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

**Levantamento de hospedeiros alternativos de *Leifsonia xyli* subsp.
xyli e análise de genótipos de sorgo como hospedeiros
experimentais**

Aline Cristine Zavaglia

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2015**

Aline Cristine Zavaglia
Engenheira Agrônoma

**Levantamento de hospedeiros alternativos de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e
análise de genótipos de sorgo como hospedeiros experimentais**

Orientador:
Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2015

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

Zavaglia, Aline Cristine

Levantamento de hospedeiros alternativos de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e análise de genótipos de sorgo como hospedeiros experimentais / Aline Cristine Zavaglia. - - Piracicaba, 2015.

70 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Cana-de-açúcar 2. Raquitismo das soqueiras 3. PCR 4. Hospedeiros alternativos
5. Hospedeiros experimentais I. Título

CDD 632.32
Z39L

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Por todo amor, paciência e incentivo dedico essa conquista
aos meus amados pais, Silvana e Plinio,
a minha irmã Danielle, ao meu sobrinho Leonardo e ao meu namorado Rafael.
Vocês foram e são fundamentais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que me guiou até aqui, me deu inúmeras bênçãos e nos momentos mais difíceis me deu forças para continuar, não acredito no acaso, tenho fé em Deus;

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, que me proporcionou essa excelente oportunidade;

Ao meu orientador e professor Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo pela confiança, paciência, dedicação, conselhos e ensinamentos;

Aos professores e funcionários da ESALQ/USP, em especial aos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia e a Prof. Cláudia Monteiro Vitorello do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos e apoio, vocês são pessoas admiráveis;

Aos orientadores e professores de graduação da Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR/Campus Araras, que também contribuíram para a profissional que sou hoje;

A CAPES pela bolsa concedida;

Aos professores Carlos Tadeu dos Santos Dias e Leandro José Dallagnol que disponibilizaram tempo e dedicação para uma valiosa contribuição nas análises estatísticas;

Ao meu amigo do Laboratório de Genética Molecular (LGM) Rafael Popin que com sua iniciação científica e trabalho de conclusão de curso prestou grande contribuição em parte dessa dissertação;

Aos demais amigos do LGM: Fernanda Moretti, Mariana Cicarelli, Lillian Bibiano, Raphael Severo, Silvania Machado e mesmo aqueles que hoje não estão mais lá como Débora Wassano, Giselle de Carvalho, Jerônimo Vieira, Maisa Curtolo, Suzane Saito, Thais Egreja e Thayne Munhoz; pela grande amizade, a valiosa ajuda e companheirismo, vocês terão ainda mais sucesso;

Aos meus amigos de mestrado, em especial Flávia Rogério, Marina Gouvêa e Victor de Souza, pelos estudos, pelas risadas e pela grande amizade que construímos, vocês são incríveis;

A todos meus amigos e demais colegas que sempre desejaram meu bem e sucesso, desejo de coração o mesmo a vocês;

Ao Centro de Tecnologia Canavieira, CTC, uma empresa maravilhosa a qual faço parte e posso desempenhar o meu trabalho na área de fitopatologia;

A todos os colaboradores do CTC, em especial aos meus amigos de trabalho Cristina Jorge, Enrico Arrigoni, Juliana Bombecini, Natália Volpato e Sidney Ducatti, pela amizade e ajuda na condução da parte experimental realizada no CTC e ao pesquisador Hugo Alejandro Campos de Quiroz pela contribuição com os resumos em inglês;

Aos meus pais Silvana e Plínio, a minha irmã Danielle, ao meu sobrinho Leonardo, ao meu namorado Rafael e a toda minha família, por me acompanharem todos esses anos com tanta paciência, força, apoio, companheirismo, confiança e amor, um dos meus grandes objetivos de vida é dar razões para vocês se orgulharem de mim e serem tão felizes comigo quanto sou com vocês.

"Nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis,
a próxima tentativa pode ser a vitoriosa."

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
Referências	17
2 LEVANTAMENTO DE HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS DE <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	21
Resumo	21
Abstract	21
2.1 Introdução	22
2.2 Desenvolvimento	25
2.2.1 Material e Métodos	25
2.2.1.1 Material vegetal	25
2.2.1.2 Extração de DNA total do material vegetal.....	26
2.2.1.3 Desenvolvimento de novos <i>primers</i> para detecção de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	26
2.2.1.4 PCR convencional para detecção de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> em diferentes hospedeiros.....	27
2.2.1.5 Teste de especificidade dos <i>primers</i> FL12650F2/FL12650R2 em bactérias endofíticas de cana-de-açúcar	28
2.2.1.6 Identificação das bactérias endofíticas de cana-de-açúcar	28
2.2.2 Resultados	29
2.2.2.1 Desenvolvimento de novos <i>primers</i> para detecção de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	29
2.2.2.2 Teste de especificidade dos <i>primers</i> FL12650F2/ FL12650R2 em bactérias endofíticas de cana-de-açúcar	31
2.2.2.3 Identificação das bactérias endofíticas de cana-de-açúcar	33
2.2.2.4 PCR convencional com diferentes <i>primers</i> para detecção de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> em diferentes hospedeiros	34
2.2.3 Discussão.....	36
2.3 Conclusões.....	38
Referências	38
3 SORGO COMO ORGANISMO MODELO PARA O ESTUDO DO RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS.....	43
Resumo.....	43

Abstract.....	43
3.1 Introdução.....	44
3.2 Desenvolvimento	45
3.2.1 Material e Métodos	45
3.2.1.1 Material vegetal.....	45
3.2.1.1 Plantio em casa de vegetação	45
3.2.1.2 Preparo do inóculo de Lxx e inoculação	46
3.2.1.3 Variáveis de crescimento	47
3.2.1.4 Confirmação da infecção por Lxx.....	48
3.2.1.5 Análises estatísticas	48
3.2.2 Resultados	48
3.2.2.1 Confirmação da infecção por Lxx.....	48
3.2.2.2 Efeito da inoculação com Lxx em variáveis de crescimento	50
3.2.3 Discussão	63
3.3 Conclusões	64
Referências.....	64
ANEXOS.....	67

RESUMO

Levantamento de hospedeiros alternativos de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e análise de genótipos de sorgo como hospedeiros experimentais

O Brasil, maior produtor mundial de cana-de-açúcar, produzirá cerca de 642 milhões de toneladas em 9 milhões de hectares plantados da cultura na safra 2014/2015. A cana-de-açúcar, assim como a maioria das culturas semi-perenes, naturalmente perde produtividade ao longo dos cortes e o setor canavieiro se preocupa com a longevidade dos canaviais, que é limitado, entre outros fatores, por doenças bióticas. O raquitismo das soqueiras (*Ratoon Stunting Disease* - RSD) é considerada a doença mais importante da cultura por causar significativas perdas em produtividade. O agente causal do RSD é a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx); o gênero é cosmopolita e apresenta inúmeras espécies. No entanto, a subespécie Lxx tem como único hospedeiro natural conhecido a cana-de-açúcar. O estudo de hospedeiros alternativos deste patógeno reveste-se de importância pela possibilidade de outras espécies servirem como fonte de inóculo para a cana-de-açúcar e também pela possibilidade da descoberta de um hospedeiro experimental que permita o estudo do RSD em condições experimentais mais favoráveis do que a cana-de-açúcar. O presente trabalho realizou um levantamento de possíveis hospedeiros alternativos de Lxx cultivados a partir de sementes ou coletados em áreas de cultivo de cana-de-açúcar empregando pares de *primers* desenvolvidos especificamente para a bactéria. O trabalho também objetivou analisar o desenvolvimento de três genótipos de sorgo após inoculações artificiais com Lxx. A bactéria não foi detectada em todos os vinte e sete hospedeiros analisados, sendo vinte e duas espécies de gramíneas, confirmando que seu único hospedeiro é a cana-de-açúcar. Por outro lado, Lxx infectou as três espécies de sorgo e causou significativa redução tanto em altura como em diâmetro das plantas comparado a plantas não infectadas. Conclui-se, portanto, que Lxx não coloniza naturalmente várias gramíneas, no entanto diferentes genótipos de sorgo podem ser usados como hospedeiros experimentais para estudos de RSD.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Raquitismo das soqueiras; PCR; Hospedeiros alternativos; Hospedeiros experimentais

ABSTRACT

Screening of alternative hosts of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and analysis of sorghum genotypes as experimental hosts

Brazil is the main world producer of sugarcane, with a predicted production of 642 million tons in approximately 9 million hectares in the 2014/2015 harvest. As most semi-perennial crops, its productivity is reduced along successive cropping (ratoons). Thus, increasing the longevity of sugarcane crops, which is limited by biotic diseases, is an important goal for Brazil's sugar industry. Ratoon stunting disease (RSD) is considered the most important disease of sugarcane because it causes significant losses in productivity. RSD is caused by the bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), a cosmopolitan genus with numerous species. However, to date sugarcane is the only known natural host of this pathogen. Identifying alternative hosts of Lxx is important not only because they might represent an additional source of inoculum but also because some might represent a better working model to the study of RSD than sugarcane. This study carried out a PCR-based screening of potential Lxx hosts with primers developed to specifically detect Lxx, using as source seeds or plant specimens collected in sugarcane fields. The effect of artificial inoculations of Lxx on the growth of three sorghum cultivars was also analyzed. Lxx was not detected in all twenty-seven alternative hosts tested, out of which twenty represented grass species, thus confirming the specificity of the Lxx-sugarcane relationship. In addition, Lxx infected the three sorghum genotypes and significantly reduced their height and diameter when compared to non-infected plants. It is concluded that Lxx does not infect other grass species; however sorghum genotypes can be used as experimental hosts in the study of RSD.

Keywords: Sugarcane; Ratoon stunting disease; PCR; Alternative hosts; Experimental hosts

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) está entre as culturas mais cultivadas do mundo (FAO, 2013). Originária da Ásia, provavelmente da Nova Guiné, chegou ao Brasil no período colonial onde encontrou condições adequadas para seu desenvolvimento, tornando o país o maior produtor mundial da cultura, seguido por Índia e China. O país também é o maior produtor mundial de açúcar e etanol de cana-de-açúcar (BRASIL, 2015), sendo responsável por mais de 50% do açúcar comercializado no mundo (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014). Em cerca de 9 milhões de hectares, estima-se que o Brasil produzirá aproximadamente 642 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2014/2015. A área plantada aumentou, no entanto, houve queda na produtividade, que diminuiu na última safra (Figura 1.1).

