



IZAÍAS ARAÚJO DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Sugarcane yellow leaf virus E UM NOVO FITOPLASMA
ASSOCIADOS À SÍNDROME DO AMARELECIMENTO
FOLIAR EM CANA-DE-AÇÚCAR NO NORDESTE DO
BRASIL**

TERESINA – PI

2019

IZAÍAS ARAÚJO DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Sugarcane yellow leaf virus* E
UM NOVO FITOPLASMA ASSOCIADOS À SÍNDROME DO AMARELECIMENTO FOLIAR
EM CANA-DE-AÇÚCAR NO NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Agricultura Tropical da Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador

Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior

Coorientador

Prof. Dr. Francisco de Alcântara Neto

**TERESINA – PI
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

O48i Oliveira, Izaías Araújo de
Identificação e caracterização molecular de *Sugarcane yellow leaf virus* e um novo fitoplasma associados à síndrome do amarelamento foliar em cana-de-açúcar no nordeste do Brasil. / Izaías Araújo de Oliveira.
44 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Teresina, 2019.
Orientação: Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior

1. Cana-de-açúcar - Doenças 2. Amarelinho 3. *Luteoviridae*
4. *Mollicutes* 5. *Polerovirus* I. Título.

CDD 633.61

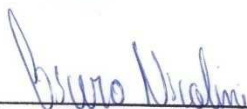
IZAÍAS ARAÚJO DE OLIVEIRA

Identificação e caracterização molecular de *Sugarcane yellow leaf virus* e um novo fitoplasma associados à Síndrome do Amarelecimento Foliar da cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

APROVADO em 27 de fevereiro de 2019.

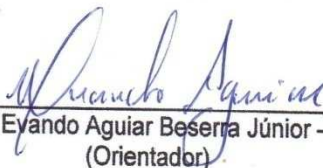
Comissão Julgadora:



Prof. Dr. Cícero Nicolini – UESPI/Membro Externo



Prof. Dr. Marcos César Gonçalves – IBSP/Membro Externo



Prof. Dr. José Eyando Aguiar Beserra Júnior – CCA/UFPI
(Orientador)

TERESINA-PI

2019

A Deus por me dar todas as condições físicas e psicológicas para alcançar mais esse objetivo. A minha amada família pelo apoio e amor. À minha namorada Charliane Melo. Ao casal Campêlo e Silvana que me acolheram em sua residência com carinho e solidariedade. Ao professor José Evando, pelo exemplo de profissional e sua dedicação, no qual tentarei me espelhar na carreira acadêmica. A Layla e Helen, pela disponibilidade e ajuda na execução desse trabalho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu imenso amor por mim, por me permitir conquistar mais esse sonho.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo incentivo e fomento nesses dois anos de muito aprendizado.

A Universidade Federal do Piauí (UFPI) pelo fomento e disponibilidade da estrutura para realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Agronomia - Agricultura Tropical por possibilitar minha inserção na pós-graduação e aquisição de novos conhecimentos.

Ao meu orientador, professor Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior, pelos seus ensinamentos a mim repassados, sua paciência e orientação.

Ao Dr. Marcos C. Gonçalves do Instituto Biológico de São Paulo por fornecer a amostra controle de ScYLV.

Ao Dr. Elliot W. Kitajima da Universidade de São Paulo (USP/ESALq) por fornecer a amostra controle do fitoplasma.

Ao Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar da UFPI, pelo fornecimento de insumos necessários para as análises moleculares.

Aos Engenheiros Agrônomos Marcos André Melo de Oliveira e Acilon da Silva, fiscais da Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão (AGED/MA), pela ajuda nas coletas de plantas de cana-de-açúcar naquele estado.

Ao professor Dr. Clemliton da Silva Ferreira (IFCE) pela ajuda nas coletas de plantas de cana-de-açúcar no município de Viçosa.

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica e social para o Brasil, uma vez que é o principal produtor de açúcar e álcool. A cana-de-açúcar é acometida por doenças que afetam o seu rendimento e entre elas está a síndrome do amarelecimento da folha (SAF) ou amarelinho, doença que pode provocar perdas na produção de até 50%. São conhecidos dois agentes causais da SAF: *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) e *Sugarcane yellow leaf phytoplasma* (ScYLP). No Brasil, os únicos registros desses patógenos foram feitos em cana-de-açúcar na região Sudeste. Apesar dos estados do nordeste brasileiro serem importantes produtores de cana-de-açúcar, não é conhecida a presença desses patógenos. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi realizar a detecção e caracterização molecular de isolados de ScYLV e fitoplasma a partir de amostras foliares coletadas em regiões produtoras de cana-de-açúcar nos estados do Piauí, Ceará e Maranhão. Amostras de folhas de cana-de-açúcar com sintomas de amarelecimento foliar foram coletadas e tiveram seu DNA e RNA total extraído. As amostras foram submetidas a RT-PCR com oligonucleotídeos específicos correspondentes a parte do gene da capa proteica do ScYLV, e nested-PCR com oligonucleotídeos de sequências complementares à região 16S rDNA de fitoplasmas. Algumas amostras positivas tanto para ScYLV, quanto para fitoplasma foram sequenciadas e comparadas com sequências depositadas no GenBank. Árvores filogenéticas foram geradas utilizando os métodos de máxima verossimilhança e *neighbor joining*. As sequências nucleotídicas e de aminoácidos do ScYLV detectados foram comparadas entre si e com sequências de isolados referência. Foram obtidos fragmentos de 450 pb específicos ao ScYLV para 40,49% (41/101) das amostras, enquanto que fragmentos de 210 pb para fitoplasmas foram amplificados em 62,24% (61/98) das amostras. O ScYLV e o fitoplasma foram detectados em todos os municípios amostrados. A incidência do ScYLV foi de 60,52% no município União-PI, 23,52% em São João dos Patos-MA, 17,85% em Sucupira do Riachão-MA e 50% em Viçosa-CE. A incidência do fitoplasma foi de 72,22% em União, 3,57% em Sucupira do Riachão e 100% em São João dos Patos e Viçosa. A comparação de identidade entre as sequências de nucleotídeos (nt) dos isolados de ScYLV variou de 99-100% e para aminoácidos a variação foi de 98-100%. Os isolados de ScYLV deste estudo agruparam no mesmo clado, juntamente com outros isolados brasileiros. Oito amostras de fitoplasma foram sequenciadas, e todas apresentaram 99% de identidade com *Artemisia witches'-broom* quando comparadas por BLASTn. Os oito isolados agruparam com outros fitoplasmas do grupo 16SrVII, com *bootstrap* de 81%. Este estudo identificou o ScYLV e um fitoplasma do grupo 16SrVII associados aos sintomas de SAF em plantas de cana-de-açúcar nos estados do Piauí, Ceará e Maranhão, além de revelar baixa variabilidade genética do gene da ORF3 do ScYLV.

Palavras chave: Amarelinho, *Luteoviridae*, *Mollicutes*, *Polerovirus*, ScYLV.

ABSTRACT

The sugarcane is a cultivated plant of great economic and social importance for Brazil, as it is the main source of sugar and alcohol production. Sugarcane may be affected by diseases that affect their yield, and, among them, is the yellow leaf syndrome (YLS) or yellowing, a disease that may cause production losses of up to 50%. Two causative agents of YLS are known: *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) and *Sugarcane yellow leaf phytoplasma* (ScYLP). In Brazil, the only recorded cases of these pathogens were made in sugarcane in the Southeast region. Although the states of northeastern Brazil are important producers of sugarcane, the presence of these pathogens is not known. Given the above, the objective of this study was to perform molecular detection and characterization of isolates of ScYLV and phytoplasma from leaf samples collected in sugarcane producing regions in the states of Piauí, Ceará and Maranhão. Samples of sugarcane with yellow leaf syndrome symptoms were collected and had their total DNA and RNA extracted. The samples were subjected to RT-PCR with specific oligonucleotides corresponding to part of the ScYLV protein coat gene, and to nested-PCR with oligonucleotides of complementary sequences to the 16S rDNA region of phytoplasmas, aiming to detect ScYLP. Some positive samples for both ScYLV and phytoplasma were sequenced and compared with sequences deposited in GenBank. The phylogenetic trees analysis were generated using the maximum likelihood and neighbor joining methods. The nucleotide and amino acid sequences of ScYLV detected were compared between each other and with reference isolate sequences. Fragments of 450 bp specific to ScYLV were obtained in 40.49% (41/101) of the samples, while fragments of 210 bp for phytoplasmas were an increased number, 62.24% (61/98) of samples. ScYLV and phytoplasma were detected in all sampled cities. The incidence of ScYLV was 60.52% in the city of União-PI, 23.52% in São João dos Patos-MA, 17.85% in Sucupira do Riachão-MA and 50% in Viçosa-CE. The incidence of phytoplasma was 72.22% in União, 3.57% in Sucupira do Riachão and 100% in São João dos Patos and Viçosa. The comparison of identity between the nucleotide sequences (nt) of ScYLV isolates varied from 99-100% and for amino acids the variation was of 98-100%. The ScYLV isolates from this study are grouped in the same clade, along with other Brazilian isolates. Eight phytoplasma samples were sequenced, and all showed 99% identity with *Artemisia witches'-broom* when compared to BLASTn. The eight isolates grouped with other phytoplasmas of the 16SrVII group, with bootstrap of 81%. This study identified ScYLV and a phytoplasma of the 16SrVII group associated with the symptoms of YLS in sugarcane plants in the states of Piauí, Ceará and Maranhã, as well as showing low variability of the ScYLV ORF3 gene.

Keywords: Yellowing, *Luteoviridae*, *Mollicutes*, *Polerovirus*, ScYLV.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Cultura da cana-de-açúcar.....	11
2.2 Síndrome do amarelecimento da folha (SAF) da cana-de-açúcar	12
2.3 <i>Sugarcane yellow leaf virus</i> (ScYLV)	14
2.4 Fitoplasmas associados à cana-de-açúcar	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Coleta do material vegetal	22
3.2 Extração do RNA total.....	23
3.3 Extração do DNA total.....	24
3.4 Detecção do ScYLV	25
3.5 Detecção de fitoplasma.....	26
3.6 Sequenciamento e análise filogenética.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5 CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

No cultivo da cana-de-açúcar ocorrem diversas doenças, e entre elas a síndrome do Amarelecimento Foliar (SAF), também conhecido como amarelinho. Essa síndrome é caracterizada pelo amarelecimento das folhas mais velhas a partir da nervura central, e com progresso da doença ocorre a necrose dos tecidos, das pontas das folhas em direção à base (CHINNARAJA e VISWANATHAN, 2015). Porém, os sintomas da SAF também podem ser ocasionados por fatores abióticos, como deficiência nutricional e o manejo incorreto da cultura, o que dificulta o diagnóstico visual da doença nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar (LOPEZ, HIDALGO e PÁRRAGA, 2014).

A esta doença estão associados dois agentes etiológicos: o *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) e o *Sugarcane yellow leaf phytoplasma* (ScYLP). Ambos os patógenos já foram identificados em plantas de cana-de-açúcar em estados da região Sudeste do Brasil.

O ScYLV é disseminado por meio de afídeos durante sua alimentação nas células do floema de forma persistente circulativa não propagativa, enquanto o fitoplasma é transmitido por cigarrinhas de forma persistente e transovariana. Entretanto, ambos se disseminam de forma eficiente nas áreas de cultivo por meio da propagação vegetativa da cana-de-açúcar (GRAY e GILDOW, 2003; RASSABY et al., 2004; BERTACCINI et al., 2014; TEDESCHI et al., 2006).

Os impactos causados a cultura pelo ScYLV e ScYLP afetam a fisiologia e fenologia da planta, ocasionando a redução da eficiência fotossintética, perdas de características agrônômicas, tais como redução do tamanho de plantas, do diâmetro do colmo, de internódios e massa vegetal, crescimento do limbo foliar alterado e diminuição do rendimento de caldo, sendo esse último o mais agravante para os cultivos destinados a produção de álcool e açúcar. Tais impactos na cultura podem culminar em perdas de produção de até 50% (VISWANATHAN et al., 2014; RASSABY et al., 2003; GONÇALVES, 2005).

