

Ocorrência de fitoplasma associado à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar em três regiões do Estado de São Paulo

Eliane G. Silva¹, Ivan P. Bedendo¹ & Marcos V. Casagrande²

¹Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ, Universidade de São Paulo, 13418-900 Piracicaba, SP, Brasil; ²Centro de Tecnologia Canavieira - CTC, 13400-970, Piracicaba, SP, Brasil

Autor para correspondência: Ivan P. Bedendo, e-mail: ipbedend@esalq.usp.br

RESUMO

Uma doença conhecida como síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar ou amarelinho causou danos expressivos à cultura no estado de São Paulo, na década de noventa. A síndrome também foi registrada em outros países e investigações sobre a etiologia evidenciaram a associação da doença com vírus e fitoplasma, de forma isolada ou simultânea. A doença é potencialmente importante e ocorre endemicamente no estado paulista, por esta razão o presente estudo buscou demonstrar a ocorrência do fitoplasma em três tradicionais regiões produtoras de cana, localizadas no estado de São Paulo, através da detecção molecular deste agente em plantas naturalmente infectadas. Para isto, plantas sintomáticas das variedades SP71-6163, SP71-6180 e SP89-1115 foram amostradas em Piracicaba, Jaú e Ribeirão Preto e a partir do tecido foliar foi extraído o DNA total. PCR duplo foi processado com os “primers” P1/Tint-16F2n/R2 e os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Amplificações de fragmentos de DNA de 1,2 kb evidenciaram a presença de fitoplasma em 36% das plantas sintomáticas e revelaram a sua ocorrência nas três regiões amostradas. Os resultados demonstraram a associação do fitoplasma com a doença e a importância de se manter uma atenta vigilância nos campos e viveiros, bem como buscar genótipos com bom nível de resistência nos programas de melhoramento.

Palavras chave: *Saccharum* spp., *Mollicutes*, procariotos fitopatogênicos.

ABSTRACT

Occurrence of phytoplasma associated with sugarcane yellow leaf syndrome in three regions of São Paulo State, Brazil

Sugarcane yellow leaf syndrome caused serious damage to crops in the São Paulo State, Brazil, in the 1990's. The syndrome was also reported in other countries and investigations into the etiology revealed an association between the disease and virus and/or phytoplasma. The disease is potentially important and occurs endemically in that State, and for this reason the present study was conducted in order to demonstrate the occurrence of phytoplasma in three traditional sugarcane-producing areas, in São Paulo State, through molecular detection from naturally infected plants. Symptomatic plants belonging to varieties SP71-6163, SP71-6180 and SP89-1115 were sampled from Piracicaba, Jaú and Ribeirão Preto, and total DNA was extracted from foliar tissues. Nested PCR was conducted with primer pairs P1/Tint-16F2n/R2, and the amplified products were analyzed by electrophoresis on agarose gels. Amplified DNA fragments of 1.2 kb evidenced the presence of phytoplasma in 36% of symptomatic plants and revealed its occurrence in all sampled regions. The results demonstrated that phytoplasma is associated with the disease and that it is important to keep a safe inspection of nurseries and monitoring plants in the field, as well as to select sugarcane genotypes with a good level of resistance in breeding programs.

Keywords: *Saccharum* spp., *Mollicutes*, phytopathogenic prokariotes.

A cultura da cana-de-açúcar é uma das mais importantes e antigas do Brasil e do estado de São Paulo, assumindo grande importância sócio-econômica, gerando aproximadamente 11,5 bilhões de reais ao ano, e mais de cinco milhões de empregos diretos e indiretos (FNP Consultoria e Comércio, 2006). Informações adicionais mostram que nas últimas safras, o estado de São Paulo contribuiu com 60% da moagem nacional, totalizando 255.140.812 toneladas de colmos processados, colocando a cultura da cana-de-açúcar como responsável por 35% do PIB estadual.

Estudos recentes revelam que em razão da expansão na produção de etanol, as lavouras de cana-de-açúcar

devem ocupar uma área 66,6% superior aos atuais 6,16 milhões de hectares, nos próximos doze anos. Ainda, o estudo “Projeções do Agronegócio no Brasil e no Mundo”, recém-concluído pela Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura, também indicou que o percentual da cana sobre o total plantado, no país, saltará nada menos que 42,2%, passando dos atuais 11,6% para 16,5% na safra 2017/18, correspondendo a 10,3 milhões de hectares. Com isso, a produção de etanol prevista saltaria 120%, passando de 18,9 bilhões para 41,7 bilhões de litros (Única, 2007).