Figura 1.1 - Séries históricas de produção de cana-de-açúcar, área plantada e produtividade ao longo das últimas nove safras

Fonte: CONAB (2014)

A cana-de-açúcar é uma cultura semi-perene, caracterizada pelo rebrote da planta após seu corte, dando origem a uma soqueira. Mesmo com o uso de insumos para potencializar a produtividade, a resposta das soqueiras é naturalmente menor ao longo dos cortes, o que faz com que seja necessária a renovação dos canaviais em média a cada cinco anos (Figura 1.2).

Figura 1.2 - Produtividade agrícola (toneladas por hectare) em função da idade de corte da cana-de-açúcar em duas safras consecutivas

Fonte: CONAB (2014)

Características genéticas da variedade definem aspectos morfológicos como o número, a altura e o diâmetro dos colmos e folhas, fatores esses determinantes da produção da planta. No entanto, as expressões destes caracteres são influenciadas por fatores ambientais, como condições climáticas, práticas agrícolas (RODRIGUES, 1995) e, sobretudo, por fatores bióticos, que potencializam a queda de produtividade das soqueiras, obrigando a antecipação da reforma dos plantios.

Distribuída em todas as regiões produtoras do mundo, o raquitismo das soqueiras (*Ratoon Stunting Disease* - RSD) é considerada a doença mais importante do setor canavieiro (IGLESIA, 2003). Destaca-se por não apresentar sintomas característicos e, no entanto, causar significativas perdas em produtividade, como as estimadas em 41% na África do Sul (BAILEY; BECHET, 1997), 33% nos Estados Unidos (GRISHAM, 1991), 37% na Austrália (YOUNG; BRUMBLEY, 2004) e 27% no Brasil (GAGLIARDI; CAMARGO, 2009). Essas perdas se dão pela colonização do xilema pela bactéria agente causal que, promove crescimento irregular da planta, encurtamento dos entrenós e diminuição do diâmetro dos colmos, resultando no subdesenvolvimento da planta (GAO et al., 2008). Em variedades altamente suscetíveis, podem aparecer sintomas internos que se caracterizam por pontuações ou vírgulas avermelhadas nos feixes vasculares de canas maduras e por uma coloração rosa salmão próximo ao meristema apical em plantas jovens (COMSTOCK; LENTINI, 2005). Porém, é preciso atenção, pois esses sintomas podem ser resultado da reação da planta à presença de outros microrganismos, como *Xanthomonas albilineans*, também patógeno de cana-de-açúcar (RICAUD, 1974).

O gênero *Leifsonia* é cosmopolita. Muito embora não haja relatos de buscas sistemáticas por hospedeiros alternativos (GILLASPIE; DAVIS, 1992), tem-se que a subespécie Lxx tem como único hospedeiro natural a cana-de-açúcar (MILLS et al., 2001; TIWARI et al., 2012). Esta especificidade, postula-se, seria advinda de um processo de decaimento genômico, evidenciado por uma análise da sequência de seu genoma que identificou vários genes não funcionais devido a mutações em suas sequências e, entre estes, genes que possibilitariam um estilo de vida independente do hospedeiro. Desta forma, o acúmulo de mutações nestes genes teria imposto sérias limitações ao estilo de vida da bactéria, tornando-a um organismo fastidioso e dependente da cana-de-açúcar (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), junto à cana-de-açúcar e a beterraba açucareira, é indicado como uma cultura de grande potencial energético (LIPINSKI; KRESOVICH; 1982). O sorgo, por ter características semelhantes a cana-de-açúcar e ser forte candidato a ocupar as mesmas áreas de plantio, é uma espécie potencial para ser organismo modelo de estudo do raquitismo das soqueiras, uma vez que, entre outros benefícios, a cultura tem um ciclo de apenas quatro meses e seu genoma sequenciado.

Diante deste contexto, o presente trabalho teve por objetivo obter novas informações sobre hospedeiros alternativos de Lxx em diferentes espécies botânicas abrangendo mono e dicotiledôneas, e estudar genótipos de sorgo como hospedeiros experimentais para estudo de RSD.

Referências

BAILEY, R.A.; BECHET, G.R. Further evidence of the effects of ratoon stunting disease on production under irrigated and rainfed conditions. **Proceedings of the South African Sugar Technology**, Mt. Edgecombe, v. 71, p. 97-101, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Culturas**: cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 24 fev. 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**: cana-de-açúcar. v. 1: Safra 2014/15, n. 3: Terceiro levantamento. 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_12_19_09_02_49_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_2014-15.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2015.

COMSTOCK, J.C.; LENTINI, R.S. **Sugarcane ratoon stunting disease**. Gainesville: University of Florida, 2005. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/SC/SC00200.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2013.

FAO. **Sugar cane**. 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/003/w3647e/W3647E03.htm>. Acesso em: 24 jun. 2013.

GAGLIARDI, P.R.; CAMARGO, L.E.A. Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 1222-1226, 2009.

GAO, S.; PAN, Y.; CHEN, R.; CHEN, P.; ZHANG, H.; XU, L. Quick detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by PCR and nucleotide sequence analysis of PCR amplicons from Chinese *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* isolates. **Sugar Tech**, New York, v. 10, n. 4, p. 334-340, 2008.

GILLASPIE JR., A.G.; DAVIS, M.J. Ratoon stunting disease of sugarcane. In: MUKHOPADHYAY, A.N.; KAMAR, J.; CHAUBE, H.S.; SINGH, U.S. (Ed.). **Plant disease of international importance**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1992. v. 4: Disease of sugar, forest and plantation crops, p. 41-61.

GRISHAM, M.P. Effect of ratoon stunting disease on yield of sugarcane grown in multiple three-year plantings. **Phytopathology**, Houma, v. 81, n. 3, p. 337-340, 1991.

IGLESIA, A. Review of ratoon stunting disease of sugarcane (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*). **Revista Protección Vegetal**, Havana, v. 18, n. 1, p. 1-6, 2003.

LIPINSKI, E.S.; KRESOVICH, S. Sugar crops as a solar energy converters. **Experientia**, Birkhauser Verlag, v. 38, p. 13-17, 1982.

MILLS, L.; LEAMAN, T.M.; TAGHAVI, S.M.; SHACKEL, L.; DOMINIAK, B.C.; TAYLOR, P.W.J.; FEGAN, M.; TEAKLE, D.S. *Leifsonia xyli*-like bacteria are endophytes of grasses in eastern Australia. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 30, p. 145–151, 2001.

MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; CAMARGO, L.E.A.; VAN SLUYS, M.A.; KITAJIMA, J.P.; TRUFFI, D.; AMARAL, A.M. do; HARAKAVA, R.; OLIVEIRA, J.C.F. de; WOOD, D.; OLIVEIRA, M.C. de; MIYAKI, C.; TAKITA, M.A.; SILVA, A.C.R. da; FURLAN, L.R.; CARRARO, D.M.; CAMAROTTE, G.; ALMEIDA, N.F.; CARRER, H.; COUTINHO, L.L.; EL-DORRY, H.A.; FERRO, M.I.T.; GAGLIARDI, P.R.; GIGLIOTI, E.; GOLDMAN, M.H.S.; GOLDMAN, G.H.; KIMURA, E.T.; FERRO, E.S.; KURAMAE, E.E.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F.; MAURO, S.M.Z.; MACHADO, M.A.; MARINO, C.L.; MENCK, C.F.; NUNES, L.R.; OLIVEIRA, R.C.; PEREIRA, G.G.; SIQUEIRA, W.; SOUZA, A.A. de; TSAI, S.M.; ZANCA, A.S.; SIMPSON, A.J.G.; BRUMBLEY, S.M.; SETÚBAL, J.C. The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 8, p. 827-836, 2004.

RICAUD, C. Problems in the diagnosis of ratoon stunting disease. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, Baton Rouge, v. 15, p. 241-248, 1974.

RODRIGUES, J.D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: UNESP, 1995. 100 p.

TIWARI, A.K.; VISHWAKARMA, S.K.; KUMAR, P.; PANDEY, N; LAL, M. Ratoon stunting disease (*Leifsonia xyli*) of sugarcane: mini review article. **Plant Knowledge Journal**, Gorakhpur, v. 1, n. 1, p. 20-24, 2012.

YOUNG, A.; BRUMBLEY, S.M. Ratoon stunting disease of sugarcane: history, management and current research. In: RAO, G.P.; SAUMTALLY, A.S.; ROTT, P. (Ed.). **Sugarcane pathology: bacterial and nematodes diseases**. Enfield: Science Publ., 2004. v. 3, p. 97-124.

2 LEVANTAMENTO DE HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Resumo

O raquitismo das soqueiras (RSD), causada pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) é considerada por muitos a mais importante do ponto de vista econômico e a mais difícil doença da cana-de-açúcar de ser estudada, pois não apresenta sintomas característicos. O gênero *Leifsonia* compreende quatorze espécies e duas subespécies. Lxx tem como único hospedeiro natural conhecido a cana-de-açúcar, porém, experimentalmente infecta ao menos 15 diferentes hospedeiros sem causar sintomas, à exceção de sorgo sudão, o único hospedeiro experimental que apresenta murcha. Existe uma série de métodos para detecção de Lxx, sendo o PCR o método mais sensível. O presente trabalho teve por objetivo desenvolver *primers* para detecção de Lxx por PCR convencional e utilizá-los em um levantamento de hospedeiros alternativos da bactéria. Para isso, os *primers* foram desenhados a partir de genes específicos de Lxx e testados em reações com DNA de Lxx, de cana infectada com a bactéria e de 22 bactérias endofíticas isoladas de cana-de-açúcar. Um par de *primers*, desenhado com base na sequência do gene Lxx12650 mostrou-se específico, dado que só amplificou um produto de tamanho esperado nos dois primeiros casos. Estes *primers* foram usados em reações de PCR com DNA de 15 espécies vegetais cultivadas em casa-de-vegetação a partir de sementes e de 12 espécies de gramíneas coletadas a campo. Os resultados indicaram a ausência de infecção por Lxx em todos os casos, confirmando que seus hospedeiros muito provavelmente se restringem a espécies do gênero *Saccharum*.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Raquitismo das soqueiras; PCR; Gramíneas; Hospedeiros alternativos

Abstract

RSD, caused by the bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), is considered the most economically important and the most difficult disease of sugarcane to study, because of its lack of evident symptoms. The genus *Leifsonia* comprises fourteen species and two subspecies. The only known natural host of Lxx is sugarcane, although under experimental conditions the bacterium can asymptotically infect as many as fifteen diverse hosts, with the exception of Sudan sorghum, the only experimental host that shows wilting. The most sensitive method to detect Lxx is by PCR. This study developed a pair of primers to detect Lxx through conventional PCR and used it to screen for potential alternative hosts. Using Lxx-specific genes, PCR primers were designed and tested in reactions with DNA of Lxx, of Lxx-infected sugarcane and also of twenty two endophytic bacteria isolated from sugarcane. A set of primers developed from the gene Lxx12650 was shown to be Lxx-specific, yielding a PCR product of the expected size in the first two cases. PCR analyses were conducted with fifteen plant species grown from seeds under greenhouse conditions and also with twelve grass species collected in the field. Lxx was not detected in any case, confirming that its host range is most likely restricted to *Saccharum* species.

