

168

Circular Técnica

Sete Lagoas, MG
Dezembro, 2011

Autores

Elizabeth de Oliveira

Bióloga, Pesquisadora da
Embrapa Milho e Sorgo,
Rod. MG 425 km 65, Cx.
Postal 151. 35701-970 Sete
Lagoas, MG,
beth@cnpms.embrapa.br

Sylvia Morais de Sousa

Bióloga, Pesquisadora a
da Embrapa Milho e Sorgo,
Rod. MG 425 km 65, Cx.
Postal 151. 35701-970 Sete
Lagoas, MG,
smsousa@cnpms.embrapa.br

Elena Charlotte Landau

Bióloga, Pesquisadora da
Embrapa Milho e Sorgo,
Rod. MG 425 km 65, Cx.
Postal 151. 35701-970 Sete
Lagoas, MG,
landau@cnpms.embrapa.br

As Condições Ambientais e a Planta Podem Influenciar a Aquisição e a Transmissão de Fitoplasma por *Dalbulus maidis*

Perdas expressivas na produção de milho podem ser causadas pela alta incidência de enfezamentos. Os agentes causais dessas doenças, fitoplasma (maize bushy stunt) e espiroplasma (*Spiroplasma kunkelii*), da classe Mollicutes, são transmitidos de forma persistente propagativa pela cigarrinha *Dalbulus maidis* (Figura 1) (NAULT, 1980). Essa cigarrinha pode transmitir cada um desses mollicutes, isoladamente, ou de forma simultânea, e estudos sobre essa transmissão evidenciam influência do isolado de fitoplasma, da temperatura e da ordem de aquisição de fitoplasma e espiroplasma (MOYARAYGOSA; NAULT, 1998; LEGRAND; POWER, 1994; OLIVEIRA et al., 2007, 2011). A determinação de condições adequadas para eficiência máxima de transmissão desses patógenos por *D. maidis* pode contribuir para a realização de experimentos de inoculação em condições controladas, bem como para a identificação de regiões e épocas de maior risco de ocorrência dessas doenças.



Foto: E. Oliveira

Figura 1. Cigarrinha *Dalbulus maidis*.

Em geral, os estudos realizados para determinação da eficiência de transmissão de fitoplasma por *D. maidis* têm sido realizados considerando-se apenas o percentual de plantas com sintomas de enfezamentos, a partir de cigarrinhas submetidas a diferentes períodos de aquisição desses micro-organismos, sem utilização de testes para sua detecção nas cigarrinhas utilizadas para inoculação.

Com o objetivo de estudar a transmissão do fitoplasma por *D. maidis*, utilizando análise PCR para detecção deste mollicute nas cigarrinhas usadas para inoculação, foram conduzidos dois experimentos em condições de viveiro telado.

Para aquisição de fitoplasma, duas colônias de jovens adultos foram confinadas em duas plantas de milho-pipoca infectadas por fitoplasma, apresentando sintomas do enfezamento causado por esse patógeno, obtidas através da inoculação de fitoplasma, usando cigarrinha infectante, e cultivo em condições controladas de viveiro telado. A cada colônia, com cerca de 300 cigarrinhas, cada uma, foi dado um período de cinco dias de acesso para aquisição (AAP), seguindo-se períodos de incubação de 39 e 44 dias, para as colônias 1 e 2, respectivamente, com base em metodologia utilizada por Nault (1980), para obtenção de cigarrinhas infectantes com fitoplasma maize bushy stunt.

Para transmissão de fitoplasma, cada experimento foi conduzido com 60 plantas de milho-pipoca e 60 plantas de uma linhagem de milho susceptível (L22). Aos oito dias da germinação, em cada plântula de milho, foi confinada apenas uma cigarrinha, permitindo-se um período de seis dias de acesso para inoculação (IAP). A colônia 1 foi usada no experimento 1 e a colônia 2, usada no experimento 2. Em cada experimento, o tratamento controle consistiu de seis plantas de milho-pipoca e seis plantas da linhagem L22, nas quais foram confinadas cigarrinhas saudias. Cada experimento foi constituído por 132 vasos com 5Kg de substrato, com uma planta por vaso, e cultivado por 60 dias.

O isolado de fitoplasma utilizado nos experimentos foi obtido de plantas de milho-pipoca, no campo, e tem sido cultivado por seis anos na mesma cultivar de milho-pipoca utilizada nesses experimentos.

