

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

**Superbrotamento de ramos em oliveira causado por fitoplasma: alterações bioquímicas, transmissão por enxertia e quantificação da bactéria nos tecidos do hospedeiro**

**Jacson Ferreira**

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

**Piracicaba  
2021**

**Jacson Ferreira**  
**Bacharel em Agronomia**

**Superbrotamento de ramos em oliveira causado por fitoplasma: alterações bioquímicas,  
transmissão por enxertia e quantificação da bactéria nos tecidos do hospedeiro**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba**  
**2021**

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

Ferreira, Jacson

Superbrotamento de ramos em oliveira causado por fitoplasma: alterações bioquímicas, transmissão por enxertia e quantificação da bactéria nos tecidos do hospedeiro/ Jacson Ferreira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

51 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Patogenicidade 2. Mollicutes 3. Vassoura-de-bruxa 4. Desenvolvimento lento  
5. PCR em tempo real. I. Título

*Dedico a Deus,*

*A minha mãe, ao meu pai*

*e ao meu irmão,*

*pelo amor que tanto tenho recebido.*

*“A persistência é o menor caminho do êxito”*

Charles Chaplin

**OFEREÇO:**

Joana Santália Ferreira

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pois, sem ti nada sou e nada posso fazer, por sempre me mostrar o melhor caminho.

Aos meus pais pelo amor incondicional, e por toda colaboração durante a minha formação.

Ao meu irmão, pelo amor, preocupação e por sempre estar ao meu lado.

Aos meus avós Maria Ferreira de Jesus Alkimim e José Ferreira Soares (*In memorian*), muito obrigado pelo amor e contribuição que recebi em toda minha vida. Sou eternamente grato!

Ao prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo pela amizade, por me ouvir, pela orientação durante a pós-graduação, pela dedicação com os meus trabalhos, e pelo incentivo a pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de Doutorado concedida.

A Ana Paula de Oliveira Amaral Mello pela contribuição e oportunidades durante o Doutorado.

A Tatiana Mituti pelas diversas orientações durante a pós-graduação.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia.

Aos colegas do laboratório de Procariotos Fitopatogênicos.

Aos colegas do laboratório de Virologia Vegetal.

Aos amigos que fiz durante o período da pós-graduação

A todos funcionários do Departamento de Fitopatologia

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
1 INTRODUÇÃO .....	9
2 DESENVOLVIMENTO .....	11
2.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
2.1.1 Cultura da oliveira .....	11
2.1.2 Fitoplasma .....	13
2.1.3 Superbrotamento de ramos da oliveira .....	15
2.1.4 A enxertia no estudo de doenças causadas por fitoplasmas.....	16
2.1.5 Alterações fisiológicas em plantas doentes .....	16
2.1.6 O PCR em tempo real.....	17
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	18
2.2.1 Teste de Patogenicidade .....	18
2.2.2 Detecção e identificação do fitoplasma .....	19
2.2.3 Análise de ´nested` PCR .....	19
2.2.4 Purificação do produto de PCR. ....	20
2.2.5 Clonagem.....	21
2.2.6 Sequenciamento dos fragmentos genômicos clonados.....	22
2.2.7 Quantificação do fitoplasma nos tecidos das plantas de oliveira por qPCR.....	22
2.2.8 Análises bioquímicas.....	23
2.2.9 Clorofila total.....	24
2.2.10 Açúcares redutores .....	24
2.2.11 Fenóis livres e ligados .....	24
2.2.12 Proteínas totais.....	25
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
3.1 Teste de patogenicidade.....	27
3.2 Quantificação do fitoplasma nos tecidos das plantas de oliveira por qPCR.....	31
3.3 Análises bioquímicas.....	34
3.3.1 Clorofila total.....	34
3.3.2 Açúcares redutores .....	36
3.3.3 Fenóis livres e ligados .....	37

3.3.4 Proteínas totais .....	40
4 CONCLUSÃO .....	43
REFERÊNCIAS .....	44

## RESUMO

### **Superbrotamento de ramos em oliveira causado por fitoplasma: alterações bioquímicas, transmissão por enxertia e quantificação da bactéria nos tecidos do hospedeiro**

No Brasil, a doença denominada de superbrotamento de ramos da oliveira tem como agente causal um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrVII-B. Essa doença tem causado significativos danos à produção por interferir com o desenvolvimento normal das plantas infectadas. As medidas de controle estão restritas, basicamente, ao plantio de mudas livres do patógeno e à erradicação de plantas doentes. A interação entre hospedeiro e patógeno ainda é pouco conhecida e este estudo teve como objetivos demonstrar a patogenicidade do fitoplasma, determinar as alterações bioquímicas induzidas pelo patógeno e avaliar a concentração do patógeno nos tecidos das plantas. Para isto, foi usada a técnica de enxertia para transmissão do fitoplasma, quantificação do patógeno nos tecidos foliares por meio de PCR em tempo real e análises bioquímicas de diversos componentes celulares. A patogenicidade foi comprovada pela presença constante do fitoplasma nas plantas doentes. A concentração do patógeno variou entre as cultivares e os resultados sugeriram um ordenamento com relação à multiplicação de células do patógeno nestas cultivares. As alterações bioquímicas nas plantas infectadas foram demonstradas, de modo geral, pela redução no teor de clorofila e aumento nos conteúdos de açúcares redutores, fenóis e proteínas totais.

**Palavras-chave:** Patogenicidade; Mollicutes; Vassoura-de-bruxa; Desenvolvimento lento; PCR em tempo real



## ABSTRACT

### **Shoot proliferation in olive plants caused by phytoplasma: biochemical changes, graft transmission and quantification of bacteria in host tissues**

In Brazil, a disease called shoot proliferation olive is caused by a phytoplasma belonging to the 16SrVII-B group. This disease has caused damage to production by interfering with the normal development of infected plants. Control measures are basically restricted to the planting of pathogen-free seedlings and the eradication of diseased plants. The interaction between host and pathogen is still poorly known and this study aimed to demonstrate the pathogenicity of phytoplasma, determine how biochemical changes induced by the pathogen and evaluate the concentration of the pathogen in plant tissues. For this, the grafting technique was used for phytoplasma transmission, quantification of the pathogen in leaf tissues through real-time PCR and biochemical analysis of several cellular components. The pathogenicity was proven by the constant presence of phytoplasma in diseased plants. The concentration of the pathogen varied among cultivars and the results suggested an ordering regarding the multiplication of cells of the pathogen in these cultivars. Biochemical changes in infected plants were demonstrated, in general, by a reduction in chlorophyll content and an increase in the contents of reducing sugars, phenols and total proteins.

**Keywords:** Pathogenicity; Mollicutes; Witches' broom; Slow development; real-time PCR

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o interesse pela cultura da oliveira tem se tornado crescente e, com isto, o seu cultivo vem se expandindo no Brasil. Como consequência, atualmente, existem grupos de pesquisa engajados em fornecer aos produtores um conjunto de tecnologias mais apropriadas para a implantação e condução dos olivais. A produção brasileira tem sido considerada satisfatória, levando-se em consideração que a cultura passou a ser explorada recentemente pelos agricultores brasileiros.

Em 2019, a produção mundial alcançou 19.464.495 toneladas em área colhida de 10.578.246 hectares. No Brasil, a cultura é ainda muito incipiente com produção de 2.505 toneladas em área colhida de 1.418 hectares, em 2019 (FAO, 2020).

Fitoplasmas são procariotos fitopatogênicos, sem parede celular, habitantes de floema que interferem com processos fisiológicos, causando sintomas externos caracterizados, principalmente, por amarelecimento, proliferação de ramos e enfezamento generalizado de plantas (BERTACCINI et al., 2014). Os danos observados estão relacionados com redução no desenvolvimento de plantas, bem como na quantidade e qualidade de seus produtos. A diagnose tem sido feita com base na sintomatologia expressa pela planta hospedeira e na detecção do fitoplasma em seus tecidos, realizada por meio de análises moleculares e microscopia eletrônica (BEDENDO, 2018). Os métodos de controle viáveis são limitados e compreendem, especialmente, o uso de material propagativo sadio, a erradicação de plantas infectadas, o controle químico do vetor e o uso de genótipos resistentes, quando disponíveis (BEDENDO, 2018; LEE et al., 2000).

No Brasil, o primeiro relato da presença de fitoplasmas em oliveira foi feito em pomares comerciais, situados no sul do estado de Minas Gerais (FERREIRA et al., 2021). As plantas afetadas apresentavam sintomas de desenvolvimento lento, superbrotamento de ramos, intensa queda de folhas e declínio generalizado. Como consequência, foi observado subdesenvolvimento, atraso na produção, redução na quantidade e qualidade dos frutos e morte de plantas. Por meio da técnica molecular de PCR, fitoplasmas foram detectados nos tecidos de plantas doentes e pelo emprego de RFLP e análise filogenética, o fitoplasma foi identificado como um representante do subgrupo 16SrVII-B, com base nos critérios usados para classificação de fitoplasmas (WEI et al., 2008). A doença foi denominada de superbrotamento de ramos da oliveira, pois já foi identificada com essa denominação em relatos feitos em outros países (POLLINI et al., 1996; FONT et al., 1998; RASHIDI et al., 2010).

Os estudos sobre a doença são muito escassos e aspectos referentes à interação patógeno-hospedeiro e ao comportamento de cultivares em relação à resistência ao patógeno são pouco conhecidos. Diante do exposto, o presente trabalho de pesquisa teve por objetivos demonstrar a patogenicidade do fitoplasma por meio da transmissão por enxertia, avaliar a multiplicação do patógeno nos tecidos vegetais e analisar as alterações bioquímicas nas plantas infectadas.

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1. Revisão Bibliográfica

#### 2.1.1. Cultura da oliveira

A oliveira (*Olea europaea* L.) tem como origem o oriente médio, sendo encontrada em todos os países da região mediterrânea (COUTINHO et al., 2015). É uma planta pertencente à família Oleaceae, de porte arbóreo, com folhas coriáceas de cutícula espessa e estômatos na face abaxial (ALBA et al., 2014). Seu cultivo é encontrado em numerosos países dos diversos continentes (COUTINHO et al., 2015; ALBA et al., 2014), sendo que no Brasil, a oliveira foi introduzida no século XX (OLIVEIRA et al., 2010). Em 2019, a produção mundial alcançou 19.464.495 toneladas em área colhida de 10.578.246 hectares. Os maiores produtores foram Espanha, Itália, Marrocos, Turquia e Grécia. Os países do continente europeu contribuíram com 54,2% da produção total, os países africanos com 25,1%, os asiáticos com 15,9%, os americanos com 4,4%, e aqueles da Oceania, com 0,4%. No Brasil, a área total colhida, em 2019, foi de 1.418 hectares com produção de 2.505 toneladas (FAO, 2020).

No Brasil, os cultivos comerciais de oliveira estão concentrados nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo e Santa Catarina. Nesses estados está havendo um crescente interesse pela cultura e os atuais cultivos se encontram em fase de produção, beneficiamento de azeitonas e embalagem de azeite (COUTINHO et al., 2015). A obtenção de rentabilidade satisfatória aliada à qualidade que atenda aos padrões internacionais depende de fatores como escolha da cultivar e de condições ambientais favoráveis à cultura, tais como temperatura, pluviosidade, umidade relativa e propriedades edáficas (ALBA et al., 2014).

A escolha da cultivar leva em consideração a finalidade do produto final, se para o consumo *in natura* destinado à mesa, para a indústria visando a produção de azeite ou ambos. As características das cultivares mais plantadas nas condições brasileiras são especificadas a seguir (CAPPELLARO et al., 2009). A cultivar Arbequina, destinada para à produção de azeite, é originária da Espanha, apresenta elevada produtividade, produção precoce, resistência ao frio e azeite de excelente qualidade, porém de baixa estabilidade. A cultivar Koreneiki, proveniente da Grécia, é destinada à extração de azeite, apresenta produção constante, tem alta produtividade, suscetibilidade ao frio, resistência à seca e seu fruto tem elevado teor de azeite, apresentando alta quantidade de ácido oleico e boa estabilidade. A cultivar espanhola denominada Arbosana é usada para a produção de azeite, tem produção elevada, pouca alternância de produção, tolerância ao frio, vigor médio e seu azeite tem baixo teor de ácido

linoleico. A cultivar Grappolo originária da Itália é empregada na obtenção de azeite, apresenta produtividade alta e constante, excelente rendimento, capacidade de adaptação a diferentes condições de clima e solo, maturação tardia, frutos assimétricos, alongados e de tamanho médio que geram um azeite com teor médio a elevado de ácido graxo, estável, frutado, com notas amargas e sabor picante.