Keywords: Sugarcane; Ratoon stunting disease; PCR; Grass species; Alternative hosts

2.1 Introdução

A capacidade da planta de cana-de-açúcar em manter seus rendimentos ao longo das soqueiras é denominada de “*ratooning ability*”, termo que reflete a longevidade dos canaviais. A reforma dos canaviais e o replantio tem alto custo, portanto é de senso comum que as variedades com alta longevidade são mais rentáveis do que as demais (RAMBURAN; ZHOUA; LABUSCHAGNE, 2011). A produtividade das soqueiras diminui naturalmente ao longo do tempo, mas pode ser acentuada por condições fitossanitárias inadequadas, motivo pelo qual as doenças representam uma das principais preocupações do setor sucroenergético.

A cana-de-açúcar apresenta doenças virais, fúngicas e bacterianas, neste último caso, como exemplo, a escaldadura das folhas, causada por *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, e o raquitismo das soqueiras (RSD), causada por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. O RSD é considerado por muitos a doença mais importante e mais difícil de ser estudada por não apresentar sintomas característicos e, no entanto, diminuir consideravelmente a longevidade dos canaviais.

O gênero *Leifsonia* pertence ao filo Actinobacteria, ordem Actinomycetales e a família Microbacteriaceae (EVTUSHENKO et al., 2000); compreende quatorze espécies e duas subespécies (Tabela 2.1), cujas ocorrências foram relatadas em plantas, amostras de solo, líquens e até de amostras de água destilada. A grande maioria das espécies é mesófila, no entanto algumas são psicrófilas, provenientes de locais com baixas temperaturas como a Antártica e o Himalaia. *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é uma bactéria gram-positiva caracterizada morfológicamente por ser corineforme, medir 0,25 a 0,5 µm por 1,4 µm e apresentar colônias circulares com margens inteiras, convexas e não-pigmentadas. É fastidiosa do ponto de vista nutricional e suas colônias atingem apenas 0,1 a 0,3 mm de diâmetro após 15 dias de crescimento em meio sólido (DAVIS et al., 1984).

Tabela 2.1 - As diferentes espécies e subespécies do gênero *Leifsonia* segundo origem e as respectivas referências

Espécie	Origem	Referência
<i>Leifsonia soli</i>	rizosfera de Teca (<i>Tectona grandis</i>)	MADHAIYAN, et al., 2010
<i>Leifsonia poae</i>	galhas de <i>Subanguina radicicola</i> em pé-de-galinha (<i>Poa annua</i>)	EVTUSHENKO et al., 2000
<i>Leifsonia naganoensis</i>	solo de Nagano, Japão	SUZUKI et al., 1999
<i>Leifsonia shinshuensis</i>	solo de Nagano, Japão	SUZUKI et al., 1999
<i>Leifsonia bigeumensis</i>	solo da Ilha de Bigeum, Coréia	DASTAGER et al., 2008
<i>Leifsonia kribbensis</i>	solo da Ilha de Bigeum, Coréia	DASTAGER et al., 2009
<i>Leifsonia lichenia</i>	líquens de Tóquio, Japão	AN et al., 2009
<i>Leifsonia aquatica</i>	água destilada	LEIFSON, 1962
<i>Leifsonia kafniensis</i>	geleira Kafni do Himalaia	PINDI et al., 2009
<i>Leifsonia antarctica</i>	sedimentos da Antártica	PINDI et al., 2009
<i>Leifsonia rubra</i>	cianobactérias coletadas em uma lagoa na Antártica	REDDY et al., 2003
<i>Leifsonia aurea</i>	cianobactérias coletadas em uma lagoa na Antártica	REDDY et al., 2003
<i>Leifsonia psychrotolerans</i>	solo da Antártica	GANZERT et al., 2011
<i>Leifsonia pindariensis</i>	geleira Pindari do Himalaia Indiano	REDDY et al., 2008
<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (Lxx)	xilema de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.)	EVTUSHENKO et al., 2000
<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>cynodontis</i> (Lxc)	xilema de grama-seda (<i>Cynodon dactylon</i>)	SUZUKI et al., 1999

Diferente de outras bactérias restritas ao xilema, como *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas albilineans*, que possuem uma ampla gama de plantas hospedeiras (YORINORI et al., 2003; TOKESHI; RAGO, 2005), até o momento não há relatos de hospedeiros alternativos para Lxx (TIWARI et al., 2012), muito embora também não haja nenhum estudo sistemático conduzido neste sentido. Porém, Lxx foi capaz de infectar 15 diferentes hospedeiros experimentalmente (Tabela 2.2) sem, no entanto, causar sintomas (GILLASPIE; TEAKLE, 1989; MILLS et al., 2001), com exceção de sorgo sudão que apresentou murcha (WORLEY; GILLASPIE JR., 1974). Estudos mais recentes conduzidos por Mills et al. (2001) analisaram 18 espécies de gramíneas da família Poaceae, das quais foram isoladas bactérias sorologicamente e morfolologicamente semelhantes a Lxx. Apesar da semelhança, concluiu-se que essas bactérias não se tratavam de Lxx, pois foram incapazes de colonizar tecido vascular

da cana-de-açúcar na mesma proporção que Lxx. Além disso, essas bactérias não foram identificadas como Lxx com base em reações de PCR usando *primers* específicos para Lxx, recebendo, portanto, a denominação de bactérias “*Leifsonia xyli*-like”.

Tabela 2.2 - Nomes comum e científico de hospedeiros experimentais de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (GILLASPIE; TEAKLE, 1989; MILLS et al., 2001)

Nome comum	Nome científico
Capim elefante	<i>Pennisetum purpureum</i>
Híbrido de grama	<i>P. purpureum</i> x <i>P. glaucum</i>
Capim-pé-de-galinha	<i>Chloris gayana</i>
Capim colônia	<i>Panicum maximum</i>
Capim braquiária	<i>Brachiaria mutica</i>
Capim braquiária	<i>B. milliformis</i>
Capim arroz	<i>Echinochloa colonum</i>
Barão vermelho	<i>Imperata cylindrica</i>
Capim natal	<i>Rhynchelytrum repens</i>
Capim costeira	<i>Sporobolus capensis</i>
Grama seda	<i>Cynodon dactylon</i>
Milho	<i>Zea mays</i>
Sorgo selvagem	<i>Sorghum verticilliflorum</i>
Sorgo Sudão	<i>Sorghum drummondii</i>
Sorgo de alepo	<i>Sorghum halepense</i>

O estudo da gama de hospedeiros de Lxx se justifica não só pela necessidade de se conhecer mais a respeito do ciclo de vida desta bactéria, mas também pela possibilidade de outras plantas agirem como fontes de inóculo para a cana-de-açúcar. Desta forma, o objetivo deste estudo foi analisar diferentes possíveis hospedeiros de Lxx com uso de *primers* desenvolvidos a partir de sequências genômicas únicas (ORFans) da bactéria e também com outros protocolos de PCR já publicados, baseados nas sequências de nucleotídeos da região ITS de Lxx (FEGAN et al., 1998; PAN; GRISHAM; WEI, 2001).

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Material vegetal

Cinco plantas de quinze espécies vegetais foram cultivadas a partir de sementes em vasos de 15 litros com apenas uma planta por vaso em casa de vegetação (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Nomes comum e científico das quinze espécies vegetais utilizadas no estudo

Nome comum	Nome científico
Sorgo granífero	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench
Sorgo sacarino	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench
Sorgo Sudão	<i>Sorghum bicolor</i> var. <i>sudanense</i>
Arroz	<i>Oryza sativa</i>
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>
Melão	<i>Cucumis melo</i>
Setária	<i>Setaria italica</i>
Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Crotalária	<i>Crotalária juncea</i>
Gramma seda	<i>Cynodon dactylon</i>
Capim elefante	<i>Pennisetum purpureum</i>
Capim braquiária	<i>Brachiaria</i> spp.
Capim colônia	<i>Panicum maximum</i>
Tiririca	<i>Cyperus rotundus</i>
Corda-de-viola	<i>Ipomoea trifoliata</i>

Além deste material, também foram coletadas duas plantas adultas de doze espécies da família Poacea (Tabela 2.4) em diferentes locais do município de Piracicaba (SP) cultivados com cana-de-açúcar (Rafael Popin, dados não publicados).

Tabela 2.4 - Nomes comum e científico das doze diferentes espécies vegetais coletadas em locais com presença de cana-de-açúcar

Nome comum	Nome científico
Capim elefante	<i>Pennisetum purpureum</i>
Capim braquiária	<i>Brachiaria</i> spp.
Capim colonião	<i>Panicum maximum</i>
Capim-rabo-de-raposa	<i>Setaria italica</i>
Capim favorito	<i>Rhynchelytrum repens</i>
Gramma seda	<i>Cynodon dactylon</i>
Capim colchão	<i>Digitaria</i> spp.
Capim carrapicho	<i>Cenchrus echinatus</i>
Capim-barbicha-de-alemão	<i>Eragrostis pilosa</i>
Capim amargoso	<i>Digitaria insularis</i>
Capim massambará	<i>Sorghum halepense</i>
Capim-pé-de-galinha	<i>Eleusine indica</i>

2.2.1.2 Extração de DNA total do material vegetal

As folhas foram coletadas e desinfestadas superficialmente com três lavagens, de um minuto cada, em água filtrada em Milli-Q®, com o objetivo de retirar impurezas e organismos epifíticos. Alíquotas de 100 µl da água da última lavagem foram plaqueadas em meio MSC sólido modificado (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004) e incubadas a 28°C, para confirmar a ausência de contaminantes epifíticos. As folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas em almofariz com auxílio de um pistilo. Posteriormente, o DNA foi extraído de acordo com Carvalho (2012). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop 1000 – Thermo Scientific), ajustado para a concentração de 50 ng/µL, e armazenado a -20°C.

