

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM  
FITOPLASMA DO GRUPO 16SrIII ASSOCIADO AO AMARELO DA  
VIDEIRA NA REGIÃO SERRANA DO RIO GRANDE DO SUL**

**RONIZE ROHR DOS SANTOS**

**CAXIAS DO SUL**  
**2015**

**RONIZE ROHR DOS SANTOS**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM  
FITOPLASMA DO GRUPO 16SrIII ASSOCIADO AO AMARELO DA  
VIDEIRA NA REGIÃO SERRANA DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna

Co-orientador(a): Dra. Luciana Bavaresco Andrade Touguinha

Co-orientador: Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo

**CAXIAS DO SUL  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

S237d Santos, Ronize Rohr dos, 1990-

Detecção e caracterização molecular de um fitoplasma do grupo 16SrIII associado ao amarelo da videira na região serrana do Rio Grande do Sul / Ronize Rohr dos Santos. – 2015.

68 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna ; Coorientadores: Profa. Dra. Luciana Bavaresco Andrade Touguinha, Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo.

1. Videira - Doenças. 2. Videira – Rio Grande do Sul. 3. Fitoplasma. 4. Biotecnologia. I. Título.

CDU 2. ed.: 632

Índice para o catálogo sistemático:

1. Videira - Doenças	632
2. Videira – Rio Grande do Sul	634.8(816.5)
3. Fitoplasmas	576.88
4. Biotecnologia	60

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Ana Guimarães Pereira – CRB 10/1460

## RONIZE ROHR DOS SANTOS

### **Detecção e Caracterização Molecular de um Fitoplasma do Grupo 16SrIII Associado ao Amarelo da Videira na Região Serrana do Rio Grande do Sul.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

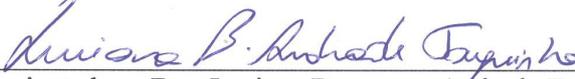
Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna

Co-orientadora: Dra. Luciana Bavaresco Andrade Touguinha

Co-orientador: Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 07 DE AGOSTO DE 2015.

  
Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna

  
Co-orientadora: Dra. Luciana Bavaresco Andrade Touguinha

  
Co-orientador: Dr. Ivan Paulo Bedendo

  
Dra. Bárbara Eckstein

  
Prof. Dr. Leandro José Dallagnol

  
Prof. Dr. Wilson Sampaio de Azevedo Filho

*“Saudade é não saber. Não saber o que fazer com os dias que ficaram mais compridos, não saber como encontrar tarefas que lhe cessem o pensamento, não saber como frear as lágrimas diante de uma música, não saber como vencer a dor de um silêncio que nada preenche”.*

Martha Medeiros

***Salmo 91:2***

*Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.*

### ***Aos meus pais...***

*Dulce (in memoriam) e Sírio, pelo exemplo de amor e companheirismo, pelo apoio a todas às minhas decisões e por confiarem em mim. Em especial à minha mãe, por me ensinar a ter fé incondicionalmente, pelo exemplo de força e coragem. Minha eterna SAUDADE.*

### ***Ao meu namorado...***

*Robson Nitsche, por todo amor, carinho, companheirismo e paciência.*

### ***À minha família...***

*Minha irmã Taíse dos Santos Batista, por existir e ser a melhor irmã que eu poderia ter. Por compreender tão bem meus sentimentos e estar ao meu lado sempre.*

*Ao meu cunhado Alexandro, pela amizade, cumplicidade, caronas e cervejas.*

*Aos meus sobrinhos Vitória e Henrique por compreenderem minhas ausências e me receberem sempre com os beijos e abraços mais sinceros.*

**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS por estar sempre comigo, não me deixar perder a fé e por dar forças para que eu pudesse seguir em frente nos momentos difíceis.

À Universidade de Caxias do Sul e ao Instituto de Biotecnologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico – CNPq, pela bolsa de Mestrado concedida.

Ao Prof. Dr. Sergio Echeverrigay pela orientação e confiança no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Luciana Bavaresco Andrade Touguinha que muito além de co-orientadora, tem sido também meu porto seguro e meu ombro amigo.

Ao Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo (Esalq/USP) por sua disponibilidade e inestimável ajuda no desenvolvimento deste trabalho, e também por contribuir para minha formação como exemplo de profissional.

Às alunas do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos (Esalq/USP) Sarah e Tyciana pela recepção no laboratório, e a Thays pelo auxílio e disponibilidade.

À Fernanda Machado Bittencourt por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e por todos os bons momentos.

Aos membros da banca de acompanhamento, Profa. Dra. Rute Terezinha da Silva Ribeiro pelas correções no trabalho, e ao Prof. Dr. Wilson Sampaio de Azevedo Filho por todas as palavras de incentivo e motivação quando o desânimo se achegava.

Ao coordenador do PPGBio Prof. Dr. Aldo Dillon e às secretárias Lucimara e Claudete por estarem sempre disponíveis a ajudar.

Ao amigo Jucimar Zacaria, pela paciência e ajuda nos primeiros anos de laboratório.

Às amigas Angélica, Fernanda, Luciana e Michele pela amizade de sempre.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada, Profa. Dra. Ana Paula, Anderson, Ângela, Cleonice, Fernando, Gabriel, Luciane, Luciane, Maurício, Morgana e Morgana pelos momentos de descontração. Em especial à Cassandra, Luisa e Suziane.

À minha família linda e ao meu namorado, pelo incentivo, amor e por estarem sempre comigo. AMO VOCÊS!

**MUITO OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE QUADROS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. A cultura da videira no Rio Grande do Sul.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Importância econômica da cultura da videira.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Aspectos fitossanitários da cultura da videira .....</b>	<b>6</b>
<b>2.4. Fitoplasmas .....</b>	<b>11</b>
<i>2.4.1. Técnicas de detecção e classificação dos fitoplasmas .....</i>	<i>14</i>
<i>2.4.2. Mecanismos de transmissão dos fitoplasmas .....</i>	<i>17</i>
<i>2.4.3. Doenças causadas por fitoplasmas .....</i>	<i>19</i>

2.5. Amarelo da videira .....	21
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1. Coleta de material vegetal.....	25
3.2. Preparo e identificação do material vegetal coletado .....	26
3.3. Extração de DNA .....	27
3.4. Detecção de fitoplasma por <i>Nested-PCR</i> .....	28
3.5. Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados.....	30
3.6. Análise de RFLP <i>in silico</i> .....	31
3.7. Análise filogenética .....	31
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
4.1. Detecção de fitoplasmas por <i>Nested-PCR</i> .....	36
4.2. Caracterização molecular do fitoplasma .....	40
4.2.1. Análise de RFLP <i>in silico</i> .....	42
4.2.2. Análise filogenética .....	44
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>
<b>6. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>49</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>50</b>

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados. ....	29
---	----

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Dados de identificação dos materiais vegetais coletados. ....	26
---	----

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Fitoplasmas visualizados em vasos do floema por microscopia eletrônica. Destaque para a característica de pleomorfismo dos fitoplasmas. A e B: fitoplasmas em formas esférica, adaptado de Silva et al. (2009). C-F: formas pleomórficas de fitoplasmas, adaptado de Bertaccini & Duduk (2009). ..... 12

**Figura 2.** Sintomas de doenças causadas por fitoplasma. A-E: sintomas característicos de flavescência dourada em videiras tintas (A-B-C) e em videiras brancas (D-E). Adaptado de: Bertaccini & Duduk (2009); Chuche & Thiéry, (2014); Margaria *et al.*, (2014).....21

**Figura 3.** Plantas sintomáticas para o amarelo da videira coletadas no ano de 2014. A: Marselan 1, avermelhamento, superbrotamento e ramos pendentes ; B: Cabernet Sauvignon 1, superbrotamento; C: Moscato Giallo 1, avermelhamento, enrolamento dos bordos e superbrotamento; D: Italia 1, clorose e enrolamento; E: Marselan 2, avermelhamento em um dos ramos; F: Merlot 1, avermelhamento em um dos ramos; G: Cabernet Sauvignon.2, superbrotamento.....34

**Figura 4.** Plantas apresentando sintomas típicos de amarelo da videira. A: Cabernet Sauvignon (CS.2). B: Cabernet Sauvignon (CS.3). C: Merlot (ME.5). D: detalhe de ramo com superbrotamento. E: murchamento de bagas.....35

**Figura 5.** Presença de fitoplasmas em plantas sintomáticas e ausência em planta assintomática de videira, pelo uso de Nested-PCR com os primers R16mF2/mR1 e R16F2n/R2. As bandas presentes no gel correspondem às amplificações de fragmentos genômicos de 1,2Kb. Colunas 1: CS.F 1A; 2: CS.F 1B; 3: CS.F 2A; 4: ME.T 1A; 5: Controle positivo; 6: videira assintomática; 7: água..... 38

**Figura 6.** Alinhamento das regiões de alta precisão do sequenciamento compartilhadas pelas quatro amostras de fitoplasma identificadas nas videiras sintomáticas.....41

**Figura 7.** Eletroferograma da sequência reversa da amostra CS.F 2A.....42

**Figura 8.** Padrões de restrição de RFLP gerados pela digestão in silico de fragmentos de DNA correspondentes à região do 16S rDNA do fitoplasma encontrado em plantas de videira (A), do representante do 16SrIII-J (B) e do representante do subgrupo 16SrIII-F (C). Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*. M: marcador  $\phi$ X174-DNA *HaeIII*.....43

**Figura 9.** Árvore filogenética construída usando o método Neighbor-Joining com as sequências da região 16S rDNA do fitoplasma identificado na videira, de fitoplasmas representantes dos subgrupos 16SrIII-B, 16SrIII-V, 16SrIII-U, 16SrIII-J, 16SrIII-F, 16SrIII-A e o procarioto *Acholeplasma palmae*. .....45

**Figura 10.** Alinhamento da sequência parcial da região 16S rDNA da amostra CS.F 2A com as sequências dos fitoplasmas representantes dos subgrupos 16SrIII-J e 16SrIII-F. Retângulos

preto marcam sítios de clivagem com a enzima *HpaII*; retângulos vermelhos marcam sítios de clivagem com a enzima *BstUI*.  Indica os pontos em que a sequência do fitoplasma da amostra CS.F 2A difere do fitoplasma do subgrupo 16SrIII-F.  Indica os pontos em que a sequência do fitoplasma da amostra CS.F 2A difere das sequências dos fitoplasmas dos subgrupos 16SrIII-F e 16SrIII-J.....46

## RESUMO

A videira (*Vitis* spp.) é uma das frutíferas mais cultivadas no mundo, tendo grande importância sócio-econômica no Brasil, principalmente na Região Serrana do Rio Grande do Sul. Inúmeras doenças acometem a videira afetando a produção vitícola e gerando prejuízos econômicos nas regiões produtoras. Uma destas doenças é o amarelo da videira, que tem associação com fitoplasmas. Esses procariotos, desprovidos de parede celular habitam e se multiplicam nos vasos do floema das plantas e na hemolinfa dos insetos vetores. No Brasil, há relatos da presença de fitoplasmas infectando videiras nos estados de São Paulo e Paraná. No Rio Grande do Sul, já foi verificado infectando macieiras, bem como a presença de seus possíveis insetos vetores, cigarrinhas do grupo Cicadellidae como parte da entomofauna vitícola. Nos últimos ciclos de produção, videiras apresentando sintomas de fitoplasmose vem sendo observadas nos vinhedos da Serra Gaúcha. O objetivo do presente estudo foi confirmar a presença de fitoplasmas infectando videiras na Região Serrana do Rio Grande do Sul, bem como classificar os fitoplasmas encontrados quanto ao grupo e subgrupo ao qual pertencem. Foram coletados, nos anos de 2014 e 2015, ramos e raízes de plantas que apresentavam sintomas como avermelhamento ou clorose das folhas em videiras tintas e brancas, respectivamente, enrolamento dos bordos foliares, superbrotamento de ramos, encurtamento de entrenós, necrose de nervuras e definhamento. O DNA total foi extraído e utilizado para detecção de fitoplasmas por meio de *Nested*-PCR com os *primers* R16 mF2/R16 R1, P/P7 ou P1/Tint na primeira reação e R16 F2n /R16 R2 na segunda reação. Para identificação molecular os produtos da segunda reação, fragmentos correspondentes à região 16S rDNA, foram sequenciados e as sequências geradas foram alinhadas entre si. Uma sequência representativa dos fitoplasmas encontrados foi utilizada para análise de RFLP *in silico*, com 17 enzimas de restrição, e análise filogenética. Fitoplasmas foram verificados em quatro amostras oriundas de três videiras sintomáticas. As sequências alinhadas apresentavam 99% de similaridade com sequências de fitoplasmas depositadas no GeneBank. A partir da avaliação dos perfis de restrição gerados pelo RFLP *in silico* e a análise filogenética, pode-se concluir que os fitoplasmas encontrados pertencem ao grupo 16SrIII, e ao subgrupo 16SrIII-J. Dessa forma, o presente estudo confirma a presença de fitoplasmas infectando videiras na Região Serrana do Rio Grande do Sul, indicando a ocorrência do amarelo da videira, doença até então não diagnosticada na região.

## ABSTRACT

The grapevine is one of the most cultivated fruit trees in the world, having great socio-economic importance in Brazil, particularly in the highlands of Rio Grande do Sul. Numerous diseases affect grapevine worldwide, interfering in grape production and generating economic losses. One of these diseases is the grapevine yellow, whose etiologic agent is a phytoplasma. These wall-less prokaryotes live and multiply in phloem vessels of plants and hemolymph of insect vectors. In Brazil, there are reports of the presence of phytoplasma infecting grapevines in the states of São Paulo and Paraná. In Rio Grande do Sul has been found infecting apple trees, causing the apple rubbery wood disease, as well as the presence of their possible insect vectors in vineyards, leafhoppers of the Cicadellidae group. In recent cycles of production, grapevines showing typical symptoms of phytoplasma infection had been observed in the vineyards of the highlands of Rio Grande do Sul. This study aimed to confirm the presence of phytoplasma infecting grapevines in vineyards of the highlands of Rio Grande do Sul and rank the phytoplasmas on the group and subgroup to which they belong. Branches and roots of plants showing symptoms such as, reddening or yellowing of leaves on red or white cultivars respectively, leaf downwards rolling, proliferation of axillary buds resulting in a witches' broom behavior, abnormal internodes elongation, phloem necrosis and stunting, were sampled during the years 2014 and 2015 vintage. Total DNA was extracted and used for phytoplasmas detection by nested PCR with primers mF2 R16/R16 R1, P1/P7 and P1/Tint in the first reaction and F2n R16/R16 R2 in the second reaction. For molecular identification the second reaction product, corresponding to the region 16S rDNA fragments were sequenced and generated sequences were aligned. A representative sequence of grapevine phytoplasma was used for RFLP analysis *in silico*, with 17 restriction enzymes, and phylogenetic analysis. Phytoplasmas were detected in four samples deriving from three symptomatic vines. The aligned sequences showed 99% similarity with phytoplasma sequences deposited in GeneBank. The RFLP patterns and the phylogenetic analysis, allowed concluding that the phytoplasmas found belongs to the group 16SrIII, and 16SrIII- J subgroup. Thus, this study confirms the presence of phytoplasma infecting grapevines in the highlands of Rio Grande do Sul, indicating the occurrence of grapevine yellow disease hitherto none diagnosed in the region.

## 1. INTRODUÇÃO

A videira (*Vitis* spp) é considerada uma das plantas frutíferas de maior relevância econômica mundial. No Brasil, a videira vem sendo explorada comercialmente a mais de um século e se firmou como atividade sócio-econômica de grande importância em diversas regiões do país. A região Serrana do Rio Grande do Sul destaca-se no âmbito nacional como a maior produtora de uvas e vinhos.

A cultura da videira enfrenta graves problemas quanto à fitossanidade de suas cultivares, sendo alvo de organismos como insetos, nematóides, fungos, vírus e bactérias. Dentre as doenças de grande relevância para essa cultura estão os amarelos da videira, conjunto de doenças causadas por fitoplasmas.

Os fitoplasmas são organismos procariotos pertencentes à Classe Mollicutes. Esses microrganismos são parasitas obrigatórios de plantas e insetos, sendo caracterizados por não possuir parede celular, e por serem pleomórficos. Habitam e se multiplicam nos vasos do floema das plantas e na hemolinfa de insetos vetores, onde atingem e alojam-se nas glândulas salivares. São apontados como agentes etiológicos de doenças em centenas de espécies vegetais.

Em videiras os sintomas típicos da infecção por fitoplasma são o superbrotamento dos ramos, o encurtamento dos entrenós, a alteração da pigmentação dos limbos foliares, encarquilhamento das folhas, necrose de nervuras, bem como definhamento das plantas afetadas. No Brasil, o *Grapevine flavescence dorée phytoplasma*, causador da flavescência

dourada, mais grave doença do tipo amarelo, não foi ainda detectado, sendo considerado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) uma praga quarentenária A1.

A presença de videiras apresentando sintomas típicos de doenças do tipo amarelo, associadas à presença de fitoplasmas, vem sendo observada ao longo dos últimos ciclos de produção no Estado do Rio Grande do Sul. Esses sintomas, muitas vezes, passam despercebidos por assemelharem-se a outros causados por inúmeras desordens fisiológicas e moléstias, como a virose do enrolamento foliar, doença muito frequente na região.