Os solos que apresentam melhores propriedades para o desenvolvimento da planta são aqueles de textura média, com adequada capacidade de retenção de umidade e boa permeabilidade, conhecidos como solos francos, franco-argilosos e franco-arenosos. A espessura do horizonte A deve ser superior a 50 cm, não apresentando teores de alumínio, com lençol freático elevado, e com pH variável de 6,0 em direção à neutralidade (FLÔRES & ALBA, 2013; BERTONCINI, 2012). O preparo do solo deve ser profundo e a calagem feita em área total, respeitando a exigência da cultura (BERTONCINI, 2012). O espaçamento recomendado é de 4 m entre plantas e 6 m entre fileiras. As covas devem ser dimensionadas para 60 cm de comprimento, 60 cm de largura e 50 cm de profundidade. A adubação, baseada na análise de solo feita a cada ano, deve prover níveis adequados de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e dos micronutrientes cobre, zinco e boro, sendo esse último muito exigido pela cultura (NETO et al., 2008).

A umidade relativa tem papel relevante e deve permanecer entre 60-80% (WREGE et al., 2009). Valores abaixo destes níveis inviabilizam o estigma e comprometem a formação e fixação do fruto. Danos também podem ocorrer quando a UR está próxima de 100%, pois o grão de pólen se hidrata excessivamente e aumenta seu peso, podendo ser destruído e dificultando seu transporte pelo vento. A planta necessita de 650-800 mm de água por ano, com chuvas regulares. Chuvas frequentes na primavera no período do florescimento reduzem a frutificação por lavarem o grão de pólen do estigma. Chuvas intensas interferem nas fases de pré e de maturação dos frutos, pois os mesmos ficam com excesso de água, o que interfere no processo de extração do azeite (ALBA et al., 2014).

A temperatura favorável à frutificação está entre 25°C e 35°C. A oliveira resiste a temperaturas em torno de 40°C no verão sem sofrer queimaduras nos ramos e folhas; no entanto, temperaturas acima de 35°C afetam negativamente sua atividade fotossintética (WREGE & COUTINHO, 2013). A planta suporta temperaturas pouco inferiores a 0°C e, no outono, temperaturas baixas são responsáveis por estimular a dormência através de um processo gradual de tolerância ao frio. Temperaturas variáveis de 0°C a -5°C podem causar lesões nos ramos novos e brotos. Temperaturas em torno de -10°C provocam severos e definitivos danos nos

ramos e brotos e a ocorrência de temperaturas abaixo desse valor, promove danos irreversíveis, levando a planta à morte (NAVARRO & PARRA, 2008).

A propagação vegetativa é indicada para a formação de plantios comerciais, por manter as características genéticas das plantas matrizes. O método de propagação mais utilizado para a formação de mudas é a estaquia. O êxito da estaquia depende muito da capacidade de emissão de raízes pela estaca, da viabilidade do sistema radicular emitido e do posterior desenvolvimento da planta. A enxertia é um método que pode ser adotado, se a estaca apresentar dificuldades para o enraizamento ou quando é desejável substituir alguma cultivar (RIBEIRO et al., 2009). A poda deve ser feita para equilibrar o crescimento e a frutificação. A época ideal compreende o fim do inverno e começo da primavera. A poda deve ser feita visando renovar árvores improdutivas e envelhecidas, promover arejamento da copa da planta, e eliminar ramos doentes, malformados e secos (NETO et al., 2008; COUTINHO et al., 2009).

O período de floração ocorre nos meses de setembro a novembro, na estação da primavera. O florescimento compreende um período de pré-florescimento, florescimento pleno, época de polinização e fase de frutificação efetiva. O período inicial tem lugar quando ocorrem temperaturas médias de 15°C, porém os processos subsequentes se desenvolvem melhor em temperaturas médias mais elevadas, em torno de 22°C; períodos mais quentes são necessários para a maturação dos frutos (WREGGE & COUTINHO, 2013). A colheita é realizada após o quarto ano de plantio da muda, no estágio em que os frutos atingirem desenvolvimento completo (NETO et al., 2008; COUTINHO et al., 2009). Quando a destinação for produção de azeite, os frutos devem ser colhidos maduros, apresentando coloração arroxeadada, verde-palha ou preta; para consumo de mesa, as azeitonas devem ser colhidas quando estiverem com coloração verde-palha, ou seja, quando ainda não atingiram maturação total (NETO et al., 2008).

### 2.1.2 Fitoplasmas

Fitoplasmas são procariotos sem parede celular, parasitas intracelulares obrigatórios, habitantes de floema, transmitidos por insetos vetores do tipo cigarrinhas, e estão associados com numerosas doenças que ocorrem em numerosas espécies vegetais (BERTACCINI et al., 2014). Esses patógenos evoluíram por meio de processos degenerativos, nos quais genes essenciais à vida foram mantidos, porém sequências genômicas significativas foram perdidas (BROWN et al., 2007). A interação do fitoplasma com o inseto vetor tem início quando esse se

alimenta em uma planta infectada. O fitoplasma é adquirido pelo estilete do inseto durante sua alimentação no floema, atravessa a parede intestinal, circula na hemolinfa, se multiplica em diversos tecidos, sendo um deles as glândulas salivares. As células do fitoplasma são, então, incorporadas à saliva e depositadas no floema de uma planta sadia, promovendo, assim, a transmissão do patógeno (TSAI, 1979; SEEMULLER et al., 2002).

A classificação taxonômica dessas bactérias tem sido feita com base na diversidade genética do gene 16S rRNA, o qual é o marcador molecular mais utilizado nos estudos desses microrganismos. A técnica de PCR-RFLP e a análise filogenética são empregadas para a caracterização molecular dos fitoplasmas, visando sua classificação em espécies putativas, grupos e subgrupos (LEE et al., 2000; LEE et al., 2004; WEI et al., 2007).

A interação do hospedeiro com o fitoplasma leva à ocorrência de desequilíbrio hormonal da planta e a doença resultante é referida como “doença auxônica”, por provocar alterações hormonais (PERTOT et al., 1984; CHANG, 1998; LEPKA et al., 1999). Os variados sintomas observados nas plantas infectadas são decorrentes da diminuição na translocação de carboidratos e aminoácidos, alteração no equilíbrio hormonal, inibição da fotossíntese e senescência rápida (CHANG, 1998; LEPKA et al. 1999). O comprometimento do floema é o maior efeito das infecções por fitoplasmas, uma vez que esses patógenos sobrevivem e se multiplicam nesse tipo de vaso condutor. Como resultado dessa interferência, é observado acúmulo de quantidades anormais de carboidratos em folhas fontes e redução em folhas dreno, devido à inibição no transporte de seiva elaborada (GUTHRIE et al., 2001; MAUST et al., 2003). Alterações também foram constatadas nos processos de fotossíntese, condutância estomática, respiração radicular, metabolismo secundário e equilíbrio hormonal (LEPKA et al., 1999; CHOI et al., 2004). Em plantas infectadas ocorre declínio da fotossíntese em razão do fitoplasma induzir perda na cadeia fotossintética, comprometendo principalmente o fotossistema II (MUSETTI, 2010). O transporte de aminoácidos também é alterado, resultando no acúmulo dessa substância, devido às perturbações no transporte de seiva; como consequência, ocorre redução no desenvolvimento da planta (LEPKA et al., 1999). O teor de compostos fenólicos pode ser alterado, comprometendo o processo de produção de proteínas de defesa pelo hospedeiro (MUSETTI & FAVALI, 2003; MUSETTI et al., 2005). Entre essas proteínas relacionadas com a patogênese (proteínas PR) podem ser destacadas as peroxidases, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (MUSETTI, 2010). As mudanças bioquímicas são responsáveis pela indução dos sintomas, os quais podem se manifestar isoladamente ou em conjunto, sendo caracterizados por clorose (amarelecimento foliar), enfezamento, superbrotamento de ramos (vassoura-de-bruxa), necrose de vasos de floema, encurtamento de entrenós, filodia,

anormalidades florais, virescência, avermelhamento foliar, redução e deformações foliares, queda de folhas, frutos pequenos, declínio e morte (LEE et al., 2000). Plantas infectadas podem ser assintomáticas ou apresentarem remissão temporária ou permanente dos sintomas, no entanto são casos raros (MARCONE, 2010).

O manejo das doenças causadas por fitoplasmas compreendem uma diversidade de medidas de controle (BEDENDO, 2018). As medidas quarentenárias podem ser aplicadas no sentido amplo, evitando a entrada de fitoplasmas em áreas livres do mesmo, ou no sentido restrito, utilizando material de propagação vegetativa de alta qualidade fitossanitária. O uso de genótipos resistentes é fortemente preconizado e, quando disponíveis, é a medida mais eficiente de controle. A erradicação de plantas infectadas pode ser utilizada em espécies perenes e culturas instaladas em pequenas áreas. O tratamento químico do hospedeiro com antibiótico do tipo tetraciclina pode promover o controle temporário da doença, porém é uma alternativa que implica em várias restrições. A aplicação de produtos químicos, visando o controle dos insetos vetores, é indicada para restringir a disseminação e transmissão do patógeno, sendo mais eficiente quando utilizada nos estádios iniciais de desenvolvimento da cultura.

### 2.1.3 Superbrotamento dos ramos da oliveira

O superbrotamento de ramos da oliveira foi relatada primeiramente na Itália, em 1996, e o fitoplasma detectado nas plantas infectadas foi classificado como pertencente ao grupo 16SrV (POLLINI et al., 1996). Em 1997, a doença foi reportada na Espanha e o fitoplasma classificado como um representante do grupo 16SrXII (FONT et al., 1998). Em 2010, o superbrotamento foi encontrado no Iran, e o fitoplasma detectado foi afiliado ao grupo 16SrI. Nas plantas infectadas pelo fitoplasma em pomares da Itália, a sintomatologia foi caracterizada por superbrotamento de ramos, amarelecimento, malformação e queda de folhas (POLLINI et al., 1996). Na Espanha, foram observados, além de superbrotamento, a presença de brotos mal formados e encurtamento de entrenós (FONT et al., 1998). No Iran, as plantas exibiam proliferação de brotos, folhas de tamanho reduzido, entrenós curtos, e declínio da planta (RASHIDI et al., 2010). No Brasil o primeiro relato da doença foi feito no ano de 2017 (FERREIRA, 2017), em uma propriedade comercial situada no Sul do Estado de Minas Gerais. O quadro sintomatológico mostrava desenvolvimento lento das plantas, amarelecimento, queda de folhas e brotação de ramos com folhas de tamanho reduzido. Interessante assinalar que quando as plantas sintomáticas recebiam nutrição mineral adicional àquela normalmente realizada apresentavam recuperação temporária, no entanto após um período curto de tempo os



sintomas voltavam a aparecer. O fitoplasma detectado nas plantas doentes foi molecularmente caracterizado e identificado como representante do sugrupo 16SrVII-B (FERREIRA, 2017; FERREIRA et al., 2021).

#### 2.1.4 A enxertia no estudo de doenças causadas por fitoplasmas

A enxertia é uma técnica que tem como princípio a união de duas partes de plantas distintas que se desenvolvem como uma única planta (RIBEIRO et al., 2005). As partes usadas na enxertia são denominadas de cavalo ou porta-enxerto e cavaleiro ou enxerto. O porta-enxerto, por meio da emissão de raízes, tem por função dar suporte físico e absorver água e nutrientes, enquanto o enxerto desenvolve a parte aérea ou copa da planta que se deseja reproduzir. Essa técnica deve ser feita utilizando espécies botânicas morfológica e fisiologicamente semelhantes, pertencentes à mesma família e gênero. Os métodos básicos de enxertia são a garfagem e a borbúlia e dentro destes métodos podem ser usados os tipos conhecidos por inglês simples e o “T” invertido, respectivamente. A enxertia é empregada para diversas finalidades, tais como viabilidade de cultivo de espécies suscetíveis a numerosas doenças, restauração de pomares em declínio, eliminação de segregações indesejáveis, propagação de cultivares nobres, obtenção de materiais de produção precoce e de porte reduzido, e indexação biológica para fins de diagnose de doenças (RIBEIRO et al., 2005).