2.2.1.3 Desenvolvimento de novos *primers* para detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Primers foram desenhados a partir de sequências de genes únicos de Lxx (CARVALHO, 2012), ou seja, aqueles que não apresentam similaridade a outros genes cujas sequências estão depositadas no GenBank, com auxílio do software Primer 3 V.4 (ROZEN et al., 2000). Os parâmetros foram: tamanho de fragmento entre 18 a 23 pares de bases (pb); tamanho de amplicon próximo a 500 pb; conteúdo GC entre 40 a 60%; grampo GC, com presença de bases G e C nos últimos cinco pares

de base para promover anelamento específico na extremidade 3'. Foram permitidas diferenças máximas de 5°C nas temperaturas de anelamento dos *primers forward* e *reverse*. A complementaridade entre os *primers* foi avaliada com os softwares NetPrimer (PREMIER BIOSOFT, 2013) e GeneRunner (GENERUNNER, 2013).

Os *primers* foram testados em PCR com 100ng de DNA total extraído a partir de cultura pura de Lxx da estirpe CTCB07, de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com a mesma estirpe de Lxx e da estirpe DSMZ46306 de L.x. subsp. *cynodontis* originalmente isolada de grama Bermuda (*Cynodon* sp.). O controle negativo consistiu no *mix* da reação sem presença de DNA. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, com 2 µL de DNA total a 50 ng/µL das respectivas amostras; 12,5 µL de tampão de amplificação GoTaq Green Master Mix (Promega®); 0,5 µL de uma solução de 10 µM de cada *primer*. Foi adicionado 9,5 µL de água livre de nucleases (Ambion®) para completar a reação. Foram utilizados diferentes programas de amplificação a fim de obter fragmentos únicos com os tamanhos esperados.

2.2.1.4 PCR convencional para detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em diferentes hospedeiros

Entre os *primers* desenhados, o par FL12650F2/FL12650R2 foi o escolhido para desenvolvimento do presente trabalho. Além deste par, também foram usados os *primers* Cxx1/Cxx2 (PAN; GRISHAM; WEI, 2001) e CxFor/CxxREV/CxcREV (FEGAN et al., 1998) usando 100 ng de DNA vegetal por reação. No primeiro caso, as reações se deram em um volume final de 25 uL contendo 2 uL de DNA (50 ng/uL), 12,5 µL de tampão de amplificação GoTaq Green Master Mix (Promega®) e 0,5 µL de uma solução de 10 µM de cada primer, sendo o volume completado com 9,5 µL de água livre de nucleases (Ambion®). O programa de amplificação consistiu de um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 10 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e um ciclo final à 72°C por 5 minutos. No caso dos *primers* Cxx1/Cxx2 e CxFor/CxxREV/CxcREV, as condições de amplificação seguiram as descritas por Pan, Grisham e Wei (2001), e Fegan et al. (1998), respectivamente.

Os produtos das reações foram visualizados por eletroforese a 80 W por cerca de duas horas (alíquota de 15 µL do produto da PCR) em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X corado com Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen®).

2.2.1.5 Teste de especificidade dos *primers* FL12650F2/FL12650R2 em bactérias endofíticas de cana-de-açúcar

A especificidade dos *primers* FL12650F2/FL12650R2 foi testada em bactérias endofíticas de cana-de-açúcar. Para obtenção destas bactérias, os entrenós basais de cinco colmos das variedades CB49-260 e SP80-3280, ambas infectadas por Lxx, foram esterilizados superficialmente com uma lavagem com álcool 70%, seguido de lavagem com hipoclorito 2% e enxague por 2 vezes com água ultrapura Milli-Q® autoclavada. A casca dos colmos foi retirada com lâmina esterilizada e os mesmos acondicionados em tubos falcon de 50mL e centrifugados por 15 min a 3.000 rpm, por 2 vezes, para extração do fluido vascular. Este procedimento rendeu, em média, 2 mL de fluido vascular de cada entrenó. O extrato foi diluído (10^{-1} ; 10^{-2}) e alíquotas de 50 μ L foram plaqueadas em MSC new modificado (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004), totalizando 30 placas. As folhas das mesmas plantas também foram desinfestadas superficialmente pelo mesmo processo, picadas com auxílio de um bisturi esterilizado e incubadas em 4 mL de solução salina a 100 mM estéril. Após 40 min, a solução foi diluída de igual modo (10^{-1} ; 10^{-2}) e alíquotas de 50 μ L foram plaqueadas no mesmo meio.

As placas foram incubadas em estufa a 28°C por 7 dias e, após este período, 22 colônias bacterianas foram transferidas para novas placas. Após o surgimento de colônias, cinco discos de cultura pura de cada isolado foram transferidos para 10 mL de solução salina a 0,85% e conservados a 10°C. Estas colônias foram ainda coletadas com auxílio da alça de transferência em 100 μ L de água ultrapura esterilizada e a suspensão assim obtida foi utilizada para a extração de DNA conforme descrito no item 2.2.1.2. O DNA foi utilizado em reações de PCR com o par de *primers* selecionado no estudo conforme as condições descritas acima.

2.2.1.6 Identificação das bactérias endofíticas de cana-de-açúcar

Para amplificação do rRNA 16S das bactérias endofíticas, utilizou-se o conjunto de *primers* 16F27 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 16R1542 (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA), descritos por Gürtler e Stanisich (1996). O programa de amplificação foi de um ciclo inicial de 94°C por 1 minuto, seguidos de 30

ciclos de desnaturação à 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e um ciclo final à 72°C por 10 minutos.

O produto da reação de PCR foi purificado e sequenciado pela Helixxa Genomics Service Provider e as sequências foram comparadas com aquelas depositadas no Genbank com uso do algoritmo BLAST disponível no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

2.2.2 Resultados

2.2.2.1 Desenvolvimento de novos *primers* para detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Foram desenhados seis pares de *primers* (Tabela 2.5) e, entre eles, o FL12650F2/FL12650R2 foi o que apresentou melhores resultados, pois amplificou o fragmento esperado de 394pb, tanto em cultura pura de Lxx como também em cana inoculada com Lxx, diferentemente dos demais pares de *primers*, que apresentaram problemas por não amplificarem controles positivos de cultura pura de Lxx ou controle positivos de cana inoculada com Lxx (Figuras 2.1 e 2.2). Além disso, o par FL12650F2/R2 resultou em ampliações do produto esperado em diluições de até 10⁻⁴ mL de suspensão cultura pura de Lxx (Figura 2.3).

Tabela 2.5 - Genes únicos de Lxx usados para o desenvolvimento de *primers*, suas sequências e tamanhos esperados de fragmentos

Gene	Primers	Sequência	Tamanho
Lxx990	1) FL990F1	ACCTCTGACCGGAACTGC	165pb
	FL990R1	GATGCTCGCGTACTCCCGGT	
Lxx12610	2) FL12610F1	CGAGCTCCTGAAGTAGAACG	354pb
	FL12610R1	GACGACGCTGGCTTGCTG	
Lxx12950	3) FL12950F1	ACTTCGTCCGATCAATTATGC	464pb
	FL12950R1	GATGCGTGCCGACTCTCCG	
	4) FL12950F2	GGCACTCCGAACGCAACG	361pb
	FL12950R2	CCCCGGACTTCGTATAGATT	
Lxx12650	5) FL12650F1	CCGTGAACAGAGTGGTCG	424pb
	FL12650R1	AGCGGCTGAAGGGAGTAGTT	
	6) FL12650F2	GCGTGGAGAAGTTCATCGTT	394pb
	FL12650R2	AGCGGCTGAAGGGAGTAGTT	

Figura 2.1 - Eletroforese de fragmentos amplificados com diferentes pares de *primers*. (L) Marcador 100pb; amostras de (1) a (5) fragmento de 165pb amplificado com os *primers* 990 F1/R1, onde (1) Lxx pura; (2) cana inoculada com Lxx; (3) tomate; (4) melão; (5) controle negativo; amostras de (6) a (10) fragmento de 354pb amplificado com os *primers* 12610 F1/R1, onde (6) Lxx pura; (7) cana inoculada com Lxx; (8) tomate; (9) melão; (10) controle negativo; amostras de (11) a (15) fragmento de 464 pb amplificado com os *primers* 12950 F1/R1, onde (11) Lxx pura; (12) cana inoculada com Lxx; (13) tomate; (14) melão; (15) controle negativo

Figura 2.2 - Eletroforese de fragmentos amplificados com diferentes pares de *primers*. (L) Marcador 100pb; amostras de (1) a (5) fragmento de 361 pb amplificado com os *primers* 12950 F2/R2, onde (1) Lxx pura; (2) cana inoculada com Lxx; (3) tomate; (4) melão; (5) controle negativo; amostras de (6) a (10) fragmento de 424 pb amplificado com os *primers* 12650 F1/R1, onde (6) Lxx pura; (7) cana inoculada com Lxx; (8) tomate; (9) melão; (10) controle negativo; amostras de (11) a (15) fragmento de 394 pb amplificado com os *primers* 12650 F2/R2 onde (11) Lxx pura; (12) cana inoculada com Lxx; (13) tomate; (14) melão; (15) controle negativo

Figura 2.3 - Eletroforese de fragmentos amplificados de 394pb com os *primers* 12650 F2/R2. (L) Marcador 100pb; (+) colônia pura de Lxx; (C) cana inoculada com Lxx; (1) a (10) diferentes diluições de suspensão de colônia pura de Lxx, 10^{-10} ; 10^{-9} ; 10^{-8} ; 10^{-7} ; 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} ; 10^{-1} mL, respectivamente; (-) controle negativo

2.2.2.2 Teste de especificidade dos *primers* FL12650F2/ FL12650R2 em bactérias endofíticas de cana-de-açúcar

A bacterioteca de organismos endofíticos de cana foi composta por 22 isolados (Figura 2.4).