Sabendo-se dos prejuízos causados pelo amarelo da videira em outras regiões, da confirmação de fitoplasmas infectando videiras nos estados de São Paulo e Paraná, bem como da presença de videiras sintomáticas no Rio Grande do Sul, o objetivo do presente estudo foi confirmar a presença e identificar fitoplasmas infectando videiras na Região Serrana do Rio Grande do Sul.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. A cultura da videira no Rio Grande do Sul**

A videira pertence à família Vitaceae e ao gênero *Vitis*, o qual possui 46 espécies, destacando-se *Vitis vinifera* L., produtora de uvas finas, de origem européia e conhecida por “uva vinífera” e *Vitis labrusca* L., produtora de uvas comuns, de origem americana e conhecida por “uva americana ou comum” (Giovannini, 2008, 2014).

As plantas da família Vitaceae possuem folhas alternas, simples ou compostas, frequentemente palminérveas e com estípulas, e inflorescência cimosas ou paniculada, terminal, axilar ou oposta às folhas. A videira é uma planta perene, lenhosa, caducifolia e sarmentosa, provida de órgãos de sustentação chamados de gavinhas, que geralmente apresentam-se opostos às folhas (Giovannini, 2008).

Apesar de ser considerada uma cultura de clima temperado, o gênero *Vitis* apresenta adaptabilidade à variadas condições climáticas (Guimarães, 2008). No Brasil, a cultura da videira está difundida desde o Rio Grande do Sul, a 31°S de latitude, até o Rio Grande do Norte e Ceará, a 05°S de latitude. A variação de altitude também é grande, havendo considerável diversidade ambiental entre as zonas de produção, incluindo regiões de clima temperado, subtropical e tropical (Camargo *et al.*, 2011). Os Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Paraná, Bahia, Santa Catarina e Minas Gerais destacam-se pelo volume de produção de uvas (Camargo *et al.*, 2011).

No Sul do Brasil, a viticultura praticada é a tradicional, com a realização de apenas um ciclo anual, no qual a planta, após a poda, inicia a brotação, floresce, frutifica, amadurece e entra novamente em repouso vegetativo (Rodrigues, 2009).

A Serra Gaúcha é considerada a principal região vitícola do país. Está localizada no Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul, cujas coordenadas geográficas e indicadores climáticos médios são: latitude 29°S, longitude 51°W, altitude 600-800m, precipitação 1.700mm, temperatura 17,2°C e umidade relativa do ar de 76% (Protas & Camargo, 2011).

Além dos fatores naturais da Serra Gaúcha, que permitem a obtenção de uvas com elevado teor de acidez, a estrutura agroindustrial existente também é favorável para a produção de destilados de vinho, como o conhaque. Apenas uma pequena fração das uvas cultivadas no sul do País é destinada ao consumo *in natura*. A fruta é utilizada, em sua maioria, na elaboração de vinhos, concentrando mais de 90% da produção nacional (MAPA, 2015).

As uvas comuns representam mais de 80% da produção brasileira para processamento e têm significativa importância também como uvas de mesa. Dentre as cultivares tintas com maiores volumes processados destacam-se Isabel e Bordô, já dentre as cultivares brancas e rosadas destaca-se Niágara Branca (Camargo, 2015a; Mello & Machado, 2015a).

Dentre as cultivares de uvas finas tintas, as que apresentam volume processado mais expressivo no Rio Grande do Sul são Cabernet Sauvignon, Merlot, Tannat, Pinot Noir, Cabernet Franc, Alicant Bouschet e Ansellota. No caso de uvas finas brancas e rosadas destacam-se as cultivares Moscato, Chardonnay, Trebbiano, Prosecco, Riesling Itálico, Malvasia di Candia e Moscato Giallo (Camargo, 2015b; Mello & Machado, 2015b).

## **2.2. Importância econômica da cultura da videira**

A viticultura é uma atividade agrícola amplamente desenvolvida que desempenha um papel fundamental na economia de muitos países. As uvas são destinadas tanto para consumo *in natura* quanto para produção de vinhos (Margaria *et al.*, 2014).

No Brasil, em 2012, a produção de uva foi de 1.455.809 toneladas, destacando-se a região Sul como a maior produtora, participando com 67,45% desta produção, enquanto a participação da região Nordeste foi de 19,7%, seguida da região Sudeste com 12,85% da produção (Mello, 2013).

No ano de 2013 as exportações brasileiras do setor vitivinícola somaram 139,10 milhões de dólares, 2,32% superior ao ano de 2012. A quantidade de vinhos exportada em 2013 foi de 9,15 milhões de litros, o que representa um aumento de 58,42% em relação ao ano anterior (Mello, 2014).

A viticultura no Brasil está concentrada principalmente nos Estados das regiões Sul e Sudeste, onde se destacam os dois maiores produtores nacionais: Rio Grande do Sul, com 49.900 hectares de área colhida e produção de 840.251 toneladas sendo 90% desse material destinado à agroindústria para produção de vinhos, sucos e outros derivados e São Paulo com 9.514 hectares de área colhida e produção de 176.902 toneladas de uva (Mello, 2013).

Dados do Cadastro Vitícola mostram que em 2014 foram processadas pelas empresas do Rio Grande do Sul aproximadamente 65,9 milhões de kg de uvas viníferas e 540 milhões de kg de uvas americanas e híbridas para a produção de vinhos de mesa, vinhos finos, sucos e derivados. A produção de vinhos e derivados em 2014 chegou a 374.268.256 litros, destinados ao abastecimento do mercado interno e externo (Uvibra, 2015).

### 2.3. Aspectos fitossanitários da cultura da videira

Problemas de ordem fitossanitária são responsáveis por sérios prejuízos à viticultura (Somavilla *et al.*, 2012). Muitas doenças atacam a videira podendo causar grandes danos, caso medidas adequadas de controle não sejam adotadas. Os principais agentes causadores dessas doenças podem ser insetos, nematoides, fungos, vírus e bactérias. De um modo geral, as variedades americanas e híbridas são menos susceptíveis a doenças do que as europeias (Neroni, 2009).

Dentre os insetos que podem causar doenças em videiras, a presença da pérola-da-terra - *Eurhizococcus brasiliensis* (Wille) (Hemiptera: Margarodidae) – destaca-se pelos danos causados e pelas dificuldades de controle (Botton *et al.*, 2010). Este inseto é uma cochonilha de hábito subterrâneo, considerado uma das principais pragas da cultura da videira no Brasil (Nondillo *et al.*, 2012), citado como um dos agentes causadores do declínio da videira (Zart *et al.*, 2014).

Vários patógenos fúngicos podem infectar a videira, variando sua importância com a região geográfica e a resistência varietal. O ambiente tem um papel muito importante neste contexto, podendo contribuir para aumentar ou limitar o desenvolvimento das doenças (Sônego *et al.*, 2005). Considerando as doenças fúngicas que atacam a videira, podem-se destacar a antracnose, a fusariose, o míldio, o oídio e a podridão cinzenta (Giovannini, 2014).

A antracnose, doença causada pelo fungo *Elsinoë ampelina*, é uma moléstia comum no sul do Brasil, cujas condições climáticas são favoráveis à sua incidência, afeta com maior severidade os órgãos verdes e tenros da planta, onde ocasiona sintomas necróticos escuros. Nas folhas aparecem pequenas e numerosas manchas de contorno circular (Giovannini, 2014). A fusariose causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schl. f.sp. *herbemontis* Tocchetto, é a moléstia de solo mais disseminada nos vinhedos gaúchos e catarinenses, sendo considerada a

principal doença vascular causadora de morte de videiras na Serra Gaúcha. Os danos causados são bastante significativos, principalmente pela redução drástica da produtividade do vinhedo provocada pela morte de plantas (Sônego *et al.*, 2005; Alvorcem, 2009; Giovannini, 2014). O míldio da videira é causado pelo oomiceto *Plasmopara viticola* (Berk & Kurt) Berlese & de Toni (Mora, 2014). Essa doença é responsável por grandes danos à viticultura no sul do Brasil, com efeitos extremamente prejudiciais à produção, podendo causar perdas de até 100% na produção, caso medidas adequadas de controle não sejam tomadas (Giovannini, 2014; Mora, 2014). Já o oídio (*Uncinula necator*), raramente apresenta alta severidade no Brasil devido ao fato de as condições climáticas não serem, em geral propícias ao desenvolvimento deste fungo. A podridão cinzenta, também conhecida como podridão do cacho ou botritis, causada por *Botrytis cinerea*, existe em todos os países vitícolas do mundo, reduzindo qualitativa e quantitativamente a produção. É considerada a mais importante das podridões do cacho (Giovannini, 2014).

Quanto às doenças causadas por nematoides, danos decorrentes de seu ataque podem afetar seriamente a cultura da videira, prejudicando o seu desenvolvimento, o estabelecimento no campo e a qualidade dos frutos, constituindo-se, dessa forma, fator limitante à produtividade (Naves, 2005), bem como aumentando os custos despendidos na produção (Somavilla *et al.*, 2012). O gênero *Meloidogyne* (nematoide das galhas) é considerado um dos mais importantes causadores de danos em videiras. Esse nematoide induz a formação de galhas nas raízes, restringindo a absorção de água, nutrientes e o crescimento da planta, além de predispor-la ao ataque de outros patógenos (Somavilla *et al.*, 2012).

Dentre os problemas fitossanitários da videira, a ocorrência de viroses constitui-se em um fator preocupante, pois os vírus uma vez instalados na planta, acarretam no seu definhamento e queda da produção (Melo, 2004). As doenças causadas por vírus são difíceis

de serem controladas, além de bastante destrutivas. O ataque desses patógenos, geralmente, resulta no declínio das plantas e, conseqüentemente, na redução da longevidade do parreiral, diminuição da produção e da qualidade dos frutos (Lima, 2009).

Já foi verificada no mundo a ocorrência de mais de 60 vírus e viróides apontados por infectar videiras. As infecções virais estão amplamente distribuídas, e embora nem todas se destaquem em importância, algumas vem causando severos danos à produção nas mais diversas regiões (Pacífico *et al.*, 2011).

As viroses ocorrem em todas as regiões vitícolas do Brasil, e a sua incidência em várias dessas regiões, em cultivares americanas e viníferas, é bastante expressiva (Basso *et al.*, 2010).

No Brasil, dez vírus já foram detectados infectando videiras: *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV-1, -2, -3, -5 e -6), *Grapevine virus A* e *B* (GVA e GVB), *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV), *Grapevine fleck virus* (GFkV) e *Grapevine fanleaf virus* (GFLV). As viroses que se destacam pela incidência e importância econômica são o enrolamento da folha (GLRaV-1, -2 e -3) e o lenho rugoso da videira, complexo formado pelo intumescimento dos ramos (GVB), a acanaladura do lenho de Kober (GVA) e as caneluras do tronco de *Rupestris* (RSPaV) (Basso *et al.*, 2010; Fajardo *et al.*, 2003; Lima, 2009).

A virose do enrolamento foliar, causada por *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV) tem como sintomas o enrolamento dos bordos da folha para baixo, nas videiras viníferas tintas o limbo foliar adquire uma coloração vermelho-violácea, permanecendo, em geral, o tecido ao longo das nervuras principais com a cor verde normal. Nas viníferas brancas o limbo foliar adquire coloração amarelo-pálida. As folhas das plantas infectadas passam a apresentar aspecto rugoso e quebradiço. Os sintomas podem variar com as condições climáticas, época do ano, fertilidade do solo, estirpe do vírus e com a cultivar infectada

(Fajardo *et al.* 2003).

Os vírus GVA, GVB e RSPaV estão associados ao chamado complexo rugoso da videira, causando alterações no lenho das plantas infectadas. Os vírus GVA e RSPaV estão relacionados às caneluras do tronco. As plantas doentes, em geral, têm seu vigor diminuído e há retardamento na brotação das gemas, de uma a duas semanas. A casca do tronco é mais grossa e apresenta aspecto corticento. Já o vírus B da videira (GVB) é o causador do intumescimento dos ramos, doença em que os sintomas se caracterizam pelo engrossamento dos entrenós do ramo do ano, com fendilhamento longitudinal do tecido afetado. Em algumas cultivares viníferas e híbridas pode ser observado avermelhamento intenso nas folhas, em cultivares tintas, ou amarelecimento em cultivares brancas, além de enrolamento dos bordos foliares (Fajardo *et al.* 2003).

A degenerescência é uma das mais antigas e bem caracterizadas viroses da videira. O agente causal desta doença é o vírus *Grapevine fanleaf virus* (GFLV). No Brasil, essa doença tem pouca expressão, com incidência de 2% a 3%. Dentre os sintomas da degenerescência cabe ressaltar que nos ramos, observam-se entrenós curtos, bifurcações, achatamentos e nós duplos, bem como a proliferação de gemas e brotação fraca e atrasada (Fajardo *et al.*, 2003).

A alta incidência de viroses pode ser explicada pelo fato de a videira ser propagada vegetativamente, o que facilita a disseminação e favorece a ocorrência de doenças complexas, pelo acúmulo de diferentes espécies/estirpes virais em uma mesma planta (Kuhn & Fajardo, 2015).

A infecção viral interfere na fotossíntese, respiração, atividade enzimática, no equilíbrio hormonal e nutricional das plantas. A resposta das videiras às infecções depende de vários fatores, podendo variar em função das condições ambientais, do estágio fenológico da planta, da fertilidade do solo e, principalmente, em função da combinação envolvendo o

cultivar e/ou espécie da hospedeira e a estirpe e/ou espécie viral (Kuhn & Fajardo, 2015).

Ao se tratar de doenças bacterianas, no Brasil os viticultores tem tido problemas com a presença da bactéria *Agrobacterium vitis*, que afeta principalmente mudas novas ou viveiros. E na região do Submédio do Vale do São Francisco, pólo vitícola que abrange os municípios de Petrolina-PE e Juazeiro-BA, também a bactéria *Xanthomonas campestris* pv *viticola* causadora de uma severa doença denominada Cancro Bacteriano tem causado prejuízos aos viticultores (Kuhn & Fajardo, 2015).

Outra doença bacteriana que afeta videiras é o Mal de Pierce, causada por *Xylella fastidiosa*. Essa doença se mostra economicamente muito importante, e endêmica em videira em países das Américas do Norte e Central, não tendo sido ainda relatada sua presença no Brasil. Porém a presença de insetos potenciais vetores de *X. fastidiosa* já foi confirmada em vinhedos, bem como a presença da bactéria em território brasileiro em outros cultivos (Azevedo Filho *et al.* 2011).

Os amarelos, um complexo de doenças causadas por fitoplasmas, também apresentam importância dentre as doenças de origem bacteriana, estando presentes na maioria das regiões vitícolas do mundo. Embora as doenças causadas por estes organismos sejam muito semelhantes em sintomatologia, podem ser causadas por fitoplasmas molecularmente distintos (Caudwell, 1993), apresentando severidade e comportamento epidemiológico diferentes. As doenças associadas à fitoplasmas serão abordadas mais detalhadamente no tópico 2.5.

Alguns sintomas apresentados pelas videiras são comuns a mais de uma doença, ou podem se assemelhar muito em doenças distintas. Esse fato pode levar a um diagnóstico impreciso quando é realizada apenas uma avaliação sintomatológica das plantas. Doenças podem estar sendo subdiagnosticadas por apresentarem sintomas muito semelhantes a outras desordens.

## 2.4. Fitoplasmas

Os fitoplasmas são procariotos pertencentes à Classe Mollicutes (Oshima *et al.*, 2013) e Filo Tenericutes. Os Mollicutes possivelmente evoluíram de um ramo dos Firmicutes, bactérias Gram positivas com baixo conteúdo de G+C, através de um processo de evolução redutiva ou degenerativa (Marcone, 2014).

O primeiro relato da presença desses organismos procarióticos ocorreu em 1965, quando Doi *et al.* (1967) descobriram a presença de pequenos corpos pleomórficos em cortes ultrafinos de porções do floema de plantas afetadas por doenças do tipo amarelo. Esses agentes foram inicialmente denominados *mycoplasma-like organisms* (MLOs) devido a sua similaridade com os micoplasmas, bem como a sensibilidade ao antibiótico tetraciclina (Maejima *et al.*, 2014). Em 1992, o termo “fitoplasma” foi proposto no 9º *Congress of the International Organization of Mycoplasmaology* em substituição ao termo MLOs (Firrao, 2004).

Os fitoplasmas podem sobreviver e se multiplicar apenas em habitats isotônicos, como no floema das plantas e na hemolinfa dos insetos. Além de serem estritamente hospedeiros-dependentes, também podem se multiplicar nos insetos vetores, reproduzindo-se por fissão binária ou gemulação (Bertaccini, 2007; Bedendo, 2011).

Estudos recentes tem revelado interessantes características dos fitoplasmas (Maejima *et al.*, 2014), como a presença de uma membrana trilaminar uniforme em lugar de uma parede celular firme (Marcone, 2014). Em análises de microscopia eletrônica fitoplasmas parecem apresentar forma principalmente esférica a ovóide (Figura 1) e seu tamanho varia de 80 a 900nm, com média de 400nm (Oshima *et al.*, 2013; Marcone, 2014). Além disso, formas pleomórficas que passam pelas fendas estreitas das placas crivadas são também comuns (Marcone, 2014).