#### 2.1.5 Alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas doentes

Quando o patógeno invade os tecidos do hospedeiro, alterações fisiológicas e bioquímicas são iniciadas por meio da ativação ou inativação de atividades realizadas pelas células. Essas mudanças podem ocorrer na estrutura e função celular, nas relações hídricas e nutricionais, na atividade de enzimas, nos processos de fotossíntese e respiração, e na produção e equilíbrio dos hormônios vegetais (DALIO & PASCHOLATI, 2018). A estrutura celular quando invadida, ativa mecanismos de defesa com o objetivo de impedir o ataque do patógeno. A planta apresenta naturalmente mecanismos de defesa estruturais (pré e pós-formados) e bioquímicos (pré e pós-formados). Os estruturais atuam como barreiras físicas à penetração e colonização do patógeno e os bioquímicos são representados por compostos que têm a capacidade de inibir o desenvolvimento do agente patogênico (PASCHOLATI & DALIO, 2018). A formação de caloses e papilas, a morte da célula criando um ambiente desfavorável, e a lignificação da parede celular dificultando o avanço do patógeno são eventos dos mecanismos de natureza estrutural da planta (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Os produtos resultantes do metabolismo secundário vegetal constituem as barreiras químicas. Entre as

barreiras químicas pré-formadas estão os alcalóides glicosídicos, glicosídeos cianogênicos, lactonas insaturadas, fenóis, fototoxinas e quitinases. As proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) e as fitoalexinas, compostos que também fazem parte dos mecanismos de defesa, são formados após a infecção (PASCHOLATI & LEITE, 1994).

#### 2.1.6 O PCR em tempo real

Existem numerosos relatos sobre a diversidade na concentração de fitoplasmas nos tecidos de plantas hospedeiras. Geralmente, hospedeiros herbáceos apresentam alta concentração do fitoplasma nos tecidos vegetais, enquanto em hospedeiros lenhosos a concentração é relativamente baixa, o que dificulta a detecção desse tipo de patógeno (BERGES et al., 2000). A maior sensibilidade na detecção e a possibilidade de quantificação do título do fitoplasma nos tecidos colonizados têm sido fornecidas pelo uso da técnica molecular de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR), a qual tem se mostrado eficiente e confiável. A técnica permite o monitoramento dos fragmentos genômicos alvos amplificados durante cada ciclo de reação, revelando não somente a presença do patógeno, mas também a sua concentração em tempo real (GALETTO & MARZACHI, 2010).

## 2.2 Material e métodos

### 2.2.1 Teste de patogenicidade

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da ESALQ/ USP em Piracicaba, São Paulo (22°42'30" S e 47°38'30" W e altitude de 546 m). Seguindo a classificação de Koppen a região apresenta inverno frio e seco e verão quente e úmido, tendo assim duas estações muito bem definidas e classificadas como Cwa. A temperatura do mês mais quente do ano é em média 22°C e do mais frio é em média 18°C. E tem 1.230mm de precipitação anual (SENTELHAS, 1998).

Mudas das cultivares Arbequina, Arbosana, Koroneiki e Grappolo, com 18 meses de idade, adquiridas de viveiro comercial localizado no Estado de Minas Gerais, foram utilizadas como porta-enxerto no teste de patogenicidade. Previamente à enxertia foram submetidas ao teste 'nested' PCR para certificação da ausência de fitoplasmas. Como enxertos, foram utilizados: i) ramos de, aproximadamente, dois cm de diâmetro, coletados de planta da cultivar Arbequina, com oito anos de idade, naturalmente infectada e comprovadamente portadora de um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrVII-B (FERREIRA et al., 2021); ii) ramos de, aproximadamente, dois cm de diâmetro, obtidos de planta da cultivar Arbequina, crescida no campo e comprovadamente livre de fitoplasma. Na enxertia, um corte em bisel foi feito no porta-enxerto e enxerto, os ramos ligados um ao outro e amarrados com fita plástica transparente, até pegamento do enxerto. Após o amarrão, para manutenção da umidade, um saco plástico transparente foi colocado envolvendo os ramos enxertados, sendo mantido até o pegamento dos ramos. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e as avaliações foram feitas periodicamente, por meio de observação de sintomas e detecção do patógeno por reações de 'nested' PCR.

O ensaio foi composto por dois tratamentos: enxertia de ramo infectado sobre porta-enxerto livre de fitoplasma (T1) e ramo livre de fitoplasma enxertado sobre porta-enxerto livre de fitoplasma (T2). Os tratamentos foram conduzidos com quatro repetições, onde cada combinação porta-enxerto/enxerto representou uma repetição. O controle (T3) foi representado por quatro mudas das mesmas cultivares usadas como porta-enxertos, livres de fitoplasma, sem receber enxerto. Assim, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos, um controle e quatro repetições.

### 2.2.2 Extração de DNA total

A extração do DNA total das amostras de oliveira foi feita com o uso do conjunto de extração de DNA de plantas DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. O material vegetal congelado a - 20°C (1g aproximadamente) foi macerado em nitrogênio líquido com o auxílio de cadinho e pistilo de porcelana. Adicionou-se 400 µL da solução tampão AP1 e 4 µL de RNase A. A suspensão contida em microtubos foi homogeneizada em agitador do tipo 'vortex' e incubada por 10 minutos a 65°C, sendo os tubos invertidos a cada 3 minutos durante a incubação. Um volume de 130 µL do tampão P3 foi adicionado e a suspensão foi incubada durante 5 minutos no gelo e, em seguida, centrifugada por 5 minutos a 14.000 rpm (20.000 x g). O sobrenadante foi transferido para coluna de purificação e centrifugado por 2 minutos a 14.000 rpm. A suspensão resultante foi transferida para novo tubo sem destruir o precipitado, sendo, em seguida, adicionados 1.5 µL do tampão AW1 e realizada a mistura por pipetagem. Um volume de 650 µL da mistura foi transferida para coluna de purificação e centrifugada por 1 minuto a 8.000 rpm, sendo o filtrado descartado. Esta etapa foi repetida com o restante da mistura contida no tubo. A coluna foi colocada em um tubo de 2 ml, sendo adicionados 500 µL do tampão AW2. Uma centrifugação foi feita durante 1 minuto a 8.000 rpm e o que passou pela coluna foi descartado. Essa etapa foi repetida e centrifugada por 2 minutos a 14.000 rpm. A coluna foi removida e colocada em um novo tubo de 1.5 ml, onde foram adicionados 100 µL do tampão AE. Uma etapa de incubação foi realizada por 5 minutos em temperatura ambiente (15 - 25°C). Nova centrifugação foi feita por 1 minuto a 8.000 rpm e o DNA extraído foi armazenado - 20°C.

### 2.2.3 Análise de 'nested' PCR

Na primeira reação de PCR foi utilizado o par de iniciadores ('primers') P1/16S-SR (DENG & HIRUKI, 1991; LEE et al., 2004) e na segunda reação, o par R16F2n/R2 (GUNDERSEN & LEE, 1996). O produto da primeira reação, representado por fragmentos de DNA de 1.55 Kb, foi usado como molde para a segunda reação, a qual gera sequências nucleotídicas de 1.25 Kb, correspondente à região do gene 16S rDNA. As duas reações de PCR foram processadas, isoladamente, em um volume final de 25 µL, contendo 1 µL do extrato do DNA; 0,6 µL de cada um dos 'primers'; 5 µL do tampão 10X; 4 µL de Mg; 2 µL de DNTP; 0,16 µL de Taq polimerase e 11,64 µL de água.

Na reação com o par P1/16S-SR, o termociclador foi programado para: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94° C por 1 minuto; 38 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto; hibridização a 55° C por 2 minutos; extensão a 72° C por 3 minutos e um ciclo de extensão final a 72° C por 7 minutos. Na reação com o par R16F2n/R2 o termociclador foi programado para: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto; hibridização a 50° C por 2 minutos; extensão a 72° C por 3 minutos e 1 ciclo de extensão final a 72° C por 7 minutos. Os produtos obtidos nas reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo o corante Sybr safe® 1% (Promega), marcador molecular 1Kb DNA ladder (life Technologies), usando tampão 1 X TAE. O DNA gerado foi submetido à corrente elétrica por 60 minutos a 65 volts, sendo a visualização dos fragmentos amplificados realizada em transiluminador de luz ultravioleta. Como padrão positivo para as reações de PCR foi utilizado o DNA extraído de plantas de *Solidago microglossa* infectadas por fitoplasma, enquanto o padrão negativo foi representado por DNA de planta de oliveira sadia.

Sequências dos iniciadores utilizados:

P1 - 5' AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T 3' (DENG & HIRUKI, 1991).

16S-SR - 5' GGT CTG TCA AAA CTG AAG ATG 3' (LEE et al., 2004).

R16 F2n - 5' GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG 3' (GUNDERSEN & LEE, 1996).

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

#### 2.2.4 Purificação do produto de PCR

A purificação foi feita usando o conjunto PureLink® PCR purification Kit (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Um volume de 400 µL do reagente Binding Buffer B2 foi adicionado para 100 µL do produto de PCR. A mistura foi depositada em uma coluna acoplada a um tubo coletor e centrifugada a 12000 rpm por um minuto, sendo o filtrado descartado. Em seguida, 650 µL do reagente Wash Buffer W1 foram adicionados ao material retido na coluna, sendo processada uma etapa de centrifugação a 12000 rpm por um minuto; novamente o filtrado foi descartado. Nova centrifugação foi conduzida à 12000 rpm por 3 minutos. Em seguida, 50 µL do reagente Elution Buffer foram depositados no centro da coluna e a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 1 minuto. Após centrifugação por 2 minutos a 14000 rpm, o DNA eluído foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop 1000 Thermo Scientific, Wilmington, USA) e em seguida armazenado a -20°C.

### 2.2.5 Clonagem

Produtos gerados no PCR (100 ng/ $\mu$ L) foram clonados em *Escherichia coli* estirpe DH5 $\alpha$ . Para a clonagem, foi permitido um período de ligação de 12 horas. A ligação foi feita em um tubo de 1,5 ml contendo 5  $\mu$ L de tampão, 3  $\mu$ L de DNA, 1  $\mu$ L de PGEM (pGEM®-T Easy Vector System I) (Promega) e 1  $\mu$ L da enzima T4 ligase. A mistura foi armazenada em refrigerador por 12 horas e, em seguida, mantida a 20°C negativos. Para a reação de transformação, foram colocados 2  $\mu$ L da ligação em 50  $\mu$ L de células competentes (MAX Efficiency® DH5 $\alpha$ ™ Competent Cells) (Promega) em um tubo de 1,5 ml. Posteriormente, a suspensão foi resfriada em gelo por 30 minutos, passou por um choque térmico a 42°C por 50 segundos e, novamente, foi resfriada em gelo por 2 minutos.

Um volume de 300  $\mu$ L do meio SOC (S.O.C. Medium - Invitrogen) (HANAHAN, 1983), foi depositado nos tubos contendo as células transformadas, sendo a mistura mantida em agitador por 2 horas a 200 rpm, à temperatura de 37°C. Em seguida, 80  $\mu$ L da suspensão foi plaqueada em meio LB sólido (BERTANI, 1951; LURIA & BURROUS, 1957). Ao meio LB foram acrescentados 40  $\mu$ L do antibiótico ampicilina (100 mg. mL<sup>-1</sup>), 80  $\mu$ L de XGAL, na concentração de 50 ng/ml, e 18  $\mu$ L de IPTG, na concentração de 50 mg/ml, para um volume de 40 ml de meio, antes das células serem plaqueadas. Os reagentes XGAL e IPTG foram acrescentados para avaliação da atividade da  $\beta$ -galactosidase das bactérias transformadas, diferenciando-as daquelas não transformadas, pelo aparecimento de colônias bacterianas de coloração branca ou azul. As placas nas quais foram plaqueadas as células foram mantidas por 12 horas a 37°C. Após o período de incubação, as placas foram colocadas em refrigerador. As colônias transformadas foram transferidas para tubos contendo o meio LB líquido, os quais foram mantidos em agitador a 200 rpm por 12 horas, a temperatura de 37°C para desenvolvimento das células bacterianas. Três clones de cada amostra foram colocados para crescer no meio LB líquido.