Figura 2.4 - Isolados endofíticos de plantas de cana-de-açúcar infectadas com Lxx

Para validação dos *primers*, o DNA destes isolados e também de *L. x. subsp. cynodontis* foi utilizado em reações de PCR com os *primers* 12650F2/R2. Não houve amplificação em nenhum dos endofíticos da coleção (Figura 2.6) e nem de DNA extraído de isolado de Lxc (Figura 2.7).

Figura 2.6 - Eletroforese de fragmentos amplificados dos endofíticos com os *primers* 12650 F2/R2. (L) Marcador 100pb; (+) Lxx pura; amostras de bactérias endofíticas de 1 a 22; (-) controle negativo

Figura 2.7 - Eletroforese de fragmentos amplificados de Lxc com os *primers* 12650F2/R2. (L) Marcador 100pb; (+) Lxx pura; (1) e (2) amostras de Lxc; (-) controle negativo.

2.2.2.3 Identificação das bactérias endofíticas de cana-de-açúcar

A análise das sequências dos produtos de PCR resultantes da amplificação da região 16S dos isolados endofíticos permitiu identificar similaridade com doze diferentes gêneros, sendo seis do Filo Actinobacteria, incluindo Lxc, e seis do Filo Proteobacteria (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 - Identificação de bactérias endofíticas isoladas de plantas de cana-açúcar com base na análise da sequência da região 16S, cobertura, valor-e e identidade das comparações

Isolados	Identificação	Cobertura	e value	Ident.	Filo
isolado 1	<i>Nocardiodies</i> sp.	97%	0.0	97%	Actinobacteria
isolado 2	<i>Microbacterium</i> sp.	98%	0.0	99%	Actinobacteria
isolado 3	<i>Microbacterium testaceum</i>	97%	0.0	99%	Actinobacteria
isolado 4	<i>Microbacterium testaceum</i>	97%	0.0	98%	Actinobacteria
isolado 5	<i>Curtobacterium luteum</i>	97%	0.0	99%	Actinobacteria
isolado 6	<i>Burkholderia</i> sp.	98%	0.0	99%	Proteobacteria
isolado 7	<i>Microbacterium testaceum</i>	97%	0.0	99%	Actinobacteria
isolado 8	<i>Curtobacterium pusillum</i>	96%	0.0	99%	Actinobacteria
isolado 9	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	88%	0.0	99%	Actinobacteria
isolado 10	<i>Curtobacterium</i> sp.	55%	1e-77	97%	Actinobacteria
isolado 11	<i>Curtobacterium</i> sp.	81%	3e-25	92%	Actinobacteria
isolado 12	<i>Xanthomonas albilineans</i>	96%	0.0	99%	Proteobacteria
isolado 13	<i>Aeromicrobium</i> sp.	95%	0.0	98%	Actinobacteria
isolado 14	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>cynodontis</i>	96%	0.0	99%	Actinobacteria
isolado 15	<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	97%	0.0	99%	Proteobacteria
isolado 16	<i>Enterobacter</i> sp.	95%	0.0	99%	Proteobacteria
isolado 17	<i>Agrobacterium</i> sp.	89%	0.0	99%	Proteobacteria
isolado 18	<i>Sphingomonas polyaromaticivorans</i>	96%	0.0	99%	Proteobacteria
isolado 19	<i>Curtobacterium luteum</i>	85%	0.0	86%	Actinobacteria
isolado 20	<i>Nocardiodaceae bacterium</i>	79%	0.0	99%	Actinobacteria
isolado 21	<i>Aeromicrobium alkaliterrae</i>	96%	0.0	99%	Actinobacteria
isolado 22	<i>Sphingomonas mali</i>	95%	0.0	97%	Proteobacteria

2.2.2.4 PCR convencional com diferentes *primers* para detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em diferentes hospedeiros

Reações de PCR com os *primers* FL12650F2/FL12650R2; Cxx1/Cxx2 e CxFor/CxxREV/CxcREV usando DNA de diferentes espécies vegetais não resultaram em amplificação tanto nas plantas provenientes de sementes como nas doze espécies

de gramíneas coletadas em ambientes de produção de cana-de-açúcar (Figuras 2.8; 2.9 e 2.10).

Figura 2.8 - Eletroforese de fragmentos amplificados de PCR dos diferentes hospedeiros com os *primers* FL12650F2/R2. (L) Marcador 100pb; (+) Lxx pura; (C) cana inoculada com Lxx; (1) sorgo sacarino; (2) sorgo sudão; (3) sorgo granífero; (4) arroz; (5) melão; (6) tomate; (7) sectária; (8) arabidopsis; (9) crotalária; (10) grama seda; (11) capim elefante; (12) capim braquiária; (13) capim colômbio; (14) tiririca; (15) corda de viola; (-) controle negativo

Figura 2.9 - Eletroforese de fragmentos amplificados de PCR dos diferentes hospedeiros com os *primers* Cxx1/Cxx2. (L) Marcador 100pb; (+) Lxx pura; (C) cana inoculada com Lxx; (1) sorgo sacarino; (2) sorgo sudão; (3) sorgo granífero; (4) arroz; (5) melão; (6) tomate; (7) sectária; (8) arabidopsis; (9) crotalária; (10) grama seda; (11) capim elefante; (12) capim braquiária; (13) capim colômbio; (14) tiririca; (15) corda de viola; (-) controle negativo

Figura 2.10 - Eletroforese de fragmentos amplificados de PCR dos diferentes hospedeiros com os *primers* CxFor/CxxREV/CxcREV. (L) Marcador 100pb; (+) Lxx pura; (Lxc) Lxc pura; (1) sorgo sacarino; (2) sorgo sudão; (3) sorgo granífero; (4) arroz; (5) melão; (6) tomate; (7) sectária; (8) arabidopsis; (9) crotalária; (10) grama seda; (11) capim elefante; (12) capim braquiária; (13) capim colômbio; (14) tiririca; (15) corda de viola; (-) controle negativo

2.2.3 Discussão

Técnicas baseadas em microscopia e sorologia não possuem sensibilidade suficiente para detectar Lxx quando presente em baixo título nos tecidos vegetais (LÓPEZ et al., 2009). Nestes casos, portanto, faz-se necessário o uso da PCR. No entanto, para garantir a fidelidade da reação, é necessário desenhar *primers* específicos. A conservação da sequência do gene alvo constitui importante critério no desenho de *primers*. Genes usados na detecção de Lxx por PCR incluem genes envolvidos na patogenicidade, regiões anônimas do genoma e genes ribossomais (ROTT; DAVIS, 2004). Os mais comumente usados são *primers* desenhados a partir da região espaçadora transcrita intergênica (ITS) entre os genes 16S e 23S rRNA do operon rRNA bacteriano (ASTUA-MONGE, 1995; DAVIS et al., 1998; FEGAN et al., 1998; PAN 1998; PAN; GRISHAM; WEI, 2001; TAYLOR, 2004). Com o sequenciamento do genoma da estirpe CTCB07 de Lxx (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004), foi possível desenvolver *primers* a partir de sequências únicas até então identificadas somente neste organismo.

Como na diagnose de Lxx é utilizado DNA total da planta, ou seja, o DNA do hospedeiro e de toda sua comunidade endofítica, faz-se necessário testar a especificidade de qualquer *primer* perante esta comunidade para certificar-se que apenas a sequência do organismo alvo é amplificada. A bacterioteca construída nesse estudo compreendeu gêneros bacterianos já relatados em cana-de-açúcar (MAGNANI, 2005; MENDES; KLEINER; ARAUJO, 2007), com predominância dos Filos Actinobacteria e Proteobacteria, porém em menor diversidade. A diferença possivelmente se deve ao uso de diferentes meios de cultura, já que a maioria dos estudos de endofíticos em cana-de-açúcar focam em bactérias diazotróficas (MAGNANI, 2005).

Os *primers* desenvolvidos no presente trabalho não amplificaram produtos de PCR com DNAs das diferentes bactérias isoladas e nem mesmo da subespécie *L. x. subsp. cynodontis*, indicando sua especificidade. Além disso, os *primers* amplificaram produtos de tamanho esperados com DNA de cultura pura de Lxx até a concentração de 10^{-4} mL e também com DNA de cana-de-açúcar infectada por Lxx, sendo esse um ponto importante já que há relatos de *primers* específicos para Lxx que geraram falso-negativos, ou seja, casos em que canas sabidamente infectadas se mostram negativas por PCR (URASHIMA; GRACHET, 2012).

Os *primers* desenvolvidos neste estudo foram utilizados para um levantamento de hospedeiros alternativos de Lxx. A colonização muitas vezes assintomática de cana por Lxx, indicador de um comportamento endofítico (BRUMBLEY et al., 2006), sugere que a bactéria pode infectar naturalmente outras espécies vegetais. Mills et al. (2001) conduziram estudos para verificar a possibilidade de gramíneas encontradas em canaviais serem portadoras de Lxx e, por ocasião da colheita mecanizada, essas servirem como fonte de inóculo. Foram coletadas aleatoriamente 18 espécies de gramíneas da família Poaceae em canaviais, das quais foram isoladas bactérias sorologicamente e morfológicamente semelhantes à Lxx. No entanto, pela PCR (FEGAN et al., 1998) não foi confirmado que essas se tratavam de Lxx, pois os produtos amplificados corresponderam a um fragmento esperado no caso de Lxc. Assim, foram denominadas “*Leifsonia xyli-like*”, não concluindo de que subespécie se tratava. No presente trabalho, os hospedeiros estudados, cultivados a partir de sementes ou coletados em áreas com presença de cana-de-açúcar, também foram testados com os *primers* utilizados no estudo de Mills et al. (2001), no entanto não foi detectada Lxx ou *Leifsonia xyli-like* nesses hospedeiros.