Tendo em vista o potencial de dano à cultura da cana-de-açúcar, e da ocorrência de sintomas semelhantes à SAF observados em plantações de cana-de-açúcar nos estados do Piauí e Ceará (dados não publicados, BESSERRA JR., J. E. A.), este estudo objetivou identificar e caracterizar por PCR, sequenciamento e

filogenia os patógenos associados à SAF em áreas de cultivo de cana-de-açúcar nos estados do Piauí, Ceará e Maranhão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea pertencente à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Andropogoneae, subtribo Saccharinae e ao gênero *Saccharum*. As cultivares de cana-de-açúcar desenvolvidas no Brasil e no mundo são oriundas de resultados de cruzamentos de gêneros *Saccharum* spp., incluindo espécies selvagens como *S. spontaneum* L., *S. arundinaceum* Retzius (sin. *Erianthus arundinaceus* (Retzius) Jeswiet), *S. robustum* (Brandes e Jeswit), e *Miscanthus* sp. e espécies cultivadas como *S. officinarum*, *S. barveri* (Jeswit), *S. sinensis* e *S. edule*. O centro de origem de *S. officinarum* parece ser a Nova Guiné, de onde os acessos se espalharam para a Indonésia, China, Índia, Micronésia e Polinésia (MORAIS et al., 2015).

A cana-de-açúcar apresenta um metabolismo do tipo C4, o que lhe permite ter alta eficiência em conversão de energia solar para energia química na captação do CO₂ atmosférico, e uso da água para seu metabolismo e o armazenamento de substâncias de reservas em seu colmo (TEJERA et al., 2007). A sua propagação comercial ocorre de forma assexuada através de toletes cortados do colmo da planta contendo as gemas localizadas na base do nódulo, porém para estudos de melhoramento genético a propagação pode se dá por sementes (CASAGRANDE, 2008). A propagação da cana-de-açúcar também pode ser feita pelo cultivo de mudas pré-brotadas. Essa técnica permite a redução do volume de gastos com colmos por hectare, o aumento da taxa de multiplicação, da sanidade das mudas e da uniformidade do plantio, o que aumenta a operacionalidade do cultivo (GÍRIO et al., 2015). Essas gemas são meristemas embrionários laterais que encontram-se dormentes pelo controle das auxinas durante a dominância apical. A planta ainda jovem se nutrem-se através do consumo de reservas acumulados no tolete e uso parcial de água e nutrientes absorvidos pelas raízes (MAGRO et al., 2011).

As fases fenológicas da cana-de-açúcar podem ser divididas em brotação e emergência, perfilhamento, crescimento dos colmos e maturação dos colmos. A

brotação e emergência iniciam quando o broto rompe e as folhas da gema crescem no sentido da superfície do solo e de forma paralela ocorre o crescimento das raízes. Os processos de brotação e emergência dura de 20 a 30 dias após o plantio, sendo influenciados por fatores internos como sanidade da gema, conteúdo de reserva do tolete, e externa como umidade, temperatura e aeração do solo (GASCHO e SHIH, 1983).

O perfilhamento ocorre ainda na parte subterrânea, e consiste na formação de outros rebentos denominados de perfilhos. Esse processo é regulado por hormônios, a emergência dos perfilhos se dá de 20 a 30 dias após a emergência do colmo primário. Sendo a partir desse processo que se origina as touceiras de cana-de-açúcar, e quando se observar a cobertura total do solo pelas folhas dos perfilhos, nessa etapa do processo o perfilhamento chega ao seu máximo. Após atingir o perfilhamento máximo, inicia-se a fase de crescimento do colmo, durante o crescimento a planta acumula açúcar na base de seu colmo e o crescimento radicular se torna mais intenso e as folhas mais velhas entram em senescência.

A maturação é a fase de acumulação máxima dos fotoassimilados nos órgãos de reserva, que no caso da cana-de-açúcar é a sacarose no colmo. Nessa fase ocorre o engrossamento e alongamento do colmo, elevando o ganho em matéria seca, retenção de sacarose, retenção do alongamento da folhas e posterior destacamento destas. E após a colheita da cana-de-açúcar madura, inicia um novo processo de brotação e perfilhamento, dando origem à soqueira (BATISTA, 2013; MAGRO et al., 2011; MANHÃES et al., 2015).

Porém para o pleno desenvolvimento das fases fenológicas da planta alguns fatores exercem forte influência, como a faixa ideal de temperatura para o crescimento de colmos entre 25 e 35 °C associado às boas condições de radiação solar, fatores genéticos e fisiológicos, como a idade e sanidade de gemas e o manejo da cultura (MAGRO et al., 2011; SERAFIM et al., 2013).

2.2 Síndrome do amarelecimento da folha (SAF) da cana-de-açúcar

Dentre as doenças que acometem a cultura da cana-de-açúcar a SAF merece destaque, pois pode provocar perdas de até 50% da produção, (GONÇALVES, 2005). A doença foi relatada pela primeira vez na década de 80 em cultivares de cana-de-açúcar no Havaí (SCHENCK e LEHRER, 2000). No Brasil foi relata em

1989 no estado de São Paulo (ELSAYED, 2015). A SAF tem dois agentes etiológicos já relatados: *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) e *Sugarcane yellow phytoplasma* (ScYLP) (ELSAYED, 2015; KUMAR et al., 2015).

O quadro sintomatológico é iniciado pela intensa coloração amarelada da nervura central observável na superfície abaxial. Posteriormente, já nas folhas mais velhas as nervuras tornam-se avermelhadas. O amarelecimento, posteriormente se espalha para o limbo da folha, progredindo a partir do ápice em direção a base da folha e é seguida, eventualmente por necrose do tecido. Raízes e caules mostram crescimento comprometido e a produção é significativamente reduzida. Os sintomas visuais geralmente não são confiáveis para identificar a doença, pois o amarelecimento da folha também pode ser causado por outros fatores abióticos (VEGA; SCAGLIUSI e ULIAN, 1997).

Os sintomas iniciais do amarelecimento da nervura central e do limbo foliar podem ser observados precocemente em variedades de cana-de-açúcar por volta de 140 a 150 dias, ocorrendo na primeira, segunda, quarta e quinta folha de plantas infectadas. No entanto, variedades de cana-de-açúcar infectadas com ScYLV podem apresentar a coloração avermelhada na nervura central, sem estender-se para o limbo foliar. Com o progresso da doença, frequentemente, ocorre a formação de necrose a partir das pontas das folhas, onde esta direciona-se para a base do limbo foliar ao longo da nervura central, dando assim um padrão do tipo “V” ou “Y”. O processo de necrose do tecido inicia-se nas folhas mais velhas, mas em variedades altamente suscetíveis os sintomas podem ocorrer nas primeiras folhas do topo da planta em até 300 dias de vida (CHINNARAJA e VISWANATHAN, 2015).

Plantas de cana-de-açúcar infectadas com o ScYLV ocorre encurtamento dos internódios e o aumento do número de folhas. Dentro do conjunto de folhas do topo, o amarelecimento pode ser observado da segunda até a sétima folha e a redução dos internódios é em decorrência da variedade de cana-de-açúcar (CHINNARAJA e VISWANATHAN, 2015).

O diagnóstico da SAF no campo, baseado na sintomatologia, se torna complexo, pois folhas assintomáticas não garantem a ausência dos agentes etiológicos. Da mesma forma que plantas ainda que apresentem sintomas não podem ser categoricamente associadas à presença dos agentes etiológicos, uma vez que condições de manejo da cultura influenciam nos fatores internos e externos da planta que culminam na expressão de sintomas característicos da SAF, como por

exemplo, estresse hídrico e deficiência nutricional de nitrogênio (LOPEZ; HIDALGO; PÁRRAGA, 2014).

2.3 Sugarcane yellow leaf virus (ScYLV)

No Brasil, o primeiro relato da presença do ScYLV ocorreu em 1989 no estado de São Paulo (ELSAYED, 2015). O ScYLV é um vírus pertencente ao gênero *Polerovirus* e família *Luteoviridae* (ICTV, 2018). Seu genoma é de RNA fita simples, sentido positivo, constituído por seis quadros de leituras abertas (*Open reading frames* – ORFs), ORF0 a ORF5, com três regiões não traduzidas (UTRs) que são expressas por mecanismos diversos (SMITH et al., 2000; ICTV, 2018) As partículas do vírus variam de 24 a 29 nm de diâmetro, apresenta uma proteína principal de 27 kDa. (Figura 1). O ácido nucleico tem tamanho estimado de 5,8 kb (SCAGLIUSI e LOCKHART, 2000).

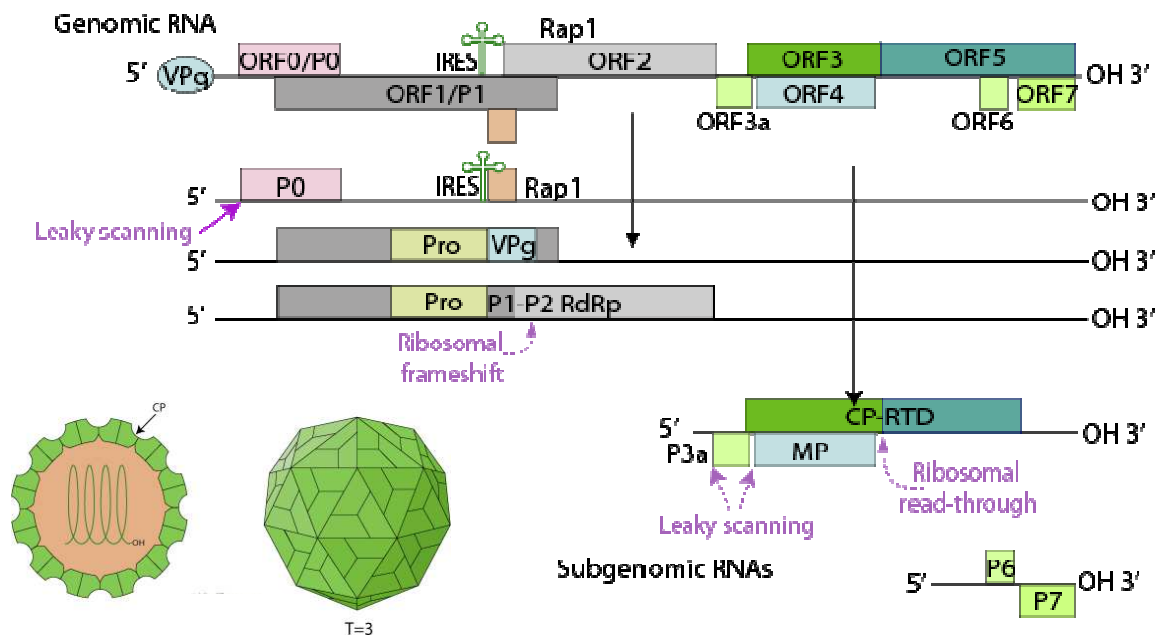


Figura 1 Partícula viral e organização do genoma do gênero *Polerovirus*.
Fonte: Viralzone (2018).

As três primeiras ORFs próximas à região 5' são traduzidas a partir do RNA genômico. A ORF0 é responsável por codificar uma proteína de 30,2 kDa, a qual atua como supressora do silenciamento gênico pós-transcricional; a ORF1 codifica uma protease viral de 72,5 kDa, sobrepondo a ORF2, que é a responsável por codificação de uma proteína envolvida na replicação do vírus, a RNA polimerase depende de RNA (RdRp) de 120,6 kDa (SMITH et al., 2000). As três outras ORFs

estão contidas em um RNA subgenômico, no qual estão incluídas a ORF3, que codifica uma proteína da capa proteica viral (CP) de 21,8 kDa; a ORF4 que codifica a proteína do movimento viral (MP) de 17kDa; e a ORF5 que dá origem a uma proteína de 51,2 kDa envolvida na transmissão do vírus pelos afídeos vetores (CHAY et al., 1995).

Nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar o ScYLV é disseminado por meio de material propagativo, pequenos pedaços do colmo (ELSAYED et al., 2015). O ScYLV é transmitido pelos afídeos *Melanaphis sacchari* (Zehntner), *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), e *R. rufiabdominalis* (Sasaki), sendo o primeiro o que apresenta melhor eficiência de transmissão (SCHENCK e LEHRER, 2000). O ScYLV não é transmitido mecanicamente (SCAGLIUSI e LOCKHART, 2000). A transmissão é do tipo persistente circulativa não propagativa, ou seja, o vírus é adquirido pelos afídeos durante a alimentação, conseguindo atingir a hemolinfa e as glândulas salivares do inseto, porém não consegue se replicar no interior do vetor. As partículas virais são encontradas nos vasos do floema (GRAY e GILDOW, 2003; RASSABY et al., 2003) Outros afídeos que são encontrados se alimentando do floema das plantas de cana-de-açúcar também podem transmitir o ScYLV, porém de baixa eficiência quando comparados a *M. sacchari* e *R. maidis* (LEHRER et al., 2007).