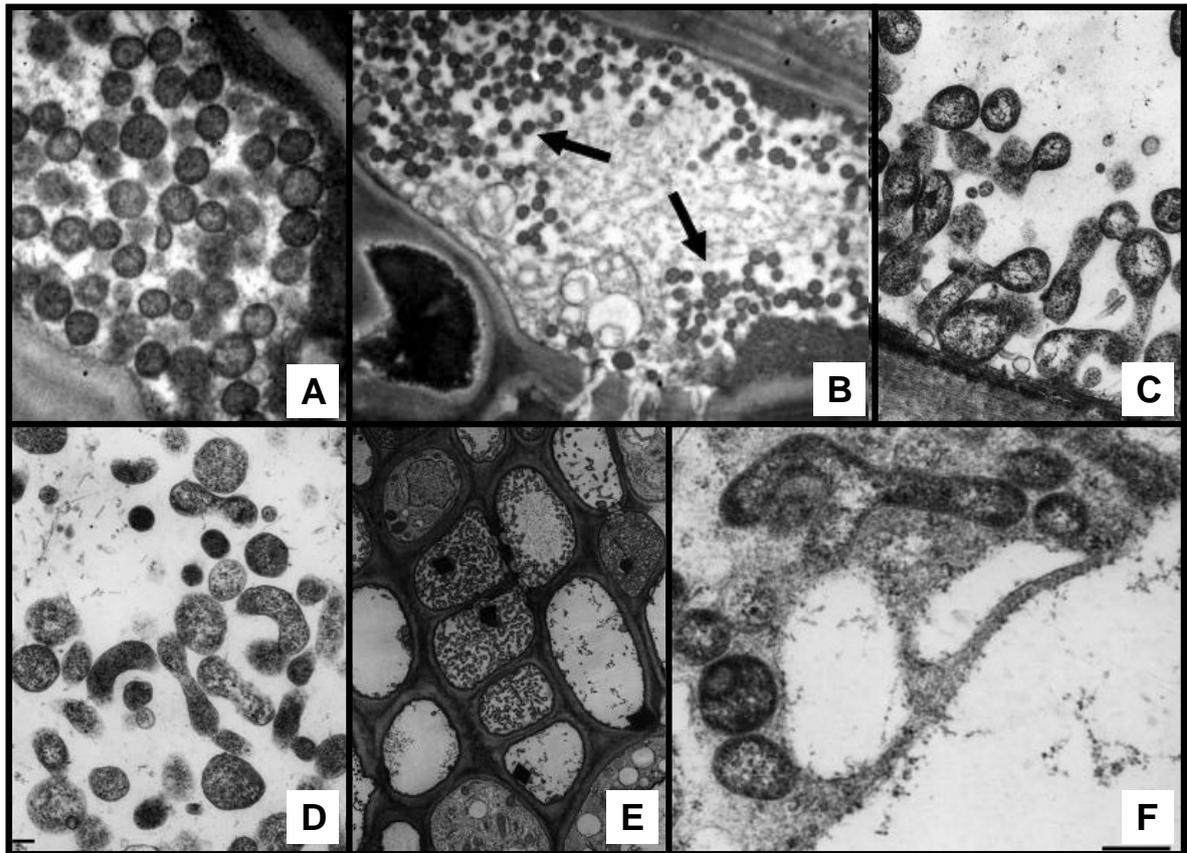


Figura 1. Fitoplasmas visualizados em vasos do floema por microscopia eletrônica. Destaque para a característica de pleomorfismo dos fitoplasmas. A e B: fitoplasmas em formas esférica, adaptado de Silva *et al.* (2009). C-F: formas pleomórficas de fitoplasmas, adaptado de Bertaccini & Duduk (2009).

Outra característica interessante sobre os fitoplasmas é o reduzido tamanho de seus cromossomos, que variam entre 680 e 1,600 kb. Estudos filogenéticos sugerem que o ancestral comum de todos os grupos de fitoplasmas é *Acholeplasma laidlawii*, já que nesses dois organismos (fitoplasma e *A. laidlawii*) a trinca UGG codifica para o aminoácido triptofano enquanto em outros procariotos, incluindo micoplasmas e espiroplasmas, o triptofano é codificado pela trinca UGA (Bertaccini, 2007).

Fitoplasmas são parasitas obrigatórios de plantas e insetos, dependem das células hospedeiras para obter compostos essenciais como açúcares, aminoácidos, íons e precursores

de nucleotídeos (Pacífico *et al.*, 2015). Os fitoplasmas ao longo de sua evolução tiveram seu genoma reduzido, fato que levou à perda da maioria de suas rotas metabólicas, como as de síntese de ATP, aminoácidos e nucleotídeos. Apesar da falta de muitos genes metabólicos importantes, fitoplasmas tem um grande número de genes transportadores, alguns dos quais são codificados por genes com várias cópias no genoma, sugerindo que importam muitos metabólitos das células hospedeiras (Miura *et al.*, 2012). Essa condensação do genoma e presença de genes de sistema de transporte refletem a adaptação dos fitoplasmas ao ambiente do floema das plantas, rico em nutrientes, e ajuda a explicar porque esses patógenos não são facilmente cultivados em condições axênicas (Pacífico *et al.* 2015).

Características biológicas e moleculares de fitoplasmas são ainda bastante incertas. Apesar de sua descoberta ter ocorrido há mais de quatro décadas, permanecem ainda como os fitopatógenos mais mal caracterizados. Não só devido a dificuldades no cultivo *in vitro* e em manipulá-los geneticamente, mas também devido às suas propriedades biológicas recalcitrantes, tais como sua restrição às células do floema, não transmissibilidade por inoculação manual e elevada especificidade do vetor (Maejima *et al.*, 2014).

Estudos recentes reportando o cultivo destas bactérias têm sido encarados com ceticismo (Dumoncaux *et al.*, 2014). Empregando meios de cultivo específicos disponíveis comercialmente, há relatos de crescimento de fitoplasmas pertencentes a diversos grupos ribossomais a partir de brotos de vinca (*Catharantus roseus*) micropropagados, infectados com o fitoplasma, como fonte inicial de inóculo. Apesar do tempo relativamente longo necessário para a incubação em meio líquido, em ágar o crescimento geralmente ocorre dentro de dois a cinco dias, como para a maioria das bactérias cultivadas. Mais estudos são ainda necessários, contudo, essa perspectiva de cultivo é agora uma opção real para os pesquisadores (Bertaccini *et al.*, 2014).

#### 2.4.1. Técnicas de detecção e classificação dos fitoplasmas

Inicialmente, as doenças associadas à fitoplasmas eram diagnosticadas por meio da verificação dos sintomas e pela observação de tecidos doentes em microscópio eletrônico. A microscopia eletrônica de transmissão tem sido uma importante ferramenta para a detecção de fitoplasmas em plantas, apesar do alto custo operacional e de não permitir a identificação destes agentes de doença (Flôres, 2009).

Para a detecção de fitoplasmas também já foram utilizadas técnicas especiais de coloração associadas à microscopia ótica comum e microscopia de fluorescência (Pereira, 2012). Análises sorológicas, como testes baseados na técnica de ELISA, para diagnóstico de doenças causadas por fitoplasmas começaram a ser utilizadas por volta de 1980 (Bertaccini & Duduk, 2009).

A detecção precisa e sensível desses micro-organismos é um pré-requisito para o manejo de doenças associadas à fitoplasmas. Técnicas moleculares baseadas em PCR desenvolvidas nos últimos 20 anos são agora usadas rotineiramente e mostram-se adequadas para detectar fitoplasmas. Em particular as técnicas que melhoram a detecção de fitoplasmas presentes em material propagativo de plantas e permitem identificar possíveis insetos vetores, deste modo ajudando a prevenir a disseminação de doenças e seus impactos econômicos (Duduk & Bertaccini, 2011).

O desenvolvimento da biologia molecular tem proporcionado novas ferramentas para classificar esses organismos. Durante a última década, o estabelecimento de um esquema de classificação baseado em padrões de polimorfismo de fragmentos de amplificação (RFLP) do gene 16S rDNA, permitiu classificar e identificar uma grande variedade de fitoplasmas com precisão e confiabilidade (Lai *et al.* 2014).

A aplicação de ensaios de PCR e *Nested-PCR* permitem detectar a presença de

fitoplasmas, mesmo em infecções mistas, em amostras coletadas a campo. O uso de sequências conservadas tem sido um grande avanço na detecção, identificação e classificação de fitoplasmas. Muito recentemente, um sistema de código de barras foi também aplicado para este fim (Bertaccini *et al.*, 2014; Contaldo *et al.*, 2014).

Outra técnica utilizada para detecção de fitoplasmas é o q-PCR, por meio deste é possível quantificar o acúmulo de produtos amplificados durante a reação. Este método apresenta algumas vantagens quando comparado com PCR convencional, principalmente no que refere a precisão, alto rendimento e ausência de manipulações pós-PCR, prevenindo possíveis contaminações (Torres *et al.*, 2005).

Um método mediado por ciclo de amplificação isotérmica (LAMP) foi desenvolvido (Notomi *et al.*, 2000). Ele contorna a sensibilidade da qPCR aos inibidores presente em extratos de plantas e a sua natureza isotérmica fornece o potencial para ser implantado a campo (Francois *et al.*, 2011; Tomlinson *et al.*, 2010). Por causa de sua velocidade, robustez e simplicidade, o uso de LAMP está ganhando popularidade para diagnóstico em medicina humana (Parida *et al.*, 2008) e, mais recentemente, na detecção de fitoplasmas em plantas (Kogovsekab *et al.*, 2014).

A metodologia mais utilizada para identificação de fitoplasmas inclui a extração de DNA, amplificação por PCR, *nested*-PCR, sequenciamento, análise das sequências e identificação *online*, por meio de banco de dados disponível, como o *Q-bank* (Contaldo *et al.*, 2014).

A classificação formal de fitoplasmas, usando métodos e critérios tradicionais aplicados para outros Mollicutes, tem sido restrita devido à dificuldade no cultivo axênico destas bactérias (Marcone, 2014).

O primeiro esquema de classificação destes micro-organismos foi baseado em

análises de RFLP de amplificadas do gene 16S rDNA. Este método mostrou-se um meio seguro para a diferenciação de um amplo conjunto de fitoplasmas, tendo se tornado o mais compreensível e amplamente aceito sistema de classificação (Duduk & Bertaccini, 2011).

A partir da última década, o estabelecimento desse esquema de classificação, baseado na técnica de RFLP do gene 16S rDNA, tem levado os pesquisadores a classificar e identificar ao nível de grupo uma ampla gama de fitoplasmas de modo correto e confiável (Lai *et al.*, 2014). Estudos desse gene tem produzido um detalhado quadro sobre a diversidade de fitoplasmas e suas relações filogenéticas com outros procaríotos (Bertaccini, 2007; Bertaccini *et al.*, 2014), demonstrando que fitoplasmas constituem um amplo grupo monofilético dentro da classe Mollicutes (Bertaccini, 2007).

De um modo geral, existem dois sistemas principais para classificação de fitoplasmas, ambos baseados na análise dos genes, dentre eles o 16S rDNA. O primeiro sistema classifica os fitoplasmas em grupos e subgrupos com base no padrão de restrição de um segmento do gene 16S rDNA. Nesse sistema de classificação, cada grupo de fitoplasmas é designado por um numeral romano e cada subgrupo por uma letra (Davis & Prince, 1994). O segundo sistema classifica os fitoplasmas em espécies “*Candidatus Phytoplasma*” com base na sequência nucleotídica do gene 16S rRNA (Sanches & Sakate, 2013).

Muitas sequências do gene 16S rRNA estão disponíveis no banco de dados *GenBank*, e é agora claro que essas regiões conservadas de DNA podem ser usadas como ferramentas suplementares para refinar a diferenciação entre fitoplasmas, melhorar a identificação das cepas, permitindo sua classificação em grupos e subgrupos (Wei *et al.*, 2007), e melhor estabelecer correlações entre estes micro-organismos e suas diferenças de patogenicidade, relações com o inseto vetor e susceptibilidade do hospedeiro (Bertaccini *et al.*, 2014).

Para uma diferenciação mais refinada de fitoplasmas, sequências de marcadores

genéticos adicionais, menos conservados, como genes de proteína ribossomal (*rp*), *rpsV* (*rpl22*), *rpsC* (*rps3*), *rplP*, *rpmC*, *rpsQ*, *rplN*, *rplX*, *rplE*, *rpsN*, *rpsH*, *rplF*, *rplR*, *rpsE*, *rpmD*, *rplO*, *rpoB*, genes *tuf*, *secA*, *secY*, *nus*, *vmp1*, *stamp*, *groEL*, *potC*, genes da região 23S rRNA, além da região de espaço intergênico 16S-23S rRNA tem sido usados. Isso por revelarem mais variação do que o gene 16S rDNA, possibilitando dessa forma uma clara indicação da relação entre as cepas de fitoplasmas, suas variantes derivadas, bem como sua distribuição geográfica (Bertaccini & Duduk, 2009; Bertaccini *et al.*, 2014; Marcone, 2014).

#### 2.4.2. Mecanismos de transmissão dos fitoplasmas

Fitoplasmas são transmitidos entre as plantas por insetos pertencentes à ordem Hemiptera (Himeno *et al.*, 2014). Cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae e Fulgoridae) são insetos exclusivamente fitófagos e são os principais vetores de fitoplasmas (Bertaccini, 2007).

Após ser ingerida por um inseto vetor, a bactéria atravessa a parede do trato intestinal, se multiplica na hemolinfa e aloja-se nas glândulas salivares. Quando o vetor infectado se alimenta em uma nova planta hospedeira, os fitoplasmas são introduzidos nos elementos de tubo crivado da planta junto com os fluídos salivares do inseto, a partir do qual eles se espalham sistemicamente por todo o organismo da planta (Miura *et al.*, 2012).

Há comumente um período de latência em que o inseto foi infectado, mas não é capaz de transmitir o patógeno, este período pode variar de algumas horas até algumas semanas (Bertaccini, 2007). Após o período de latência, os fitoplasmas podem ser transmitidos pelo inseto vetor durante toda a vida, mantendo com este uma relação do tipo circulativa-propagativa (Munhoz, 2012).

Muitos insetos podem adquirir fitoplasmas e ser considerados como "portadores", ou seja, determinados como fitoplasma-positivos por métodos moleculares. No entanto, apenas

algumas espécies podem ser competentes "vetores", ou seja, adquirir e transmitir fitoplasmas a uma planta com sucesso. O processo de transmissão é o resultado de uma interação tritrófica específica bem-sucedida entre o fitoplasma, o inseto vetor e a planta hospedeira (Olivier *et al.*, 2014).

Ao contrário da grande diversidade de plantas conhecidas como hospedeiras de fitoplasmas, apenas uma espécie de cigarrinha (Hemiptera: Cicadellidae), a *Daubulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923), foi confirmada como vetor no Brasil na cultura de milho, apesar de estudos terem verificado a presença de diversas espécies de cigarrinhas potenciais vetoras como *Atanus nitidus*, *Agalliana sticticollis*, *Balchlutha hebe* e *Agallia albidula*, que transmitiram, em condições experimentais, um fitoplasma do grupo 16SrIII, associado ao enfezamento do brócolis (Eckstein *et al.*, 2014; Kreycki, 2012).

A falta de informações sobre os vetores de fitoplasma tem sido um fator limitante para compreensão e controle das doenças associadas com esses patógenos (Eckstein *et al.*, 2014). É também importante compreender os mecanismos moleculares envolvidos na relação estrita de especificidade entre o patógeno e o inseto, a fim de controlar as doenças causadas por fitoplasmas (Maejima *et al.*, 2014).

A transmissão transovariana de fitoplasmas já foi reportada ocorrendo em algumas espécies de cigarrinhas como *Scaphoideus titanus*, *Hishimonoides sellatifomis* e *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Bertaccini, 2007; Bertaccini *et al.*, 2014). A possibilidade de transmissão de fitoplasmas via sementes também tem sido investigada (Bertaccini, 2007). O DNA de fitoplasma já foi detectado em embriões de coqueiro com a doença do amarelo letal do coco. Estudos *in vitro* com sementes comerciais de alfafa demonstraram as primeiras evidências de transmissão de fitoplasmas via sementes, porém para a maioria das espécies de plantas testadas, esse tipo de transmissão não ocorre (Bertaccini *et al.*, 2014).

Fitoplasmas podem ser eficientemente dispersados via propagação vegetativa quando um tecido vegetal ou gema infectada é transplantado sobre uma planta saudável, por propagação vegetativa de estacas diretamente, por práticas de micropropagação, bem como por outros métodos utilizados para multiplicar material vegetal que não a reprodução sexual (Duduk & Bertaccini, 2011).

#### 2.4.3. Doenças causadas por fitoplasmas

Fitoplasmas são agentes patogênicos, conhecidos como indutores de doenças que afetam várias centenas de espécies de plantas. Uma ampla gama de culturas, tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas, já foram verificadas sendo afetadas por moléstias associadas à fitoplasmas, incluindo sua ocorrência nas principais culturas agrícolas, plantas ornamentais, lenhosas e frutíferas (Hren *et al.*, 2009; Kube *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2014; Dumonceaux *et al.*, 2014; Maejima *et al.*, 2014). A infecção por fitoplasmas é muitas vezes fatal e provoca danos devastadores para a produção agrícola mundial (Maejima *et al.*, 2014).

Os fitoplasmas induzem mudanças dramáticas no desenvolvimento das plantas infectadas (Dumonceaux *et al.*, 2014; Maejima *et al.*, 2014), levando a uma série de sintomas que sugerem distúrbios no balanço dos reguladores de crescimento (Duduk & Bertaccini, 2011).