A escolha das 15 espécies estudadas procurou abranger diferentes características ecológicas: setária (*Setaria italica.*), grama seda (*Cynodon dactylon*), capim elefante (*Pennisetum purpureum*), capim braquiária (*Brachiaria* spp.), capim colônio (*Panicum maximum*), tiririca (*Cyperus rotundus*) e corda-de-viola (*Ipomoea trifoliata*) são consideradas plantas daninhas em canaviais; crotalária (*Crotalaria juncea*) é uma espécie usada para adubação verde e rotação de culturas em áreas canavieiras; as espécies de sorgo (*Sorghum* spp.), sorgo granífero, sorgo sacarino e sorgo Sudão, podem ser utilizados em rotação de culturas em áreas canavieiras, além do sorgo ser uma espécie em potencial na produção de energia assim como a cana-de-açúcar; arroz (*Oryza sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e melão (*Cucumis melo*) foram escolhidos por serem espécies diferentes de cana, assim como arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), que além disso, é considerado um organismo modelo para estudos genéticos. As doze espécies da família Poacea foram coletadas aleatoriamente em áreas onde há presença de cana-de-açúcar a fim de verificar se eram portadoras de Lxx.

Apesar da heterogeneidade na escolha dos hospedeiros, a bactéria não foi detectada em nenhum deles, o que confirma que a cana-de-açúcar é o único hospedeiro natural conhecido de Lxx (GRISHAM, 2004; RAO; GIRARD; ROTT, 2004).

A ausência de hospedeiros alternativos de Lxx é uma importante informação, pois a presença desses em canaviais seria uma fonte alternativa de sobrevivência da bactéria, que poderia ser capaz de infectar as canas mesmo quando essas estiverem sadias, uma vez que Lxx é transmitida de uma cana portadora para outra por instrumentos de corte. A especificidade de Lxx quanto ao seu hospedeiro se explica pela análise da sequência de seu genoma, que demonstrou que essa bactéria provavelmente já teve capacidade de viver como um organismo de vida livre e possivelmente infectar outros hospedeiros. No entanto, devido a um processo de decaimento genômico, seu genoma passou a acumular mutações em genes essenciais para um estilo de vida livre, o que a tornou dependente de seu hospedeiro, a cana-de-açúcar (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

A ocorrência de outras espécies do gênero *Leifsonia* semelhantes a Lxx, como a *Leifsonia xyli*-like descrita por Mills et al. (2001), pode ajudar a compreender a evolução da patogênese desses patógenos e sua relação com seu hospedeiro (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Assim como o realizado em Lxx, essas bactérias podem ser isoladas, sequenciadas e seus genes investigados e comparados, assim seria possível o entendimento dessas diferenças uma vez que esses microrganismos são tão próximos em muitas características.

2.3 Conclusões

Conclui-se que o par de *primers* FL12650 F2/R2 é específico e, portanto, apropriado para detectar Lxx.

Conclui-se também que Lxx não coloniza naturalmente várias gramíneas.

Referências

AN, S.-Y.; XIAO, T.; YOKOTA, A. *Leifsonia lichenia* sp. nov., isolated from lichen in Japan. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 55, p. 339–343, 2009.

ASTUA-MONGE, G. **Detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, based on amplification of DNA in the ribosomal DNA spacer.** 1995. 60 p. Thesis. - University of Florida, Gainesville, 1995.

BRUMBLEY, S.; PETRASOVITS, L.; HERMANN, S.; YOUNG, A.; CROFT, B. Recent advances in the molecular biology of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of

ratoon stunting disease. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 35, n. 6, p. 681-689, 2006.

CARVALHO, G. **Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-das-soqueiras**. 2012. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/111137/tde-18092012-141357/>>. Acesso em: 01 jul. 2013.

DASTAGER, S.G.; LEE, J.-C.; JU, Y.-J.; PARK, D.-J.; KIM, C.-J. *Leifsonia bigeumensis* sp. nov., isolated from soil on Bigeum Island, Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Republic of Korea, v. 58, p. 1935–1938, 2008. DOI 10.1099/ijs.0.65572-0 65572 G.

DASTAGER, S.G.; LEE, J.-C.; JU, Y.-J.; PARK, D.-J.; KIM, C.-J. *Leifsonia kribbensis* sp. nov., isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Hyderabad, v. 59, p. 18–21, 2009. DOI 10.1099/ijs.0.001925-0 18 001925.

DAVIS, M.J.; ROTT, P.; ASTUA-MONGE, G. Multiplex, nested PCR for simultaneous detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and *Xanthomonas albilineans* in sugarcane. In: INTER-AMERICAN SUGAR CANE SEMINARS, 19., 1998, Miami. 1998. **Identification of sugarcane bacterial pathogens and assessing their genetic diversity using molecular techniques**: proceedings... Miami, 1998. p. 110-114, 379-383.

DAVIS, M.J.; GILLASPIE, A.G.; VIDAVER, A.K.; HARRIS, R.W. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov.; subsp. nov and *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* subsp. *cynodontis* subsp. Nov; pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermuda Grass stunting disease. **International Journal of Sugarcane Bacteriology**, Washington, v. 34, p. 107-117, 1984.

EVTUSHENKO, L.I.; DOROFEEVA, L.V.; SUBBOTIN, S.A.; COLE, J.R.; TIEDJE, J.M. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatic* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 50, p. 371–380, 2000.

FEGAN M.; CROFT, B.J.; TEAKLE, D.S.; HAYWARD, A.C.; SMITH, G.R. Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causative agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. **Plant Pathology**, Oxford, v. 47, p. 495– 504, 1998.

GANZERT, L.; BAJERSKI, F.; MANGELSDORF, K.; LIPSKI, A.; WAGNER, D. *Leifsonia psychrotolerans* sp. nov., a psychrotolerant species of the family

Microbacteriaceae from Livingston Island, Antarctica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 61, p. 1938–1943, 2011. DOI 10.1099/ijs.0.021956-0.

GENERUNNER. **Engineer your DNA**. 2013. Disponível em: <www.generunner.net>. Acesso em: 10 jul. 2013.

GILLASPIE, A.G.; TEAKLE, D.S. Ratoon stunting diseases. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE, A.G.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of sugarcane: major diseases**. New York: Elsevier, 1989. p. 59-80.

GRISHAM, M.P. Ratoon stunting disease. In: RAO, G.P; SAUMTALLY, A.S.; ROTT, P. **Sugarcane pathology**. Enfield: Science Publ., 2004. v. 3: Bacterial and nematode diseases, p. 77-96.

GÜRTLER, V.; STANISICH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, London, v. 142, p. 3-16, 1996.

LEIFSON, E. The bacterial flora of distilled and stored water. III. New species of the genera *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Spirillum*, and *Pseudomonas*. **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy**, Chicago, v. 12, p. 161-170, 1962.

LOPEZ, M.M.; LLOP, P.; OLMOS, A.; MARCO-NOALES, E.; CAMBRA, M.; BERTOLINI, E. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Current Issues in Molecular Biology**, Hethersett, v. 11, n. 1, p. 13-46, 2009.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, J.S.; SENTHILKUMAR, M.; LEE, K.C.; SUNDARAM, S. *Leifsonia soli* sp. nov., a yellow-pigmented actinobacterium isolated from teak rhizosphere soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 60, p. 1322–1327, 2010. DOI 10.1099/ijs.0.014373-0.

MAGNANI, G.S. **Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar**. 2005. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/bitstream/handle/1884/2316/tese_finalok.pdf?sequence=1> Acesso em: 27 jul. 2015.

MENDES, R.; KLEINER, A.A.P.; ARAUJO, W.L.; RAAIJMAKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 22, p. 7259–7267, Nov. 2007.

MILLS, L.; LEAMAN, T.M.; TAGHAVI, S.M.; SHACKEL, L.; DOMINIAK, B.C.; TAYLOR, P.W.J.; FEGAN, M.; TEAKLE, D.S. *Leifsonia xyli*-like bacteria are endophytes of grasses in eastern Australia. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 30, p. 145–151, 2001.

MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; CAMARGO, L.E.A.; VAN SLUYS, M.A.; KITAJIMA, J.P.; TRUFFI, D.; AMARAL, A.M. do; HARAKAVA, R.; OLIVEIRA, J.C.F. de; WOOD, D.; OLIVEIRA, M.C. de; MIYAKI, C.; TAKITA, M.A.; SILVA, A.C.R. da; FURLAN, L.R.; CARRARO, D.M.; CAMAROTTE, G.; ALMEIDA, N.F.; CARRER, H.; COUTINHO, L.L.; EL-DORRY, H.A.; FERRO, M.I.T.; GAGLIARDI, P.R.; GIGLIOTI, E.; GOLDMAN, M.H.S.; GOLDMAN, G.H.; KIMURA, E.T.; FERRO, E.S.; KURAMAE, E.E.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F.; MAURO, S.M.Z.; MACHADO, M.A.; MARINO, C.L.; MENCK, C.F.; NUNES, L.R.; OLIVEIRA, R.C.; PEREIRA, G.G.; SIQUEIRA, W.; SOUZA, A.A. de; TSAI, S.M.; ZANCA, A.S.; SIMPSON, A.J.G.; BRUMBLEY, S.M.; SETÚBAL, J.C. The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 8, p. 827-836, 2004.

THE NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

PAN, Y.B.; GRISHAM, M.P.; BURNER, D.M. A Polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 3, p. 285-290, 1998.

PAN, Y.B.; GRISHAM, M.P.; WEI, Q. PCR diagnosis of sugarcane leaf scald and ratoon stunting disease. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**. Louisiana, v. 24, p. 607–608, 2001.

PINDI, P.K.; KISHORE, K.H.; REDDY, G.S.N.; SHIVAJI, S. Description of *Leifsonia kafniensis* sp. nov. and *Leifsonia antarctica* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Hyderabad, v. 59, p. 1348–1352, 2009. DOI 10.1099/ijs.0.006643-0 1348 006643.

PREMIER BIOSOFT. **Accelerating research in life sciences**. 2013. Disponível em: <www.premierbiosoft.com/netprimer>. Acesso em: 10 jul. 2013.

POSPIECH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick preparation of genomic DNA from gram-positive bacteria. **Trends in Genetics**, London, v. 11, p. 217-218, 1995.

RAMBURAN, S.; ZHOUA, M.; LABUSCHAGNE, M. Interpretation of genotype × environment interactions of sugarcane: identifying significant environmental factors. **Field Crops Research**, South African, v. 124, p. 392–399, 2011.