Para a extração do DNA plasmidial foi utilizado o conjunto de reagentes Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Um volume de 1,5 ml do meio LB líquido, contendo as células que cresceram durante as 12 horas, foi centrifugado por 3 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 250  $\mu$ L de CRS e 10  $\mu$ L de APS, sendo a mistura incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Uma alíquota de 350  $\mu$ L de NS foi acrescentada e a mistura

foi centrifugada por 10 minutos a 14000 rpm, à temperatura ambiente. A suspensão foi depositada em uma coluna e centrifugada a 14000 rpm por 1 minuto, à temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e um volume de 750 µL de WS foi adicionado à coluna e centrifugado por 1 minuto a 14000 rpm. O filtrado foi novamente descartado e, após a adição de 250 µL de WS, a suspensão foi centrifugada por 2 minutos a 14000 rpm. O DNA foi eluído em 100 µL de NFW, centrifugado por 1 minuto a 14000 rpm e armazenado a 20°C negativos. Para detectar a presença do fragmento pertencente ao fitoplasma no vetor, foi feito um ensaio de PCR utilizando o par de primer R16F2n/ R2. Após a confirmação da presença do fragmento genômico, o plasmídeo foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop 1000 Thermo Scientific, Wilmington, USA).

### 2.2.6 Sequenciamento dos fragmentos genômicos clonados

Os fragmentos genômicos do 16S rDNA, na concentração de 100ng/µL, foram enviados para sequenciamento na empresa Macrogen (Maryland, Estados Unidos). Três isolados (três clones para cada isolado) foram sequenciados e as sequências foram montadas em contigs, de acordo com o programa Electropherogram quality analysis da Embrapa, editadas e alinhadas por meio do programa BIOEDIT. Os fragmentos genômicos sequenciados foram analisados pela ferramenta molecular interativa denominada *iPhyClassifier* (ZHAO et al., 2009).

### 2.2.7 Quantificação do fitoplasma nos tecidos das plantas de oliveira por qPCR

Com o objetivo de quantificar a concentração do fitoplasma nos tecidos das quatro diferentes cultivares de oliveira foi feito o ensaio de PCR em tempo real. Para isso o DNA total extraído das plantas foi padronizado para a concentração de 50ng/µL em espectrofotômetro (Nanodrop 1000 Thermo Scientific, Wilmington, USA). As reações de qPCR foram conduzidas em duplicata em microplacas (MicroAmp® fast optical 96-well reaction plate with barcode (0.1 mL)), em um termociclador 7500 FAST (Applied Biosystems). Para o preparo das reações, foram utilizados os reagentes componentes do conjunto Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Os iniciadores utilizados na reação foram UniRNA Forward / UniRNA Reverse (HREN et al., 2007). Cada reação foi preparada com 2 µL de DNA; 12,5 µL de Supermix (1X); 0,5 µL de cada iniciador

(concentração de 10 pmol.  $\mu\text{L}^{-1}$ ); 0,5  $\mu\text{L}$  de ROX e 9  $\mu\text{L}$  de água miliQ autoclavada, perfazendo um volume final de 25  $\mu\text{L}$ .

As condições para amplificação compreenderam: 10 minutos à 95°C, seguido de 45 ciclos de 15 segundos à 95°C e 1 minuto à 60°C. Os controles negativos foram representados pelo DNA extraído de planta sadia de oliveira e água. Para relacionar os valores de Ct (Threshold cycle) das reações de qPCR com concentrações diferentes do DNA puro do fitoplasma, uma curva padrão de diluição de DNA foi preparada. A concentração de DNA de fitoplasma nas amostras foliares das quatro cultivares de plantas de oliveira foram estimadas com base nesta curva padrão. As concentrações de DNA do fitoplasma usadas para a construção da curva padrão foram: 10 ng; 1ng; 0,1ng; 0,01ng; 0,001ng. Pela determinação da curva padrão, os valores de Ct foram transformados primeiramente para número de cópias de fitoplasma por 100ng de DNA total usando a fórmula: Número de cópias de Fitoplasma/100ng de DNA total = [concentração de DNA do plasmídeo (g/  $\mu\text{L}$ )] / [(tamanho do clone em pb x peso médio de 1 pb DNA) x unidade de massa atômica (g/u)]. O tamanho do clone é: o peso molecular do vetor + o inserto. O peso médio de 1pb de DNA corresponde a 649. A massa atômica por unidade é  $1,6605 \times 10^{-24}$  g/u (BARIC et al., 2011; APPLIED BIOSYSTEMS, 2009). Para a análise estatística, cada cultivar foi considerada como um tratamento, resultando em quatro tratamentos, cada um com quatro repetições. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). Os dados obtidos foram analisados pelo teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). O software estatístico utilizado foi o R (versão 3.4.3) (R CORE TEAM, 2017).

A seguir encontram-se descritas as sequências dos ‘primers’ utilizados:

UniRNA - Forward 5' AAA TAT AGT GGA GGT TAT CAG GGA TAC AG 3' (HREN et al., 2007).

UniRNA - Reverse 5' AAC CTA ACA TCT CAC GAC ACG AAC T 3' (HREN et al., 2007).

#### 2.2.8 Análises bioquímicas

Para avaliar as alterações bioquímicas, foram coletadas folhas completamente desenvolvidas, de mesma idade fisiológica e presentes no terço inferior das plantas. Imediatamente após a coleta, as amostras foram embaladas em filme de alumínio e imersas em nitrogênio líquido, até serem armazenadas definitivamente a - 4°C. As amostras usadas na



determinação do conteúdo de clorofila não foram submetidas aos processos de congelamento, pois a análise foi processada no mesmo dia da coleta. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com dois tratamentos, um controle, e 4 repetições. Os dados obtidos foram analisados usando o teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). O software estatístico utilizado foi o R (versão 3.4.3) (R CORE TEAM 2017).

#### 2.2.9 Clorofila total

Tecido foliar (1g) foi macerado em nitrogênio líquido contido em almofariz gelado ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) até a obtenção de um pó fino. Ao macerado 10 mL de acetona 80% a  $4^{\circ}\text{C}$  foram adicionados. A suspensão foi homogeneizada, transferida para tubos de centrifuga de 15 mL, e processada a centrifugação a  $3.000\text{g}/5$  minutos, à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o precipitado foi descartado. As amostras foram mantidas no escuro até a leitura. A leitura da absorbância foi determinada nos comprimentos de onda de 645, 663 e 710nm em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1900. O conteúdo de clorofila total foi expresso em mg de clorofila/g de tecido fresco (MACKINNEY, 1941).

#### 2.2.10 Açúcares redutores

Amostra de tecido foliar (1g) foi macerado usando nitrogênio líquido e PVP em almofariz, até a obtenção de um pó fino. Adicionou-se ao macerado 3 mL de tampão fosfato de sódio 0,01M (pH6,0) e a suspensão obtida foi transferida para tubo e centrifugada a  $20.000\text{g}/25$  minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante ( $500\ \mu\text{L}$ ) foi coletado e o precipitado foi descartado. Ao sobrenadante foram adicionados 1,5 mL de PAHBAH (hidrazida do ácido p-hydroxibenzóico) (a solução de PAHBAH foi preparada dissolvendo 1g do reagente em 20ml de HCL a 0,5 M e 80 mL de NaOH a 0,5M) e essa solução foi aquecida em banho-maria à  $100^{\circ}\text{C}/5$  minutos. Após o resfriamento, a leitura de absorbância foi feita a 410nm em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1900. Os valores obtidos na leitura foram expressos em mg de glicose/g tecido fresco. Para a construção da curva padrão foi utilizado o carboidrato glicose (LEVER, 1972).

#### 2.2.11 Fenóis livres e ligados

Amostra de tecido foliar (1g) foi macerada em nitrogênio líquido contido em almofariz até a obtenção de um pó fino. O macerado foi transferido para tubo de ensaio, onde foram adicionados 4 mL de metanol 50%. A suspensão resultante foi incubada por 1,5 horas a  $80^{\circ}\text{C}$ . Após ser resfriada em temperatura ambiente, a suspensão foi centrifugada a  $20.000\ \text{g}/15$  minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi utilizado para avaliar o conteúdo de fenóis livres, por meio

da reação de Folin-Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI, 1965). Para isto, foi preparada uma solução de 3 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2%) em 150 µL do extrato, à qual foram adicionados 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 20 minutos foi feita a leitura. Para ser utilizado o referido reagente foi diluído em água 1:1 (v:v). A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1900, no comprimento de onda de 750 nm. A cubeta de referência (branco) foi preparada com 150 µL de metanol 50%, 3 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2%) e 150 µL de reagente Folin-Ciocalteu.

A quantificação dos fenóis ligados (KOFALVI & NASSUTH, 1995) foi feita a partir do precipitado gerado no processo de obtenção do extrato de fenóis livres. Ao precipitado foram adicionados 2 mL de NaOH 0,5 M para saponificação dos fenóis ligados à parede. Essa reação foi neutralizada com a adição de 9,5 mL de HCL 2M, após 24 horas, e centrifugada a 20.000g/15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi usado para a quantificação dos fenóis ligados pela reação de Folin-Ciocalteu, descrita para os fenóis livres. A cubeta de referência (branco) foi preparada com 150 µL da solução de 2 mL de NaOH 0,5 M; 9,5 mL de HCl 2M; 3 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2%) e 150 µL de reagente Folin-Ciocalteu. Uma curva padrão de ácido clorogênico (0 – 250 µg) foi feita, sendo a equação da curva calculada com os valores obtidos. O conteúdo de fenóis foi expresso em equivalentes de miligrama de ácido clorogênico por grama de tecido fresco<sup>-1</sup> (BRAY & THORPE, 1954).

#### 2.2.12 Proteínas totais

Amostra de tecido foliar (1g) foi depositada em almofariz resfriado, ao qual foram adicionados nitrogênio líquido e polivinilpirrolidona (PVP) 0,5% (peso/volume). O tecido vegetal foi macerado até a obtenção de um pó fino e transferido para tubo de centrifuga. Ao material macerado, foram adicionados 4 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,5), à 4°C. Essa suspensão foi homogeneizada por inversão do tubo. A suspensão foi centrifugada a 15.000g/ 25 min, à 4°C. O extrato protéico (sobrenadante) foi armazenado a -20°C. A quantificação das proteínas totais foi feita pelo método BRADFORD (1976). Foram adicionados em tubo de ensaio 975 µL de tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 6,5); 5 µL do extrato protéico e 200 µL do reagente de BRADFORD (Bio-Rad Protein Assay) concentrado. Depois de 5 minutos a leitura da absorbância foi realizada com o comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1900. A curva padrão usada foi a de Albumina de Soro Bovino (BSA) (0-12 µg mL<sup>-1</sup>). Essa curva foi feita diluindo 0,05g de BSA em 50 mL de água (1000 µg mL<sup>-1</sup>), sendo que a solução resultante foi diluída 40 vezes em água (0,1 mL da

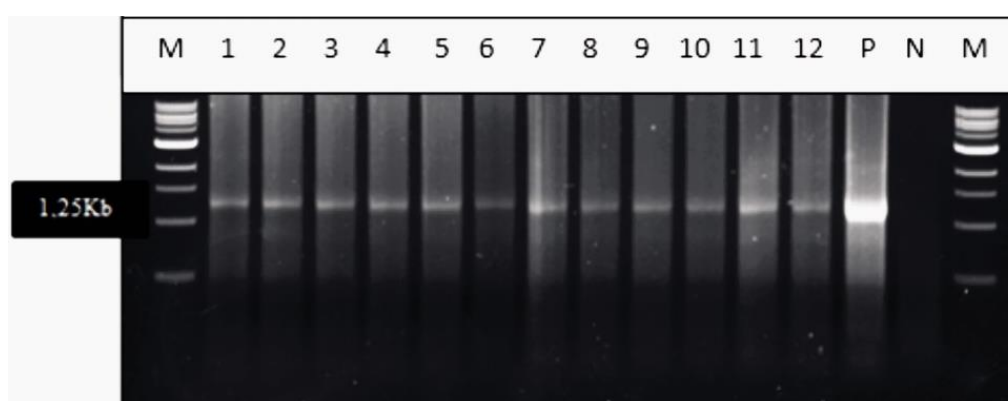
solução em 3,9 mL de água). A concentração de trabalho obtida foi de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em mg de proteínas totais/g de tecido vegetal fresco<sup>-1</sup>.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Teste de patogenicidade

A transmissão do fitoplasma foi revelada em 80% das plantas enxertadas. O patógeno foi detectado nos porta-enxertos de todas as cultivares testadas, ou seja, Arbequina, Arbosana, Grappolo e Koroneiki. A primeira detecção do fitoplasma nos tecidos vegetais ocorreu quatro meses após a enxertia, em plantas da cultivar Arbequina; após oito meses, foi detectado nas plantas das demais cultivares. A transmissão foi confirmada pela amplificação de fragmentos genômicos de 1.25 Kb, gerados nas reações de ‘nested’ PCR (Figura 1). Amplicons de 1.25 Kb também foram gerados para o controle positivo, porém nenhuma amplificação ocorreu para os controles negativos (Figura 1).