Com exceção do *Beet western yellow virus* (BWYV), a maioria dos vírus pertencentes à família *Luteoviridae* possui reduzida gama de hospedeiros (ELSAYED et al., 2015). O ScYLV é capaz de infectar eficientemente com índice de infecção superior a 90%, via inseto vetor (*M. sacchari*) em condições de casa de vegetação, plantas de trigo, aveia e cevada, e plantas de milho com índice de infecção de 10% (ELSAYED, 2012). O sorgo também é uma hospedeira natural do ScYLV (SCHENCK e LEHRER, 2000).

Os isolados de ScYLV coletados em diferentes continentes apresentam elevada diversidade genética (BORG et al., 2001; MOONAN et al., 2002; ABU AHMAD et al., 2006b). Com base nessa heterogeneidade os isolados de ScYLV foram classificados em genótipos (BRA, PER, CUB e REU) (ABU AHMAD et al., 2006a). O nome dado a esses genótipos foi baseado na localização geográfica onde os isolados foram detectados: Brasil, Peru, Cuba e Ilha de Reunião. Os genótipos de ScYLV foram detectados em 245 amostras de plantas de cana-de-açúcar de diferentes regiões do mundo, sendo 137 genótipos de cana-de-açúcar infectados com os genótipos virais BRA-PER (56%), 51 com CUB (21%) e 82 com REU (33%).

Os genótipos BRA-PER apresentaram maior prevalência, pois foram identificados em 18 regiões do mundo, enquanto os genótipos CUB e REU foram encontrados em quatro regiões (ABU AHMAD et al., 2006a).

Posteriormente, foram identificados genótipos a partir de 15 isolados em regiões produtoras da China: genótipo BRA (6 isolados), genótipo PER (5 isolados) e genótipo CUB (4 isolados) (WANG et al., 2012). Também na China, em estudo com maior número de amostras (332) e locais de coleta observou incidência de 24 a 38% do ScYLV em cana-de-açúcar (LIN et al., 2015). A partir dessas amostras, 141 foram alvo de análise filogenética, que revelou oito genótipos, alguns deles novos (BRA, PER, HAW, CHN3, REU, CHN1, CUB e IND), dos quais 102 foram classificados como genótipo BRA, apresentando maior prevalência. O ScYLV também foi detectado em todo território do Quênia, onde a incidência do vírus foi de 36 a 64%, de modo que, quatro isolados de ScYLV chegaram a no mínimo 90% de identidade de nucleotídeos com genótipos BRA, PER e CUB (AMATA et al., 2016).

Isolados de ScYLV também foram encontrados em coleções de germoplasma em Cuba. Os testes de RT-PCR revelaram que 57,86% das amostras estavam infectadas pelo ScYLV. As análises genótípicas evidenciaram a infecção pelos genótipos CUB, BRA-PER e REU. A maioria das amostras estava infectada por apenas um genótipo viral (82,2%), mas também houve infecção mista de genótipos. Foi a primeira vez que o genótipo REU foi detectado em Cuba (DIAZ et al., 2017).

A partir da sequência do genoma completo de quatro isolados de ScYLV foi possível evidenciar que 15,1% das diferenças de nucleotídeos eram devido a eventos de recombinação (CHINNARAJA et al., 2013). Foram encontrados eventos de recombinação em todas as ORFs, no entanto a ORF2 foi a que apresentou o maior número de pontos de recombinação. A ocorrência de recombinação no genoma do ScYLV também foi caracterizado por Moonan et al. (2000) e Smtih et al. (2000) os quais demonstraram que o ScYLV pertence ao gênero *Polerovirus* a partir de ancestrais oriundos dos gêneros *Luteovirus*, *Polerovirus* e *Enamovirus*. A elevada incidência de eventos de recombinação sugere que a recombinação tem um papel relevante na evolução do ScYLV.

A infecção pelo ScYLV parece impactar nos processos fisiológicos da cana-de-açúcar, pois as plantas apresentam baixa eficiência fotossintética no processo de captação de energia solar no centro de reação do fotossistema II, redução da eficiência na capacidade de troca de CO₂, redução nas quantidades de clorofilas (a e

b), xantofilas e carotenóides, redução na quantidade de sacarose nos colmos de plantas infectadas em decorrência da baixa eficiência na troca de CO₂ e aumento na concentração de açúcares nas folhas das plantas, principalmente a sacarose, (GONÇALVES et al., 2005; VISWANATHAN et al., 2014).

O ScYLV pode também induzir o aumento da enzima precursora do amido (ADP-glicose pirofosforilase) em folhas de plantas infectadas, de forma predominante nas células da bainha e nas células de Kranz. Além disso, as folhas infectadas pelo ScYLV apresentam maior acúmulo de amido nos plastídios das células da bainha do feixe, nas células Kranz, de modo que os níveis de amido tornam-se quatro vezes superiores em relação às plantas saudas. As folhas sintomáticas apresentam maiores níveis de carboidratos, acentuando-se nas folhas mais velhas. Os cloroplastos têm sua estrutura modificada pelo ScYLV, que tornam-se densamente envolvidos por grãos de amido, resultando em desbalanço na relação entre clorofilas *a* e *b*. Em decorrência dessas alterações, as plantas infectadas pelo ScYLV tendem a senescer mais rapidamente (YAN et al., 2009).

Em relação aos parâmetros de crescimento, plantas de cana-de-açúcar infectadas por ScYLV, apresentaram redução do crescimento, redução no número de internódios, no peso das folhas, no peso de colmos, diminuição do índice de área foliar. O rendimento de caldo de cana-de-açúcar também é afetado, sendo este um parâmetro de grande importância, pois é ele que determina a produção de açúcar (VISWANATHAN et al., 2014).

O ScYLV pode interferir também nas características agronômicas da cana-de-açúcar, havendo reduções de até 28% na altura da panícula, 37% no rendimento de caldo, 13% no diâmetro do colmo, e 46% no peso dos colmos (RASSABY et al., 2003). O teor de açúcar dos colmos pode ser reduzido em até 12% (COMSTOCK e MILLER, 2004), quando se contrasta cultivares livres e cultivares infectadas pelo vírus. Viswanathan et al. (2014) relatam reduções nos parâmetros de crescimento e produção entre plantas infectadas com ScYLV e plantas livres do vírus, havendo reduções no número de perfilhos (28,6%), altura de plantas (17,7%), diâmetro de colmo (15,3%), perdas de produção da ordem de 28,1%, e redução de 39,6% no rendimento do suco.

O ScYLV também influencia na redução do peso fresco da planta, por interferir no transporte de açúcar pela células do floema. O vírus também impede o transporte da sacarose para raízes, levando ao aumento da sacarose nas folhas. As

plantas de cana-de-açúcar tiveram redução de 43% no peso seco das raízes, redução da área de absorção do sistema radicular, além de terem a parte aérea comprometida (VASCONCELOS et al., 2009).

A técnica de cultura de meristema mostra-se ser o método mais eficaz na eliminação de vírus de plantas, uma vez que muitos vírus não conseguem se replicar nas regiões meristemáticas. O sucesso da eliminação do ScYLV pelo cultivo meristemático é possível pela distribuição desigual do vírus nos diferentes tecidos até mesmo na folha (ELSAYED et al., 2015). Com o objetivo de obter plantas de cana-de-açúcar livres de vírus o método mais eficiente de eliminação do ScYLV seria a cultura de tecidos (FITCH et al., 2001; PARMESSUR et al., 2002). Utilizando esse método de propagação para cana-de-açúcar, o vírus foi eliminado em 92% das plantas oriundas de meristemas apicais de plantas infectadas e 100% para plantas oriundas das brotações axilares (CHEONG, MOK e LI, 2012). Plantas infectadas pelo ScYLV e regeneradas por meristemas estavam livres do patógeno em 100% das vezes (FITCH et al., 2001). Em trabalho semelhante, a cultura de meristema apical foi eficiente na eliminação do ScYLV, atingindo 92% de sucesso (CHATENET et al., 2001).

A busca por cultivares de cana-de-açúcar resistentes ao ScYLV vem sendo realizada por programas de melhoramento de cana-de-açúcar, porém a complexidade do genoma da cana-de-açúcar dificulta a obtenção de informações genéticas (ELSAYED et al., 2015). Cultivares híbridas de cana-de-açúcar havaianas mostraram de 60 a 70% de suscetibilidade, na tentativa de obter uma cultivar que apresentasse resistência ao vírus cruzamentos foram realizados entre, cultivares resistentes e suscetíveis do qual resultou em 85% da progênie era resistente ao ScYLV, ou seja, houve menor quantidade de vírus detectada nessa progênie, levando a concluir que a resistência ao ScYLV é um traço dominante (KOMOR, 2012). O uso de plantas transgênicas de cana-de-açúcar com resistência ao ScYLV ainda é uma estratégia incipiente, entretanto plantas portando o gene da capa proteica do vírus apresentaram 103 vezes menos carga viral, quando comparada com uma variedade suscetível (ZHU et al., 2011).

2.4 Fitoplasmas associados à cana-de-açúcar

Os fitoplasmas são procariotos que não apresentam parede celular, com célula delimitada por uma membrana plasmática, a qual apresenta uma forma pleomórfica pela ausência da parede celular. O tamanho é variável, entre 200 e 800 nm, e no seu interior encontra-se o material genético, cujo cromossomo varia de 680 a 1600 kb. O cromossomo dos fitoplasmas consiste de um DNA circular de cadeia dupla, distinguindo-se dos micoplasmas e espiroplasmas por possuírem uma região espaçadora de aproximadamente 300 pb entre as regiões gênicas 16S e 23S, e pela tradução da trinca UGA em Triptofano em micoplasmas e espiroplasma, enquanto os fitoplasmas utilizam essa mesma trinca como códon de parada (BERTACCINI, 2007; BERTACCINI e DUDUK, 2009).

A primeira associação entre micoplasmas (MLOs) e as plantas ocorreu em 1967, com a observação de corpúsculos celulares com formato pleomórfico oblongos e arredondados em vasos do floema de plantas ornamentais e batata (DOI et al., 1967). Com o advento das técnicas moleculares de identificação como nested-PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), RFLP (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) e sequenciamento de DNA foi possível caracterizar a diversidade desse grupo de fitopatógenos e concluir que pertencem a um grupo monofilético da classe dos *Mollicutes* (BERTACCINI, 2007). A partir da década de 90 os MLOs passaram a ser denominados de fitoplasmas, sendo então, reconhecidos como importantes fitopatógenos, ocorrendo em ampla gama de espécies botânicas (SEARS e KIRKPATRICK, 1994).

A identificação desse grupo de fitopatógenos atualmente se dá por meio de técnicas moleculares baseadas no sequenciamento de nucleotídeos do gene 16S rDNA, da nested-PCR e da PCR-RFLP (BERTACCINI, 2007). O uso de nested-PCR permite elevar a sensibilidade e especificidade da PCR sendo aplicada para amplificação de DNA do fitoplasma que encontram-se em baixas concentrações no tecido vegetal (GUNDERSEN et al., 1994). A nested-PCR se dá por uma amplificação preliminar do DNA com oligonucleotídeos universais, seguida de uma segunda amplificação a partir do produto da primeira PCR com o uso de oligonucleotídeos específicos; essa técnica permite identificar fitoplasmas que estão presentes em infecções mistas (LEE et al., 1994).

O estudo do gene 16S rDNA a partir das análises de PCR-RFLP e sequenciamento permitiram expandir os grupos de classificação, as relações filogenéticas com outros fitoplasmas e a diversidade genética desses patógenos, (BERTACCINI et al., 2014).

A disseminação dos fitoplasmas pode ocorrer por insetos vetores pertencentes às famílias *Cicadellidae*, *Fulgoridae* e *Psyllidae* ao se alimentarem da seiva elaborada dos vasos do floema, entrando pelo canal alimentar do inseto e atingindo a hemolinfa, na qual podem ou não se multiplicarem. Também podem alcançar as glândulas salivares do inseto vetor, podendo apresentar um período de latência (BERTACCINI et al., 2014; BERTACCINI e DUDUK, 2009). Há relatos da transmissão transovariana desse grupo de fitopatógenos, como *Candidatus Phytoplasma mali* por *Cacopsylla melanoneura*, *C. Phytoplasma prunorum* por *Cacopsylla pruni* (TEDESCHI et al., 2006), *Mulberry dwarf* por *Hishimonoides sellatiformis* (KAWAKITA et al., 2000), *White leaf sugarcane phytoplasma* por *Matsumuratettix hiroglyphicus* (HANBOONSONG et al., 2002). As formas de propagação vegetativa como enxertia, estaquia, borbulhia e, além do transporte de materiais propagativos como bulbos, tubérculos e gemas possibilitam a disseminação desses fitopatógenos, havendo também a possibilidade de propagação por sementes, como por exemplo, o fitoplasma causador do amarelecimento letal do coqueiro que é transmitido em embriões das sementes (BERTACCINI et al., 2014; BERTACCINI, 2007; CORDOVA et al., 2003).