RAO, G.P.; GIRARD, J.C.; ROTT, P. Current scenario and future perspectives of sugarcane bacterial diseases. In: RAO, G. P; SAUMTALLY, A. S.; ROTT, P. **Sugarcane pathology**. Enfield: Science Publ., 2004. v. 3: Bacterial and nematode diseases, p. 8.

REDDY, G.S.N.; PRABAGARAN, S.R.; SHIVAJI, S. *Leifsonia pindariensis* sp. nov., isolated from the Pindari glacier of the Indian Himalayas, and emended description of the genus *Leifsonia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Hyderabad, v. 58, p. 2229–2234, 2008. DOI 10.1099/ijs.0.65715-0.

REDDY, G.S.N.; PRAKASH, J.S.S.; SRINIVAS, R.; MATSUMOTO, G.I.; SHIVAJI, S. *Leifsonia rubra* sp. nov. and *Leifsonia aurea* sp. nov., psychrophiles from a pond in Antarctica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Hyderabad, v. 53, p. 977–984, 2003. DOI 10.1099/ijms.0.02396-0.

ROTT, P.; DAVIS, M.J. Identification of sugarcane bacterial pathogens and assessing their genetic diversity using molecular techniques. In: RAO, G. P; SAUMTALLY, A.S.; ROTT, P. **Sugarcane pathology**. Enfield: Science Publ., 2004. v. 3: Bacterial and nematode diseases, p. 178.

ROZEN, S.; SKALESTSKY, H.J. Bioinformatics methods and protocols. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). **Methods in molecular biology**. Totowa: Humana Press, 2000. p. 365–386.

SUZUKI, K.; SUZUKI, M.; SASAKI, J.; PARK, Y.-H.; KOMAGATA, K. *Leifsonia* gen. nov., a genus for 2,4-diaminobutyric acid-containing actinomycetes to accomodate '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* Davis et al. 1984. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Wako, v. 45, p. 253–262, 1999.

TAYLOR, P.W.J. Detection and control of transmission of ratoon stunting disease. In: RAO, G. P; SAUMTALLY, A.S.; ROTT, P. **Sugarcane pathology**. Enfield: Science Publ., 2004. v. 3: Bacterial and nematode diseases, p. 216.

TIWARI, A.K.; VISHWAKARMA, S.K.; KUMAR, P.; PANDEY, N.; LAL, M. Ratoon stunting disease (*Leifsonia xyli*) of sugarcane: mini review article. **Plant Knowledge Journal**, Gorakhpur, v. 1, n. 1, p. 20-24, 2012.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum spp.*). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M., BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 185-213.

URASHIMA, A.S.; GRACHET, N.G. Métodos de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e efeito da termoterapia na brotação das gemas de diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 1, p. 57-64, 2012.

WORLEY, J.F.; GILLASPIE JR., A.G. Electron microscopy in situ of the bacterium associated with ratoon stunting disease in Sundangrass. **Phytopathology**, Maryland, v. 65, p. 287-295, 1974.

YORINORI, M.A.; RIBAS, A.F.; UENO, B.; MASSOLA JÚNIOR, N.S.; LEITE JÚNIOR, R.P. Detecção de *Xylella fastidiosa* em germoplasma de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 427-430, 2003.

3 SORGO COMO ORGANISMO MODELO PARA O ESTUDO DO RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS

Resumo

As perdas em produtividade ocasionadas pelo raquitismo das soqueiras (RSD) ocorrem em função do subdesenvolvimento da planta, caracterizado pelo encurtamento dos entrenós e pela redução do número de perfilhos e do diâmetro dos colmos. No entanto, esses danos só são evidentes em função do número de cortes, em plantas de soqueira, o que reflete no nome da doença. Esta característica, aliado ao fato de que o RSD não possui sintomas únicos que permitam sua fácil identificação, compreendem sérios entraves para o estudo da doença em condições controladas. Assim, a utilização de um hospedeiro experimental em estudos exploratórios de fatores que controlam o processo infeccioso do agente causal do RSD, a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), é de grande utilidade para uma melhor compreensão desta pouco estudada doença. Como o sorgo é uma espécie próxima a cana-de-açúcar e apresenta um ciclo reprodutivo mais curto, o presente trabalho investigou o comportamento de três genótipos desta espécie quando inoculados com a bactéria. Para tal, o patógeno foi inoculado em plantas de sorgo híbrido granífero de ciclo precoce; sorgo híbrido interespecífico (sorgo sudão) e sorgo sacarino. A altura da planta e o diâmetro dos colmos foram medidos semanalmente, por seis semanas, e o peso de massa verde, 90 dias após a semeadura. A colonização por Lxx foi confirmada por meio de PCR usando DNA extraído de folhas aos 90 dias com os pares de *primers* FL12650F2/FL12650R2 e Cxx1/Cxx2. Análises estatísticas indicaram diferenças significativas entre plantas inoculadas e não inoculadas para altura e diâmetro, independente do genótipo de sorgo utilizado. No entanto, não foram detectadas diferenças em massa verde. Conclui-se que os diferentes genótipos de sorgos apresentam sintomas quando inoculados com Lxx e, portanto, podem ser utilizados como hospedeiros experimentais para estudo do RSD.

Palavras-chave: *Leifsonia*; Sorgo; Hospedeiro experimental; Organismo modelo

Abstract

Losses in productivity caused by RSD are due to a sub-optimal growth of the plant characterized by shortening of internodes and by a reduction in the diameter of the stalks. However, these symptoms can only be observed along sequential harvests, in ratoon plants, as indicated by the name of the disease. This characteristic along with the fact that RSD does not display specific symptoms, are significant constraints to the study of this disease under controlled conditions. The identification of an alternative host to study the aspects related to the infection process of the causal agent of RSD, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) under experimental conditions, represents an important step towards a better understanding of this disease. Since sorghum is botanically related to sugarcane and with a shorter life cycle, this study assessed the impact of RSD on three sorghum genotypes: early grain sorghum, inter specific Sudan sorghum, and sweet sorghum. Plant height and culm diameter were measured weekly over a period of six weeks, and green matter was evaluated 90 days after planting. The infection of Lxx was confirmed in 90 days-old leaves through PCR analyses using the primer pairs FL12650F2/FL12650R2 and Cxx1 e Cxx2. Statistical analyses detected significant differences between inoculated and non-inoculated plants in plant height

and culm diameter, independent of the sorghum genotype. However, no difference was observed for green matter. It is concluded that the different sorghum genotypes develop RSD symptoms when inoculated with Lxx, and therefore can be used as alternative hosts to Lxx under experimental conditions.

Keywords: *Leifsonia*; Sorghum; Experimental host; Model organism

3.1 Introdução

O raquitismo das soqueiras (RSD) é uma doença da cana-de-açúcar que não apresenta sintomas característicos. As perdas em produtividade ocorrem em função do subdesenvolvimento da planta, resultado do encurtamento dos entrenós e pela redução de número de perfilhos e diâmetro dos colmos. No entanto, esses danos são evidentes apenas em função da progressão dos cortes (GRISHAM, 1991), o que dificulta o estudo da doença, uma vez que a cana-de-açúcar, uma cultura semi-perene, tem potencial de permanecer no campo por cinco anos ou mais. Uma importante ferramenta para o estudo de RSD seria a descoberta de um hospedeiro experimental que tenha grande volume de informação genética disponível, seja de ciclo relativamente curto e de fácil cultivo (MEINKE et al., 1998; DELATORRE; SILVA, 2008). Segundo Delatorre e Silva (2008), *Arabidopsis thaliana*, tabaco, petúnia, milho, tomate e arroz são alguns exemplos de espécies usadas como organismos modelo na área vegetal. Para a cana-de-açúcar, no entanto, não há relatos de organismos que possam ser usados como modelos para estudos patológicos.

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é uma espécie com alto potencial para ser usado como organismo modelo para estudos em cana-de-açúcar, pois se trata de uma planta da mesma família, mas seu ciclo de cultivo, no entanto, é bem mais curto, cerca de 4 meses. Além disso, existem genótipos de sorgo que também apresentam hábitos de perfilhamento e que rebrotam após o corte, o que pode simular uma condição de soqueira como a de cana-de-açúcar. Outra grande vantagem em relação à cana-de-açúcar é o sorgo possuir grande volume de informação genética e biológica, inclusive com disponibilidade da sequência completa de seu genoma (PATERSON et al., 2009).

No que diz respeito a sanidade, os mosaicos (*Sugarcane mosaic virus* (SCMV) e *Sorghum mosaic virus* (SrMV)) são as únicas doenças comum às duas espécies, no entanto *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) pode infectar experimentalmente o sorgo Sudão, resultando em murcha da planta (WEHLBURG, 1956; MATSUOKA, 1972;

BENDA, 1975 citado por GILLASPIE JR.; TEAKLE, 1989). No entanto, não há estudos que indiquem o impacto da bactéria no crescimento desta espécie, especialmente no que toca as variáveis de crescimento que são afetadas pelo RSD. A partir desse contexto, o presente trabalho usou diferentes genótipos de sorgo com objetivo de desenvolver um organismo modelo para estudo de RSD.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

3.2.1.1 Material vegetal

Foram utilizados três genótipos de sorgo: sorgo (*Sorghum bicolor* ssp. *bicolor*) híbrido granífero de ciclo precoce 1G 282 (Dow AgroSciences); sorgo híbrido interespecífico (*Sorghum bicolor* ssp. *bicolor* x *Sorghum bicolor* ssp. *Drummondii*) sudão IP400 (Dow AgroSciences) e sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* ssp. *bicolor*) BRS506 (Embrapa).

3.2.1.1 Plantio em casa de vegetação

Dois experimentos foram realizados em casa-de-vegetação, o primeiro em março e o segundo em julho de 2014. O primeiro foi instalado no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) (Piracicaba, SP) e o segundo no campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz (Piracicaba, SP). Em ambos os experimentos, o desenho experimental consistiu de três blocos ao acaso com os três genótipos de sorgo inoculados com Lxx ou com meio MSC New estéril modificado (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004) como tratamentos (6 tratamentos). A unidade experimental constitui-se de três vasos contendo duas plantas cada (Figura 3.1). O plantio foi realizado em vasos de 25 litros com 10 kg de substrato e 22,5g de adubo 4-20-20 por vaso. Foram semeadas 6 sementes por vasos e o desbaste para permanecer 2 plantas foi realizado 15 dias após o plantio.