Em algumas plantas foi observado que mesmo não havendo o pegamento do enxerto ocorreu a passagem do fitoplasma para o porta-enxerto, evidenciando que o contato de tecido doente e tecido sadio, por um determinado tempo, foi suficiente para a transmissão do patógeno. Nesse caso, a transmissão do fitoplasma foi possível a partir de dois meses se prolongando até 14 meses após a enxertia. A caracterização molecular do fitoplasma detectado nas plantas enxertadas, baseada no sequenciamento de três isolados, mostrou perfeita identidade entre esses isolados e o fitoplasma, agente causal do superbrotamento da oliveira, identificado anteriormente em plantas de oliveira (GenBank MH141985) pertencente ao grupo 16SrVII-B (FERREIRA et.al. 2021; FERREIRA, 2017).



**Figura 1-** Amplificação do 16S rDNA do fitoplasma presente em plantas sintomáticas de oliveira enxertadas, revelada por meio de ‘nested’ PCR com os primers P1/16S-SR seguidos de R16F2n/R2. Coluna: M- marcador molecular 1Kb Lader; Colunas: 01-12 amostras positivas de oliveira; Coluna: P- Controle positivo; Coluna: N- amostra negativa de oliveira.

Sintomas foram observados nas plantas enxertadas ao longo do ensaio. Os primeiros sintomas se expressaram como amarelecimento foliar intenso e redução no tamanho das folhas, quatro meses após a enxertia (Figura 2). Em seguida, foi observado desenvolvimento lento das plantas e redução no crescimento, intensa queda de folhas (Figura 3) e enrolamento de folhas (Figura 4). As novas brotações apresentavam folhas pequenas e internódios curtos (Figura 5), além de proliferação de ramos com folhas de tamanho reduzido, caracterizando o sintoma de vassoura-de-bruxa (Figura 6). Os sintomas descritos foram observados em plantas de todas as cultivares testadas. Os sintomas presentes nas plantas enxertadas foram semelhantes àqueles mostrados pelas plantas sintomáticas encontradas no campo, das quais os enxertos foram coletados. Amarelecimento, vassoura-de-bruxa, redução de internódios e proliferação de brotos são sintomas comumente associados às doenças de etiologia fitoplasmática (MARCONE, 2010).

Assim como neste trabalho, em que foi demonstrada a transmissão do patógeno por enxertia, este mesmo tipo de transmissão foi relatada para diversos patossistemas. No patossistema pereira-fitoplasma do declínio, a transmissão foi evidenciada por enxertia de gemas infectadas, com eficiência de 88% (GARCIA-CHAPA, 2004). Para este patossistema foi reportado também alta eficiência na transmissão, quando gemas portadoras do patógeno retiradas de sete cultivares de pereira foram enxertadas em porta-enxertos de um ano de idade (ERREA et al., 2002). Em macieiras, a parte aérea de plantas enxertadas com material infectado mostrou alta concentração do fitoplasma associado à proliferação de ramos, com o aparecimento de sintomas típicos da doença (SCHAPER & SEEMÜLLER, 1984). A transmissão via enxertia tem propiciado selecionar material resistente a fitoplasmas. Assim, os porta-enxertos de macieira *Malus domestica*, *M. silvestris* e *M. baccata* desenvolveram alta proliferação de ramos e mostraram alta concentração do fitoplasma na parte aérea, enquanto plantas de *M. tschonoskii*, *M. kansuensis* e *M. sargentii* desenvolveram apenas o sintoma de amarelecimento foliar, correlacionado com a baixa concentração do fitoplasma. (KARTTE & SEEMÜLLER, 1991). Em plantas enxertadas de pessegueiro e cerejeira infectadas pelo fitoplasma associado à “doença X” foi observada a ocorrência de sintomas severos correlacionada com a extensa colonização do patógeno na parte aérea das plantas (DOUGLAS, 1986). Também em plantas enxertadas de videira infectadas pelo agente causal da doença “amarelo da videira” foi evidenciada a presença de sintomas severos da doença relacionadas à alta colonização da copa, sendo o patógeno detectado com maior frequência em brotos sintomáticos (CONSTABLE et al., 2003). Assim, a transmissão de fitoplasmas por enxertia,

relatada nos trabalhos referidos, mostra a validade da técnica para fins experimentais, como também demonstra as precauções que devem ser tomadas na produção de mudas propagadas vegetativamente.



**Figura 2:** Folhas de oliveira provenientes de plantas infectadas por fitoplasma apresentando sintomas de amarelecimento e redução da área foliar comparadas com folhas sadias.



**Figura 3:** Planta de oliveira infectada por fitoplasma apresentando intensa queda de folhas (esquerda) e planta sadia (direita).



**Figura 4:** Ramo de oliveira proveniente de planta infectada por fitoplasma apresentando enrolamento foliar comparado com ramo sadio.



**Figura 5:** Brotações de plantas de oliveira infectadas por fitoplasma apresentando redução no tamanho de folhas e internódios.

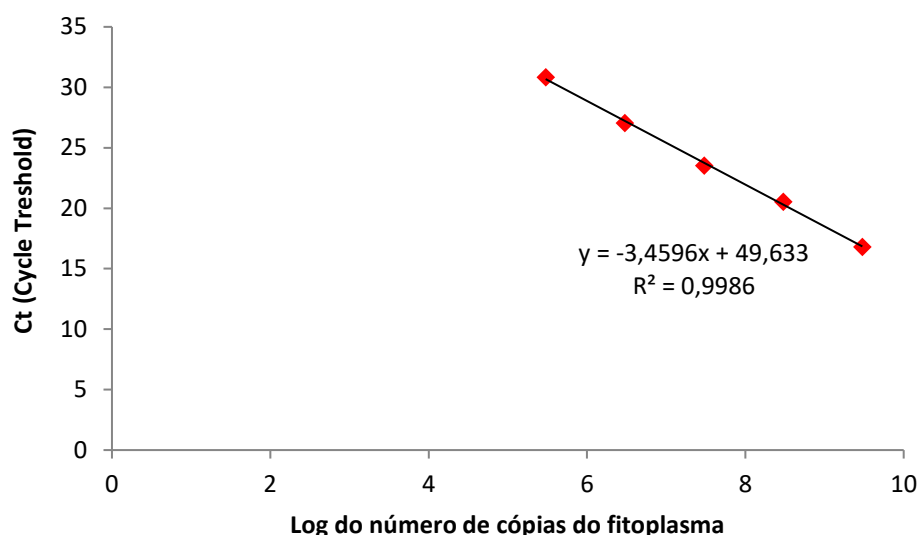


**Figura 6:** Ramos de plantas de oliveira infectadas por fitoplasma exibindo superbrotamento.

### 3.2 Quantificação do fitoplasma nos tecidos das plantas de oliveira por qPCR

Para correlacionar os valores de Ct (Cycle Thershold) obtidos com o título de fitoplasma nos tecidos do hospedeiro utilizou-se a equação  $[\log \text{ do } n^{\circ} \text{ de cópias de fitoplasma}/100\text{ng de DNA} = ((49,633-\text{Ct}) / 3,4596)]$ . Os pontos da curva padrão de quantificação do fitoplasma apresentados em valores de Ct: foram 16, 20, 23, 27, e 31. Esses valores correspondem às concentrações de 10ng, 1ng, 0,1ng, 0,01ng, 0,001ng de DNA do patógeno por reação (Gráfico 1). A determinação do número de cópias de fitoplasma em 100ng de DNA total foi calculada usando a média do Ct das duplicatas.





**Gráfico 1:** Curva padrão da concentração conhecida de DNA de fitoplasma (nº de cópias) correlacionada aos valores de Ct. (Y= Ct da amostra e X= log do número de cópias de fitoplasma/ 100ng de DNA).

Todas as amostras submetidas à análise de qPCR em duplicata apresentaram resultados positivos, exceto as amostras usadas como controle negativo. A análise estatística mostrou que há diferença significativa entre as cultivares quanto à concentração do fitoplasma nos tecidos das plantas (Tabela 1). A cultivar Koroneiki apresentou maior concentração de fitoplasma nos seus tecidos, seguida das cultivares Arbosana, Grappolo e Arbequina, respectivamente, em nº de cópias / 100 ng de DNA total.

**Tabela 1:** Concentração de fitoplasma em tecido foliar de plantas de oliveira enxertadas, pertencentes a diferentes cultivares.

Cultivares	Título de fitoplasma (cópias/100ng de DNA total)
<b>Koroneiki</b>	5 x 10 <sup>7</sup> a
<b>Arbosana</b>	2 x 10 <sup>6</sup> b
<b>Grappolo</b>	6 x 10 <sup>5</sup> c
<b>Arbequina</b>	2 x 10 <sup>4</sup> d

Médias seguidas por letra diferente diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis (P < 0,05).

Apesar de constatada diferença significativa na concentração do fitoplasma nas distintas cultivares, não foi possível observar diferenças quanto à manifestação de sintomas, pois mesmo presente em concentrações variadas, o patógeno induziu sintomas semelhantes. A análise mostrou que a concentração de fitoplasma da ordem de  $2 \times 10^4$  cópias/ng de DNA já foi suficiente para promover a expressão de sintomas pelas plantas. É interessante destacar também que a partir desta concentração de células do patógeno na planta, ocorreram alterações fisiológicas nos tecidos, as quais foram demonstradas pelas análises bioquímicas dos teores de proteínas totais, fenóis livres e ligados, açúcares redutores, e clorofila total (dados mostrados no próximo ítem desta tese).

Os níveis dos títulos do patógeno encontrados nas diferentes cultivares de oliveira estão próximos de níveis relatados para fitoplasmas ocorrentes em outros patossistemas. Em plantas de videira, a concentração do fitoplasma associado à flavescência dourada foi da ordem de  $1,5 \times 10^2$  cópias/ng de DNA da planta (D'AMELIO et al., 2007). Em macieira, a concentração do agente causal da proliferação de ramos alcançou valores de  $7,1 \times 10^6$  cópias/ng de DNA de tecido (BARIC et al., 2011). Em ameixeira, a concentração do fitoplasma associado à doença conhecida por 'amarelo' variou de  $9,7 \times 10^3$  a  $3,0 \times 10^5$  cópias/ng de DNA da planta (MARCONE, 2010). Em pereiras, o fitoplasma do declínio foi encontrado nas concentrações de  $9,7 \times 10^3$  a  $3,0 \times 10^5$  cópias/ng de DNA de tecido (TORRES et al., 2005). Em árvores de damasco, a concentração do fitoplasma do "amarelo" foi de  $2 \times 10^4$  cópias/ng de DNA da planta (D'AMELIO et al., 2007; MARTINI et al., 2007). Além da quantificação da concentração do fitoplasma, agente causal da vassoura-de-bruxa, nos tecidos de plantas de oliveira, a análise conduzida com PCR em tempo real confirmou a transmissão do patógeno, a qual foi inicialmente demonstrada pela análise de 'nested' PCR.

Os resultados do presente trabalho sugerem, com base na concentração do fitoplasma em plantas de oliveira, que a cultivar Arbequina seja a mais tolerante, seguida pelas cultivares Grappolo, Arbosana e Koroneiki. No entanto, a tentativa de ordenação destas cultivares quanto à tolerância à multiplicação do patógeno deve ser considerada com altas restrições, pois o termo tolerância está relacionado não somente com a multiplicação do patógeno e colonização dos tecidos do hospedeiro, mas principalmente com sua relação com a produção da planta. No presente caso, nenhuma pesquisa foi conduzida neste sentido, tornando a tentativa de ordenação aqui referida como tendo carácter especulativo.

Em razão da oliveira ser uma espécie na qual não ocorre autopolinização, o olival deve ser formado obrigatoriamente por diferentes cultivares, pois uma cultivar é polinizada por outra

propiciando a produção de frutos. Assim, o conhecimento da tolerância ou resistência das diversas cultivares à multiplicação do patógeno em seus tecidos pode indicar quais cultivares devem ser escolhidas para compor os pomares. Com isto, a escolha de uma cultivar que desfavoreça a multiplicação do fitoplasma representa uma medida de controle que pode reduzir o impacto da doença na cultura a ser implantada.