Quanto à sintomatologia, os fitoplasmas tipicamente podem causar o surgimento de estruturas verdes que se assemelham a folhas no lugar de estruturas florais, também chamado de filoidia ou virescência, a esterilidade de flores, emissões de brotações axilares semelhante à vassoura de bruxa, e crescimento anormal de regiões internodais. No entanto, os sintomas são variáveis em decorrência do estresse o qual as plantas são submetidas. O amarelecimento das folhas é um sintoma comum causado pelos fitoplasmas, que ocorre por alterações no transporte e síntese de carboidratos e inibição da fotossíntese pela destruição e redução da biossíntese da clorofila e carotenóides no fotossistema II (BERTACCINI et al., 2014; BERTAMINI e NEDUNCHEZHIAN, 2001).

Os fitoplasmas foram classificados e agrupados de acordo com as análises de RFLP e filogenia das sequências do gene 16S rDNA (BERTACCINI e DUDUK, 2009). Os grupos de fitoplasmas existentes são 16SrI (*Aster yellows*), 16SrII

(*Peanut witchaes broom*), 16SrIII (*X-disease*), 16SrIV (*Coconut lethal yellows*), 16SrV (*Elm yellows*), 16SrVI (*Clover proliferation*), 16SrVII (*Ash yellows*), 16Sr VIII (*Loofah witches broom*), 16SrIX (*Pigeon pea witches broom*), 16SrX (*Apple proliferations*), 16SrXI (*Rice yellow dwarf*), 16SrXII (*Stolbur*), 16SrXIII (*Mexican periwinkle virescence*), 16SrXIV (*Bermudagrass white leaf*), 16SrXV (*Hibiscus witches broom*), 16SrXVI (*Sugarcane yellow leaf syndrome*), 16SrXVII (*Papaya bunchy top*), 16SrXVIII (*American potato purple top wilt*), 16SrXIX (*Chestnut witches broom*), 16SrXX (*Rhamnus witches broom*), 16SrXXI (*Pinus pytoplasmas*), 16Sr XXII, 16SrXXIII, 16SrXXIV, 16SrXXV, 16SrXXVI, 16SrXXVII, 16SrXXIII 16SXXIX (*Cassia wiches broom*), 16SXXX (*Salt cedar witches broom*), 16SXXXI (*Soyabean stunt*), 16SXXXII (*Malaysian periwinkle virescence and phyllody*) e 16SXXXIII (*Allocasuarina muelleriana phytoplasma*) (BERTACCINI et al., 2014).

Em cana-de-açúcar são conhecidos cinco principais doenças ocasionadas por fitoplasmas de grande importância como, *Sugarcane Grassy shoot*, *Sugarcane white leaf*, *Sugarcane yellow leaf*, *Sugarcane green garssy shoot disease* e *Ramu stunti*, pertencente aos grupos 16Srl, 16SrIII 16SrXI, 16SrXVI (RAO, MALL e MARCONE, 2012). O ScYLP foi relatado causando a síndrome do amarelecimento da folha da cana-de-açúcar em Cuba, pertencendo ao grupo 16SrXVI e a espécie *Candidatus Phytoplasma graminis* (AROCHA et al., 2005). No Brasil já foi relatada a ocorrência de fitoplasmas associados à síndrome do amarelecimento em cultivos de cana-de-açúcar em São Paulo, pertencente ao grupo 16Srl (*Aster yellows*) (SILVA et al, 2009).

A folha branca da cana-de-açúcar foi relatada pela primeira vez em 1954 na Tailândia (RAO, MALL e MARCONE, 2012). Seus sintomas característicos são a clorose total das folhas, iniciando pelo clareamento da nervura central, redução do limbo foliar e raquitismo (RAO, MALL e MARCONE, 2012). O *Sugarcane white leaf phytoplasma* (ScWLP) pode ser transmitido naturalmente por cigarrinhas *Matsumuratettix hiroglyphicus* Matsumura, sendo também possível a transmissão transovariana (HABOONSOG et al., 2002). O ScWLP é pertencente ao grupo de outros importantes fitoplasmas que causam doenças em culturas da família *Poaceae*, como o *Rice yellow dwarf* (16SrXI) (BERTACCINI et al., 2014).

Em plantas de cana-de-açúcar na Tailândia sintomas semelhantes ao fitoplasma da folha amarela, porém as análises de RFLP e a filogenia agruparam o isolado no grupo do fitoplasma da folha branca da cana-de-açúcar (SOUFI et al.,

2013). Nesse país, o sintoma de amarelecimento foliar parece ser um sintoma inicial da síndrome da folha branca, o que resulta em maior dificuldade na avaliação visual destas doenças. No Hawaii, fitoplasmas foram identificados em plantas de cana-de-açúcar assintomáticas. As análises filogenéticas comprovaram a presença de dois grupos 16SrI (*aster yellows*) e 16SrIII (*X-diseases*) (SOUFI e KOMOR, 2014). Esses dois grupos também foram identificados em plantas de cana-de-açúcar voluntárias presentes nos campos de cultivo.

O fitoplasma *Candidatus Phytoplasma asteris* também foi relatado em plantas de cana-de-açúcar sintomáticas na Índia. Esse patógeno pertencente ao grupo 16SrI, e compartilha 99% de identidade com o fitoplasma da folha amarela da cana-de-açúcar (KUMAR et al., 2015). No Egito Elsayed et al. (2016) obtiveram isolados, em cana-de-açúcar, do grupo 16SrXI, compartilhando de 98-99% de identidade de sequências com outros fitoplasmas do grupo 16SrXI. No estado de São Paulo, Brasil, um fitoplasma foi detectado em 36% das amostras sintomáticas de cana-de-açúcar coletadas em Piracicaba, Jaú e Ribeirão Preto (SILVA, BEDENDO e CASAGRANDE, 2008).

Estudos visando a eliminação do fitoplasma dos materiais propagativos de cana-de-açúcar foram realizados por Soufi e Komor (2014), que submeteram os toletes de cana-de-açúcar à processos de termoterapia, tendo sido o binômio 50 °C / 30 min o tratamento que conseguiu eliminar completamente o fitoplasma do grupo 16SrI. Tratamentos mais longos ou com temperaturas mais elevadas reduziam severamente a viabilidade da planta.

O cultivo de meristemas de cana-de-açúcar têm conseguido elevadas taxas de sucesso (85 a 100%) na eliminação de fitoplasmas em toletes infectados (PARMESSUR et al., 2002; WONGKAEW e FLETCHER, 2004). O uso de antibióticos como a oxitetraciclina em concentrações de 200 a 300 mg.L⁻¹, pode também ser aliado ao cultivo de meristemas, visando otimizar a controle de fitoplasmas (WONGKAEW e FLETCHER, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal

As amostras foliares de cana-de-açúcar foram coletadas nos municípios produtores de cana-de-açúcar dos estados do Piauí, Ceará e Maranhão (Tabela 1),

totalizando 101 amostras devidamente identificadas e acondicionadas temporariamente em gelo até serem levadas ao laboratório e preservadas a -80 °C até o processo de extração dos ácidos nucleicos.

3.2 Extração do RNA total

As amostras foliares foram submetidas à extração de RNA total com auxílio reagente Trizol® (Life Technologies, EUA) conforme as recomendações do fabricante. O material vegetal foi macerado em almofariz e pistilo de porcelana com auxílio de nitrogênio líquido. A seguir foi adicionado 1,0 mL do Trizol® e 200 µL de clorofórmio, ambos a 4 °C, ao tecido macerado, agitando-se por inversão manualmente para homogeneizar e incubado por 3 min em temperatura ambiente (23 a 25 °C).

Tabela 1 Localização, data de coleta e número de amostras coletadas nas regiões produtoras de cana-de-açúcar no Piauí, Ceará e Maranhão

Propriedades	Município - Estado	Coordenadas	Data de coleta	Número de amostra
COMVAP	União - Piauí	04°52'09" S / 42°52'45" O	13/03/18 20/08/18	38
Pinga	São João dos Patos - Maranhão	06°29'46" S / 43°39'51" O	11/05/18	17
Cosmo		06°22'16" S / 43°31'41" O		
Vale do Riachão	Sucupira do Riachão - Maranhão	06°26'02" S / 43°32'01" O	11/05/18	28
Vertende		06°26'30" S / 43°31'55" O		
Campos Sales		35°57'67" S / 41°11'80" O		
Chico Gabriel	Viçosa - Ceará	35°63'49" S / 41°12'95" O	26/09/18	18
Mapirunga		36°36'51" S / 41°15'41" O		

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (microcentrífuga refrigerada Novatecnica NT805) a 4 °C por 15 min a 12.000 g visando separar as fases orgânica e aquosa. Em seguida 400 µL do sobrenadante (fase aquosa) foram transferidos para novo microtubo de 2,0 mL. O RNA foi precipitado pela adição de 500 µL de isopropanol P.A. e posterior agitação por inversão durante 2 min e mantidos em repouso durante 10 min. As amostras foram submetidas à centrifugação a 4 °C durante 10 min a 12.000 g, para precipitação do RNA total na forma de *pellet* no fundo do microtubo. O sobrenadante foi descartado deixando-se apenas o precipitado, o qual foi lavado com 1,0 mL de etanol 75% a 4 °C e centrifugado a 7500 g por 5 min a 4 °C, em seguida o sobrenadante foi descartado, deixando-se os microtubos abertos por 20 min a temperatura ambiente visando secagem ao ar. O RNA foi ressuscitado em 50 µL de água ultrapura livre de nucleases e incubado em banho-maria a 58 °C por 18 minutos.

Os RNAs foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5x, corados com brometo de etídio e visualizadas sob luz UV no transiluminador UVB (Loccus do Brasil, São Paulo, Brasil). Os RNAs foram armazenados a -80 °C para posteriormente serem utilizados nas ampliações de RT-PCR.

3.3 Extração do DNA total

A extração de DNA total das amostras de folhas de cana-de-açúcar seguiu o protocolo de Dellaporta et al. (1983), onde fragmentos do tecido vegetal foram macerados em almofariz de porcelana com auxílio de nitrogênio líquido, em seguida o macerado foi transferidos para microtubos de 1,5 ml e adicionado 33 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20%, sendo agitado e em seguida incubado em banho maria a 65 °C por 10min. Após a incubação adicionou-se 160 µL de acetato de potássio 5 M, agitou por 2 min e levou a centrifugação por 10 min a 18.407 g. Posteriormente o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e nele adicionou-se isopropanol (1/2 do volume do sobrenadante), sendo posteriormente agitado e centrifugado por 10 min a 18.407 g. Em seguida o sobrenadante foi descartado, adicionou-se 500 µL de etanol 70% no microtubo, e este foi submetido à centrifugação por 5 min a 18.407 g. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi removido e os tubos deixados

abertos em temperatura ambiente para secagem por 20 min. Após a secagem o DNA foi resuspenso em 150 µL de água ultrapura livre de nucleases.

Os DNAs foram analisados por eletrofoerese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5x, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV no transiluminador UVB (Loccus do Brasil, São Paulo, Brasil) e armazenado a -80 °C até serem utilizados nas análises de nested-PCR.

3.4 Detecção do ScYLV

Ensaio de RT-PCR (reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase) foram realizados para detectar a infecção por ScYLV em folhas de cana-de-açúcar. O cDNA viral foi sintetizado usando Murine M-MLV transcriptase reversa® (Promega, Madison, WI, EUA) utilizando o oligonucleotídeo P2r de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados os oligonucleotídeos específicos (P1f e P2r) (GONÇALVES et al., 2002), que amplificam um fragmento de 450 pb correspondendo à parte da ORF3 CP (capa proteica) do vírus.

Cada reação consistiu de 10 µL de tampão *Taq* DNA polimerase; 2 µL de MgCl₂; 1 µL de dNTP Mix (100 nM), 1 µL de cada primer (*forward* e *reverse*) (40 µM); 0,25 µL (5u/µL) de *Taq* DNA polimerase, 2 µL de cDNA e água ultrapura autoclavada (q.s.p. 50 µL). As reações de PCR foram realizadas no termociclador automático Axygen (Axygen, Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os parâmetros do ciclo para amplificação consistiram de um passo de desnaturação a 94 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 30 seg, anelamento a 60 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 7 min (GONÇALVES et al., 2002).

Os produtos de PCR foram analisados por eletrofoerese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5x, corados com brometo de etídio e visualizadas sob luz UV no transiluminador UVB (Loccus do Brasil, São Paulo, Brasil) e foram armazenados a -20 °C.