A relevância econômica atual da cultura da cana-de-açúcar e a projeção da expansão da área plantada

submetem a cultura a uma ampla variedade de fatores de estresse capazes de provocar redução na produtividade, sendo as doenças um dos fatores relevantes. As cinco principais doenças da cultura da cana são a escaldadura, o raquitismo das soqueiras, o mosaico, o carvão e a síndrome do amarelecimento foliar (Tokeshi & Rago, 2005). A síndrome do amarelecimento foliar, também conhecida por “amarelinho”, foi relatada no Brasil em 1989, mas começou a se tornar problema sério a partir do início da década de 90 (Vega *et al.*, 1997). Plantações comerciais com a variedade SP71-6163, no Estado de São Paulo, sofreram perdas de até 50% na produção. Nesta época, as investigações conduzidas no Brasil e no exterior, levantaram várias hipóteses sobre o agente causal da doença. Alguns estudos revelaram a possível atuação de fatores abióticos relacionados ao solo e clima, enquanto outros buscaram demonstrar a associação de agentes bióticos. Dentre os agentes infecciosos, foi evidenciada a presença de luteovírus em tecidos de plantas sintomáticas de cana-de-açúcar (Vega *et al.*, 1997) e que este vírus era transmitido por espécies de afídeos (Scaglioni & Lockhart, 2000), comumente encontradas em território brasileiro. No entanto, pesquisas também mostraram uma associação freqüente entre planta doente e fitoplasma. Na África do Sul, a presença de fitoplasma foi detectada em plantas que apresentavam sintomas muito similares àqueles observados no Brasil (Cronjé *et al.*, 1998). Uma investigação preliminar realizada no país no início desta década revelou a ocorrência de fitoplasma em plantas sintomáticas amostradas em áreas paulistas (Palma *et al.*, 2001).

A partir da substituição gradual da variedade SP71-6163 por outras mais resistentes, a incidência da síndrome caiu drasticamente. No entanto, a preocupação dos técnicos com a doença tem se mantido ao longo do tempo, tanto que os programas de melhoramento genético e o serviço de “roging” em viveiros se mantêm alertas em relação ao problema. Atualmente, a doença pode ser considerada endêmica no estado de São Paulo e o seu potencial de dano foi recentemente comprovado através de um ensaio de campo, no qual a produção de cana em parcelas com plantas doentes apresentou redução de 31%, em comparação com a produção de parcelas com plantas assintomáticas (M.V. Casagrande, dados não publicados).

Assim, considerando-se a relevância econômica da cultura da cana-de-açúcar, os danos provocados pelo ‘amarelinho’ em passado recente e a importância potencial desta doença, o presente trabalho visou demonstrar a ocorrência de fitoplasma em três importantes regiões de cultivo de cana, no estado de São Paulo, através da detecção molecular deste agente em plantas naturalmente infectadas, pertencentes a distintas variedades de cana.

Plantas sintomáticas, com idade de um ano, pertencentes às variedades SP71-6163, SP71-6180 e SP89-1115 foram amostradas em três importantes regiões canavieiras: Piracicaba (SP), Ribeirão Preto (SP) e Jaú (SP). Dez plantas de cada variedade foram coletadas em cada região. As amostras consistiram de folhas denominadas

“folha +1”, que corresponde à folha fotossintetizante mais ativa da planta, sendo a primeira folha imediatamente abaixo do cartucho e que apresenta o colarinho visível. Extrações de DNA total foram feitas de acordo com protocolo de Lee *et al.* (1993). PCR duplo foi conduzido usando-se na primeira reação o par de “primers” P1/Tint (Deng & Hiruki, 1991; Smart *et al.*, 1996) e na segunda reação o par R16F2n/R2 (Gundersen & Lee, 1996), que amplifica um fragmento da região do 16S rDNA, de 1,2 kb. Como controle negativo foi usado DNA obtido de planta de cana sadia (variedade SP71-6163) e, como controle positivo, o DNA extraído de plantas de milho infectadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho.