### 3.3. Análises bioquímicas

#### 3.3.1. Clorofila total

A análise do conteúdo de clorofila revelou diferença estatística entre os tratamentos e as cultivares (Tabela 2). Para a cultivar Grappolo, os valores de conteúdo de clorofila não diferiram significativamente para as plantas enxertadas com ramos infectados e não infectados pelo fitoplasma, e para as plantas usadas como controle. No entanto, as demais cultivares mostraram diferença significativa entre as plantas enxertadas com ramos portadores de fitoplasma em relação àquelas enxertadas com ramos livres do patógeno e plantas usadas como controle. Para estas cultivares, a presença do patógeno provocou redução no conteúdo de clorofila. Quando se compara as quatro cultivares enxertadas com ramos doentes, observa-se que as mesmas não diferem quanto ao conteúdo de clorofila, porém os controles das cultivares Grappolo e Arbequina apresentam significativamente menor quantidade de clorofila quando comparadas com os controles das cultivares Arbosana e Koroneiki. Isto indica que o efeito negativo do patógeno foi muito mais drástico nestas duas últimas cultivares do que nas duas primeiras aqui mencionadas. Os resultados obtidos para plantas submetidas à enxertia com ramo sadio e plantas controle não enxertadas revelam que a enxertia praticamente não promoveu alteração no conteúdo de clorofila.

**Tabela 2:** Conteúdo de clorofila total em tecido foliar de plantas de oliveira pertencentes a diferentes cultivares.

Tratamentos	Cultivares			
	Grappolo	Arbosana	Koroneiki	Arbequina
<b>Enxertia de ramo doente</b>	0,22* aA	0,20 aA	0,21 aA	0,19 aA
<b>Enxertia de ramo sadio</b>	0,26 aB	1,38 bA	1,30 bA	0,45 bB
<b>Controle</b>	0,32 aC	1,40 bA	1,20 cA	0,58 bB

\*Os valores estão expressos em mg de clorofila/g de tecido vegetal fresco

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas nas colunas representam os tratamentos e letras maiúsculas nas linhas representam as cultivares.

Espécies frutíferas que apresentam deficiência fotossintética têm seu desenvolvimento prejudicado e produzem frutos de baixa qualidade. O efeito dos patógenos no processo fotossintético se deve aos danos causados aos cloroplastos e ao envelhecimento de células infectadas (DALIO & PASCHOLATI, 2018); portanto a redução do processo fotossintético é considerada como resultante da resposta da planta à infecção (ROJAS et al., 2014). Esse declínio na fotossíntese é atribuído à interferência do patógeno nas atividades relacionadas ao transporte de elétrons do processo fotossintético e na atividade de enzimas (BERTAMINI et al., 2002). A redução do conteúdo de clorofila total foi também relatada para outras culturas perenes infectadas por fitoplasmas. Em videira, foi observada diminuição na quantidade de clorofila em folhas de plantas infectadas pelos fitoplasmas da doença ‘bois noir’ e da flavescência dourada, quando comparadas com folhas de plantas livres dos patógenos (OLIVEIRA et al., 2020; ENDESHAW et al., 2012). Em plantas de maçã infectadas pelo fitoplasma da proliferação da macieira foram observados diminuição nos pigmentos fotossintéticos devido ao aumento da atividade da clorofilase em folhas infectadas (BERTAMINI et al., 2002). Em coqueiros infectados com o fitoplasma agente causal do amarelecimento letal foi constatada diminuição no conteúdo de clorofila e na taxa fotossintética (LEON et al., 1996).

### 3.3.2 Açúcares redutores

O efeito da inoculação do fitoplasma sobre o teor de açúcares redutores encontrado nas diversas cultivares estão apresentados na Tabela 3. Os dados mostram diferenças significativas em relação aos tratamentos conduzidos e às cultivares avaliadas no ensaio. Assim como ocorreu para a determinação de clorofila, a cultivar Grappolo não mostrou diferença significativa para o teor de açúcares redutores encontrados em plantas enxertadas com ramos infectados e não infectados pelo fitoplasma e plantas usadas como controle. As demais cultivares mostraram diferenças significativas entre as plantas enxertadas com ramos doentes e com ramos livres do patógeno, e com os controles. Para estas cultivares, a infecção causada pelo patógeno resultou no aumento do teor de açúcares redutores. Quando se compara as quatro cultivares enxertadas com ramos portadores de fitoplasma, observa-se que as mesmas não diferem significativamente entre si quanto ao conteúdo de açúcares redutores, exceção feita para a cultivar Arbosana, onde foi encontrado o menor teor deste carboidrato. Exceção feita às cultivares Grappolo e Arbequina, as plantas das demais cultivares submetidas à enxertia com ramo sadio mostraram diferença significativa entre si. Em relação ao controle, a cultivar Arbequina mostrou diferença estatística quando comparada as outras cultivares, quanto à quantidade de açúcares redutores. Estes resultados evidenciam que a enxertia promoveu alteração no conteúdo de açúcares redutores, aumentando seu teor nas cultivares Koroneiki e Arbequina e diminuindo seu teor nas plantas da cultivar Arbosana.

**Tabela 3:** Conteúdo de açúcares redutores em tecido foliar de plantas de oliveira pertencentes a diferentes cultivares.

Tratamentos	Cultivares			
	Grappolo	Arbosana	Koroneiki	Arbequina
<b>Enxertia de ramo doente</b>	1,32* aAB	1,26 aB	1,75 aA	1,61 aAB
<b>Enxertia de ramo sadio</b>	0,82 aB	0,77 cC	0,98 bA	0,84 bB
<b>Controle</b>	0,86 aA	0,86 bA	0,87 cA	0,70 cB

\*Os valores estão expressos em mg de glicose/g tecido vegetal fresco

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas nas colunas representam os tratamentos e letras maiúsculas nas linhas representam as cultivares.

A translocação dos compostos gerados pela atividade fotossintética das plantas é feita via vasos do floema, ligando os órgãos produtores aos órgãos consumidores. Esta conexão pode ser interferida pela ação de patógenos, prejudicando a distribuição dos produtos fotossintetizados através do sistema fonte e dreno (DALIO & PASCHOLATI, 2018). Pesquisas têm mostrado que a interferência no processo de transporte do floema resulta em acúmulo de aminoácidos e amido nas folhas doentes (LEPKA et al., 1999; CHAOLING XUE et al., 2018). No caso da oliveira, estudado no presente trabalho, em folhas de plantas infectadas pelo fitoplasma foi encontrado acúmulo de açúcares redutores, evidenciando a interferência do patógeno com a distribuição do produto sintetizado. Se a infecção pelo fitoplasma leva à redução no transporte dos açúcares redutores, também deve interferir com a distribuição de aminoácidos. Assim, a redução na distribuição tanto do carboidrato como de aminoácidos compromete o desenvolvimento de plantas doentes. Esta redução no crescimento de plantas infectadas de oliveira foi observada durante a condução dos ensaios em casa de vegetação. A interferência do fitoplasma na translocação de fotossintetizados também tem sido relatada para outros patossistemas. Assim, em fruteiras lenhosas portadoras de fitoplasmas foi demonstrado acúmulo de carboidratos nas folhas velhas e diminuição nas raízes (KARTTE & SEEMÜLLER, 1991). Em videiras infectadas com o fitoplasma agente da doença conhecida como ‘bois noir’ foi constatada que a redução na translocação de amido gerou acúmulo desse carboidrato nas folhas, indicando possível bloqueio dos vasos de floema (SANTI et al., 2013). Em mamoeiro, maior concentração de açúcares nas folhas e sua diminuição nas raízes foi correlacionada com bloqueio de vasos devido à presença do patógeno (GUTHRIE et al., 2001). Ainda, o fitoplasma associado ao amarelecimento letal do coqueiro provocou acúmulo de açúcares redutores nas folhas e redução deste carboidrato nas raízes, sendo este acúmulo atribuído à redução no transporte de fotoassimilados pelo floema (MAUST et al., 2003).

### 3.3.3 Fenóis livres e ligados

Com relação ao conteúdo de fenóis livres, os dados revelaram diferença estatística entre os tratamentos e as cultivares (Tabela 4). Os conteúdos de fenóis livres foram estatisticamente maiores nas cultivares Grappolo e Arbosana para as plantas enxertadas com ramos doentes em comparação com as plantas usadas como controle; no entanto não houve diferença significativa entre plantas infectadas e controle para as cultivares Koroneiki e Arbequina. Resultados idênticos aos anteriores, em termos estatísticos, foram encontrados para comparações entre os

tratamentos representados por enxertia com ramos portadores do patógeno e enxertia com ramos livres do patógeno. Exceção feita às plantas da cultivar Grappolo, as demais cultivares mostraram que a enxertia de ramos saudáveis não alterou a quantidade de fenóis livres presentes nas plantas. Considerando o tratamento enxertia de ramo doente, as quatro cultivares não mostraram diferença significativa para as quantidades de fenóis livres produzidos, porém as cultivares Grappolo e Arbosana apresentaram quantidades iniciais deste composto bem menores que as cultivares Koroneiki e Arbequina. Estes resultados evidenciam que o efeito do patógeno foi mais severo nas duas primeiras cultivares, porém, a infecção do patógeno não alterou significativamente a produção de fenóis produzidos pelas duas últimas cultivares aqui mencionadas.

**Tabela 4:** Conteúdo de fenóis livres em tecido foliar de plantas de oliveira pertencentes a diferentes cultivares.

Tratamentos	Cultivares			
	Grappolo	Arbosana	Koroneiki	Arbequina
<b>Enxertia de ramo doente</b>	3,67* aA	4,74 aA	4,73 aA	4,34 aA
<b>Enxertia de ramo sadio</b>	2,31 bB	1,45 bC	4,77 aA	3,99 aA
<b>Controle</b>	1,55 cB	1,44 bB	3,74 aA	3,92 aA

\* Valores expressos em equivalentes de mg de ácido clorogênico/g de tecido fresco<sup>-1</sup>

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas na coluna representam os tratamentos e letras maiúsculas na linha representam as cultivares.

Em relação aos fenóis ligados (Tabela 5), as quantidades destes compostos foram estatisticamente maiores nas cultivares Grappolo e Arbosana para as plantas enxertadas com ramos infectados pelo fitoplasma em comparação com as plantas usadas como controle; no entanto, não houve diferença significativa entre plantas infectadas e controle para as cultivares Koroneiki e Arbequina. A análise estatística mostrou resultado idêntico aos anteriormente mencionados para comparações entre os tratamentos identificados por enxertia com ramos doentes e enxertia com ramos saudáveis. Houve diferença significativa entre as cultivares dentro do tratamento enxertia de ramos saudáveis, apontando que as cultivares Grappolo e Arbosana são

iguais entre si e diferem das cultivares Koroneiki e Arbequina. No controle foi observado que as cultivares Arbosana e Koroneiki apresentam o mesmo conteúdo de fenóis ligados, diferindo da Grappolo e da Arbequina. Em relação ao tratamento enxertia de ramo doente, todas as variedades mostraram valores significativamente distintos; no entanto, as cultivares Grappolo e Arbosana apresentaram quantidades iniciais deste composto bem menores que as cultivares Koroneiki e Arbequina. Estes resultados evidenciam que as alterações causadas pela presença do patógeno foram mais intensas nas cultivares Grappolo e Arbosana e que o fitoplasma não interferiu significativamente na síntese de fenóis ligados nas cultivares Koroneiki e Arbequina.

**Tabela 5:** Conteúdo de fenóis ligados em tecido foliar de plantas de oliveira pertencentes a diferentes cultivares.

Tratamentos	Cultivares							
	Grappolo		Arbosana		Koroneiki		Arbequina	
<b>Enxertia de ramo doente</b>	15,97*	aB	12,04	aC	5,54	aD	27,11	aA
<b>Enxertia de ramo sadio</b>	7,57	bB	7,35	bB	4,58	aC	21,73	aA
<b>Controle</b>	6,86	bB	5,77	bC	4,74	aC	23,97	aA

\* Valores expressos em equivalentes mg de ácido clorogênico/g de tecido fresco<sup>-1</sup>

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas na coluna representam os tratamentos e letras maiúsculas na linha representam as cultivares.