3.5 Detecção de fitoplasma

Testes de nested-PCR foram realizados para detecção de fitoplasmas nas folhas de cana-de-açúcar coletadas. O DNA total (1 µL) foi adicionado a primeira reação de PCR com o oligonucleotídeos MLOX e MLOY que amplificam um fragmento de 700 pb da região 16s DNA dos fitoplasmas. O produto de amplificação (1 µL) resultante da primeira PCR foi usado para a reação de nested-PCR utilizando os oligonucleotídeos P1 e P2. Esta última reação amplifica um fragmento de 210 pb. Ambos os pares de oligonucleotídeos utilizados são universais, não específicos para os grupos de fitoplasma (WANG et al., 2014). A primeira PCR e a nested-PCR se construíram de 10 µL de tampão *Taq* DNA polimerase; 2 µL de MgCl₂; 1 µL de dNTP Mix (100 nM), 1 µL de cada oligonucleotídeo (*forward* e *reverse*) (40 µM); 0,25 uL (5u/µL) de *Taq* DNA polimerase, 1 µL de DNA total e água ultrapura autoclavada (q.s.p. 50 µL). As reações de PCR foram realizadas no termociclador automático Axygen (Axygen, Applied Biosystems, Foster City, EUA). As condições do ciclo de amplificação para a primeira PCR foram: 94 °C durante 5 min para desnaturação, seguido de 25 ciclos a 94 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 10 min. Condições semelhantes foram usadas para nested-PCR, porém, com 35 ciclos e temperatura de anelamento de 62 °C (WANG et al., 2014).

Os produtos das nested-PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5x, corados com brometo de etídio e visualizadas sob luz UV no transiluminador UVB (Loccus do Brasil, São Paulo, Brasil) e conservados a -80 °C.

3.6 Sequenciamento e análise filogenética

Os produtos de RT-PCR que apresentaram resultado positivo para o ScYLV e, produtos de amplificação por nested-PCR que apresentaram resultado positivo para infecção por fitoplasma foram enviados para purificação e sequenciamento em ambas as direções (*forward* e *reverse*) para a empresa Macrogen (Macrogen, Inc., Seul, Coréia do Sul). Os eletroferogramas gerados foram analisados por meio do programa SeqAssem (HEPPERLE, 2011).

As sequências obtidas foram inicialmente analisadas por BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), e otimizadas manualmente para assegurar a homologia posicional. Os *gaps* foram tratados como dados perdidos. Os alinhamentos múltiplos das sequências foram gerados pela ferramenta MUSCLE através do programa MEGA v. 8.0 (KUMAR et al., 2018). Os alinhamentos foram corrigidos manualmente e análise realizada com o programa MEGA v. 8.0 utilizando os métodos de máxima verossimilhança e *Neighbor-Joining* para o ScYLV e o fitoplasma respectivamente, com análise de *bootstrap* com 1.000 repetições. Comparações entre as sequências obtidas e demais sequências de isolados referência foram feitas com DNAMAN versão 4.0 (Lynnon Biosoft), usando a opção alinhamento duplo com os seguintes parâmetros: K-tuple = 2, Gap penalty = 7, Gap open = 10, Gap extension = 5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi frequente a observação de plantas de cana-de-açúcar com sintomas de SAF (Figura 2) nas plantações de todas as propriedades amostradas. As análises de RT-PCR e nested-PCR permitiram detectar amostras de cana-de-açúcar infectadas com isolados de ScYLV e um fitoplasma, respectivamente, em todos os municípios amostrados (Tabela 2). A incidência total do ScYLV e do fitoplasma foi 40,49% e 62,24% respectivamente, demonstrando que o fitoplasma estava mais presente do que o vírus nas regiões amostradas.

Por município a incidência do ScYLV alcançou 60,52%, 23,52%, 17,85% e 50% em União-PI, São João dos Patos-MA, Sucupira do Riachão-MA e Viçosa-CE, respectivamente. A incidência do fitoplasma foi de 72,22%, 3,57% e 100% em União, Sucupira do Riachão, São João dos Patos e Viçosa, respectivamente.

Os valores de incidência do ScYLV foram elevados quando comparados aos 19,4% encontrados em regiões produtoras de cana-de-açúcar na Argentina (BERTANI et al., 2014), e próxima dos 38% de incidência encontrado em regiões produtoras na China (LIN et al., 2015). Incidências de até 64% foram registradas em algumas regiões do Quênia (AMATA et al., 2016). A elevada incidência do ScYLV também foi registrada na Flórida, com 73,5% das amostras infectadas, evidenciando ser este o patógeno viral de maior ocorrência em plantas de cana-de-açúcar daquela região produtora (FILLOUX et al., 2018).

Incidências de fitoplasma também já foram relatadas em plantações de cana-de-açúcar nas cidades paulistas de Piracicaba (50%), Jaú (20%) e Ribeirão Preto (30%) (SILVA, BEDENDO e CASAGRANDE, 2008).



Figura 2 Folhas de cana-de-açúcar com sintomas da síndrome do amarelecimento foliar (SAF). Contraste entre plantas saudáveis e afetadas com a SAF (A), amostras de folhas saudáveis comparadas com folhas doentes (B e C).

Os resultados obtidos neste estudo, juntamente com aqueles disponíveis na literatura científica, revelam elevada incidência dos agentes etiológicos da síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar no Brasil e outros países. Essa elevada incidência pode ser explicada pela propagação por material vegetativo infectado e por meio de insetos vetores (ELSAYED et al., 2015). Esses fatores muitas vezes são desconhecidos ou negligenciados pelos produtores, o que pode resultar em elevada incidência dos patógenos. Deve-se levar em consideração também a permanência das plantas em campo, uma vez que em um único plantio de cana-de-açúcar pode-se realizar colheitas anuais, variando de cinco a oito anos de cultivo, sobretudo para

pequenos produtores que não realizam a renovação do canavial com regularidade (SOARES, 2014).

Tabela 2 Incidência do *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) e fitoplasma em folhas de cana-de-açúcar, detectados por RT-PCR e nested-PCR respectivamente

Amostras	Localidade	ScYLV	Fitoplasma
A1	União – PI	+	-
A2		-	-
A3		-	-
A4		-	-
A5		-	-
A6		-	-
A7		-	-
A8		-	-
A9		-	+
A10		-	-
A11		-	-
A12		-	+
A13		-	+
A14		-	+
A15		-	+
A16		+	+
A17		-	+
Total		60,52%	72,22%
B1	São João dos Patos - MA	-	+
B2		-	+
B3		-	+
B4		-	+
B5		-	+
B6		-	+
B7		-	+
B8		-	+
B9		+	+
B10		-	+
B11		-	+
B12		-	+
B13		+	+
B14		+	+
B15		+	+
B16		-	NT
B17		-	+
Total		23,52%	100%
C1		-	-
C2		+	-
C3		-	-
C4		-	-
C5		-	-
C6		-	-
C7		-	-
C8		-	-
C9		-	-
C10		-	-
C11		-	-
C12		-	-
C13		+	-
C14		-	-
C15		-	-

C16		-	-
C17		-	-
C18		+	-
C19	Sucupira do Riachão – MA	-	-
C20		+	-
C21		-	-
C22		-	-
C23		-	-
C24		-	-
C25		-	-
C26		+	-
C27		-	-
C28		-	+
Total		17,85%	3,57%
D1		+	+
D2		+	+
D3		+	+
D4		+	+
D5		+	NT
D6		+	+
D7		+	+
D8		+	+
D9		+	+
D10	União – PI	+	+
D11		+	+
D12		+	+
D13		+	+
D14		+	+
D15		+	+
D16		+	+
D17		+	+
D18		+	+
D19		+	+
D20		+	+
D21		+	NT
Total		60,52%	72,22%
E1		-	+
E2		+	+
E3		-	+
E4		+	+
E5		-	+
E6		+	+
E7		-	+
E8		+	+
E9		-	+
E10	Viçosa-CE	+	+
E11		+	+
E12		-	+
E13		-	+
E14		+	+
E15		+	+
E16		+	+
E17		-	+
E18		-	+
Total		50%	100%
Total de amostras infectadas (%). Amostras positivas / total de amostras		40,49% (41/101)	62,24% (61/98)

(+) amostras positivas; (-) amostras negativas. NT. Não testada.

Os dados também evidenciaram que 33,57% das amostras havia infecção mista com SYLV e fitoplasma. Isso se deve provavelmente ao fato de os insetos vetores do vírus e do fitoplasma, no caso os afídeos e cigarrinhas respectivamente, compartilharem a mesma planta para sua alimentação..

Os fragmentos de DNA amplificados das 41 amostras positivas para ScYLV correspondem a ORF3 que codifica a proteína do capsídeo e resultaram em um amplicom de 450 pb (Figura 3). A comparação de nucleotídeos da ORF3 dos isolados de ScYLV deste estudo revelou 99 a 100% de identidade, e de 98 a 100% com as sequências de isolados depositadas no Genbank (Tabela 3).

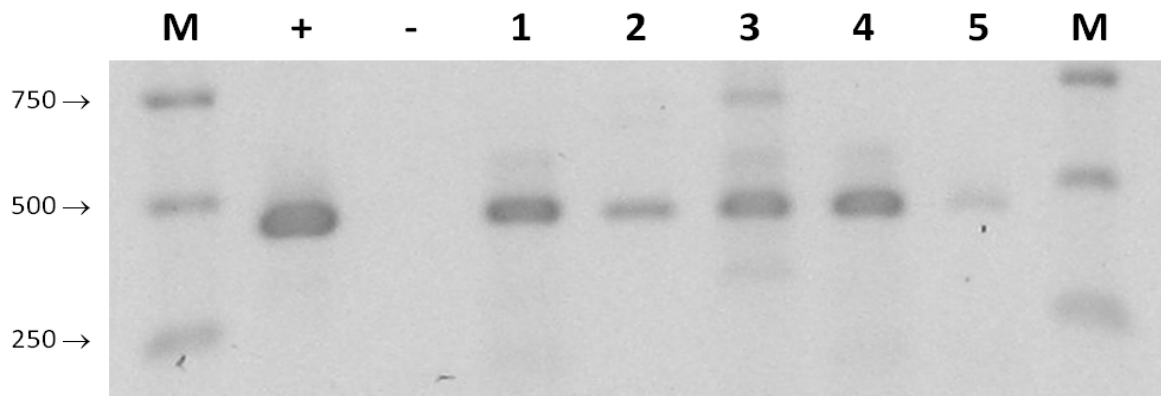


Figura 3 Padrão eletroforético em gel de agarose (1,0%) de fragmentos de DNA de amostras de cana-de-açúcar, amplificados por RT-PCR com oligonucleotídeos específicos. M, marcador molecular de comprimento (1kb DNA ladder, em pb); +, controle positivo (cDNA da CP do vírus amplificado por PCR); - controle negativo (água ultrapura esterilizada); 1 (amostra de União-PI, 1ª coleta); 2 (amostra de São João dos Patos-MA); 3 (amostra de Sucupira do Riachão-MA); 4 (amostra de União-PI, 2ª coleta) e 5 (amostra de Viçosa-CE).

Quando compara-se as sequências de aminoácidos da ORF3 dos isolados obtidos nesse estudo com outros depositados no Genbank, observa-se que a identidade variou de 98 a 100% e a mesma variação ocorreu quando compara-se os aminoácidos dos isolados deste estudo entre si (Tabela 3). Esses resultados demonstram que os isolados de ScYLV deste estudo apresentam baixa variabilidade genética para o gene da capa protéica do vírus (ORF3), e que o gene da capa proteica viral (ORF3) mostra-se conservado nestes isolados. De acordo com *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), para que um isolado de *Polerovirus* seja classificado como nova espécie a variação de aminoácidos deve ser

superior a 10% para qualquer produtor sequenciado das ORFs do genoma viral (ICTV, 2018).

Com o objetivo de traçar o perfil evolutivo dos isolados de ScYLV foi construída uma árvore filogenética com base nas sequências nucleotídicas da ORF3 dos isolados (Figura 4). Nota-se que houve agrupamento dos isolados A1, A16, B9, B13, B14, B15, C2 e C13 junto com os isolados brasileiros BRA-YL1 (AM072750), BRA1 (AJ582772) e BRA2 (AJ582779), além de isolados de outros países, os quais compartilharam identidade de sequência de nucleotídeos de 98 a 100% (Tabela 3). Os oligonucleotídeos da capa protéica viral (ORF3) usados na identificação do ScYLV neste estudo não discriminam os genótipos a que cada isolado pertence.