Figura 3.1 - Exemplo de desenho experimental de ensaio em blocos ao acaso. “Su” representa sorgo sudão; “Gr” representa sorgo granífero; “Sa” representa sorgo sacarino; “NI” representa plantas inoculadas com meio MSC New; “I” representa plantas inoculadas com Lxx e os números de 1 a 9 representam a identificação dos vasos

3.2.1.2 Preparo do inóculo de Lxx e inoculação

O inóculo de Lxx, estirpe CTCB07, foi preparado a partir de uma alíquota de 50 µL de células criopreservadas em glicerol a -80°C transferida para meio MSC New líquido (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004) e incubado a 28°C por 8 dias sob agitação de 150 rpm até a densidade óptica (D.O.) de aproximadamente 0,8. Após o desenvolvimento da cultura, alíquotas foram utilizadas para exame microscópico de células para coloração de gram e para reação de PCR para confirmação da identidade do inóculo. Esta foi realizada com uma alíquota de 5µL do meio contendo a bactéria pura; 12,5 µL de tampão de amplificação GoTaq Green Master Mix (Promega®); 0,5 µL de uma solução de 10 µM de cada primer desenvolvido neste estudo (FL12650F2/FL12650R2) e água livre de nucleases (Ambion®) para completar a

reação para 25 μ L. O programa de amplificação empregado foi de um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 10 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e um ciclo final à 72°C por 5 minutos, sendo o produto da PCR visualizado por eletroforese de uma alíquota de 15 μ L do produto da PCR aplicado em gel de agarose 1,5% em Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen®) com TBE 0,5X, submetidas a uma voltagem de 80 W por cerca de duas horas.

A inoculação foi realizada 25 dias após o plantio pelo método descrito por Carvalho (2012), por corte da parte aérea na altura de dois centímetros da base com o auxílio de bisturi estéril, perfuração do tecido com agulhas estéreis (três perfurações/planta) e deposição de 50 μ L do inóculo na superfície do corte (Figura 3.2).

Figura 3.2 - Inoculação de plântulas de sorgo. (a) corte da parte aérea; (b) perfuração dos tecidos; (c) deposição do inóculo; (d) gota de inóculo depositado no corte

3.2.1.3 Variáveis de crescimento

As variáveis de crescimento avaliadas foram a altura da planta (cm), o diâmetro do colmo (medido com paquímetro; em cm) e o peso de massa verde (com balança digital). A altura e o diâmetro foram avaliados semanalmente, por seis semanas, iniciando-se aos 30 dias após a inoculação. Aos 90 dias após a semeadura,

a massa verde foi avaliada pesando-se a parte aérea e desprezando-se o sistema radicular.

3.2.1.4 Confirmação da infecção por Lxx

Aos 90 dias após a semeadura, coletou-se a folha do último nó (folha bandeira) de cada uma das plantas, que foi desinfestada superficialmente e usada para extração de DNA, como descrito no item 2.2.1.2. As reações de PCR foram realizadas com 100ng de DNA total usando tanto o par de *primers* desenvolvido neste estudo (FL12650F2/ FL12650R2) seguindo o programa de amplificação descrito no item 3.2.1.2, como com o par de *primers* Cxx1 (5' - CCGAAGTGAGCAGATTGACC - 3') e Cxx2 (5' - ACCCTGTGTTGTTTTCAACG - 3'), conforme condições descritas em Pan, Grisham, Wei (2001).

3.2.1.5 Análises estatísticas

Análise de variâncias (ANOVA) foram realizadas para as três variáveis com auxílio do *software* Statistica, versão 7.0 (STATSOFT, 2015).

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Confirmação da infecção por Lxx

Em ambos os experimentos houve amplificação do fragmento de DNA de Lxx nas plantas de sorgo inoculadas, indicando que houve colonização de Lxx nos diferentes genótipos de sorgo (Figura 3.3). Já em plantas inoculadas apenas com o meio não houve amplificação (dados não apresentados).

Figuras 3.3 - (a) (b). Produtos de PCR amplificados com os *primers* FL12650F2/R2 do Experimento 2 realizado na ESALQ. (L) Marcador 100pb; (+) Lxx pura; (C) cana inoculada com Lxx; amostras de sorgo inoculadas com Lxx: de 1 a 9 sorgo sacarino; de 10 a 18 sorgo granífero; de 19 a 27 sorgo sudão; (-) controle negativo

A exemplo dos *primers* anteriores, em reações usando os *primers* Cxx1/Cxx2, também houve amplificação em plantas inoculadas de ambos experimentos (figura 3.4), mas não em plantas não inoculadas (dados não apresentados), indicando concordância de resultados entre pares de *primers*.

Figuras 3.4 - (a) (b). Produtos de PCR amplificados com os *primers* Cxx1/Cxx2 do Experimento 1 realizado no CTC. (L) Marcador 100pb; (+) Lxx pura; (C) cana inoculada com Lxx; amostras de sorgo inoculadas com Lxx: de 1 a 9 sorgo sacarino; de 10 a 18 sorgo granífero, de 19 a 27 sorgo sudão; (-) controle negativo

3.2.2.2 Efeito da inoculação com Lxx em variáveis de crescimento

Testes de homogeneidade de variâncias entre os dois experimentos indicaram que os experimentos foram homogêneos para as três variáveis (dados não apresentados). Desta forma, os experimentos foram analisados em conjunto. De acordo com a Tabela 2.1, para a variável altura houve efeito de bloco, local e condição (inoculação) ($P < 0,01$). A diferença significativa entre condições, ou seja, entre plantas inoculadas ou não com Lxx é uma importante informação, indicou que a inoculação afetou esta variável nos genótipos de sorgo. A infecção por Lxx reduziu a altura em média 5%, 7% e 8%, respectivamente nos sorgos sudão, sacarino e granífero no experimento 1 realizado no CTC (Figura 3.5), ao passo que no experimento 2 as reduções foram da ordem de 7%, 12% e 5%, respectivamente (Figura 3.6). As interações tipo de sorgo X condição e condição x local, não foram significativas, indicando que os efeitos da inoculação foram detectados independente tanto do genótipo de sorgo como do local do experimento. De igual modo, a interação condição x tempo não foi significativa, demonstrando que o efeito da bactéria em altura independe do momento da avaliação.

Tabela 2.1 - Análise de variâncias (ANOVA) conjunta para os experimentos realizados no CTC e na ESALQ, com a variável de crescimento altura

Efeito	soma de quadrados	graus de liberdade	média dos quadrados	F	p
Intercept	589881.6	1	589881.6	15077.72	0,000
Bloco	466.4	2	233.2	5.96	0,003
Local (CTC e LGM)	28360.1	1	28360.1	724.90	0,000
Condição (inoculado Lxx e não inoculado)	846.6	1	846.6	21.64	0,000
Tipo Sorgo (sudão; sacarino; granífero)	45904.7	2	22952.4	586.68	0,000
Tipo Sorgo * Condição	35.5	2	17.8	0.45	0,636
Tempo (seis avaliações ao longo do tempo)	58650.1	5	11730.0	299.83	0,000
Condição * Tempo	47.0	5	9.4	0.24	0,944
Tipo Sorgo * Tempo	13229.8	10	1323.0	33.82	0,000
Tempo* Local	7729.0	5	1545.8	39.51	0,000
Condição * Local	87.6	1	87.6	2.24	0,137
Tipo Sorgo * Local	1238.0	2	619.0	15.82	0,000
Tipo Sorgo * Condição * Tempo * Local	4022.3	37	108.7	2.78	0,000
Error	5555.4	142	39.1		

Figura 3.5 - Média de altura (cm) das plantas de genótipos de sorgo no experimento realizado no CTC aos 55 (A), 62 (B), 69 (C), 76 (D), 83 (E) e 90 (F) dias após a semeadura, onde “NI” representa plantas inoculadas apenas com meio MSC New e “I” plantas inoculadas com Lxx

Figura 3.6 - Média de altura (cm) das plantas de genótipos de sorgo no experimento realizado na ESALQ aos 55 (A), 62 (B), 69 (C), 76 (D), 83 (E) e 90 (F) dias após a semeadura, onde “NI” representa plantas inoculadas apenas com meio MSC New e “I” plantas inoculadas com Lxx

Para a variável diâmetro não houve efeito de bloco, mas houve efeito de local e condição (Tabela 2.2), sendo que a diferença entre condições indica que a infecção por Lxx, a exemplo da variável altura, também afetou o diâmetro dos genótipos de sorgo. Neste caso, a redução média no diâmetro de plantas inoculadas foi de 20%, 38% e 19%, respectivamente nos sorgos sudão, sacarino e granífero no experimento 1 (Figura 3.7) e de 15%, 6% e 14%, respectivamente no experimento 2 (Figura 3.8). Assim como para altura, não houve interação tipo de sorgo X condição, indicando que os efeitos da inoculação foram detectados independente do genótipo de sorgo. Já as interações condição x local e condição x tempo foram significativas, mostrando que as diferenças em diâmetro entre plantas não inoculadas e inoculadas foram afetadas pelas condições experimentais e pelo tempo, sendo que 69 dias após o plantio foi o tempo que melhor evidenciou o efeito da inoculação (Figuras 3.7 e 3.8).

Tabela 2.5 - Análise de variâncias (ANOVA) conjunta para os experimentos realizados no CTC e na ESALQ, com a variável de crescimento diâmetro

Efeito	soma de quadrados	graus de liberdade	média dos quadrados	F	p
Intercept	8.902.058	1	8.902.058	16870.59	0,000
Bloco	0.04016	2	0.02008	3.81	0,025
Local (CTC e LGM)	221.366	1	221.366	419.52	0,000
Condição (inoculado Lxx e não inoculado)	0.88593	1	0.88593	167.90	0,000
Tipo Sorgo (sudão; sacarino; granífero)	0.36310	2	0.18155	34.41	0,000
Tipo Sorgo * Condição	0.03522	2	0.01761	3.34	0,038
Tempo (seis avaliações ao longo do tempo)	445.655	5	0.89131	168.92	0,000
Condição * Tempo	0.07472	5	0.01494	2.83	0,018
Tipo Sorgo * Tempo	0.13444	10	0.01344	2.55	0,007
Tempo* Local	0.14575	5	0.02915	5.52	0,000
Condição * