA
GGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAA
CACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
ATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTA
CTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGG
ACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAA
CCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGG
TTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATG
TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGT
AATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGG
GACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATAC
AATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAA
AAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGG
AATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGT
TGTACACACCGCCCGTCA

>Sequência parcial do gene 16S rDNA do fitoplasma presente na amostra PIY-Br02

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTT
AAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTT
AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGA
GGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCG
CGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATA
AATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAAC
TATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGC
AATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGA
GGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAA
CACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
ATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTA
CTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGG
ACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAA
CCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGG
TTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATG
TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGT
AATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGG
GACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATAC
AATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAA
AAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGG
AATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTGCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGT
TGTACACACCGCCCGTCA