Os sintomas das plantas foram avaliados semanalmente. As temperaturas e os dados de umidade relativa do ar foram registrados semanalmente na Estação Meteorológica da Embrapa Milho e Sorgo.

Amostras de 10 cigarrinhas de cada colônia, coletadas antes do teste de transmissão, 10 cigarrinhas tomadas ao acaso, após o período de acesso para inoculação (IAP) no milho-pipoca e 10 cigarrinhas tomadas ao acaso, após o período de acesso para inoculação (IAP) na linhagem L22, de cada experimento, foram analisadas por teste de PCR para detecção de fitoplasma, usando primers R16F2 e R16R2 (LEE et al., 1993). O DNA de fitoplasma foi utilizado como controle nesses testes.

As análises por PCR mostraram bandas fracas de 1,2kb, indicativas de fitoplasma, e bandas não específicas (Figura 2), em 21 cigarrinhas da colônia 1, e apenas uma banda específica de 1,2kb em oito cigarrinhas da colônia 2 (Tabela 1).

A transmissão de fitoplasma foi confirmada pelos sintomas nas plantas (Figura 3), apenas para as cigarrinhas que apresentaram bandas fortes, no teste de PCR. Com base na percentagem de bandas fortes, a infecção das cigarrinhas foi estimada em 27,5 e 3,3% para as colônias 1 e 2, respectivamente (Tabela 2).

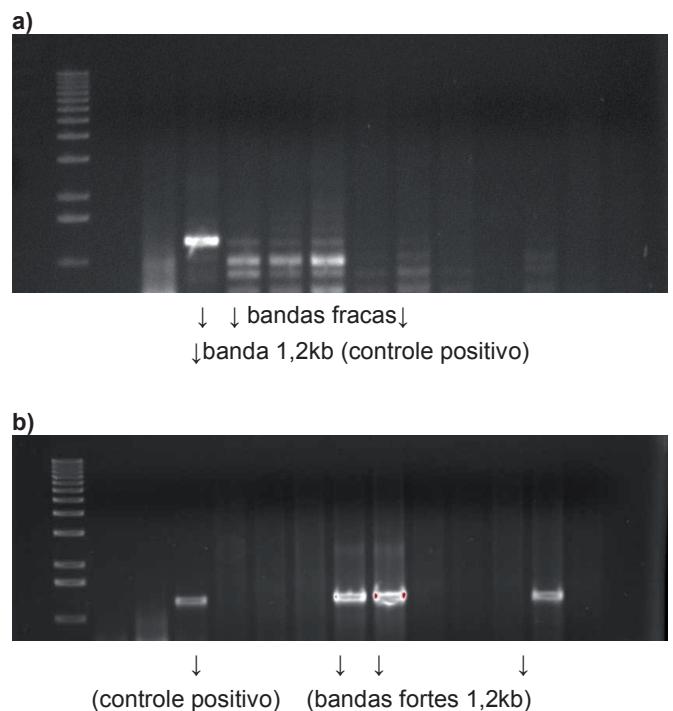


Figura 2. Resultado de teste de PCR para cigarrinhas da colônia 1 (a) e da colônia 2 (b).

Tabela 1. Resultados para testes de PCR e de transmissão por cigarrinhas infectadas.

Experimento 1 (colônia 1)			
Amostras de cigarrinhas	Produto PCR		Plantas com sintomas
	fraca ¹	forte	
10 cigarrinhas após IAP	7	0	Não testado
10 cigarrinhas após IAP em milho-pipoca	7	0	0
10 cigarrinhas após IAP em L22	5	0	0

Experimento 2 (colônia 2)			
Leafhoppers samples	Produto PCR t		Plantas com sintomas
	fraca ¹	forte	
10 cigarrinhas após IAP	2	3	Não testado
10 cigarrinhas após IAP em milho-pipoca	0	3	3
10 cigarrinhas após IAP em L22	0	2	2

1. Banda de 1.2 kb e banda não específica; IAP – Período de acesso à inoculação



Foto: E. Oliveira

Figura 3. Sintomas do enfezamento causado pelo fitoplasma.**Tabela 2.** Resultados da transmissão por cigarrinhas das colônias 1 and 2.