As funções dos compostos fenólicos nas plantas estão relacionadas à estruturação de tecidos de sustentação e mecanismos de proteção, portanto envolvidos com o desenvolvimento da planta (BOUDET, 2007; CHUNGLONG et al., 2008). Essas substâncias apresentam atividade antimicrobiana e fazem parte dos mecanismos de resistência das plantas contra o ataque de fitopatógenos. São substância encontradas em altas concentrações nos tecidos sadios dos vegetais e podem ser convertidas em compostos altamente tóxicos para patógenos, nos processos de infecção (PASCHOLATI & DALIO, 2018). Os compostos fenólicos são produzidos por células especializadas, distribuídas ao acaso ou em pontos estratégicos da planta. Este produto é sintetizado na sua forma original ou glicolisada, sendo armazenado de forma compartimentalizada em vesículas (LABANCA, 2002). Quando a planta é afetada os



fenólicos se tornam tóxicos e são, então, liberados (HRAZDINA, 1994). Uma característica importante dos fenóis é sua produção de maneira rápida pelas plantas e sua acumulação após a infecção pelo patógeno (HARTLEB et al., 1997). Dentre esses compostos podem ser citados: fenóis, lactonas, alcaloides e terpenoides (PASCHOLATI & DALIO, 2018). Esse aumento na quantidade de fenóis nas plantas infectadas se relaciona com o processo de defesa natural da planta à infecção, formando barreiras físicas e químicas atuando no processo de invasão do patógeno (BALLESTER et al., 2013). Os estudos sobre o comportamento dos fenóis nos processos de infecção de plantas por fitoplasmas têm sido relatados para variados patossistemas. Plantas de macieira infectadas com o fitoplasma agente causal da doença proliferação de ramos apresentaram um aumento expressivo de tanino, cutina e suberina, substâncias de natureza fenólica envolvidas na lignificação das paredes celulares (MUSETTI et al., 2000). Em plantas de videira portadoras do fitoplasma associado à doença conhecida como ‘amarelo’ (bois noir) foi observado aumento significativo do composto fenólico fenilalanina amônia-liase (PAL), quando comparadas com plantas livres do patógeno (ROMANAZZI et al., 2007). Também em videira, em plantas infectadas com o fitoplasma associado ao ‘amarelo’ (bois noir), foi observado aumento dos compostos fenólicos proantocianidinas, antocianina, lignina, epicatequina, estilbenoide e flavonóides em plantas infectadas assintomáticas (NEGRO et al., 2020). Em plantas de ameixeira infectadas com o fitoplasma agente da leptonecrose ocorreu um aumento altamente significativo no conteúdo de polifenóis, quantitativamente três vezes superior em plantas doentes quando comparadas com plantas saudáveis (MUSETTI et al., 2000).

#### 3.3.4 Proteínas totais

A análise do conteúdo de proteínas totais revelou diferença estatística entre os tratamentos e as cultivares, exceção feita para a cultivar Grappolo, cujos resultados para tratamentos não foram estatisticamente distintos (Tabela 6). As plantas das cultivares Arbosana, Koroneiki e Arbequina inoculadas com o fitoplasma apresentaram aumento significativo no conteúdo de proteínas, em relação àquelas do controle, as quais não foram submetidas à enxertia. Estes resultados indicaram que o patógeno teve influência no acúmulo de proteínas na parte aérea destas plantas. Para todas as cultivares, os dados mostraram que a enxertia realizada com ramos não infectados não promoveu alterações no conteúdo de proteínas, não havendo diferença estatística entre elas. As plantas pertencentes às cultivares Arbosana e Koroneiki enxertadas com ramo doente mostraram maior acúmulo de proteínas em comparação com plantas enxertadas com ramos livres do patógeno, confirmando que a presença do fitoplasma

induz a produção destas substâncias; ainda, para as cultivares Arbosana e Arbequina, foram aferidas as maiores quantidades de proteínas totais.

**Tabela 6:** Conteúdo de proteínas totais em tecido foliar de plantas de oliveira pertencentes a diferentes cultivares.

Tratamentos	Cultivares			
	Grappolo	Arbosana	Koroneiki	Arbequina
<b>Enxertia de ramo doente</b>	7,20* aB	9,00 aA	7,90 aA	8,04 aAB
<b>Enxertia de ramo sadio</b>	7,03 aA	7,49 bA	6,86 bA	7,93 aA
<b>Controle</b>	7,16 aB	7,64 bA	7,23 bAB	7,25 bAB

\*Valores expressos em mg de proteínas totais/g de tecido vegetal fresco<sup>-1</sup>

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas na coluna representam os tratamentos e letras maiúsculas na linha representam as cultivares.

As plantas têm capacidade de codificarem proteínas como uma reação de resposta ao ataque de patógenos; portanto, o conteúdo de proteínas em tecidos doentes tende a ser maior, embora nem sempre, do que nos tecidos sadios (PASCHOLATI & DALIO, 2018). Estas proteínas, cuja síntese é maior em planta doente, são denominadas de proteínas-PR (LINTHORST, 1991). As alterações nos níveis de proteínas totais têm sido estudadas para diversas relações entre hospedeiros e fitoplasmas, porém a resposta das plantas pode variar em direção ao acúmulo ou redução na quantidade. Em macieiras infectadas pelo fitoplasma do superbrotamento de ramos foi observado aumento no conteúdo de proteínas nas plantas doentes (PATUI et al., 2013). Em plantas de limoeiro mexicano portadoras de um fitoplasma associado à proliferação de ramos foi demonstrado aumento na quantidade de proteínas em plantas enxertadas (MOLLAYI et al., 2016). Em plantas de videira infectadas pelo fitoplasma agente causal do ‘amarelo’ (bois noir) foi evidenciado aumento no teor de proteínas (RUSJAN et al., 2012). Contrariamente aos resultados dos patossistemas anteriores, em ensaios com videira infectada pelo fitoplasma da flavescência dourada (MUSETTI et al., 2007) e macieira infectada pelo fitoplasma do superbrotamento de ramos (BERTAMINI et al., 2002a) foram obtidos dados que mostraram redução no conteúdo de proteínas solúveis totais. Interessantemente, plantas de

damasco, portadoras do fitoplasma agente da doença 'amarelo das fruteiras temperadas de caroço' não apresentaram alterações quanto ao conteúdo de proteínas, quando comparadas com plantas não infectadas (MUSETTI et al., 2005).

Com base nos resultados da análise bioquímica, foi possível observar que o fitoplasma causou alterações nos mecanismos fisiológicos das plantas de oliviera. Essas alterações foram observadas para as cinco análises estudadas: conteúdo de clorofila total; teor de açúcares redutores; conteúdo de fenóis livres e ligados e conteúdo de proteínas totais. Para as análises de clorofila total, açúcares redutores e proteínas totais, as cultivares Arbequina, Arbosana e Koroneiki, infectadas pelo fitoplasma apresentaram alterações no conteúdo desses compostos. E para as análises de fenóis livres e ligados as cultivares Grappolo e Arbosana infectadas pelo fitoplasma mostraram alterações no conteúdo desses compostos.

## **4. CONCLUSÕES**

Com base nos resultados pode-se concluir que:

- A patogenicidade do fitoplasma foi demonstrada pela sua transmissão por meio da técnica de enxertia.
- A concentração de células do fitoplasma nos tecidos da planta foi diferente nas quatro cultivares de plantas de oliveira estudadas.
- O fitoplasma provocou alterações bioquímicas nos tecidos das plantas de oliveira.

## REFERÊNCIAS

ALBA, J.M.; FLORES, C.A.; WREGE, M.S.; COUTINHO, E.F.; JORGE, R.O. **Zoneamento edafoclimático da olivicultura para o Rio Grande do Sul**. Embrapa, Brasília, 2014, 80 p.

APPLIED BIOSYSTEMS. Apostila. **Aplicações da PCR quantitativa em tempo real**. São Paulo, p. 51, 2009.

BALLESTER, A-R.; LAFUENTE, M.T.; DE VOS, R.CH. Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part I: Metabolic profiling in elicited fruits. **Food Chem**, v. 136, p. 178-185, 2013.

BARIC S.; BERGER, J.; CAINELLI, C.; KERSCHBAMER, C.; LETSCHKA, T.; DALLAVIA, J. Seasonal colonization 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**. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2018. chap. 11, p. 181-190.

BERGES, R.; ROTT, M.; SEEMULLER E. Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. **Phytopathology**, v. 90, p. 1145-1152, 2000.

BERTACCINI, A.; DUDUK, B.; PALTRINIERI, S.; CONTALDO, N. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 1763-1788, 2014.

BERTAMINI, M.; GRANDO, M.S.; MUTHUCHELIAN, K.; NEDUNCHEZHIAN, N. Effect of phytoplasmal infection on photosystem II efficiency and thylakoid membrane protein changes in field grown apple (*Malus pumila*) leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 61, p. 349-356, 2002.

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

BERTONCINI, E.I. Cultivo de oliveiras no estado de São Paulo. **Pesquisa & Tecnologia**, São Paulo, v. 9, p. 1-10, 2012.

BOUDET, A-M. Evolution and current status of research of in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2722-2735, 2007.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRAY, H.G; THORPE, W.V. Analysis of phenolic compounds of interest in metabolismo. **Methods Biochem Anal**, v.1, p. 27-52, 1954.

BROWN, D.; WHITCOMB, R.F.; BRADBURY, J.M. Revised minimal standard for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2703-2719, 2007.

CAPPELLARO, T.H.; COUTINHO, E.F.; RIBEIRO, F.C.; ARAÚJO, F.A.; FARIA, M.A.R. Cultivares. In: COUTINHO, E.F.; RIBEIRO, F.C.; CAPPELLARO, T.H. **Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.)**. Sistemas de Produção 16. Embrapa Clima Temperado, Pelotas - RS, 2009, 125p.

CHANG, C.J. Pathogenicity of aster yellows phytoplasma and *Spiroplasma citri* on periwinkle. **Phytopathology**, v. 88, p.1347-1350, 1998.

CHAOLING, X.; ZHIGUO, L.; LI, D.; JIAODI, B.; MENGJUN, L.; ZHIHUI, Z.; ZIHUI, J.; WEILIN, G.; JIN, Z. Changing host photosynthetic, carbohydrate, and energy metabolisms play important roles in phytoplasma infection. **Phytopathology Sep**, v. 108, p. 1067-1077, 2018.

CHOI, Y.H.; TAPIAS, E.C.; KIM, H.K.; LEFEBER, A.W.M.; ERKELENS, C.; VERHOEVEN, J.T.J.; BRZIN, J.; ZEL, J.; VERPOORTE, R. Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using HNMR spectroscopy and multivariate data analysis. **Plant Physiology**, v. 135, p. 2398-2410, 2004.

CHUNGLONG, C.; SONG, L.; RONGSU, L.; FENGPING, W.; JUNQPIN, LI. Concentration of phenolic compounds of *Populus euphratica* and soil water contents in Ejina oasis, Inner Mongolia, China. **Acta Ecologica Sinica**, v. 28, p. 69-75, 2008.

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

COUTINHO, E.F.; JORGE, R.O.; HAERTER, J.A.; COSTA, V.B. **Oliveira Aspectos técnicos e cultivo no Sul do Brasil**. Embrapa, Brasília - DF 2015. 181p.

COUTINHO, E.F.; WREGE, M.S.; REISSER JÚNIOR, C.; ALMEIDA, I.R.; STEINMETZ, S. Clima. In: COUTINHO, E.F.; RIBEIRO, F.C.; CAPPELLARO, T.H. **Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.)**. Sistemas de Produção 16. Embrapa Clima Temperado, Pelotas - RS, 2009, 125p.

DALIO, R.J.D.; PASCHOLATI, S.F. Alterações fisiológicas em plantas doentes. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2018. chap. 36, p. 181-190.

D'AMELIO, R.; MARZACHI, C.; BOSCO, D. Double infection of 'Candidatus Phytoplasma asteris' and 'flavescence doree' phytoplasma in the vector *Euscelidius variegatus*. **Bulletin of Insectology**, v. 60, p. 223-224, 2007.

DENG, S.; HIRUKI, C. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 14, p. 53-61, 1991.

DOUGLAS, S.M. Detection of mycoplasma-like organisms in peach and chokecherry with X-disease by fluorescence microscopy. **Phytopathology**, v. 76, p. 784-787, 1986.

ENDESHAW, S.T.; MUROLO, S.; ROMANAZZI, G.; NERI, D. Effects of Bois noir on carbon assimilation, transpiration, stomatal conductance of leaves and yield of grapevine (*Vitis vinifera*) cv. Chardonnay. **Physiology Plant**, v. 145, p. 286-295, 2012.

ERREA, P.; AGUELO, V.; HORMAZA, J.I. Seasonal Variations in Detection and Transmission of Pear Decline Phytoplasma. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, p. 439-443, 2002.