Os sintomas típicos de doenças causadas por fitoplasmas incluem a virescência (presença de clorofila em flores), a filodia (desenvolvimento de folhas verdes em vez de flores), a esterilidade de flores, proliferação de gemas axilares resultando em crescimento anormal ou superbrotamento, aspecto conhecido como vassoura das bruxa, alongamento anormal de entrenós e nanismo generalizado, além do encarquilhamento de folhas, da necrose de nervuras e alteração da pigmentação dos limbos foliares (Bertaccini *et al.*, 2014; Lee *et al.*,

2000). Muitos outros sintomas inespecíficos decorrentes do estresse ao qual às plantas são submetidas podem também ser gerados a partir da infecção por fitoplasmas (Maejima *et al.*, 2014).

Fitoplasmas geneticamente indistinguíveis podem estar associados com doenças induzindo diferentes sintomas e/ou afetando diferentes espécies de plantas, e também diferentes fitoplasmas podem estar associados com sintomas similares em uma mesma planta ou em diferentes hospedeiros (Bertaccini, 2007).

As doenças causadas por fitoplasmas foram inicialmente atribuídas a vírus de plantas devido a sua transmissibilidade por insetos e semelhança de sintomas (Maejima *et al.*, 2014). Já na década de oitenta, centenas de doenças eram referidas como sendo associadas à presença de fitoplasmas. Dentre elas destacam-se, o superbrotamento da batata, o declínio da pereira, os amarelos da videira, o enfezamento vermelho do milho, o nanismo do arroz, o superbrotamento do sândalo, os amarelos do pessegueiro, o superbrotamento e o lenho mole da macieira e o amarelo letal do coqueiro entre outras (Neroni, 2004).

Atualmente, sabe-se que nem todas as infecções causadas por fitoplasmas são necessariamente prejudiciais (Bertaccini *et al.*, 2014). Em algumas espécies de plantas ornamentais como o bico-de-papagaio (*Euphorbia pulcherrima* Wild), os sintomas gerados pela infecção são comercialmente interessantes. Estudos de Abad *et al.* (1997) e Lee *et al.* (1997) demonstraram que plantas infectadas por fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII apresentam proliferação de ramos. Esta característica é altamente desejável e importante para a produção de plantas envasadas, pois torna as plantas mais vistosas e comercialmente mais valorizadas (Ribeiro & Bedendo, 2006).

Fitoplasmas ocorrem em todo o mundo, no entanto há diferenças na distribuição dos vários grupos e subgrupos taxonômicos, havendo também distinção considerável em relação à

sua especificidade às plantas hospedeiras (Marcone, 2014).

Até o momento, já foram registrados fitoplasmas em 18 Estados brasileiros e no Distrito Federal distribuídos em 36 famílias botânicas e 95 espécies vegetais (Brioso, 2015). Algumas das doenças associadas à presença de fitoplasmas já detectadas no Brasil são: o enfezamento vermelho do milho (Bianchini, 2001), o enfezamento do repolho (Mello, 2007), da couve-flor (Rapussi, 2010), do tomateiro e da berinjela (Mello *et al.*, 2007), o superbrotamento da mandioca (Flôres, 2009), da primavera (Silva, 2008) e do maracujazeiro (Ribeiro *et al.*, 2008), o amarelo da ameixeira (Flôres, 2013), da abobrinha-da-moita (Melo, 2008), o amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (Silva *et al.*, 2008), o lenho mole da macieira (Ribeiro *et al.*, 2007), além do amarelo da videira (Neroni *et al.*, 2006).

Além dos fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI e 16SrIII, também há relatos no Brasil de fitoplasmas dos grupos 16SrII, 16SrV, 16SrVII, 16SrIX, 16SrXII, 16SrXIII, 16SrXV (Montano *et al.*, 2007; 2011).

No controle das doenças causadas por fitoplasmas, as medidas devem estar voltadas, sobretudo, para a prevenção, principalmente evitando a entrada do patógeno numa área anteriormente livre da doença. Para culturas perenes as medidas de controle baseiam-se principalmente na diagnose precoce e segura, em culturas anuais a diagnose mesmo que precoce não tem efeitos no controle (Neroni *et al.*, 2006).

## **2.5. Amarelo da videira**

Os amarelos da videira, causados por fitoplasmas, são doenças economicamente importantes que ocorrem em muitas áreas vitícolas em todo o mundo (Kuzmanovic *et al.*, 2008). Há relatos da ocorrência de doenças do tipo amarelo na Europa, em países como ....., África do Norte, Austrália, Estados Unidos, Chile e Brasil (Neroni *et al.*, 2006; Olivier *et al.*,

2014).

As desordens do tipo amarelo representam um conjunto de doenças comuns em videira, exibindo sintomas semelhantes associados com fitoplasmas molecularmente distintos (Bertaccini *et al.*, 2014). Fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI-B, 16SrI-C, 16SrII, 16SrIII, 16SrV-C, 16SrXII-A e 16SrXII-B já foram identificados infectando videiras (Belli *et al.*, 2010; Jezic *et al.*, 2013; Marcone, 2014).

Os sintomas de amarelo da videira são semelhantes àqueles relatados para outras doenças causadas por fitoplasmas (Figura 2). Dentre os sintomas evidenciados pode-se verificar avermelhamento dos limbos foliares em cultivares tintas e clorose em cultivares brancas, enrolamento dos bordos foliares, folhas rígidas e com aspecto quebradiço, necrose de nervuras, suberbrotaamento dos ramos, causando o sintoma conhecido como vassoura de bruxa, redução da lignificação dos ramos, gerando aspecto pendente, seca de inflorescências e murchamento de bagas com consequente queda na produção, bem como o declínio geral da planta (Neroni, 2004; 2009).

Os sintomas podem aparecer na planta toda ou em apenas uma parte dela, e a manifestação depende da variedade, do vigor da planta e do nível de infecção ocorrido (Neroni, 2009). Todas as variedades de *Vitis vinifera* são susceptíveis à doenças do tipo amarelo, porém em diferentes níveis (Neroni, 2009; Stoepler *et al.*, 2013).



Figura 2. Sintomas de doenças causadas por fitoplasma. A-E: sintomas característicos de flavescência dourada em videiras tintas (A-B-C) e em videiras brancas (D-E). Adaptado de: Bertaccini & Duduk (2009); Chuche & Thiéry (2014); Margaria *et al.* (2014).

A flavescência dourada foi a primeira doença do tipo amarelo a ser descrita em videiras, tendo sido relatada em 1954 no sudoeste da França (Caudwell, 1957). É apontada como uma doença grave e representa uma séria ameaça para a produção em muitas áreas vitícolas da Europa (Galletto *et al.*, 2014). A flavescência dourada é a mais severa dos amarelos da videira e está amplamente distribuída em muitas regiões vitícolas da França e da Itália, onde as infecções tem sido reportadas como catastróficas (Prezelj *et al.*, 2012). Surto também tem sido verificados na Slovenia, Portugal e Sérvia e há pouco foram relatadas ocorrências na Espanha, Suíça e Áustria (Kogovsekab *et al.*, 2014; Prezelj *et al.*, 2012).

A flavescência dourada tem como agente etiológico fitoplasmas do grupo 16SrV, conhecidos como *Elm yellow*. A transmissão pelo inseto vetor é altamente espécie específica,

sendo a cigarrinha *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae) apontada, até o momento, como único vetor conhecido por transmitir a flavescência dourada em videiras na Europa (Chuche & Thiéry, 2014). O *Grapevine flavescence dorée phytoplasma*, causador da flavescência dourada não foi ainda detectado no Brasil, sendo considerado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) uma praga quarentenária A1 (MAPA, 2015).

A doença conhecida como *Bois noir* (BN), também conhecida como ‘vergilbungskrankheit’ na Alemanha e ‘legno nero’ na Itália, é causada pelo ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ formalmente conhecido como Stolbur fitoplasma, pertencente ao subgrupo filogenético 16SrXII-A. Fitoplasmas desse grupo necessitam de hospedeiros herbáceos, como *Urtica dioica* e *Convolvulus arvensis*, para manter seus ciclos de vida, estas plantas servem como reservatórios da bactéria (Aryan *et al.*, 2014; Avramov *et al.*, 2008).

Os fitoplasmas causadores do BN são transmitidos para as videiras pela cigarrinha *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Hemiptera, Cixiidae) (Mori *et al.*, 2008). O BN é frequentemente uma doença endêmica, mas, em alguns casos, pode estar associada com epidemias, como reportado em várias regiões da Itália nos últimos anos (Belli *et al.*, 2010; Santi *et al.*, 2013).

Ao longo dos últimos anos, outras doenças indistinguíveis em sintomatologia à flavescência dourada e ao BN, mas associadas com diferentes fitoplasmas tem sido observadas e estudadas em muitos países por todo o mundo (Belli *et al.*, 2010). Como por exemplo, videiras infectadas por fitoplasmas do subgrupo 16SrI-B na Itália e na África do Sul, do subgrupo 16SrVII-A no Chile, e do subgrupo 16SrXII-B na Austrália (Bertaccini *et al.*, 2014), bem como fitoplasmas dos grupos 16SrI e 16SrIII no Brasil, nos estados de São Paulo e Paraná (Neroni, 2009).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Coleta de material vegetal**

Nos anos de 2014 e 2015, plantas apresentando sintomas típicos de amarelo da videira foram coletadas em diferentes municípios da Serra Gaúcha (Quadro 1). A escolha dos locais de coleta foi realizada aleatoriamente, em pontos onde por visualização superficial foram identificadas plantas com sintomas suspeitos de serem causados por fitoplasmas e a coleta dos materiais foi realizada no final do ciclo vegetativo, após a colheita dos frutos.

Os sintomas considerados foram: avermelhamento ou clorose dos limbos foliares em videiras tintas e brancas, respectivamente, o enrolamento dos bordos foliares para a face adaxial da folha, craquelamento das folhas, presença de aspecto necrótico nas nervuras, presença de mais de uma folha por nó caracterizando superbrotamento, encurtamento dos entrenós, bem como redução do porte da planta em relação às demais plantas do vinhedo.

No ano de 2014 foi coletado material de 27 plantas sintomáticas para o amarelo da videira, sendo assim consideradas aquelas que apresentavam pelo menos três das características acima citadas. Essas amostras foram constituídas por apenas um ramo de cada planta. Já no ano de 2015 foram coletados ramos e/ou raízes de nove plantas sintomáticas para o amarelo da videira. De cada planta foram coletados três ramos e quando possível também três amostras de raiz.

Quadro 1. Dados de identificação dos materiais vegetais coletados.

Variedade	Código da amostra	2014			2015		Local de Coleta
		Ramos	Ramos	Ramos	Ramos	Raízes	
Cabernet Sauvignon	CS. 1	X	---	---	---	Caxias do Sul	
Bordô	BD. 1	X	---	---	---	Caxias do Sul	
Itália	IT.1	X	---	---	---	Caxias do Sul	
Cabernet Sauvignon	CS. 2	X	X	X	X	Caxias do Sul	
Cabernet Sauvignon	CS.3	X	X	---	---	Caxias do Sul	
Niágara Branca	NB.1	---	X	X	X	Caxias do Sul	
Niágara Branca	NB.2	---	X	---	---	Caxias do Sul	
Concord	CO.1	---	X	---	---	Caxias do Sul	
Riesling Itálico	RI.1	X	---	---	---	Flores da Cunha	
Moscato Giallo	MG.1	X	---	---	---	Flores da Cunha	
Cardinal	CD.1	X	---	---	---	Flores da Cunha	
Bordô	BD.2	X	---	---	---	Flores da Cunha	
Isabel Precoce	IP.1	X	---	---	---	Flores da Cunha	
Bordô	BD.3	X	---	---	---	Nova Pádua	
Isabel	IS.1	X	---	---	---	Pinto Bandeira	
Malvasia	MV. 1	X	---	---	---	Pinto Bandeira	
Merlot	ME.1	X	---	---	---	Pinto Bandeira	
Merlot	ME.2	X	---	---	---	Pinto Bandeira	
Cabernet Sauvignon	CS.4	X	---	---	---	Pinto Bandeira	
Merlot	ME.3	X	X	X	X	Vale dos Vinhedos	
Merlot	ME.4	X	---	---	---	Vale dos Vinhedos	
Cabernet Sauvignon	CS.5	X	X	X	X	Vale dos Vinhedos	
Marselan	MS.1	X	---	---	---	Vale dos Vinhedos	
Marselan	MS.2	X	---	---	---	Vale dos Vinhedos	
Merlot	ME.5	X	X	---	---	Vale dos Vinhedos	
Merlot	ME.6	---	X	X	X	Vale dos Vinhedos	
Itália	IT.2	X	---	---	---	Vale dos Vinhedos	
Itália	IT.3	X	---	---	---	Vale dos Vinhedos	
Chardonnay	CH.1	X	---	---	---	Vale dos Vinhedos	
Chardonnay	CH.2	X	---	---	---	Vale dos Vinhedos	
Chardonnay	CH.3	X	---	---	---	Vale dos Vinhedos	
Merlot	ME.SS	X	---	---	---	Vale dos Vinhedos	
Cabernet Sauvignon	CS.SS	---	X	---	---	Vale dos Vinhedos	

### 3.2. Preparo e identificação do material vegetal coletado

O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz até a obtenção de um pó de espessura fina. Do ramo coletado para cada planta em 2014, porções de pecíolo e da nervura central das folhas foram maceradas e consideradas como uma amostra,

sendo estas identificadas conforme indicado no Quadro 1.

Para os materiais coletados em 2015, cada amostra foi composta por diferentes porções dos três ramos coletados de cada planta, destes foi ainda separada por excisão apenas a região dos vasos condutores para maceração, ou seja, foi retirada a região da epiderme do material. As raízes quando coletadas foram maceradas separadamente dos ramos, sendo consideradas como amostras diferentes. Cada amostra de raiz macerada foi constituída de diferentes porções dos vasos condutores, seguindo o mesmo procedimento realizado para avaliação dos ramos.

Para diferenciar as amostras coletadas de ramo e raiz da mesma planta na safra 2014/2015, foram adicionadas aos nomes dessas amostras as letras A, quando amostra oriunda de ramo, e B quando amostra oriunda de raiz. O material da safra 2013/2014 macerado foi armazenado à -80°C para posterior extração de DNA total, já o material da safra 2014/2015 foi submetido à extração de DNA total imediatamente após a maceração.

### **3.3. Extração de DNA**

Para a obtenção do DNA total, foram utilizados aproximadamente 150 mg do material vegetal previamente macerado em nitrogênio líquido, a este foram adicionados 800 µL de tampão de extração CTAB 2 % (2 % CTAB; 8,18 % NaCl; 0,74 % EDTA; 1,57 % Tris - HCl; 1,5 % PVP-40, pH 8) pré-aquecido à 60°C, com 2 µL de 2-mercaptoetanol por amostra. Os tubos foram incubados à 65°C em banho seco durante o período de uma hora, sendo homogeneizados por inversão a cada 15 minutos para ressuspender o material vegetal.

Após o período de incubação, foi realizada uma etapa de desproteínização, para isso se adicionou 600 µL de clorofil (clorofórmio/álcool isoamílico 24:1) e procedeu-se vigorosa agitação até que a solução apresentasse aspecto leitoso. Os tubos foram centrifugados a

14.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação a suspensão separou-se em três fases distintas. A fase aquosa, superior, foi transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 600 µL de álcool isopropílico gelado, após homogeneizados as suspensões foram mantidas a -20°C *overnight*.

O *pellet* precipitado foi isolado por centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos e posteriormente lavado com 1 mL de etanol 80 %. O processo de lavagem foi repetido duas vezes, seguido de uma etapa de purificação com NaCl 1M. O *pellet* foi homogenizado com 500 µL de NaCl e incubado por 60 minutos a 4°C. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foram adicionado 340 µL de álcool isopropílico gelado. O material foi incubado à -20°C *overnight*. O DNA foi separado a 14.000 rpm por 10 minutos, lavado duas vezes com etanol 80 %, seco e ressuspenso em 50 µL de água deionizada autoclavada. Para avaliar a presença de DNA foi realizada eletroforese em gel de agarose 1 %. O DNA foi tratado com RNase e armazenado à -20°C.

#### **3.4. Detecção de fitoplasma por *Nested-PCR***

Para a detecção de fitoplasmas foi utilizada a técnica de *Nested-PCR* com *primers* que amplificam a região correspondente ao 16S rDNA de fitoplasmas. Como controle positivo em todas as reações foi utilizado DNA obtido de plantas de milho comprovadamente infectadas por fitoplasma. Como controles negativos foram utilizados, uma amostra de DNA extraído de uma videira assintomática, e água deionizada destilada. Todos os oligonucleotídeos iniciadores, bem como sua sequência e referência estão listados na tabela 1.

Tabela 1. Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

Nome do <i>Primer</i>	Sequência (5'>3')	Fragmento gerado	Referência
P7	CGT CCT TCA TCG GCT CTT	~1800 pb	Smart <i>et al.</i> (1996)
P1	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T	-----	Deng & Hiruki (1991)
Tint	TCA CGC GTG TGC TCT AAC CAG C	~1650 pb	Smart <i>et al.</i> (1996)
R16 mF2*	CAT GCA AGT CGA ACG A	~1400 pb	Gundersen & Lee, (1996)
R16 mR1*	CTT AAC CCC AAT CAT CGA C		
R16 F2n	GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG	~1200 pb	Gundersen & Lee, (1996)
R16 R2	TGA CGC GCG GTG TGT ACA AAC CCC G		

\* - oligonucleotídeos utilizados apenas nas análises do ano de 2015.