	Exp. 1 (colônia 1)		Exp. 2 (colônia 2)	
	Pipoca	L22	Pipoca	L22
Nº de plantas com sintomas	2	0	15	5
Percentagem de plantas com sintomas	3.3	0	25	8.3
Percentagem de transmissão fitoplasma (da percentagem de banda forte 27.5)	-	-	92.5	30.7

A aquisição e a transmissão do fitoplasma foram dependentes da planta-fonte e das condições da temperatura ambiente registradas no período AAP. O baixo índice de aquisição em condições de temperatura de 17 °C pode ser responsável pela baixa concentração de fitoplasma nas cigarrinhas, não sendo suficiente para transmissão, e resultando nas fracas bandas de 1,2kb, obtidas nos testes de PCR.

Os resultados sugerem que poderia ser conveniente utilizar pelo menos três cigarrinhas, após o período AAP e o período latente, para inoculação de fitoplasma.

O milho-pipoca mostrou ser mais susceptível ao fitoplasma que a linhagem L22, com relação à infecção, o que pode ser possivelmente atribuído à maior adaptação fisiológica do patógeno a esse material, devido a sua utilização prolongada para cultivo "in vivo" dele.

A transmissão para o milho-pipoca, a partir das cigarrinhas infectadas, foi de quase 100%, e cerca de 30% para a linhagem L22.

As variáveis climáticas são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Médias e desvio padrão de temperaturas máxima e mínima (Tmax, Tmin) e umidade relativa do ar (RH) na Embrapa Milho e Sorgo (Estação Meteorológica de Sete Lagoas - INMET), durante o período de aquisição de fitoplasma (AAP), período latente (LP) e período de acesso para inoculação (IAP) por cigarrinhas das colônias (experimentos 1 e 2).

Período	Experimento 1			Experimento 2		
	Tmax (°C)	Tmin (°C)	RH (%)	Tmax (°C)	Tmin (°C)	RH (%)
AAP	32.1 ± 1.2	17.4 ± 0.9	57.7 ± 4.4	30.4 ± 3.7	20.4 ± 0.5	75.2 ± 17.4
PL	29.6 ± 2.1	19.5 ± 1	75.1 ± 14.5	30.1 ± 3.3	19.2 ± 1	72.1 ± 14.5
IAP	32.7 ± 0.6	18.5 ± 0.3	58.9 ± 2.4	32.8 ± 0.8	18.8 ± 0.7	60.2 ± 4.19

A variabilidade fisiológica do fitoplasma maize bushy stunt (MOYA-RAYGOSA; NAULT, 1998) e a adaptação a condições de temperatura podem permitir a sobrevivência desse patógeno em áreas com diferentes cultivares de milho, e diferentes condições ambientais, favorecendo a disseminação dessa doença emergente.

A análise de cigarrinhas por PCR poderá auxiliar a decisão de quantos indivíduos são necessários para uma inoculação eficiente, desde que confirmada a presença de apenas uma forte banda de 1,2kb, como produto do teste de PCR.

Referências

LEE, I. M.; HAMMOND, R. W.; DAVIS, R. E.; GUNDERSEN, D. E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 8, p. 834-842, 1993.

LEGRAND, A. I.; POWER, A. G. Inoculation and acquisition of maize bushy stunt mycoplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 125, p. 115-122, 1994.

MOYA-RAYGOZA, G.; NAULT, L. R. Transmission biology of maize bushy stunt phytoplasma by the corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 91, n. 5, p. 668-676, 1998.

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

OLIVEIRA, E.; LANDAU, E. C.; SOUSA, S. M. Transmission of maize bushy stunt phytoplasma. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 64, p.153-154, 2011.

OLIVEIRA, E.; SANTOS, J. C.; MAGALHÃES, P. C.; CRUZ, I. Maize bushy stunt phytoplasma transmission is affected by spiroplasma acquisition and environmental conditions. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60 n. 2, p. 229-230, 2007.

Circular Técnica, 168

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027 1100
Fax: (31) 3027 1188
E-mail: sac@cnpmc.embrapa.br
1ª edição
1ª impressão (2011): on line

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira.
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau.
Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro.

Expediente

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros.
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro.
Tratamento das ilustrações: Tânia Mara A. Barbosa.
Editoração eletrônica: Tânia Mara A. Barbosa.