Para a PCR, considerando o volume padrão de 50 μ L, as concentrações finais dos componentes foram: 0,4 μ M de cada “primer”; 200 μ M de cada dNTP; 1 unidade de Taq polimerase (Promega); e 20 ng de DNA total extraído de cada amostra. Para o par de “primers” P1/Tint, o termociclador foi programado para um total de 30 ciclos, compreendendo as etapas de desnaturação por 1 min a 94°C, anelamento por 1 min a 56°C e extensão por 2 min a 72°C. Para as reações com o par de “primers” R16F2n/R2, o aparelho foi programado para 35 ciclos, com desnaturação por 1 min a 94°C, anelamento por 2 min a 50°C e extensão por 3 min a 72°C. Uma alíquota de 5 μ L de cada reação foi aplicada em gel de agarose 1%, sendo os produtos de PCR analisados após a condução de eletroforese, coloração do gel com brometo de etídio e visualização em transiluminador de luz ultravioleta. O marcador de peso molecular utilizado foi 1kb ladder (Invitrogen).

As plantas de cana amostradas apresentaram sintomas típicos da síndrome do amarelecimento foliar, caracterizados por amarelecimento intenso da porção abaxial da nervura central das folhas, com correspondente avermelhamento da porção adaxial, além de redução de porte. Sintomas idênticos a estes observados nas plantas amostradas têm sido relatados em outros países onde a doença também é conhecida (Aljanabi *et al.*, 2001). Através de PCR duplo foram amplificados fragmentos genômicos de 1,2 kb, revelando a presença de fitoplasma em 36% das plantas sintomáticas. Os resultados mostraram que o fitoplasma associado a plantas sintomáticas estava presente nas três regiões amostradas. Resultados positivos para fitoplasmas foram encontrados em 50% das amostras coletadas em Piracicaba, 20% das amostras provenientes de Jaú e em 30% das amostras originárias de Ribeirão Preto. Amplificação de fragmento de 1,2 kb foi observada para o controle positivo, representado por DNA de plantas de milho com fitoplasma, no entanto, nenhuma amplificação ocorreu para o controle negativo, correspondente ao DNA de planta de cana sadia (Figura 1).

A demonstração da presença de fitoplasma em tecidos de plantas portadoras da síndrome levou à confirmação do diagnóstico feito pela observação dos sintomas, em 36% das amostras sintomáticas, sugerindo a associação deste agente com a doença. A não detecção de fitoplasmas nas amostras

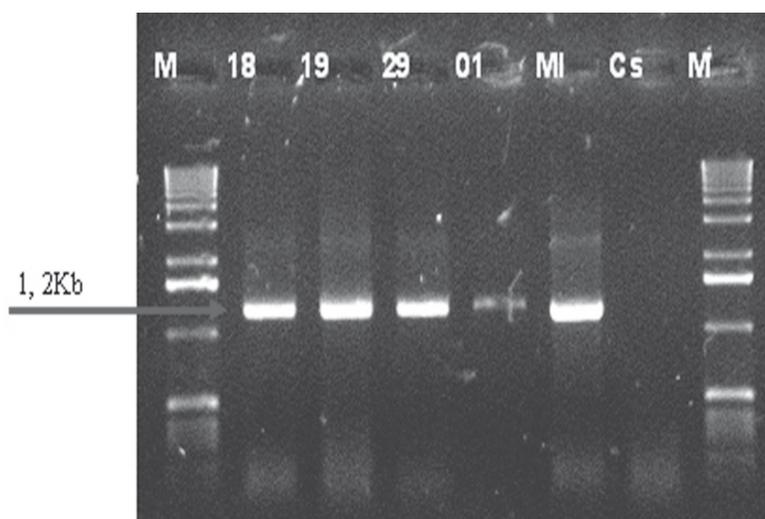


FIG. 1 - Amplificação do 16S rDNA (1,2 kb) do fitoplasma encontrado em amostras de plantas de cana-de-açúcar com a síndrome do amarelecimento foliar. PCR duplo com os pares de "primers" P1/Tint e F2n/R2. M= marcador molecular (1kb ladder); 18, 19, 29 e 01= amostras sintomáticas de cana-de-açúcar; Cs= controle negativo- amostra sadia de cana-de-açúcar; MI= controle positivo- fitoplasma do enfezamento vermelho do milho. Amostras de cana: **01**- SP716163 (Piracicaba); **18**- SP716180 (Jaú); **19**- SP716180 (Jaú); **29**- SP891115 (Ribeirão Preto).

sintomáticas restantes pode ser atribuída, possivelmente, a alguns fatores ou condições, entre os quais: 1- concentração de fitoplasmas nos tecidos das plantas, em níveis abaixo do limite de detecção por PCR, como citado em trabalhos com o mesmo patossistema (Aljanabi *et al.*, 2001); 2- à ocorrência de luteovírus associado às plantas, o que pode ter incitado o aparecimento de sintomas típicos da doença, como relatado em trabalho conduzido anteriormente no estado de São Paulo (Vega *et al.*, 1997). O estudo aqui conduzido confirmou evidência anterior (Palma *et al.*, 2001) de que os fitoplasmas podem estar associados à doença nas condições brasileiras. Existem relatos da ocorrência de vírus e fitoplasmas como agentes da síndrome em diversos países, inclusive ocorrendo simultaneamente na forma de infecções mistas (Aljanabi *et al.*, 2001, Cronjé *et al.*, 1998). No Brasil, já existem relatos de que um luteovírus esteja associado à doença (Vega *et al.*, 1997; Scagliusi & Lockhart, 2000) e os resultados do presente trabalho mostraram que os fitoplasmas, possivelmente, estão envolvidos com a síndrome no nosso país. Isto sugere que o amarelecimento foliar da cana-de-açúcar, presente nos cultivos brasileiros, possa também estar sendo causado por um complexo formado por vírus e fitoplasmas.

A detecção de fitoplasmas em plantas de cana-de-açúcar provenientes de três tradicionais regiões produtoras indica que o monitoramento deve ser constante em relação à ocorrência da doença, principalmente quanto à recomendação de novas variedades. Os resultados também mostraram que em programas de melhoramento é justificável dar ênfase à seleção de material promissor que tenha um bom nível de resistência à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Tecnologia Canavieira - CTC pelo fornecimento das amostras e apoio técnico. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior - CAPES pela bolsa concedida para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aljanabi SM, Parmessur Y, Moutia Y, Saumtally S, Dookun A (2001) Further evidence of the association of a phytoplasma and a virus with yellow leaf syndrome in sugarcane. *Plant Pathology* 50:628-636.
- Cronjé CPR, Bailey RA, McFarlane K (1998) Update the occurrence of yellow leaf syndrome in the South African sugar industry and evidence for the causal organism. In: *Proceedings of South African Sugar Technologists Association Annual Congress*. Durban. Sasta. pp. 81-84.
- Deng S, Hiruki C (1991) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14:53-61.
- FNP Consultoria e Comércio (2006) Cana-de-açúcar. In: *Agrianoal 2006: anuário da agricultura brasileira*. São Paulo. pp. 241-242.
- Gundersen DE, Lee IM (1996) Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primers pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35:144-151.
- Lee IM, Davis RE, Sinclair WA, Dewitt ND, Conti M (1993) Genetic relatedness of mycoplasma-like organisms detected in

Ulmus spp. in the United States and Italy by means of DNA probes and polymerase chain reactions. **Phytopathology** 83:829-833.

Palma FMS, Bedendo IP, Casagrande M (2001) Presença de fitoplasma em plantas de cana-de-açúcar com sintomas da síndrome do amarelecimento foliar. **Fitopatologia Brasileira** 26:507.

Scagliusi SM, Lockhart BE (2000) Transmission, characterization and serology of sugarcane yellow leaf luteovirus. **Phytopathology** 90:120-124.

Smart CD, Schneider B, Blomquist CL, Guerra LJ, Harrison, NA, Ahrens U, Lorenz KH, Seemuller E, Kirkpatrick BC (1996) Phytoplasma-specific PCR based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. **Applied and Environmental Microbiology**

68:2988-2993.

Tokeshi H, Rago A (2005) Doenças da cana-de-açúcar. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo. Editora Ceres. pp. 185-196.

Única Sociedade. Desenvolvimento sustentável e mercado de trabalho. www.unica.com.br/pages/sociedades_mercados.asp. novembro 2007.

Vega J, Scagliusi SMM, Ulian EC (1997) Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: evidence of association with a luteovirus. **Plant Disease** 81:21-26.

Recebido 1 Fevereiro 2008 - Aceito 9 Dezembro 2008 - TPP 8012
Editor Associado: Marisa A.S.V. Ferreira