Para avaliar a presença de fitoplasma nas amostras coletadas em 2014 foram utilizados para a primeira reação do *Nested-PCR* dois conjuntos de *primers*, P1/P7 e P1/Tint. Para serem utilizadas nestas reações, as amostras de DNA foram diluídas nas seguintes proporções: 1:5; 1:20; 1:50 e 1:100. Os produtos gerados foram submetidos à segunda reação do *Nested-PCR*, com o par de *primers* R16 F2n/R16 R2, sendo os *amplicons* da primeira reação utilizados diretamente como molde ou diluídos na proporção 1:30.

Além dos *primers* P1/P7 e P1/Tint, foi também utilizado o par de *primers* R16 mF2/R16 R1 na primeira reação do *Nested-PCR* para avaliar os materiais coletados em 2015. Para a realização da segunda reação foi utilizado o *primer* e o procedimento descritos no parágrafo acima.

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti<sup>®</sup> 96-Well *Thermal Cycler* (Applied Biosystems<sup>®</sup>) programado para realizar um ciclo de 1 minuto à 94°C para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos compreendendo as etapas de desnaturação por 1 minuto à 94°C, anelamento dos *primers* por 2 minutos à 50°C e extensão da fita de DNA à 72°C por 3 minutos. Após os 35 ciclos extensão final à 72°C por 7 minutos (Lee *et al.*, 1998).

As reações foram constituídas de 25 µM de tampão, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTPs, 0,2 µM de cada *primer* e 0,75 U da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>). Todas as reações foram ajustadas para volume final de 25 µL.

Para avaliação dos resultados, os produtos gerados na segunda reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, sendo corado com Gel *red*<sup>®</sup>. Como marcador de peso molecular e para quantificação das amostras foi utilizado o padrão *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen<sup>®</sup>). Os produtos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador.

### **3.5. Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados**

As amostras positivas no *Nested-PCR* após a quantificação dos produtos amplificados por comparação com *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen), foram submetidas à purificação com as enzimas Exonuclease I (EXO I) e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), para posterior sequenciamento.

O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório de Identificação Genética (Hospital de Clínicas de Porto Alegre) utilizando o equipamento ABI 3500 *Genetic Analyzer* com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems<sup>®</sup>). Os produtos de PCR foram marcados utilizando-se 5,0 pmol de cada *primer* (R16 F2n/R16 R2) e 1 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems<sup>®</sup>) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador Veriti<sup>®</sup> 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems<sup>®</sup>) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 1 min seguida de 40 ciclos de 96°C por 15 seg, 50°C por 15 seg e 60°C por 2 min. Depois de marcadas as amostras foram purificadas pela precipitação com BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems<sup>®</sup>) e eletroinjetadas no sequenciador automático.

As sequências obtidas foram analisadas através dos programas computacionais de construção Bio Edit V.7.0.9.0 e a análise de sequências utilizando *Multiple Sequence Alignment* - CLUSTALW.

### 3.6. Análise de RFLP *in silico*

Para análise dos mapas de sítios putativos de restrição das sequências do 16S rDNA do fitoplasma encontrado nas plantas sintomáticas de videira foi utilizado o programa pDraw32 V.1.1.110 (AcaClone Software). A sequência nucleotídica do 16S rDNA do fitoplasma obtida no presente estudo, bem como as sequências dos fitoplasmas representantes do grupo 16SrIII depositadas no GenBank foram clivadas e alinhadas no programa Bio Edit V.7.0.9.0. No programa pDraw32 V.1.1.110 foi realizada uma simulação de digestão com 17 enzimas, conforme proposto por Wei *et al.* (2007). As enzimas utilizadas foram *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*. Após a digestão *in silico*, foi gerada uma imagem simulada de eletroforese em gel de agarose 3%.

Os padrões gerados pela análise de RFLP *in silico*, correspondentes ao fitoplasma encontrado em videiras no presente estudo, foram comparados com aqueles dos fitoplasmas representantes dos diversos subgrupos do grupo 16SrIII, para fins do cálculo dos coeficientes de similaridade (F). Para cada par de fitoplasma, foi calculado o coeficiente de similaridade de acordo com a fórmula descrita por Nei e Li (1979),  $F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$ , onde  $N_x$  e  $N_y$  representam o número total de bandas no perfil de cada fitoplasma resultantes da digestão com as 17 enzimas e  $N_{xy}$  é o número de bandas compartilhadas pelos dois fitoplasmas. As bandas de até 50 pb foram consideradas para os cálculos.

### 3.7. Análise filogenética

Através do programa MEGA 5.0 uma árvore filogenética foi construída usando-se a sequência representativa do fitoplasma presente em videiras, identificado neste estudo, a sequência do fitoplasma representante padrão do grupo 16SrIII (*X-diseas phytoplasma*), a sequência do fitoplasma representante do subgrupo 16SrIII-F e as sequências de fitoplasmas

pertencentes ao grupo 16SrIII encontrados no Brasil (subgrupos 16SrIII-B; 16SrIII-J; 16SrIII-V; 16SrIII-U). Como grupo externo foi utilizada a sequência do microrganismo *Acholeplasma palmae*. Na construção da árvore filogenética foi utilizado o método de agrupamento Neighbour-joining e o teste Bootstrapping foi processado 1.000 vezes, para garantir a confiabilidade da posição dos ramos.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nos anos de 2014 e 2015 foi possível verificar na região serrana do Rio Grande do Sul a presença de videiras apresentando sintomas muito semelhantes àqueles descritos como característicos de doenças do tipo amarelo. Todas as 31 videiras amostradas apresentavam algum tipo de alteração de pigmentação das folhas (Figura 3.A-B).

Conforme Neroni (2009), os sintomas de amarelo podem aparecer na planta toda ou em apenas uma parte dela. Algumas das plantas coletadas apresentavam avermelhamento das folhas (Figura 3.F), bem como outros sintomas apenas em alguns ramos. A clorose foi observada nas lâminas foliares de cultivares brancas, como Chardonnay e Itália (Figura 3.D).

Ramos com superbrotamento, caracterizado pela presença de mais de uma folha em cada nó, presença de brotações, folhas novas, em nós onde já havia folhas maduras, como pode ser verificado nas figuras 3.A-C, e ramos com encurtamento da região dos entrenós (Figura 3.G) são sintomas que estavam presentes nas plantas coletadas. Caudwell (1985) verificou que em geral plantas infectadas por fitoplasmas apresentam este tipo de sintomas.

Enrolamento dos bordos foliares (Figuras 3.A-D-E), necroses na região das nervuras, perda de lignificação dos ramos, tornando-os pendentes (Figura 3.A), são sintomas também observados nas videiras amostradas. A redução no porte da planta, verificada visualmente, em comparação com as demais plantas do vinhedo foi outro aspecto observado no momento das coletas (Figura 3.E).

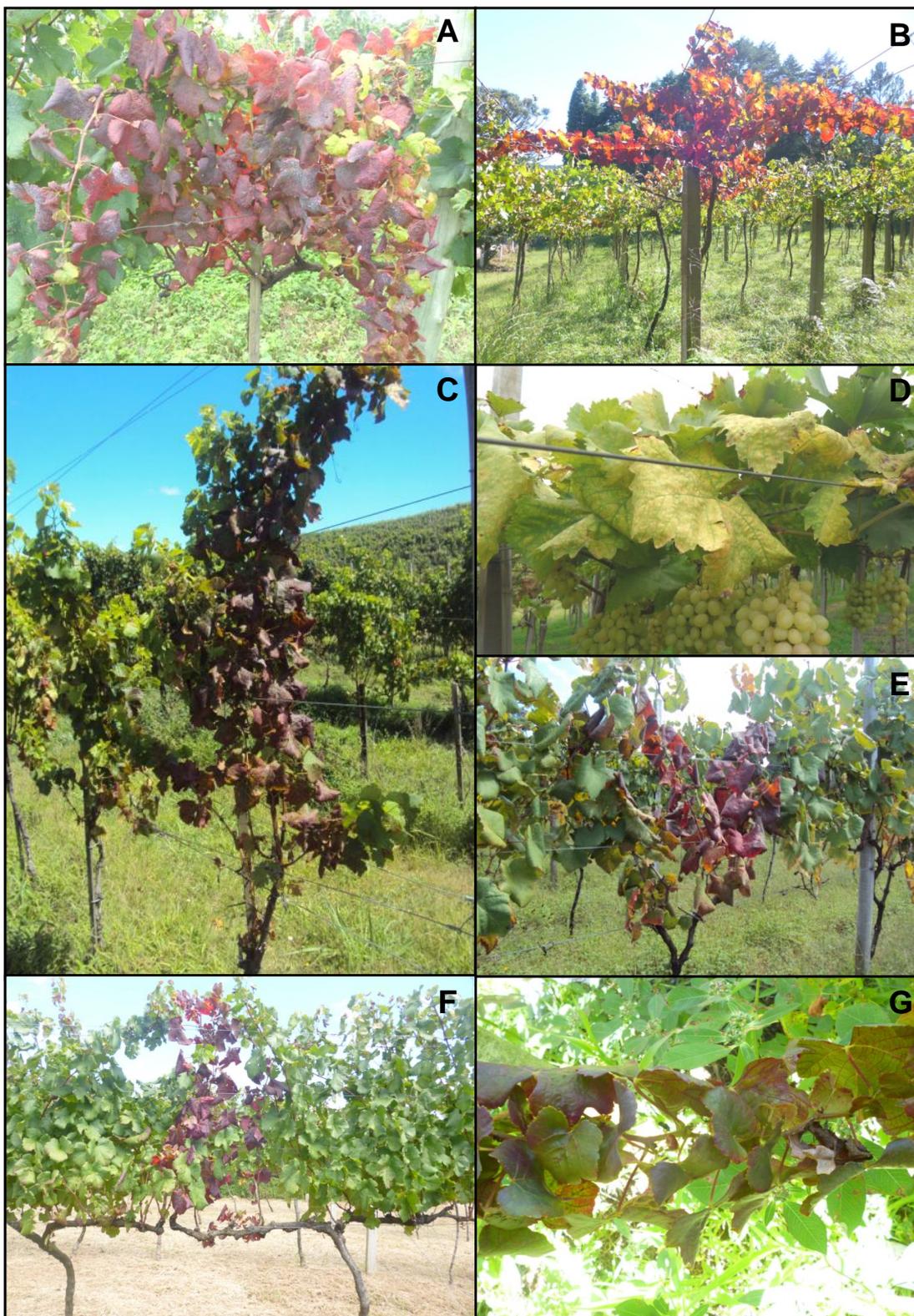


Figura 3. Plantas sintomáticas para o amarelo da videira coletadas no ano de 2014. A: Marselan 1, avermelhamento, superbrotamento e ramos pendentes ; B: Cabernet Sauvignon 1, superbrotamento; C: Moscato Giallo 1, avermelhamento, enrolamento dos bordos e superbrotamento; D: Italia 1, clorose e enrolamento; E: Marselan 2, avermelhamento em um dos ramos; F: Merlot 1, avermelhamento em um dos ramos; G: Cabernet Sauvignon.2, superbrotamento.

As plantas coletadas em 2015 também apresentavam alteração na pigmentação das folhas (Figura 4.A), sendo que em uma, CS.F 2 (Figura 4.B) os sintomas estavam evidentes em apenas um ramo. A amostra ME.5 foi oriunda de uma videira que apresentava acentuada redução de porte quando comparada às demais plantas do mesmo vinhedo (Figura 4.C). A planta em questão (ME.5) também apresentava superbrotamento de ramos (Figura 4.D) e alterações na formação dos frutos, como o murchamento e a maturação irregular das bagas (Figura 4.E).

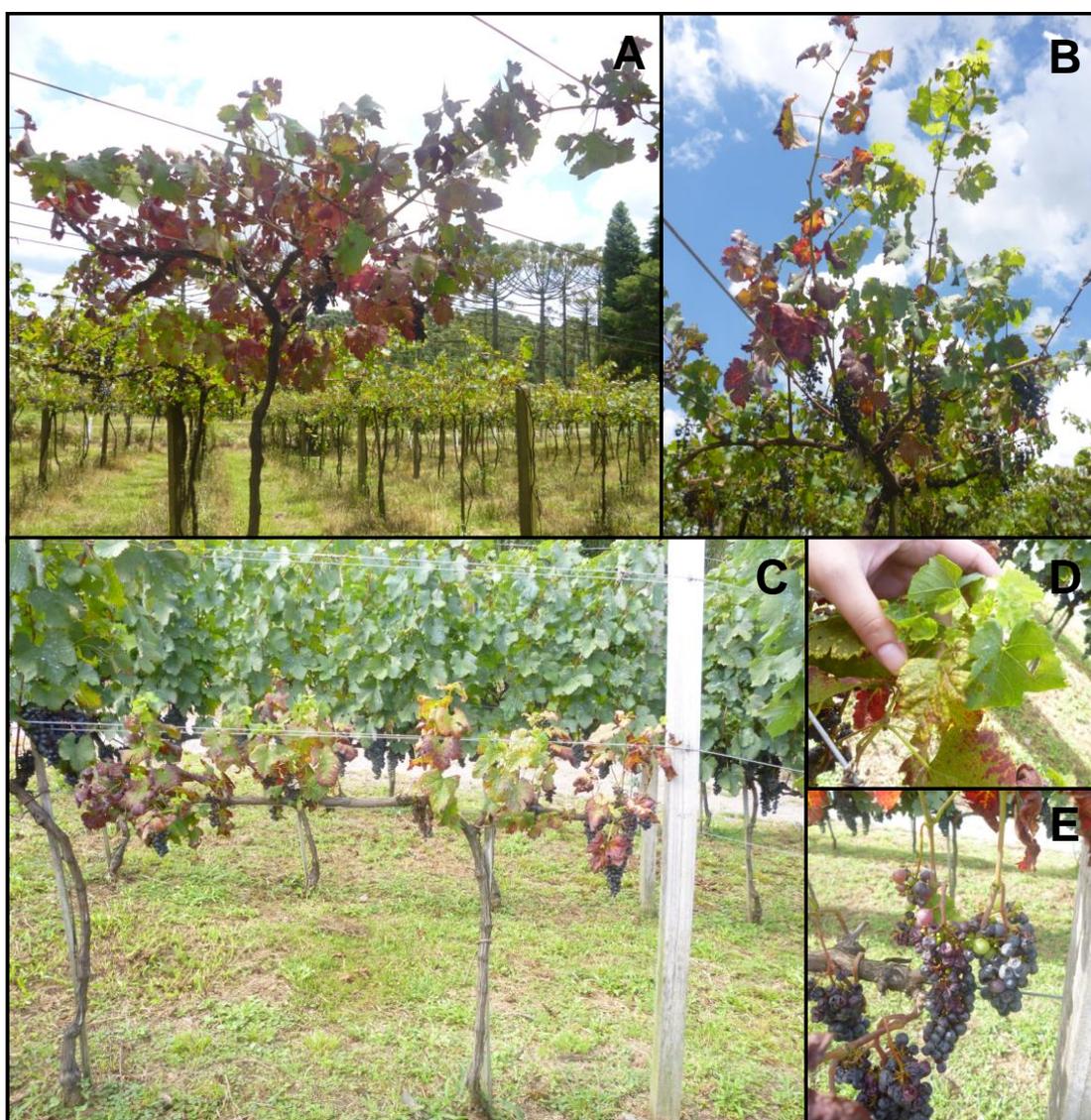


Figura 4. Plantas apresentando sintomas típicos de amarelo da videira. A: Cabernet Sauvignon (CS.2). B: Cabernet Sauvignon (CS.3). C: Merlot (ME.5). D: detalhe de ramo com superbrotamento. E: murchamento de bagas.

#### 4.1. Detecção de fitoplasmas por *Nested-PCR*

Apesar dos sintomas evidenciados nas plantas coletadas em 2014 indicarem a presença de infecção por fitoplasmas, esse fato não se confirmou pelo teste de detecção por *Nested-PCR*. Em nenhuma das 27 amostras avaliadas nesta safra foi verificada a amplificação do fragmento de 1,2kb do gene 16S rDNA de fitoplasma.

Estudos apontam que o melhor período para amostragem e detecção de infecções causadas por fitoplasmas é o início do verão, quando estes se apresentam em mais alta quantidade (Roggia *et al.*, 2014). Porém há dados que demonstram que fitoplasmas podem ser detectados tanto antes quanto bem após o período de floração (Roggia *et al.*, 2014). Todas as plantas avaliadas neste estudo foram amostradas após o período de maturação dos frutos, quando os sintomas apresentavam-se mais evidentes.

Para avaliação das amostras coletadas em 2015 foram realizadas algumas adaptações metodológicas, visando minimizar aspectos que possam ter causado resultados falsos negativos nas análises das amostras coletadas em 2014.

A primeira dessas adaptações foi a alteração da quantidade e tipo de material vegetal coletado. Em 2015 foram coletados três ramos de cada planta ao invés de um, como em 2014, bem como, durante o processo de separação do material para maceração foram selecionadas diferentes porções de cada um dos três ramos. Para algumas amostras também foi avaliado material oriundo de raízes.