Tabela 3 Percentual de identidade de nucleotídeos (diagonal abaixo) e aminoácidos (diagonal acima) da ORF3 do genoma do *Sugarcane yellow leaf virus* dos isolados obtidos em coletas no Piauí, Maranhão e Ceará

	A1 ¹	A16 ¹	B9 ¹	B13 ¹	B14 ¹	B15 ¹	C2 ¹	C13 ¹	C18 ¹	C20 ¹	C26 ¹	REU – YL2 ²	BRA – YL1 ²	HAW87 – 4094 ²	CHI – GX1 ²	PER1 ²
A1¹	-	100	100	100	100	100	100	100	98	100	100	100	99	100	99	99
A16¹	100	-	100	100	100	100	100	100	98	100	100	100	99	100	99	99
B9¹	100	100	-	100	100	100	100	100	98	100	100	100	99	100	100	99
B13¹	100	100	100	-	100	100	100	100	98	100	100	100	99	100	100	99
B14¹	100	100	100	100	-	100	100	100	98	100	100	100	99	100	100	99
B15¹	100	100	100	100	100	-	100	100	98	100	100	100	99	100	100	99
C2¹	100	100	100	100	100	100	-	100	98	100	100	100	99	100	100	99
C13¹	100	100	100	100	100	100	100	-	98	100	100	100	99	100	100	99
C18¹	99	99	99	99	99	99	99	99	-	98	98	98	98	98	98	98
C20¹	100	100	100	100	100	100	100	100	99	-	100	100	99	100	100	99
C26¹	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	-	100	99	100	100	99
REU – YL2²	100	100	100	100	100	100	100	100	99	100	99	-	98	100	98	99
BRA – YL1²	99	99	99	99	99	99	99	99	98	99	99	94	-	98	97	98
HAW87 – 4094²	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	93	96	-	98	99
CHN – GX1²	99	99	100	100	100	100	100	100	99	100	99	95	99	97	-	98
PER1²	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	98	99	99	99	-

¹Isolados deste estudo.

²Isolados de referência obtidos do Genbank.

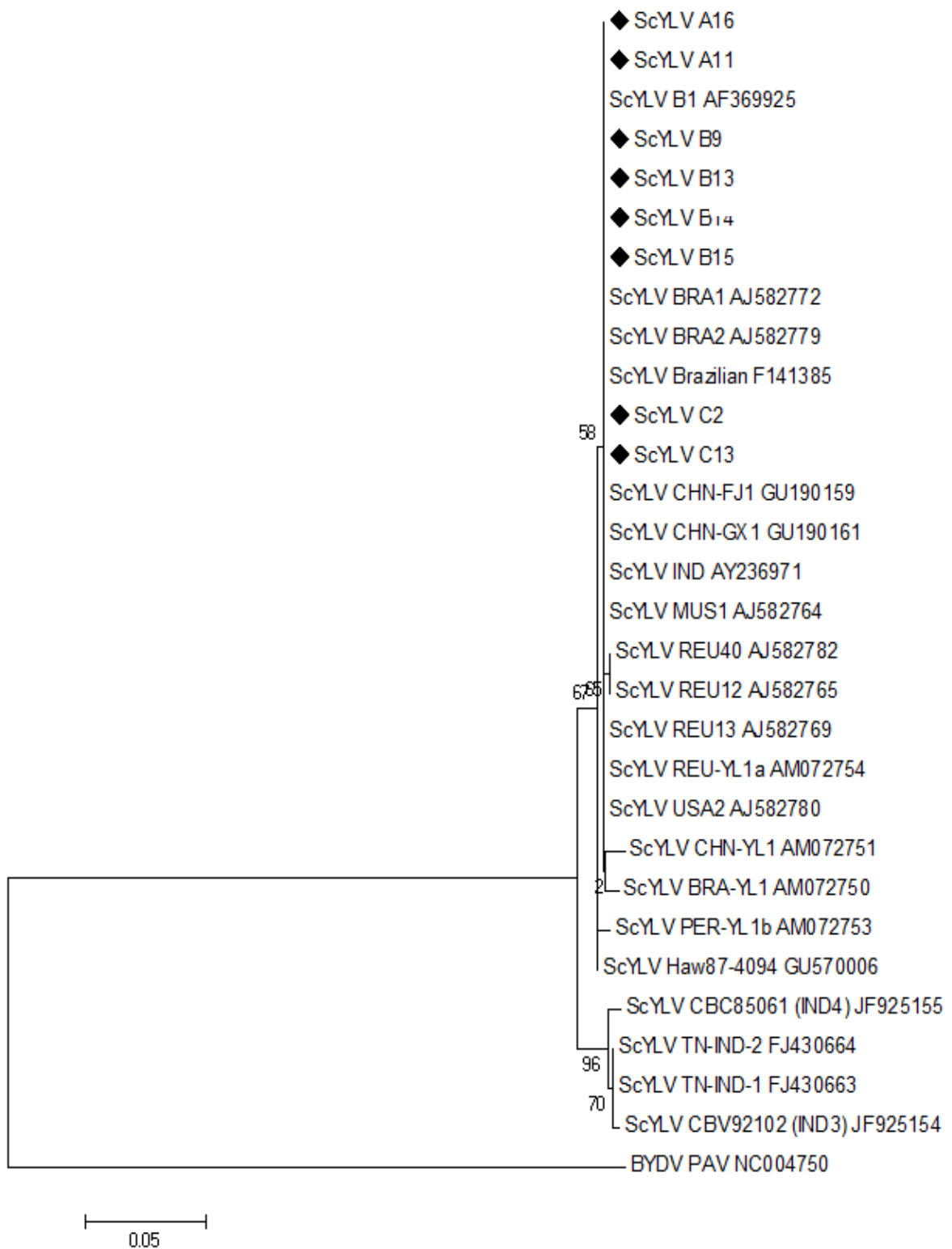


Figura 4 Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica da ORF 3 de isolados de *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV). A árvore foi construída usando o método da máxima verossimilhança. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores de *bootstrap* (1000 repetições) são indicados acima dos internódios. *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) foi usado como *outgroup*. Os isolados obtidos neste estudo estão marcados (◆).

Assim, não é possível indicar a que genótipo pertence os isolados de ScYLV deste estudo. De qualquer forma, a filogenia contribuiu com os resultados (Figura 3, Tabela 3) da ocorrência do ScYLV em cana-de-açúcar no nordeste brasileiro. Os fragmentos do gene 16S do rDNA das amostras positivas para fitoplasmas (Tabela 2) amplificados por nested-PCR resultaram em amplicons de 210 pb (Figura 5).

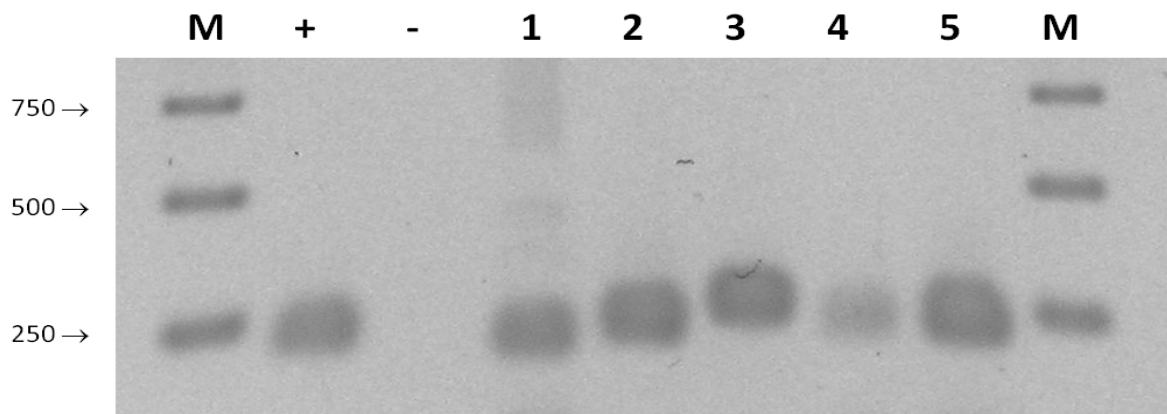


Figura 5 Padrão eletroforético em gel de agarose (1,2%) de fragmentos de DNA de amostras de cana-de-açúcar, amplificados por Nested-PCR com oligonucleotídeos específicos. M, marcador molecular de comprimento (1kb DNA ladder, em pb); +, controle positivo (fitoplasma obtido de *Solidago microglossa*); - controle negativo (água ultrapura esterilizada); 1 (amostra de União-PI, 1ª coleta); 2 (amostra de São João dos Patos-MA); 3 (amostra de Sucupira do Riachão-MA); 4 (amostra de União-PI, 2ª coleta) e 5 (amostra de Viçosa-CE).

A análise das sequências de nucleotídeos dos produtos de nested-PCR positivos para o fitoplasma através do BLASTn, demonstrou que os isolados obtidos nesse estudo alcançaram 99% de identidade com representantes do grupo 16SrVII (*Ash yellows*) subgrupo “B” (Figura 6). A filogenia reforçou o elevado percentual de identidade ao agrupar esses isolados com *Artemisia witches-broom phytoplasma* (DQ989180) e *Erigeron witches-broom phytoplasma* (AY034608), com 81% de suporte de *bootstrap*, ambos pertencentes ao grupo 16SrVII-B (Figura 7), evidenciando que os isolados A13, B5, B11, B13, D6, D8, E13 e E18 pertencem ao grupo 16SrVII-B. A árvore filogenética não indica correlação geográfica entre os isolados de fitoplasma sequenciados neste estudo, uma vez que isolados obtidos de regiões distintas agruparam em mesmo clado (Figura 7).

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Artemisia witches'-broom phytoplasma isolate III contains 16S ribosomal RNA, tRN	249	249	94%	5e-62	99%	gi 119382598 DQ989180.1
<input type="checkbox"/>	Artemisia witches'-broom phytoplasma isolate II contains 16S ribosomal RNA, tRN	249	249	94%	5e-62	99%	gi 119382597 DQ989179.1
<input type="checkbox"/>	Artemisia witches'-broom phytoplasma isolate I contains 16S ribosomal RNA, tRN/	249	249	94%	5e-62	99%	gi 119382596 DQ989178.1
<input type="checkbox"/>	Erigeron witches'-broom phytoplasma strain RPWB 16S ribosomal RNA gene, part	249	249	94%	5e-62	99%	gi 22652300 AF411592.1
<input type="checkbox"/>	Erigeron witches'-broom phytoplasma 16S ribosomal RNA gene, partial sequence;	249	249	94%	5e-62	99%	gi 21307637 AY034608.1
<input type="checkbox"/>	Ash yellows phytoplasma strain AshY3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	225	225	94%	5e-55	95%	gi 4008075 AF105315.1
<input type="checkbox"/>	Candidatus Phytoplasma fraxini clone Gr-7b 16S ribosomal RNA gene and 16S-23	221	221	94%	6e-54	94%	gi 1359094594 KY454858.1
<input type="checkbox"/>	Candidatus Phytoplasma fraxini strain ASHY4 16S ribosomal RNA gene, partial se	221	221	94%	6e-54	94%	gi 442539876 JQ868445.1
<input type="checkbox"/>	Candidatus Phytoplasma fraxini strain ASHY-7 16S ribosomal RNA gene, partial se	221	221	94%	6e-54	94%	gi 315258452 HQ589190.1
<input type="checkbox"/>	Ash yellows phytoplasma ribosomal RNA operon, partial sequence	221	221	94%	6e-54	94%	gi 6007830 AF189215.1
<input type="checkbox"/>	Ash yellows phytoplasma strain LWB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence;	221	221	94%	6e-54		

 **Questions/comments**

Figura 6 Valores de cobertura e identidade de sequência obtidos pela ferramenta *on line* BLASTn (NCBI), quando testado a sequência do fitoplasma B5, obtida por Nested-PCR com os oligonucleotídeos MLOX/MLOY e P1/P2.

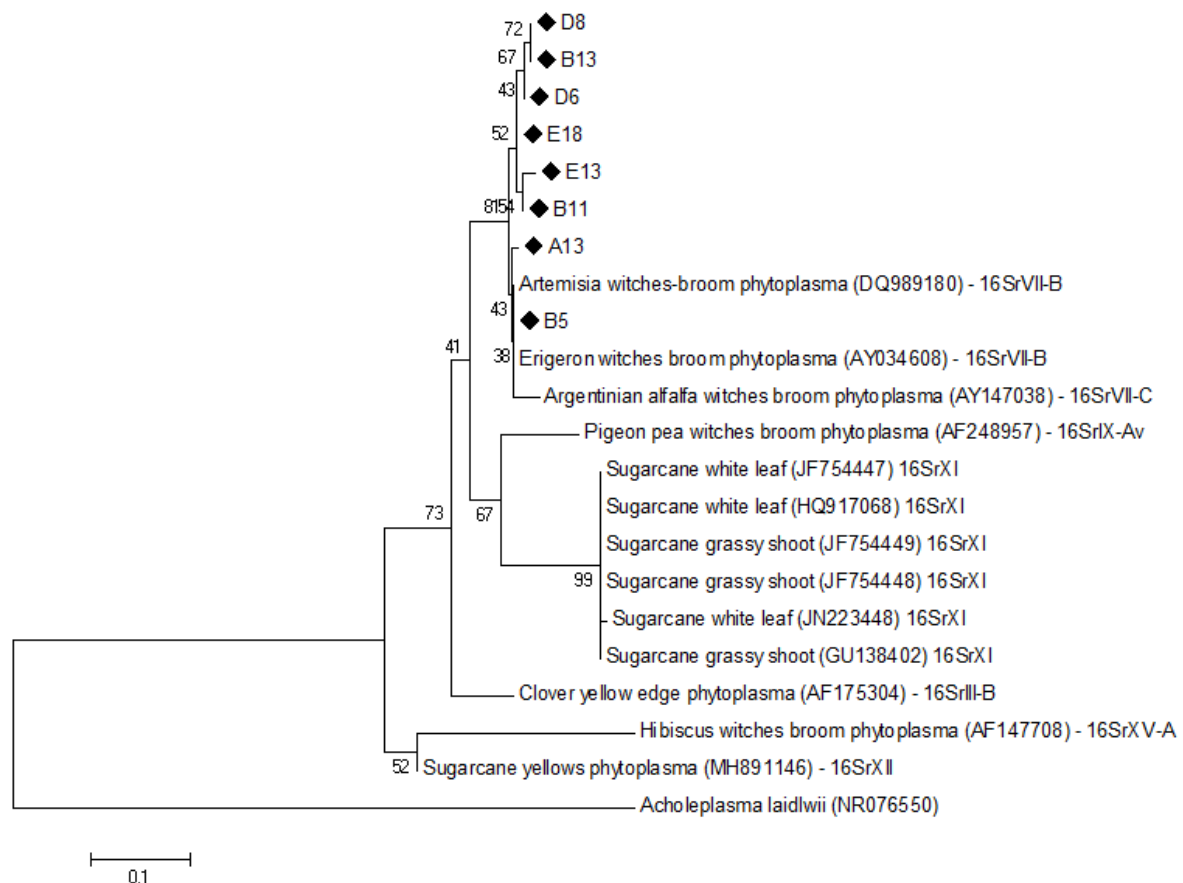


Figura 7 Árvore filogenética construída usando o método *Neighbor-Joining* com as sequências da região 16S rDNA do fitoplasma identificado na cana-de-açúcar (isolados A13, B5, B11, B13, D6, D8, E13 e E18), de fitoplasmas representantes dos grupos 16SrIII, VII, IX, XI, XII disponíveis no GenBank, e do procaríoto *Acholeplasma laidlawii*, como ancestral comum dos fitoplasmas. Os números nos ramos são valores de *bootstrap* (1000 repetições). As barras representam escala genética. Os isolados obtidos neste estudo estão marcados (◆).

A troca de material vegetal entre produtores sem controle de qualidade e certificação da sanidade fitossanitária, pode ter disseminado os patógenos através de material vegetal infectado, fazendo com que os patógenos consigam ser distribuídos para áreas mais distantes. A disseminação dos patógenos pode também ter sido favorecida dentro dos campos de cultivo pela ação dos vetores.

Diversos fitoplasmas pertencentes a diferentes grupos já foram relatados em associação à SAF da cana-de-açúcar: 16SrI (*aster yellows*), 16SrIII (*X-diseases*), 16SrXI (*Rice yellow dwarf*) e 16SrXVI (*Sugarcane yellow leaf syndrome*) (AROCHA et al., 2005; SILVA et al., 2009; SOUFI et al., 2013; ELSAYED e BOULILA, 2014; SOUFI e KOMOR, 2014; KUMAR et al., 2015). No Brasil, o primeiro relato de *Ash yellows* subgrupo “B” foi feito por Barros et al. (2000) em plantas de *Erigeron* sp. e *Catharanthus roseus* com sintomas de vassoura de bruxa. No entanto, não se

conhecia a associação de fitoplasma do grupo 16SrVII com a síndrome do amarelecimento da cana-de-açúcar, sendo este estudo o primeiro a relatar esta associação.

O uso de oligonucleotídeos que possibilite amplificar fragmentos maiores do gene 16S dos isolados do fitoplasma deste estudo (Tabela 2) permitirá obter sequências com maior número de sítios de restrição, viabilizando a técnica de RFLP com diferentes enzimas, podendo evidenciar maior diversidade de grupos de fitoplasma associados à SAF (Figura 7).

Das 101 amostras coletadas, em 31 não foi possível a amplificação de fragmentos de tamanho esperado para o ScYLV ou para fitoplasmas (Tabela 2). Possivelmente, as amostras, mesmo apresentando sintomas de amarelecimento foliar, não estivessem infectadas com nenhum dos patógenos, ou suas concentrações tenham sido insuficientes para serem detectados pelas técnicas utilizadas neste estudo. Além disso, sabe-se que algumas condições abióticas podem induzir sintomas semelhantes à SAF, o que pode ter levado a coleta de material vegetal não infectado.

5 CONCLUSÕES

O ScYLV e um fitoplasma do grupo 16SrVII (*Ash yellows*) subgrupo B, estão associados à síndrome do amarelecimento foliar em plantas de cana-de-açúcar nos estados do Piauí, Ceará e Maranhão.

Os isolados do ScYLV obtidos neste estudo apresentam baixa variabilidade genética da ORF3.

É a primeira vez no mundo que um fitoplasma do grupo 16SrVII é encontrado em associação à SAF em cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

- ABU AHMAD, Y. A.; ROYER, M.; DAUGROIS, J. H.; COSTET, L.; LETT, J-H.; VICTORIA, J. I.; GIRARD, J-C.; ROTT, P. Geographical distribution of four *Sugarcane yellow leaf virus* genotypes. **Plant Disease**, v. 90, n. 9, p. 1156-1160, 2006a.
- ABU AHMAD, Y A.; RASSABY, L.; ROYER, M.; BORG, Z.; BRAITHWAITE, K. S.; MIRKOV, E.; IREY, M. S.; PERRIER, X.; SMITH, G. R.; ROTT, P. Yellow leaf of sugarcane is caused by at least three different genotypes of sugarcane yellow leaf virus, one of which predominates on the Island of Réunion. **Archives of Virology**, v. 151, n. 7, p. 1355-1371, 2006b.
- AMATA, R. L.; FERNANDEZ, E. FILLOUX, MARTIN, D. P.; D.; ROTT, P.; ROUMAGNAC, P. Prevalence of *Sugarcane yellow leaf virus* in sugarcane-producing regions in Kenya revealed by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification method. **Plant Disease**, v. 100, n.2, p. 260-268, 2016.
- AROCHA, Y.; LOPEZ, M.; PIÑOL, B.; FERNANDEZ, M.; PICORNELL, B.; ALMEIDA, R.; PALENZUELA, I.; WILSON, M. R.; JONES. P. *Candidatus Phytoplasma graminis* and *Candidatus Phytoplasmas caricae*, two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 2451-2463, 2005.
- BARROS, T. S. L.; DAVIS, R. E.; RESENDE, R. O.; DALLY, E. L. Erigeron witches-broom phytoplasma inf Brazil represents new subgroup VII-B in 16 sRNA gene group VII, the Ash yellows Phytoplasma group. **Plant Disease**, v. 86, n. 10, p.1142-1148, 2002.
- BATISTA, L. M. **Avaliação morfofisiológica da cana-de-açúcar sob diferentes regimes hídricos**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- BERTACCINI, A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, n. 2, p. 673-689, 2007.
- BERTACCINI, A.; DUDUK, B. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent reseach. **Phytopatologia Mediterranea**, v. 48, n. 3, p. 355-378, 2009.
- BERTACCINI, A.; DUDUK, B.; PALTRINIERI, S.; CONTALDO, N. Phytoplasmas and phytoplasmas diseases: a severe threat to Agriculture. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 12, p. 1763-1788, 2014.
- BERTAMINI, M.; NEDUNCHEZHIAN, N. Effects of phytoplasma [stolbur – subgroup (Bois noir – BN)] on photosynthetic pigments, saccharides, ribulose 1,5 – biphosphate carboxylase, nitrate and nitrite reductases, and photosynthetic activities in Field-grown grapenive (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. **Photosynthetica**, v. 3, n.1, p. 119-122, 2001.

- BERTANI, R. P.; PERERA, M. F.; ARIAS, M. E.; LUQUE, C.; FUNES, C.; GONZÁLES, V.; CUENYA, M. I.; PLOPER, L. D.; WELIN, B.; CASTAGNARO, A. P. A study of the sugarcane yellow leaf disease in Argentina. **Plant Disease**, v. 98, n. 8, p. 1036-1042, 2014.
- BORG, Z.; MOONAN, F.; BRAITHWAITE, K.; MIRKOV, T. E.; SMITH, G. Characterising the genetic diversity of *Sugarcane yellow leaf virus*. **Proceedings International Society of Sugarcane Technology Congress**, v. 24, p. 654-656, 2001.
- CASAGRANDE, A. A.; VASCONCELOS, A. C. M. Fisiologia da parte aérea. Em: MANHÃES, C. M. C.; GARCIA, R. F.; FRANCELINO, F. M. A.; FRANCELINO, H. O.; COELHO, F. C.; Fatores que afetam a brotação e o perfilhamento da cana-de-açúcar. **Vértices**, v. 17, n.1, p. 163-181, 2015.
- CHATENET, M.; DELAGE, C.; RIPOLES, M.; IREY, M.; LOCKHART, B.; ROTT, P.; Detection of Sugarcane yellow leaf virus in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. **Plant Disease**, v. 85, n. 11, p.1177–1180, 2001.
- CHAY, C. A. A.; SMITH, D. M.; VAUGHAN, R.; GRAY, S. M.; Diversity among isolates within the PAV serotype of *Barley yellow dwarf virus*. **Phytopathology**, v. 86, n. 4, p. 370-377, 1995.
- CHEONG, E. J.; MOCK, R.; LI, R. Elimination of five virus from sugarcane using in vitro culture of axillary buds and apical meristems. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.109, n. 2, p. 439-445, 2012.
- CHINNARAJA, C.; VISWANATHAN, R. Variability in yellow leaf symptom expression caused by the *Sugarcane yellow leaf virus* and its seasonal influence in sugarcane. **Phytoparasitica**, v. 43, n.3, p. 339-353, 2015.
- CHINNARAJA, C.; VISWANATHAN, R.; KARUPPAIAH, R.; BAGAYLAKSHMI, K.; MALATHI, P.; PARAMESWARI, B. Complete genome characterization of *Sugarcane yellow leaf virus* from India: evidence for RNA combination. **European Journal Plant Pathology**, v. 135, n. 2, p. 335-349, 2013.
- COMSTOCK, J. C.; MILLER, J. D. Yield comparisons: disease – free tissue – culture versus bud – propagated sugarcane plants and healthy versus yellow leaf infested plants. **Journal American Society Sugarcane Technologists**, v. 24, s.n, p. 1-40, 2004.
- CORDOVA, I.; JONES, P.; HARRISON, A. N.; OROPEZA, C. *In situ* PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 2, p. 99-108, 2003.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Report**, v. 1, n. 4, p. 19-20, 1983.

DIAZ, O. C. A.; HECHAVARRÍA, M. L. L. O.; IZAGUIRRE, Y. P.; NAVARRO, M. A. Z.; LOPEZ, J. M. M.; LISSBRANT, S.; ARENCIBIA, A. D. Genotyping of *Sugarcane yellow leaf virus* in commercial cultivars na the cuban germplasm colletion. **Sugar Tech**, v. 19, n. 1, p. 102-108, 2017.

DOI, Y.; TERANAKA, M.; K. YORA, K.; ASUYAMA, H. Mycoplasma or PLT grouplike microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or pawlownia witches' broom. **Japanese Journal of Phythopathology**, v. 33, n. 4, p. 259-266, 1967.

ELSAYED, A. L.; BOULILA, M. Molecular identification and phylogenetic analysis of sugarcane yellow leaf phytoplasma (ScYLP) in Egypt. **Journal of Phytopathology**, v. 162, n. 2, p. 89-97, 2014.

ELSAYED, A. I.; KOMOR, E.; BOULILA, M.; VISWANATHAN, R.; ODERO, D.C. Biology and management of *Sugarcane yellow leaf virus*: an historical overview. **Archives of Virology**, v. 160, n.12, p. 2921-2934, 2015.

ELSAYED, A. I. Maize (*Zea mays* L.) constitutes a novel host to *Sugarcane yellow leaf virus*. **Journal of Plant Pathology**, v. 35, n.1, p. 68-74, 2012.