FAO. 2020. FAOSTATS: CROPS. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC>> acessado em 17 de maio, 2021.

FERREIRA, J.; PEREIRA, T.B.C.; ALMEIDA, C.A.; BEDENDO, I.P. Olive tree represents a new host of a subgroup 16SrVII-B phytoplasma associated with witches' broom disease in Brazil. **Plant Disease**, v. 105, p. 1189, 2021.

FERREIRA, J. **Identificação molecular de um fitoplasma associado a árvores de oliveira com sintoma de vassoura-de bruxa**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017, 46p.

FLORES, C.A.; ALBA, F.J.M. Zoneamento edafoclimático da olivicultura. In: ALBA, J.M. F; FLORES, C.A.; WREGGE, M.S. **Zoneamento edafoclimático da olivicultura para o Rio Grande do Sul**. Embrapa, Brasília – DF, 2013, 70p.

FONT, I.; ABAD, P.; DALLY, E. L.; DAVIS, R.E.; JORDÁ, C. Nueva enfermedad en el olivar español. **Phytoma España**, p. 211-212, 1998.

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

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

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

GUTHRIE, J.N.; WALSH, K.B.; SCOTT, P.T.; RASMUSSEN, T.S. The phytopathology of Australian papaya dieback: a proposed role for the phytoplasma. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.58, p. 23-30, 2001.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HARTLEB, H.; HEITEFUSS, R.; HOPPE, H. **Resistance of crop plants against fungi**. Stuttgart: G. Fischer, 544p, 1997.

HRAZDINA, G. Compartmentation in phenolic metabolism. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 1, p. 86-93, 1994.

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

KARTTE, S.; SEEMULLER, E. Histopathology of apple proliferation in *Malus* taxa and hybrids of different susceptibility. **Journal of Phytopathology**, v.131, p. 149-160, 1991.

KOFALVI, S.A.; NASSUTH, A. Influence of wheat streak mosaic virus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignina in wheat. **Physiol Mol Plant Pathol**, v.47, p. 365-377, 1995.

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*).** Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002 118p.

LEE, I. –M.; DAVIS, R. E.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 221 - 255, 2000.

LEE, I.M.; MARTINI, M.; MARCONE, C.; ZHU, S.F. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of ‘*Candidatus* phytoplasma ulmi’ for the phytoplasma associated with elm yellows. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 337-347, 2004.

LEON, R.; SANTAMARIA, J.M.; ALPIZAR, L.; ESCAMILLA, J.A.; OROPEZA, C. Physiological and biochemical changes in shoots of coconut palms affected by lethal yellowing. **New Phytologist**, v. 134, p. 227-234, 1996.

LEPKA, P.; STITT, M.; MOLL, E. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 59-68, 1999.

LEVER, M.A. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v.47, p. 273-279, 1972.

LINTHORST, H.J.M. Pathogenesis-related proteins of planta. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.10, p.123-150, 1991.

LURIA, S.E.; BURROUS, J.W. Hibridization between *Escherichia coli* and *Shigelia*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 74, p. 461-476, 1957.

MACKINNEY, G. Absorption of light by chlorophyll solutions. **Journal Biological Chemistry**, v. 140, p. 315-322, 1941.

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**. 1. ed. Oxford, Centre for Agriculture and Biosciences 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**, v. 60, p. 251-252, 2007.

MAUST, B.E.; ESPADAS, F.; TALAVERA, C. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. **Journal of Phytopathology**, v. 93, p. 976-981, 2003.

MOLLAYI, S.; FARZANEH, M.; GHANATI, F.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; GHASSEMPOUR, A. Study of catechin, epicatechin and their enantiomers during the progression of witches' broom disease in Mexican lime (*Citrus aurantifolia*). **Physiological and Molecular Plant pathology**, v.93, p.93-98, 2016.

MUSETTI, R. Biochemical Changes in Plants Infected by Phytoplasmas. In: WEINTRAUB, P. G.; JONES, P. **Phytoplasmas Genomes, Plant Hosts and Vectors**. 1. ed. Oxford, Centre for Agriculture and Biosciences International, 2010. chap. 8, p. 132-146.

MUSETTI, R.; DI TOPPI, L.S.; MARTINI, M.; FERRINI, F.; LOSCHI, A.; FAVALI, M.A.; OSLER, R. Hydrogen peroxide localization and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European Stone Fruit Yellows. **European Journal of Plant Pathology**, v.112, p. 53-61, 2005.

MUSETTI, R.; FAVALI, M.A. Calcium localization and X-ray microanalysis in *Catharanthus roseus* L. infected with phytoplasmas. **Micron**, v. 34, p. 387-393, 2003.

MUSETTI, R.; FAVALI, M.A.; PRESSACCO, L. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. **Cytobios**, v. 102, p. 133-147, 2000.

MUSETTI, R.; MARABOTTINI, R.; BADIANI, M.; MARTINI, M.; SANITA DI TOPPI, L.; BORSELLI, S.; BORGIO, M.; OSLER, R. On the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the recovery of grapevine (*Vitis vinifera*, cv. Prosecco) from Flavescence doree disease. **Functional Plant Biology**, v. 34, p. 750-758, 2007.

MUSETTI, R.; SANITA DI TOPPI, L.; MARTINI, M.; FERRINI, F.; LOSCHI, A.; FAVALI, M.A.; OSLER, R. Hydrogen peroxide localisation and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European stone fruit yellows. **European Journal of Plant Pathology**, v. 112, p. 53-61, 2005.

NAVARRO C.; PARRA M.A. Plantación. In: BARRANCO, D.; FERNANDEZ-ESCOBAR, R. **El cultivo del olivo**. 6. ed. Madri: Mundi-Prensa, 2008. p.188-238.

NEGRO, C.; SABELLA, E.; NICOLÍ, F.; PIERRO, R.; MATERAZZI, A.; PANATTONI, A.; APRILE, A.; NUTRICATI, E.; VERGINE, M.; MICELI, A.; DE BELLIS, L.; LUVISI, A. Biochemical changes in leaves of *Vitis vinifera* cv. Sangiovese infected by Bois Noir phytoplasma. **Pathogens**, v.9, p.1-17, 2020.

NETO, J.V.; LIVEIRA, A.F.; OLIVEIRA, N.C.; DUARTE, H.S.S.; GONÇALVES, E.D. **Aspectos técnicos da cultura da oliveira**. EPAMIG, 2008 60p.

OLIVEIRA, M.C.; NETO, J.V.; PIO, R.; OLIVEIRA, A.F.; RAMOS, J.D. Enraizamento de estacas de oliveira submetidas a aplicação de fertilizantes orgânicos e AIB. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, p. 337-344, 2010.

OLIVEIRA, M.J.; CASTRO, S.; PALTRINIERI, S.; BERTACCINI, A.; SOTTOMAYOR, M.; SANTOS, C. “Flavescence dorée” impacts growth, productivity and ultrastructure of *Vitis vinifera* plants in Portuguese “Vinhos verdes” region. **Science Horticulture**, v.216, p. 108-742, 2020.

PASCHOLATI, S.F.; DALIO, R.J.D. Fisiologia do parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2018. chap. 35, p. 181-190.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência à doenças. In: LUZ, W.C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas: RAPP**, v.2, p. 1-51, 1994.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, cap.22, p. 417-453, 1995.

PATUI, S.; BERTOLINI, A.; CLINCON, L.; ERMACORA, P.; BRAIDOT, E.; VIANELLO, A.; ZANCANI, M. Involvement of plasma membrane peroxidase and oxylipin pathway in the recovery from phytoplasma disease in apple (*Malus domestica*). **Physiologia Plantarum**, v. 148, p. 200-213, 2013.

PERTOT, I.; MUSETTI, R.; PRESSACCO, L.; OSLER, R. Changes in indole-3-acetic **Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz** v. 91, p. 608-613, 1984.

POLLINI POGGI, C.; BISSAN, R.; GIUNCHED, L.; VINDIMIAN, E. First Report of Phytoplasma Infection in Olive Trees (*Olea Europea L.*). **Journal of Phytopathology**, v. 144, p. 109-111, 1996.

R, CORE TEAM, 2017. R: A language and environment for statistical computing. <https://www.R-project.org/>

RASHIDI, M.; GHOSTA, Y.; BAHAR, M. Molecular identification of a phytoplasma associated with Russian olive witches' broom in Iran. **European Journal of Plant Pathology**, p. 157-159, 2010.

RIBEIRO, F.C; COUTINHO, E.F.; CAPPELLARO, T.H.; ARAÚJO, F.A.; CASTRO, L.A.S. Produção e Obtenção de Mudas ou Sementes. In: COUTINHO, E.F.; RIBEIRO, F.C.; CAPPELLARO, T.H. **Cultivo de Oliveira (*Olea europaea L.*)**. Sistemas de Produção 16. Embrapa Clima Temperado, Pelotas - RS, 2009, 125p.

RIBEIRO, G.D.; COSTA, J.N.M.; VIEIRA, A.H.; SANTOS, M.R.A. Enxertia em fruteiras. **Embrapa**, v.92, p.1-8, 2005.

ROJAS, C.M.; SENTHIL-KUMAR, M.; TZIN, V.; MYSORE, K. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interaction and its contribution to plant defense. **Frontiers in plant Science – Plant microbe interactions**, v. 5, p. 1-13, 2014.

ROMANAZZI, G.; PROTA, V.A.; CASATI, P.; MUROLO, S.; SILLETTI, M.R.; DI GIOVANNI, R.; LANDI, L.; ZORLONI, A.; D'ASCENZO, D.; VIRGILI, S.; GARAU, R.; SAVINO, V.; BIANCO, P.A. **Incidenza del recovery in viti infette da fitoplasmi in diverse condizioni climatiche e varietali italiane e tentativi di comprensione ed induzione del fenomeno. Atti Convegno nazionale 'Nuove possibilità di lotta contro le fitoplasmosi della vite e dei fruttiferi basate su recovery, resistenze indotte e antagonisti**, Ancona, 2007, p. 9-11.

RUSJAN, D.; HALBWIRTH, H.; STICH, K.; MIKULIE-PETKOVSEK, M.; VEBERIE R. Biochemical response of grapevine variety 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) to infection with grapevine yellows (Bois noir). **European Journal Plant Pathology**, v. 134, p. 231-237, 2012.

SANTI, S.; DE MARCO, F.; POLIZZOTTO, R.; GRISAN, S.; MUSETTI, R. Recovery from stolbur disease in grapevine involves changes in sugar transport and metabolism. **Front Plant Science**, v. 4, p. 171, 2013.

SCHAPER, U.; SEEMULLER, E. Recolonization of the stem of apple proliferation and pear decline-diseased trees by the causal organisms in spring. **Zeitschrift für Pflanzkrankheiten und Pflanzenschutz** v. 91, p. 608-613, 1984.

SEEMULLER, E.; GARNIER, M.; SCHNEIDER, B. Mycoplasmas of plants and insects. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R. (ED). **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2002. chap. 5, p. 91-117.

SENTELHAS, P.C. **Estimativa diária da evapotranspiração de referência com dados de estação meteorológica convencional e automática**. Tese (Doutorado em Irrigação e Drenagem) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998, 97p.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

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**, v. 19, p. 334-340, 2005.

TSAI, J.H. Vector transmission of mycoplasmal agents of plant diseases. In: *variegatus*. **Bulletin of Insectology**, v. 60, p. 223-224, 2007.

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.

WEI, W.; LEE, I.M.; DAVIS, R.E.; SUO, X.; ZHAO, Y. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2368-2377, 2008.

WREGGE M.S.; COUTINHO E.F. Zoneamento agroclimático da olivicultura para o Rio Grande do Sul. In: ALBA, J.M. F; FLORES, C.A.; WREGGE, M.S. **Zoneamento edafoclimático da olivicultura para o Rio Grande do Sul**. Embrapa, Brasília – DF, 2013, 70p.

WREGGE M.S.; COUTINHO E.F.; STEINMETZ S.; REISSER JUNIOR C.; ALMEIDA I.R.; MATZENAUER R.; RADIN B. **Zoneamento agroclimático para oliveira no Estado do Rio Grande do Sul**. Embrapa Clima Temperado, Pelotas - RS 2009, 24 p.

ZHAO Y.; WEI W.; LEE I.M.; SHAO J.; SUO X.; DAVIS, R.E. Construction of an interactive on line phytoplasma classification tool, *iPhyClassifier*, and its application in analysis of the peach X- disease phytoplasma group (16SrIII). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v.59, p. 2582-2593. 2009.