Conforme Bertaccini (2007), o DNA para detecção e identificação de fitoplasmas pode ser extraído da região do floema da planta, já que nestas regiões a titulação é usualmente mais alta, mas sempre menor que 1% do DNA extraído.

A alteração do material coletado e da forma de processamento das amostras até a maceração permitiu avaliar maior número de locais dentro da mesma planta, bem como pode

ter favorecido a obtenção de uma titulação mais alta, ampliando assim as possibilidades de detecção de fitoplasmas.

Estudos apontam para uma distribuição marcadamente irregular dos fitoplasmas em plantas frutíferas lenhosas que apresentam período de dormência (Lee *et al.*, 1995; Heinrich *et al.*, 2001; Neroni, 2009). Hren *et al.* (2007) também demonstraram que a distribuição de fitoplasma pode variar dentro da videira, podendo esta ser uma justificativa para possíveis falsos negativos nas amostras analisadas, bem como para as alterações realizadas na segunda safra.

O segundo aspecto modificado no processamento das amostras coletadas no ano de 2015 foi a extração de DNA total imediatamente após a maceração do material vegetal com nitrogênio líquido. Essa adaptação permitiu obter uma amostra de DNA de melhor qualidade, com menor nível de oxidação. A verificação da redução do nível de oxidação se deu apenas pela visualização do aspecto do DNA total obtido, ficando este mais claro do que aquele obtido de material vegetal macerado e armazenado em temperatura de -80°C.

Compostos polifenólicos estão amplamente distribuídos em plantas e apresentam muitas funções, incluindo a proteção contra bactérias, fungos e insetos. Alterações no conteúdo de polifenóis, bem como no de outros metabólitos secundários já foram reportados em plantas infectadas por fitoplasmas (Margaria & Palmano, 2011). Acredita-se que estes compostos possam interferir na qualidade do DNA total extraído, prejudicando a detecção de fitoplasmas.

A terceira modificação foi em relação aos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na primeira reação do *Nested*-PCR. Na análise das amostras coletadas na segunda safra foi utilizado também o par R16 mF2/R16 R1, além dos pares P1/P7 e P1/Tint.

Aplicando-se as referidas modificações foram avaliadas nove plantas sintomáticas para o amarelo da videira no ano de 2015. No total foram obtidas 14 amostras de DNA, já que para

cinco plantas foi possível coletar material de ramos e raízes.

Fitoplasmas foram detectados em amostras da variedade Cabernet Sauvignon (CS.F 1A, CS.F 1B, CS.F 2A) e da variedade Merlot (ME.T 1A) (Figura 5). As amostras positivas para a presença de fitoplasmas foram evidenciadas pela presença de uma banda de aproximadamente 1,2kb, típica de fitoplasmas quando se utiliza os oligonucleotídeos iniciadores R16 mF2/R16 R1 na primeira e R16 F2n/R16 R2 na segunda reação. O controle positivo, amostra de DNA de milho infectado por fitoplasmas, também resultou na amplificação de uma banda de 1,2kb, conforme esperado. Para os controles negativos, planta de videira assintomática e água destilada deionizada, não houve amplificação.

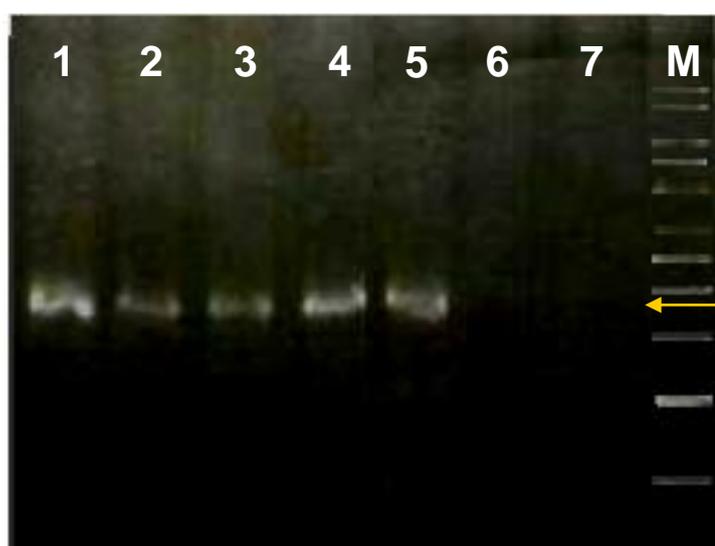


Figura 5. Gel de agarose apontando a presença de fitoplasmas em plantas sintomáticas e ausência em planta assintomática de videira, pelo uso de Nested-PCR com os primers R16mF2/mR1 e R16F2n/R2. As bandas presentes no gel correspondem às amplificações de fragmentos genômicos de 1,2Kb. Colunas: 1: CS.F 1A; 2: CS.F 1B; 3: CS.F 2A; 4: ME.T 1A; 5: Controle positivo, fitoplasma isolado de plantas de milho; 6: videira assintomática; 7: água; M: Marcador molecular 1kb ladder.

Neroni *et al.* (2006) já verificaram a presença de plantas apresentando sintomas característicos de amarelo da videira, semelhantes aos relatados no presente estudo, em vinhedos localizados nos estados de São Paulo e Paraná. Em seu estudo, a associação de fitoplasmas com plantas apresentando sintomas de amarelo da videira também foi confirmada.

No Rio Grande do Sul, estado com a maior contribuição para a produção nacional de uvas, o amarelo da videira estava, até o momento, sendo subdiagnosticado. Com o presente estudo foi possível confirmar a presença de fitoplasmas infectando videiras das cultivares Cabernet Sauvignon e Merlot.

Segundo Mello & Machado (2015b) dentre as cultivares da espécie *V. vinifera*, produtoras de uvas finas tintas, destacam-se Cabernet Sauvignon e Merlot como as que representam os maiores volumes processados, logo o amarelo da videira foi verificado em cultivares de grande relevância nos quesitos volume produzido e processado. Em 2014, no Rio Grande do Sul foram processados 8.556.337 kg de uvas da cv. Cabernet Sauvignon e 7.846.034 kg da cv. Merlot. Estas duas cultivares representaram em 2014 mais de 55% do total de uvas viníferas tintas processadas no Estado.

Embora a técnica de duplo PCR seja considerada sensível, não é rara a ocorrência de resultados negativos para plantas que exibem sintomas típicos de infecção por fitoplasmas. Os fatores responsáveis pelo falso negativo nas reações de amplificação podem estar relacionados à distribuição irregular de fitoplasmas nos tecidos, justificando, possivelmente, a não detecção em amostras com sintomas (Eckstein & Bedendo, 2010). Conforme Eckstein *et al.*, (2012) a ausência de amplificação em amostras oriundas de plantas sintomáticas pode ser também atribuída à presença do patógeno em níveis abaixo do limiar de detecção. Estes fatos podem ser possíveis justificativas para alguns dos resultados negativos obtidos neste estudo.

## 4.2. Caracterização molecular do fitoplasma

Após a etapa de detecção, foi realizada a caracterização molecular do fitoplasma com base na sequência de nucleotídeos de um fragmento do gene 16S rDNA. Esta sequência foi gerada como produto final do *Nested-PCR* (segunda reação), a qual foi diretamente submetida ao sequenciamento de bases nucleotídicas.

Em relação ao fitoplasma encontrado nas amostras de videira, quando sua sequência foi comparada com as sequências de fitoplasmas depositadas no GenBank, foi observado que estas compartilharam 99% de similaridade com diversos grupos de fitoplasmas. Este fato revelou que fitoplasmas estavam presentes nas quatro amostras oriundas de videiras sintomáticas.

O alinhamento e a comparação das regiões de alta precisão do sequenciamento (730pb) compartilhadas pelas quatro amostras de fitoplasma, (Figura 6) mostrou que as mesmas são idênticas, indicando se tratar de fitoplasmas do mesmo grupo.



Figura 6. Alinhamento das regiões de alta precisão do sequenciamento compartilhadas pelas quatro amostras de fitoplasma identificadas nas videiras sintomáticas.

#### 4.2.1. Análise de RFLP *in silico*

Considerando que as quatro amostras pertencem ao mesmo grupo de fitoplasmas (Figura 6), foi tomada a sequência mais longa com 1064 pb correspondente à amostra CS.F 2A, para identificação molecular do fitoplasma. As análises de RFLP *in silico*, conduzidas com 17 enzimas de restrição, revelaram que os padrões eletroforéticos produzidos pelo fitoplasma encontrado na videira apresentaram maior similaridade com aqueles gerados pelo fitoplasma representante do subgrupo 16SrIII-J e pelo fitoplasma representante do subgrupo 16SrIII-F. As diferenças encontradas nos perfis com as enzimas BstUI e HpaII foram desconsideradas já que as mesmas correspondem a uma falha de sequenciamento corrigida posteriormente com base na sequência reversa, conforme pode ser observado na Figura 7.

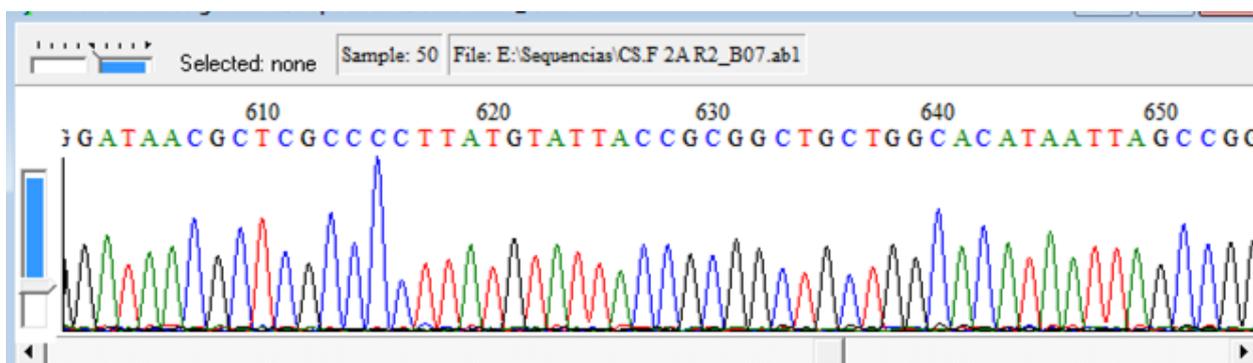


Figura 7. Eletroferograma da sequência reversa da amostra CS.F 2A.

Os resultados das análises de RFLP *in silico*, portanto, apontam que o fitoplasma encontrado nas videiras amostradas está mais relacionado com membros dos subgrupos 16SrIII-J e 16SrIII-F (Figura 8).

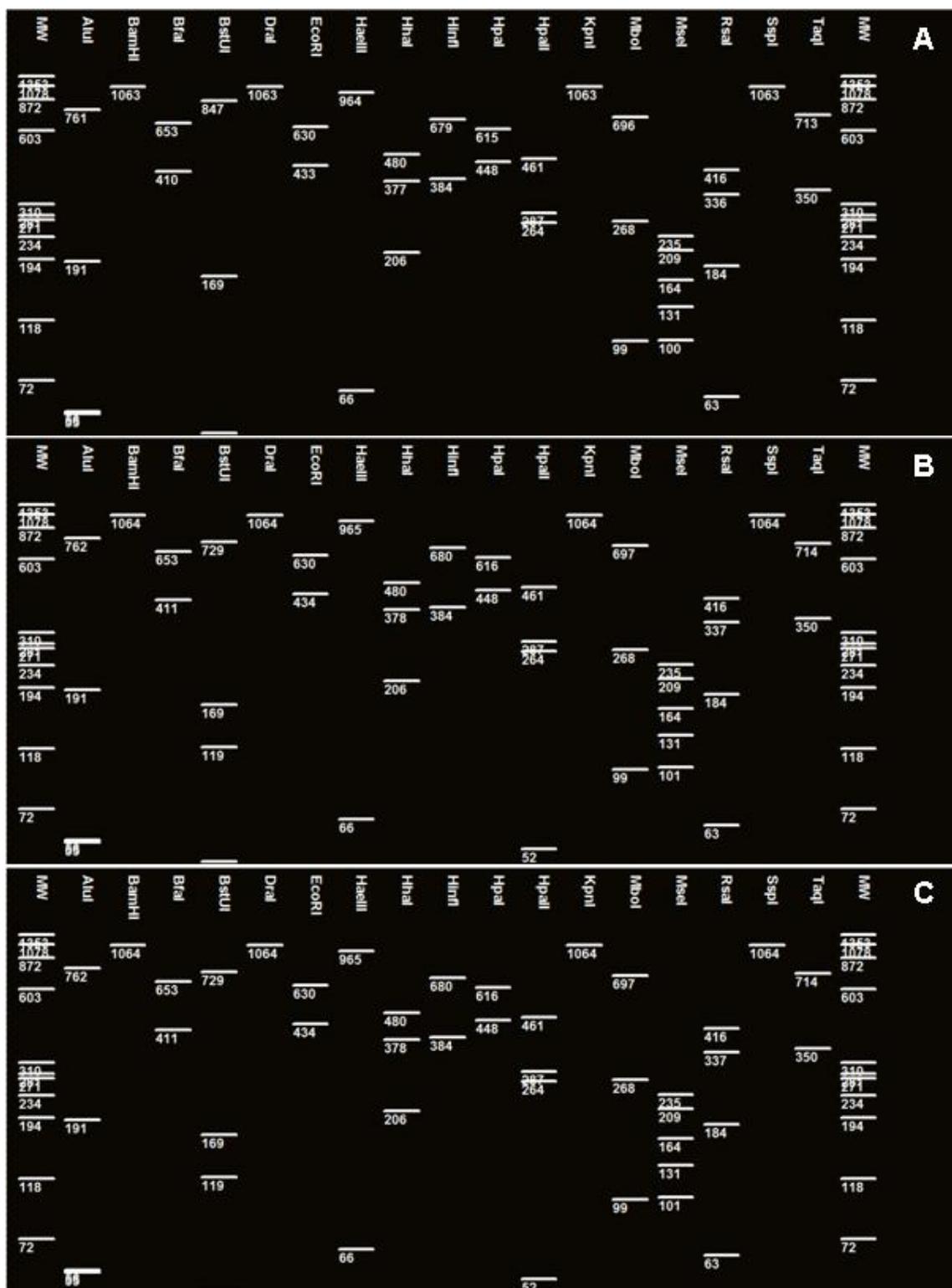


Figura 8. Padrões de restrição de RFLP gerados pela digestão in silico de fragmentos de DNA correspondentes à região do 16S rDNA do fitoplasma encontrado em plantas de videira (A), do representante do 16SrIII-J (B) e do representante do subgrupo 16SrIII-F (C). Enzimas de restrição: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*. M: marcador  $\phi$ X174-DNA *HaeIII*.

Os fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII (*X-disease*) estão associados a várias doenças. Até o presente momento, representantes deste grupo já foram verificados infectando mais de 50 espécies vegetais em território brasileiro (Brioso, 2015), causando doenças como o lenho mole da macieira (Ribeiro, *et al.*, 2007), o enfezamento do tomateiro e da berinjela (Mello, *et al.*, 2007), o enfezamento do brócolis (Eckstein, *et al.*, 2013) e o superbrotamento da mandioca (Flôres, *et al.*, 2013).

A associação de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII com videiras sintomáticas para doenças do tipo amarelo já foi evidenciada em países como Estados Unidos (Davis *et al.*, 1998) e Israel (Orenstein *et al.*, 2001). No Brasil, a ocorrência de materiais infectados por fitoplasmas pertencentes aos grupos 16SrI (*Aster yellow*) e 16SrIII (*X-disease*) já foi relatada em videiras das cultivares Itália, Cabernet Franc e Benitaka nos estados de São Paulo e Paraná (Neroni *et al.*, 2006; Montano *et al.*, 2011).

Já fitoplasmas pertencentes especificamente ao subgrupo 16SrIII-J foram verificados, no Brasil, infectando plantas das espécies *Celosia spicata*, *Celosia argenta*, *Cucumis anguria*, *Cucurbita moschata*, *Luffa cylindrica*, *Momordica charantia*, *Sechium edule* e *Lycopersicon esculentum*, *Brassica oleracea*, dentre outras (Brioso, 2015; Rapussi, *et al.*, 2012).

#### 4.2.2. Análise filogenética

Uma árvore filogenética foi construída usando-se a sequência representativa do fitoplasma presente na videira (1064pb da amostra CS.F 2A), a sequência do fitoplasma representante padrão do grupo 16SrIII (X disease phytoplasma – L04682), a sequência do fitoplasma representante do subgrupo 16SrIII-F (AF510724) e as sequências de fitoplasmas pertencentes ao grupo 16SrIII encontrados no Brasil (subgrupos 16SrIII-B - GU193977;

16SrIII-J – AF147706; 16SrIII-V – GU292982; 16SrIII-U – HM589213). As ramificações da árvore mostram que o fitoplasma da videira amostrada na região serrana do Rio Grande do Sul está estritamente relacionado ao fitoplasma representante do subgrupo 16SrIII-J (Figura 9).

Este achado é resultante da evidência de que ambos os fitoplasmas emergem do mesmo ramo e formam um agrupamento estatisticamente significativo mostrando a proximidade filogenética entre ambos. Este resultado confirma aqueles mostrados pelas análises de RFLP virtual que revelaram a similaridade dos padrões de restrição entre o fitoplasma da videira e os representantes dos subgrupos 16SrIII-F e 16SrIII-J. No entanto, a análise filogenética aponta que o fitoplasma da videira pertence ao subgrupo 16SrIII-J ou que pode ser uma linhagem do fitoplasma representante deste subgrupo.

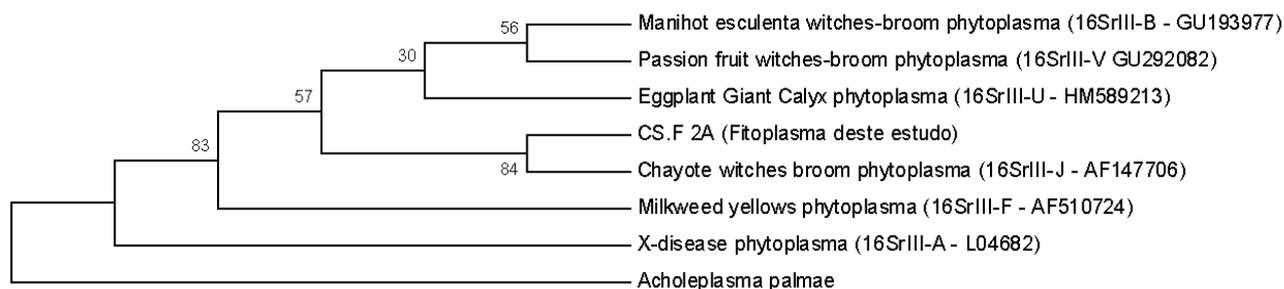


Figura 9. Árvore filogenética construída usando o método Neighbor-Joining com as sequências da região 16S rDNA do fitoplasma identificado na videira, de fitoplasmas representantes dos subgrupos 16SrIII-B, 16SrIII-V, 16SrIII-U, 16SrIII-J, 16SrIII-F, 16SrIII-A e o procarioto *Achleplasma palmae*.

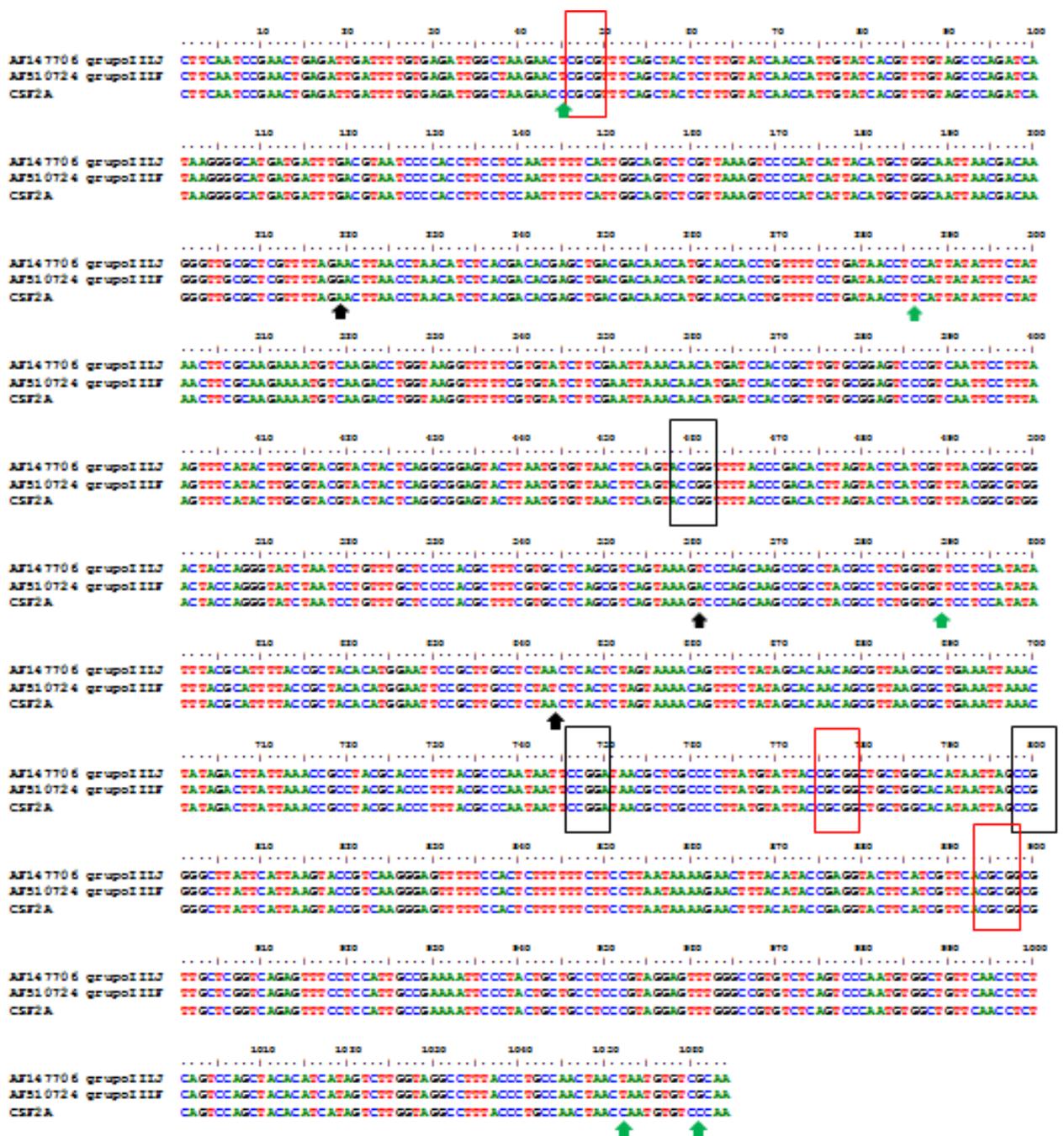


Figura 10. Alinhamento da sequência parcial da região 16S rDNA da amostra CS.F 2A com as sequências dos fitoplasmas representantes dos subgrupos 16SrIII-J e 16SrIII-F. Retângulos preto marcam sítios de clivagem com a enzima *HpaII*, retângulos vermelhos marcam sítios de clivagem com a enzima *BstUI*, ▲ Indica os pontos em que a sequência do fitoplasma da amostra CS.F 2A difere do fitoplasma do subgrupo 16SrIII-F, ▲ Indica os pontos em que a sequência do fitoplasma da amostra CS.F 2A difere das sequências dos fitoplasmas dos subgrupos 16SrIII-F e 16SrIII-J.

A sequência parcial da região 16S rDNA da amostra CS.F 2A apresenta os mesmos sítios de cortes com as enzimas de restrição HpaII e BtsUI do que as sequências dos fitoplasmas representantes dos grupos 16SrIII-J e 16SrIII-F depositadas no GeneBank, confirmando se tratar de um fitoplasma do grupo 16SrIII e de um destes dois subgrupos, conforme pode ser evidenciado na Figura 10. Por outro lado, a sequência da amostra CS.F 2A apresentou oito diferenças (alterações de base) com respeito à sequência representativa de fitoplasmas do subgrupo 16SrIII-F e cinco com respeito a fitoplasmas do subgrupo 16SrIII-J. Assim, em conjunto, RFLP-PCR e análise filogenética, apontam que os fitoplasmas presentes em videiras da região serrana do Rio Grande do Sul são pertencentes ao grupo III, provavelmente ao subgrupo J.

A identificação molecular de fitoplasmas é feita com fragmentos genômicos de 1245pb. No presente caso, as análises de RFLP e filogenética foram realizadas com fragmentos genômicos de 1064pb. Assim, a identificação do fitoplasma da videira como membro do subgrupo 16SrIII-J não pode ser considerada como definitiva. No entanto, com base nos resultados concordantes obtidos no presente estudo é possível indicar, preliminarmente, o fitoplasma encontrado em videira como pertencente ao subgrupo 16SrIII-J.

## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo foi possível concluir que:

- Videiras de diferentes variedades apresentando sintomas sugestivos de infecção por fitoplasma estão presentes em vinhedos comerciais na região serrana do Rio Grande do Sul.
- Fitoplasmas estão associados com plantas de videiras apresentando sintomas típicos de doença do amarelo.
- A doença conhecida como amarelo da videira foi confirmada por *Nested-PCR* em plantas das cultivares Cabernet Sauvignon e Merlot na região serrana do Rio Grande do Sul.
- Para detecção de fitoplasmas em videiras os oligonucleotídeos iniciadores R16mf2/R16R1 e R16F2n/R16R2 são os mais indicados.
- O fitoplasma detectado nas plantas de videira avaliadas é pertencente ao grupo 16SrIII.
- O amarelo da videira estava até o momento sendo subdiagnosticado no Estado do Rio Grande do Sul.

## **6. PERSPECTIVAS**

- Avaliar a incidência de fitoplasmas nos diferentes municípios da Serra Gaúcha.
- Avaliar a presença de fitoplasmas infectando videiras assintomáticas.
- Verificar a ocorrência de infecções mistas.
- Avaliar as populações de possíveis insetos vetores presentes nos vinhedos.
- Realizar testes de transmissão de fitoplasmas pelos insetos vetores.
- Testar plantas forrageiras presentes nos vinhedos quanto à presença de fitoplasmas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, J.A.; Randall, C.; Moyer, J.W. (1997). Genomic diversity and molecular characterization of poinsettia phytoplasma. **Phytopathology**. 87:S1.
- Alvorcem, C.P. (2009). Critérios para escolha de porta-enxertos para a videira no Rio Grande do Sul. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Curso de Tecnologia em Viticultura e Enologia. Instituto Federal do Rio Grande do Sul de Educação, Ciência e Tecnologia. Bento Gonçalves, Brasil.
- Aryan, A.; Brader, G.; Mörtel, J.; Pastar, M.; Riedle-Bauer, M. (2014). An abundant ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ tuf b strain is associated with grapevine, stinging nettle and *Hyalesthes obsoletus*. **Europe PMC Funders Group**. 140(2): 213–227.
- Avramov, Z.; Gillet, J.; Laginova, M. (2008). First detection of stolbur phytoplasma in grapevines (*Vitis vinifera* cv. Merlot) affected with grapevine yellows in Bulgaria. **J. Phytopathol.** 156, 112–114.
- Azevedo Filho, W.S.; Paladini, A.; Botton, M.; Carvalho, G.S.; Ringenberg, R.; Lopes, J.R.S. (2011). Manual de Identificação de Cigarrinhas em Videira. Brasília. Embrapa

Informação Tecnológica. 95p. (Embrapa Uva e Vinho).

Basso, M.F.; Fajardo, T.V.M.; Eiras, M.; Ayub, R.A.; Nickel, O. (2010). Detecção e identificação molecular de vírus associados a videiras sintomáticas e assintomáticas. **Ciênc. Rural**. 40: 2249-2255.

Bedendo, I.P. (2011). Fitoplasmas e espiroplasmas. In: Amorin, L.; Rezemde, J.A.M.; Bergamim Filho, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4.ed. São Paulo. Agronômica Ceres. p.255-270.

Belli, G.; Bianco, P.A.; Conti, M. (2010). Grapevine Yellows in Italy: Past, present and future. **J. Plant Pathol**. 92(02):303:326.

Bertaccini, A. (2007). Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. **Front. Biosci**. 12:673-689.

Bertaccini, A.; Duduk, B. (2009). Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. **Phytopathol. Mediterr**. 48:355–378.

Bertaccini, A.; Duduk, B.; Paltrinieri, S.; Contaldo, N. (2014). Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. **Am. J. Plant Sci**. 5:1763-1788.

Bianchini, L. (2001). Identificação molecular de isolados do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho coletados no estado de São Paulo. **Dissertação de mestrado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, Brasil.

Botton, M.; Melo, G.W.B.; Oliveira, O.L.P.; Onzi, I. (2010). Efeito da cobertura vegetal sobre a pérola-da-terra (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira. **Acta Sci. Agron.** 32: 681-684.

Brioso, P.S.T. (2015). Brasil - Fitoplasma ("Phytoplasma"). Hospedeiros no Brasil. **Disponível (online)** <http://www.fito2009.com/fitop/fitoplasmas.html/> (16 de abril).

Camargo, U.A. (2015a). Porta-enxertos e cultivares de videira. **Disponível (online)** <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/portaenx.html> (10 de junho).

Camargo, U.A. (2015b). Uva para processamento: cultivares. **Disponível (online)** [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva\\_para\\_processamento/arvore/CONT000g5f8cou802wx5ok0bb4szwyx060i6.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva_para_processamento/arvore/CONT000g5f8cou802wx5ok0bb4szwyx060i6.html) (10 de junho).

Camargo, U.A.; Tonietto, J.; Hoffmann, A. (2011). Progressos na viticultura Brasileira. **Rev. Bras. Frutic.** 33:144-149. ISSN 0100-2945.

Caudwell, A. (1957). Deux Années d'études sur la Flavescence dorée, nouvelle maladie grave de la vigne. **Annales de l'Amélioration des Plants.** 12:359-393.

Caudwell, A.; Dalmasso, A. (1985). Epidemiology and vectors of grapevine viruses and yellows diseases. **Phytopathol. Mediterr.** 24:170-176.

- Caudwell, A. (1993). Advances in grapevine yellows research since 1990. In: Meeting ICVG 11, **Abstracts**. Ed. Montreaux, p79-83.
- Chuche, J. & Thiéry, D. (2014). Biology and ecology of the Flavescence dorée vector *Scaphoideus titanus*: a review. **Agron. Sustain. Dev.** 34:381–403.
- Contaldo, N.; Bertaccini, A.; Nicolaisen, M. (2014). Q-bank phytoplasma database. **Phytopathogenic Mollicutes**. 4(1):1-4.
- Davis, R.E.; Jomantiene, R.; Dally, E.L.; Wolf, T.K. (1998). Phytoplasmas associated with grapevine yellows in Virginia belong to group 16SrI, subgroup A (tomato big bud phytoplasma subgroup), and group 16SrIII, new subgroup I. **Vitis**. 37(3):131-137.
- Davis, R.E.; Prince, J.L. (1994). Molecular diagnosis of mycoplasma-like organisms (MLOs) in plant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 48: 23-26.
- Deng, S.; Hiruki, C. (1991). Amplification of a 16SrRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. **J. Microbiol. Methods**. 14: 53-61.
- Doi, Y.; Teranaka, M.; Yora, K.; Asuyama H. (1967). Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches' broom (in Japanese with English summary). **Ann. Phytopath. Soc. Japan**. 33:259–266.

- Duduk, B.; Bertaccini, A. (2011). Phytoplasma classification: Taxonomy based on 16S ribosomal gene, is it enough? **Phytopathogenic Mollicutes**. 1(1):3-13.
- Dumonceaux, T.J.; Green, M.; Hammond, C.; Perez, E.; Olivier, C. (2014). Molecular Diagnostic Tools for Detection and Differentiation of Phytoplasmas Based on Chaperonin-60 Reveal Differences in Host Plant Infection Patterns. **PLOS ONE**. Doi:10.1371/journal.pone.0116039.
- Eckstein, B.; Barbosa, J.C.; Kreycki, P.F.; Canale, M.C.; Brunelli, K.R.; Bedendo, I.P. (2013). Broccoli Stunt, a New Disease in Broccoli Plants Associated with Three Distinct Phytoplasma Groups in Brazil. **J. Phytopathol.** 161:442–444.
- Eckstein, B.; Bedendo, I.P. (2010). Detecção molecular de fitoplasmas em plantas do gênero *Celosia* com malformação das folhas. **Summa Phytopathol.** 36:89.
- Eckstein, B.; Silva, E.G.; Bedendo, I.P. (2012). Shoot Proliferation and Leaf Malformation of *Celosia argentea* and *Celosia spicata* Caused by a Phytoplasma of the 16SrIII-J Group. **J. Phytopathol.** 260:206-208.
- Eckstein, B.; Barbosa, J.C.; Kreycki, P.F.; Zanol, K.M.R.; Coelho, L.B.N.; Gonçalves, A.C.S.M.L.; Brunelli, K.R.; Lopes, J.R.S.; Bedendo, I.P. (2014). Identification of potential leafhoppers vectors of phytoplasmas (16SrIII group) associated with broccoli stunt disease in Brazil. **Australas. Plant Path.** 43:459–463.

- Fajardo, T.V.M.; Kuhn, G.B.; Níkel, O. (2003). **Doenças virais**. In: FAJARDO, T.V.M. Uva para processamento - Fitossanidade. Série Frutas do Brasil 35. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 45-62.
- Firrao, G. (2004). 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. **Int. J. Syst. Evol. Micr.** 54:1243–1255.
- Flôres, D. (2009). Caracterização molecular e análise filogenética do fitoplasma agente do superbrotamento da mandioca (*Manihot esculenta*) no estado de São Paulo. **Dissertação de mestrado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, Brasil.
- Flôres, D. (2013). Amarelo da ameixeira: caracterização molecular do fitoplasma e modelo de colonização do hospedeiro. **Tese de doutoramento**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, Brasil.
- Flôres, D.; Hass, I.C.; Canale, M.C.; Bedendo, I.P. (2013). Molecular identification of a 16SrIII-B phytoplasma associated with cassava witches' broom disease. **Eur. J. Plant Pathol.** 137:237–242.
- Francois, P.; Tangomo, M.; Hibbs, J.; Bonetti, E-J.; Boehme, C.C.; Notomi, T.; Perkins, M.D.; Schrenzel, J. (2011). Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 62:41–48.

Galetto, L.; Miliordos, D.; Roggia, C.; Rashidi, M.; Sacco, D.; Marzachi, C.; Bosco, D. (2014). Acquisition capability of the grapevine Flavescence dorée by the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* Ball correlates with phytoplasma titre in the source plant. **J. Pest Sci.** Doi: 10.1007/s10340-014-0593-3.

Giovannini, E. (2008). **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. 3.ed. Porto Alegre: Renascença. 368 p.

Giovannini, E. (2014). **Manual de Viticultura**. Porto Alegre. Bookman. 253 p.

Guimarães, J.C. (2008). Caracterização de Cultivares de Videira em Clima Tropical: uma Abordagem Fotossintética. **Dissertação de Mestrado**. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campo dos Goytacazes, Brasil.

Gundersen, D.E.; Lee, I.M. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primers pair. **Phytopathol. Mediterr.** 36: 144-151.

Heinrich, M.; Botti, S.; Caprara, L.; Arthofer, W.; Strommer, S.; Hanzer, V.; Katinger, H.; Bertaccini, A.; Machado, M.L.C. (2001). Improved detection methods for fruit tree phytoplasmas. **Plant Mol. Biol. Rep.** 19:169-179.

Hren, M.; Nikolic, P.; Rotter, A.; Blejec, A.; Terrier, N.; Ravnikar, M.; Dermastia, M.; Gruden, K. (2009). 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf

transcriptome in the field grown grapevine. **BMC Genomics**. Doi:10.1186/1471-2164-10-460.

Himeno, M .; Kitazawa, Y .; Yoshida, T .; Maejima, K .; Yamaji, Y .; Oshima, K .; Namba, S. (2014). Sintomas parte superior roxa estão associados à redução da morte celular folha em plantas infectadas pelo fitoplasma. Relatórios científicos. Doi: 10.1038 / srep04111.

Ježić, M.; Kantić, J.K.; Preiner, D.; Maletić, E.; Curković-Perica, M. (2013). Grapevine yellows affecting the Croatian indigenous grapevine cultivar Grk. **Acta Bot. Croat.** 72(2):287–294.

Kogovšek, P.; Hodgetts, J.; Hall, J.; Prezelj, N.; Nikolić, P.; Mehle, N.; Lenarčič, R.; Rotter, A.; Dickinson, M.; Boonham, N.; Dermastia, M.; Ravnikar, M. (2014). LAMP assay and rapid sample preparation method for on-site detection of flavescence doree phytoplasma in grapevine. **Plant Pathol.** Doi: 10.1111/ppa.12266.

Kreyci, P. F. (2012). Transmissão de um fitoplasma associado ao enfezamento do brócolis por cigarrinhas de diferentes espécies. **Dissertação de mestrado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

Kube, M.; Mitrović, J.; Duduk, B.; Rabus, R.; Seem, E. (2012). Current View on Phytoplasma Genomes and Encoded Metabolism. **Sci. World J.** Doi:10.1100/2012/185942.

Kuhn, G.B.; Fajardo, T.V.M. (2015). Doenças causadas por vírus, bactérias e nematoides e

medidas de controle. **Disponível (online)**

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/virus.htm> (08 de março).

Kuzmanovic, S.; Martini, M.; Ermacora, P.; Ferrini, F.; Starovic, M.; Tosic, M.; Carraro, L.; Osler, L. (2008). Incidence and molecular characterization of flavescente dorée and stolbur phytoplasmas in grapevine cultivars from different viticultural areas of Serbia. **Vitis**. 47(2):105–111.

Lai, F.; Song, C.S.; Ren, Z.G.; Lin, C.L.; Xu, Q.C.; Li, Y.; Piao, C.G.; Yu, S.S.; Guo, M.W.; Tian, G.Z. (2014). Molecular characterization of a new member of the 16SrV group of phytoplasma associated with *Bischofia polycarpa* (Levl.) Airy Shaw witches' -broom disease in China by a multiple gene-based analysis. **Australas. Plant Path.** Doi: 10.1007/s13313-014-0298-3

Lee, I.M.; Bertaccini, A.; Vibio, M.; Gundersen, D.E. (1995). Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruits trees with decline symptoms in Italy. **Phytopathology**. 85:728-735.

Lee, I.M.; Davis, R.E.; Gundersen-Rindal, D.E. (2000). Phytoplasma: phytopathogenic Mollicutes. **Annu. Rev. Microbiol.** 54:221-255.

Lee, I.M.; Gundersen-Rindal, D.E.; Davis, R.E.; Bartoszyk, I.M. (1998). Revised classification scheme of phytoplasma based on RFLP analyses of 16S ribosomal protein

gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 48:1153-1169.

Lee, I.M.; Klopmeier, M.; Bartoszyk, I.M.; Gundersen-Rindal, D.E.; Chou, T.; Thomson, K.L.; Eisenreich, R. (1997). Phytoplasma induced free-branching in commercial poinsettia cultivars. **Nature Biotechnol.** 15:178-182.

Lima, M.F. (2009). **Detecção e controle de viroses em videiras**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 9p. (Embrapa Semiárido. Circular Técnica, 90).

Maejima, K.; Oshima, K.; Namba, S. (2014). Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. **J. Gen. Plant Pathol.** 80:210–221.

MAPA (2015). Uva. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Disponível (online)** <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva> (10 de junho).

Marcone, C. (2014). Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. **Ann Appl Biol.** 165:199–221.

Margaria, P.; Ferrandino, A.; Caciagli, P.; Kedrina, O.; Schubert, A.; Palmano, S. (2014). Metabolic and transcript analysis of the flavonoid pathway in diseased and recovered Nebbiolo and Barbera grapevines (*Vitis vinifera* L.) following infection by Flavescence dorée phytoplasma. **Plant Cell Environ.** 37:2183–2200.

Margaria, P.; Palmano, S. (2011). Response of the *Vitis vinifera* L. cv. ‘Nebbiolo’ proteome to

Flavescence dore é phytoplasma infection. **Proteomics**. 11:212–224.

Melo, N.F. (2004). **Contribuição da biotecnologia no desenvolvimento da viticultura no Vale do São Francisco**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido. Seminário Novas Perspectivas para o Cultivo da Uva sem Sementes. (Embrapa Semi-Árido. Documentos 185).

Melo, L.A. (2008). Identificação molecular de fitoplasmas associados ao amarelo da abobrinha-da-moita e á filodia de frutos do morangueiro. **Dissertação de mestrado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, Brasil.

Mello, A.P.O.A. (2007). Identificação molecular de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença. **Tese de doutoramento**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brasil.

Mello, A.P.O.A.; Bedendo, I.P.; Camargo, L.E.A. (2007). Identidade molecular dos fitoplasmas associados aos enfezamentos do tomateiro e da berinjela com base na análise do gene 16S rDNA. **Summa Phytopathol**. 33:258-263.

Mello, L.M.R. (2013). **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho. 5p.

Mello, L.M.R. (2014). **Atuação do Brasil no Mercado Vitivinícola Mundial: Panorama 2013**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho. 3p.

Mello, L.M.R.; Machado, C.A.E. (2015a). Dados da Viticultura. Banco de dados de uva, vinho e derivados. **Disponível (online)**  
[http://vitibrasil.cnpuv.embrapa.br/index.php?sopcao=sopt\\_07&opcao=opt\\_03](http://vitibrasil.cnpuv.embrapa.br/index.php?sopcao=sopt_07&opcao=opt_03) (04 de fevereiro).

Mello, L.M.R.; Machado, C.A.E. (2015b). Dados da Viticultura. Banco de dados de uva, vinho e derivados. **Disponível (online)**  
[http://vitibrasil.cnpuv.embrapa.br/index.php?sopcao=sopt\\_06&opcao=opt\\_03](http://vitibrasil.cnpuv.embrapa.br/index.php?sopcao=sopt_06&opcao=opt_03) (04 de fevereiro).

Miura, C.; Sugawara, K.; Neriya, Y.; Minato, N.; Keima, T.; Himeno, M.; Maejima, K.; Komatsu, K.; Yamaji, Y.; Oshima, K.; Namba, S. (2012). Functional characterization and gene expression profiling of superoxide dismutase from plant pathogenic phytoplasma. **Gene**. 510:107–112.

Montano, H.G.; Brioso, P.S.T.; Pimentel, J.P. (2007). List of phytoplasma hosts in Brazil. **Bull. Insectology**. 60(2):129-130.

Montano, H.G.; Cunha Junior, J.O.; Pimentel, J.P. (2011). Phytoplasmas in Brazil: an update. **Bull. Insectology**. 64(Supplement):S251-S252.

Mora, F.D.S. (2014). Seleção assistida por marcadores moleculares na piramidação de genes de resistência ao míldio (*Plasmopara viticola*) e oídio (*Erysiphe necator*) em videiras. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil.

Mori, N.; Pavan, F.; Bondavalli, R.; Reggiani, N.; Paltrinieri, S.; Bertaccini, A. (2008). Factors affecting the spread of "Bois Noir" disease in north Italy vineyards. **Vitis**. 47(1):65–72.

Munhoz, E.M. (2012). Caracterização molecular de um fitoplasma associado ao superbrotamento do Melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L) com base nas seqüências do genes 16S rRNA e secY. **Dissertação de mestrado**. Mestrado em Ciências. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, Brasil.

Naves, R.S. (2005). **Diagnose e manejo de doenças causadas por fitonematóides na cultura da videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 12p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 57).

Neroni, R.C. (2004). Detecção e identificação molecular de fitoplasmas associados ao amarelo da videira. **Dissertação de mestrado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, Brasil.

Neroni, R.C.; Bedendo, I.P.; Kuniyuki, H. (2006). Fitoplasmas associados com sintomas do tipo amarelo em videira. **Summa Phytopathol.** 32:45 (suplemento).

Neroni, R.C. (2009). Amarelos da videira: identificação e análise filogenética dos fitoplasmas, transmissão dos agentes causais e otimização do diagnóstico. **Tese de doutoramento**.

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, Brasil.

Nondillo, A.; Sganzerla, V.A.; Bueno, O.C.; Botton, M. (2012). **Metodologia para infestação da pérola-da-terra em plantas de videira utilizando *Linepithema micans* (Forel) sob condições controladas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 8p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 117).

Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Res.** 28: e63.

Olivier, C.; Saguez, J.; Stobbs, L.; Lowery, T.; Galka, B.; Whybournec, K.; Bittner, L.; Chene, X.; Vincent, C. (2014). Occurrence of phytoplasmas in leafhoppers and cultivated grapevines in Canada. **Agric. Ecosyst. Environ.** 195: 91–97.

Orenstein, S.; Zahavi, T.; Weintraub, P.G. (2001). Survey of the distribution of phytoplasma in wine grapes in the Golan Heights, Israel and development of specific primers. **Vitis.** 40:219-223.

Oshima, K.; Maejima, K.; Namba, S. (2013). Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. **Front. Microbiol.** Doi: 10.3389/fmicb.2013.00230.

Pacifico, D.; Caciagli, P.; Palmano, S.; Mannini, F.; Marzachi, C. (2011). Quantitation of Grapevine leafroll associated virus-1 and -3, Grapevine virus A, Grapevine fanleaf virus and Grapevine fleck virus in field-collected *Vitis vinifera* L. ‘Nebbiolo’ by real-time

reverse transcription-PCR. **J. Virol. Methods.** 172:1–7.

Pacifico, D.; Galetto, L.; Rashidi, M.; Abba, S.; Palmano, S.; Firrao, G.; Bosco, D.; Marzachi, C. (2015). Decreasing global transcript levels over time suggest phytoplasma cells enter stationary phase during plant and insect colonization. **Appl. Environ. Microbiol.** Doi:

Parida, M.; Sannarangaiah, S.; Kumar, Dash, P.K.; Rao, P. V. L.; Morita, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Rev. Med. Virol.** 18: 407–421.

Pereira, T.B.C. (2012). Identificação molecular de um fitoplasma do grupo 16SrI-B em plantas de soja. **Dissertação de mestrado.** Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, Brasil.

Prezelj, N.; Nikolic, P.; Gruden, K.; Ravnikar, M.; Dermastia, M. (2012). Spatiotemporal distribution of flavesence dorée phytoplasma in grapevine. **Plant Pathol.** Doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02693.x.

Protas, J.F.S.; Camargo, U.A. (2011). **Vitivinicultura Brasileira: panorama setorial em 2010.** Brasília, DF: SEBRAE; Bento Gonçalves: IBRAVIN: Embrapa Uva e Vinho.110 p.

Rappussi, M.C.C. (2010). Enfezamento da couve-flor: identificação molecular de fitoplasmas, evidência de potencial vetor e análise epidemiológica da doença. **Tese de doutoramento.**

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, Brasil.

Rappussi, M.C.C.; Eckstein, B.; Flôres, D.; Haas, I.C.R.; Amorim, L.; Bedendo, I.P. (2012).

Cauliflower stunt associated with a phytoplasma of subgroup 16SrIII-J and the spatial pattern of disease. **Eur J Plant Pathol.** 133:829–840.

Ribeiro, L.F.C.; Bedendo, I.P. (2006). Proliferação de Ramos em Plantas Comerciais de Bico-de-Papagaio Associada a Fitoplasma do Grupo 16SrIII. **Fitopatol. Bras.** 31(4):367-371.

Ribeiro, L.F.C.; Bedendo, I.P.; Sanhueza, R.M.V. (2007). Evidência molecular da ocorrência de um fitoplasma associado ao lenho mole da macieira. **Summa Phytopathol.** 33: 30-33.

Ribeiro, L.F.C.; Silva, E.G.; Bedendo, I.P. (2008). Evidência molecular da ocorrência de fitoplasma associado ao superbrotamento do maracujazeiro em cinco estados brasileiros. **Trop. Plant Pathol.** 4:323-325.

Rodrigues, A. (2009). Desenvolvimento da Videira “Italia” em Clima Tropical de Altitude. **Tese de doutoramento.** Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, Brasil.

Roggia, C.; Caciagli, P.; Galetto, L.; Pacifico, D.; Veratti, F.; Bosco, D.; Marzach, C. (2014). Flavescence dorée e phytoplasma titre in field-infected Barbera and Nebbiolo grapevines. **Plant Pathol.** 63:31–41.

- Santi, S.; Marco, F.; Polizzotto, R.; Grisan, S.; Musetti, R. (2013). Recovery from stolbur disease in grapevine involves changes in sugar transport and metabolism. **Front. Plant Sci.** 4: 171. Doi: 10.3389/fpls.2013.00171.
- Sanches, M.M.; Sakate, R.K. (2013). **Análise para vírus, viróides e fitoplasmas em material vegetal importado.** Brasília. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 31p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos 344).
- Silva, E.G. (2008). Identificação de fitoplasmas associados à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar e ao superbrotamento de primavera (*Bougainvillea spectabilis*) no estado de São Paulo. **Tese de doutoramento.** Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, Brasil.
- Silva, E.G.; Bedendo, I.P.; Casagrande, M.V. (2008). Ocorrência de fitoplasma associado à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar em três regiões do Estado de São Paulo. **Trop. Plant Pathol.** 33(6):453-456.
- Silva, E.G.; Bedendo, I.P.; Massola Junior, N.S.; Silva, R.F. (2009). *Candidatus* Phytoplasma brasiliense associado ao superbrotamento do hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathol.** 35(3): 234-236.
- Smart, C.D.; Scheneider, B.; Blomquist, C.L.; Guerra, L.J.; Harrison, N.A.; Ahrens, U.; Lorenz, K.-H.; Seemüller, E.; Kirkpatrick, B.C. (1996). Phytoplasm-specific PCR primer base don sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. **Appl. Environ. Microbiol.** 62:

2988-2993.

Somavilla, L.; Gomes, C.B.; Quecini, V.M. (2012). Registro da Ocorrência de *Meloidogyne incognita* no Porta-Enxerto “IAC 766-Campinas” no Estado de Pernambuco e reação de porta-enxertos e de cultivares copa de videira a *Meloidogyne* spp. **Rev. Bras. Frutic.** 34: 750-756.

Sônego, O.R.; Garrido, L.R.; Júnior, A.G. (2005). **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 32p. (Embrapa uva e Vinho. Circular Técnica, 56).

Stoepler, T.M.; Smith-Junior, A.H.; Wolf, T.K. (2013). North American Grapevine Yellow Disease: Current Knowledge and Management Recommendations for Wine Growers. **Virginia Cooperative Extension**. AREC-48P.

Tomlinson, J.A.; Boonham, N.; Dickinson, M. (2010). Development and evaluation of a one-hour DNA extraction and loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of phytoplasmas. **Plant Pathol.** 59:465–471.

Torres, E.; Bertolini, E.; Cambra, M.; Carmina, M.; Martín, M.P. (2005). Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. **Mol. Cell. Probes.** 19:334-340.

Uvibra (2015). Produção de uvas, elaboração de vinhos e derivados. **Disponível (online)**

[http://www.uvibra.com.br/dados\\_estatisticos.htm](http://www.uvibra.com.br/dados_estatisticos.htm) (10 de junho).

Wei, W.; Davis, R.E.; Lee, I-M.; Zhao, Y. (2007). Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 57:1855–1867.

Zart, M.; César, A.; Santos, H.P.; Souza, P.V.D. (2014). Caracterização morfofisiológica de plantas de videira atacadas por pérola-da-terra. **Semina: Ci. Agrárias.** 35: 1187-1200.