ELSAYED, A. I.; SOUFI, Z.; WAHDAN, K. M.; KOMOR, E. Detection and characterization of phytoplasma and *Sugarcane yellow leaf virus* associated with leaf yellowing of sugarcane. **Journal Phytopathology**, v. 164, n. 4, p. 217-225, 2016.

FILLOUX, D.; FERNANDEZ, E.; COMSTOCK, J. C.; MOLLOV, D.; ROUMAGNAC, P.; ROOT, P. Viral metagenomic-based screening of sugarcane from Florida reveals occurrence of six sugarcane-infecting viruses and high prevalence of *Sugarcane yellow leaf virus*. **Plant Disease**, v. 102, n. 11, p. 2317-2323, 2018.

FITCH, M. M. M.; LEHRER, A. T.; KOMOR, E.; MOORE, P. H.; Elimination of *Sugarcane yellow leaf virus* from infected sugarcane plants by meristem tip culture viralized by blot immunoassay. **Plant Pathology**, v. 50, n. 6, p. 676-680, 2001.

GASCHO, G. J.; SHIH, S. F. Sugarcane. In: TEERE, I. D.; PEET, M. M. **Crop-water relations**. New York: A Wirley Interscience, 1983, p. 445-479.

GÍRIO, L. A. S.; DIAS, F. L. F.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; SCHULTZ, N.; BOLONHEZI, D.; MUTTON, M. A. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n.1, p. 33-43, 2015.

GONÇALVES, M. C.; VEJA, J.; OLIVEIRA, J. G.; GOMES, M. M. A. *Sugarcane yellow leaf virus* infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30. n.1, p. 10-16, 2005.

GONÇALVES, M. C.; KLERKS, M. M.; VERBEEK, M.; VEGA, J.; van den HEUVEL, J. F. J. M. The use of molecular beacons combined with NASBA for the sensitive

detection of *Sugarcane yellow leaf virus*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 5, p. 401-407, 2002.

GONÇALVES, M. C. Viroses da cana-de-açúcar: potencialidade de novas epidemias. **Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p.19-21, 2005.

GUNDERSEN, D. E.; I-M LEE, S. A.; REHNER, R. E.; DAVIS, D. T. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 17, 5244-5252, 1994.

GRAY, S. GILDOW, F. E. Luteovirus aphid interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, n. 1, p. 539-566, 2003.

HANBOONSONG, Y.; CHOOSAI, C.; PANYIM, S.; DAMAK, S. Transovarial transmission of sugarcane White leaf phytoplasmas in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). **Insect Molecular Biology**, v. 11, n. 1, p. 93-100, 2002.

HEPPERLE, D. **DNA Dragon** 1.4.1 - DNA sequence contig assembler software. <http://www.dna-dragon.com/>. Acesso em 15 de ago. 2018.

ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/. Acesso em: 23 out. 2018.

KAWAKITA, H.; SAIKI, T.; WEI, W.; MITSUHASHI, W.; WATANABE, K.; SATO, M. Identification of Mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. **Phytopathology**, v. 90, n. 8, p. 909-914, 2000.

KOMOR, E. Susceptibility of sugarcane, plantation weeds and grain cereals to infection by *Sugarcane yellow leaf virus* and selection by breeding in Hawaii, **European Journal Plant Pathology**, v. 129, n. 3, p. 379-388, 2011.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, MICHAEL; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA 8: Mega X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.

KUMAR, S.; TIWARI, A. K.; HOLKAR, S. K.; DUTTAMAJUMDER, S. K.; RAO, G. P. Characterization of a 16Srl-B subgroup phytoplasma associated with sugarcane yellow leaf disease in India. **Sugar Tech**, v. 17, n. 2, p. 156-161, 2015.

LEE I-M, D. E.; GUNDERSEN, R. W.; HAMMOND, R. E. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. **Phytopathology**, v. 84, n. 6, p. 559-556, 1994.

LEHRER, A. T.; SCHENCK, S.; YAN, S. L.; KOMOR, E. Movement of aphid-transmitted *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) within and between sugarcane plants. **Plant Pathology**, v. 56, n.4, p. 711-717, 2007.

LIN, Y. H.; WU, X. B.; LIU, Y. H.; XIAO, S. H.; ZHOU, G. H.; CHEN, R. K.; FU, H. Y.; GAO, S. J. Molecular detection, genetic diversity and distribution of sugarcane yellow leaf virus genotypes in China. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, n.3, p. 200-207, 2015.

LOPEZ, M.; HIDALGO, W.; PÁRRAGA, C. Severidade del síndrome del amarillamiento de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) asociado al virus de la hoja amarilla. **Revista Unellez de Ciencia y Tecnología**, v.32, s.n., p. 7-12, 2014.

MORAIS, L. K.; CURSI, D. E.; SANTOS, J. M.; SAMPAIO, M.; CÂMARA, T. M. M.; SILVA, P.; A.; BARBOSA, G. V.; HOFFMANN, H. P.; CHAPOLA, R. G.; FERNANDES JÚNIOR, A. R.; GAZAFFI, R. **Melhoramento genético de cana-de-açúcar**. Aracajú, p. 38, 2015.

MAGRO, F. J.; TAKAO, G.; CAMARGO, P. E.; TAKAMATSU, S. Y. **Biometria em cana-de-açúcar**. ESALQ, Piracicaba, São Paulo, p. 1-18 2011.

MANHÃES, C. M. C.; GARCIA, R. F.; FRANCELINO, F. M. A.; FRANCELINO, H. O.; COELHO, F. C.; Fatores que afetam a brotação e o perfilhamento da cana-de-açúcar. **Vértices**, v. 17, n.1, p. 163-181, 2015.

MOONAN, F.; MIRKOV, T. E. Analyses of the genotypic diversity among North, South, and Central American isolates of *Sugarcane yellow leaf virus*. Evidence for Colombian origins and for intraspecific spatial phylogenetic variation. **Journal of Virology**, v. 76, n. 3, p. 1339-1348, 2002.

MOONAN, F.; MOLINA, J.; MIRKOV, T. E. *Sugarcane yellow leaf virus*: an emerging virus that has evolved by recombination between luteoviral and poleroviral ancestors. **Virology**, v. 269, n. 1 p. 158-171, 2000.

PARMESSUR, Y.; ALJANABI, S.; SAUMTALLY, S.; DOKKUN-SAUTALLY, A. *Sugarcane yellow leaf virus* and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. **Plant Pathology**, v.51, n.5, p. 561-566, 2002.

RASSABY, L.; GIRARD, J. C.; LETOURMY, P.; CHAUME, J.; IREY, M. S.; LOCKHART, B. E. L.; KOKJA, H.; ROTT, P. Impact of *Sugarcane yellow leaf virus* on sugarcane yield and juice quality in Réunion Island. **European Journal of Plant Pathology**, v. 10, n. 5, p. 459-466, 2003.

RAO, G. P.; MALL, S.; MARCONE, C. Recent biotechnological approaches in diagnosis and management of sugarcane phytoplasma diseases. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v.6, n. 2, p. 19-29, 2012

SCAGLIUSI, S. M.; LOCKHART, B. E. L. Transmission, characterization, and serology of a luteovirus associated with yellow leaf syndrome of sugarcane. **Phytopathology**, v. 90, n. 2, p. 120-124, 2000.

SCHENCK, S.; LEHRER, A. T. Factors affecting the transmission and spread of *Sugarcane yellow leaf virus*. **Plant Disease**, v. 84, n. 10, p. 1085-1088, 2000.

SCENCK, S.; LEHRER, A. T.; WU, K. Yellow leaf syndrome. **Hawai Agriculture Resarch Center Pathology Report**, v. 68, p. 1-6, 2001.

SEARS, B. B.; KIRKPATRICK, B. C. Uveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. **ASM News**, (Whashington), v. 60, n. 6, p. 307-312, 1994.

SERAFIM, L.G.F. STOLF, R.; SILVA, J. R.; SILVA, L. C. F.; MANIERO, M. A. Influência do plantio mecanizado no índice de brotação da cana-de-açúcar. **STAB** v. 31, n, 3, p. 22-25, 2013.

SILVA, E. G.; BEDENDO, I. P.; CASAGRANDE, M. V. Ocorrência de fitoplasma associado à síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar em três regiões do estado de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 6, p. 453-456, 2008.

SILVA, E. G.; BEDENDO, I. P.; CASAGRANDE, M. V.; MORAES, V. A. Molecular identification and phylogenetic analysis of a group 16SRI-B phytoplasma associated with sugarcane yellow leaf syndrome in Brazil. **Journal of phytopathology**, v. 157, n 11/12, p. 771—774, 2009.

SMITH, G. R.; BORG, Z.; LOCKHART, B. E. L.; BRAITHWAITE, K. S.; GIBBS, M. J.; *Sugarcane yellow leaf virus*: a novel member of the Luteoviridae that probably arose by inter species recombination. **Journal of General Virology**, v.81, n. 7, p.1865-1869, 2000.

SOARES, M. B. B. **Sistemas de cultivo em área de reforma de cana-de-açúcar e a sucessão de culturas na composição da comunidade infestante** (Dissertação mestrado em agronomia), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

SOUFI, Z.; KOMOR, E. Latent infection of asymptomatic Hawaiian sugarcane cultivars whit 16Srl and 16SrXI phytoplasmas. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, n. 3, p. 255-263, 2014.

SOUFI, Z.; SAKUANRUNGSIRIKUL, S.; WONGWARAT, T.; HAMARN, T.; SRISINK, S.; KOMOR, E. Sugarcane yellow leaf symptomatic plants in Thailand are infected by White leaf phytoplasma, not by leaf yellows phytoplasma. **Australasian Plant Pathology**, v. 43, n. 6, p. 723-729, 2013.

TEDESCHI, R.; FERRATO, V.; ROSSI, J.; ALMA, A. Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopylla melanoneura* and *Cacopsylla pruini*. **Plant Pathology**, v. 55, n. 1, p. 18-24, 2006.

TEJERA, N. A.; RODÉS, R.; ORTEGA, E.; CAMPOS, R.; LLUCH, C. Comparative analysis of physiological characteristics and yield components in sugarcane cultivars. **Field Crops Research**, Amsterdam ,v.102, n. 1 p.64–72, 2007.

- VASCONCELOS, A. C. M.; GONÇALVES, M. C.; PINTO, L. R.; LANDELL, M. G. A.; PERECIN, D. Effects of *Sugarcane yellow leaf virus* on sugarcane yield and root system development. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 31-35, 2009.
- VEGA, J.; SCAGLIUSI, S. M. M.; ULIAN, E. C. Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: Evidence of association with a luteovirus. **Plant Disease**, v. 81, n. 1, p. 21-26, 1997.
- WAN G. M. Q.; XU, D. L.; LI, R.; ZHOU, G. H. Genotype identification and genetic diversity of *Sugarcane yellow leaf virus* in China. **Plant Pathology**, v. 61, n. 5, p. 986-993, 2012.
- WANG, X, Y.; LI, W, F.; HUANG, Y. K.; ZHANG, R. Y.; LUO, Z. M.; SHAN, H. L.; YIN, J.; SHEN, K.; JIA, Y. M.; BAI, Z. G. Analyses of the 16S-23S intergenic region of the phytoplasma causing the sugarcane White leaf disease in Yunnan Province, China. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n.2, p. 184-188, 2014.
- VISWANATHAN R.; CHINNARAJA, C.; MALATHI, P.; GOMATHI, R.; RAKKIYAPPAN, P.; NEELAMATHI, D.; RAVICHANDRAN, V. Impact of *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) infection on physiological efficiency and growth parameters of sugarcane under tropical climatic conditions in India. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 7, p. 1805-1822, 2014.
- WONGKAEW, P.; FLETCHER, J. *Sugarcane white leaf phytoplasma* in tissue culture: long-term maintenance, transmission, and oxytetracycline remission. **Plant Cell Reports**, v. 23, n. 6, p. 426-434, 2004.
- YAN, S. L.; LEHRER, A. T.; HAJIREZAEI, M. R.; SPRINGER, A.; KOMOR, E. Modulation of carbohydrate metabolism and chloroplast structure in sugarcane leaves which were infected by *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 73, n. 4-5, p. 78-87, 2009.
- ZHU, Y. J.; McCAFFERTY, H.; OSTERMAN, G.; LIM, S.; AGBAYANI, R.; LEHRER, A.; SCHENK, S.; KOMOR, E. Genetic transformations with untranslatable coat protein gene of *Sugarcane yellow leaf virus* reduces virus titers in sugarcane. **Transgenic Research**, v. 20, n. 3, p. 503-512, 2011.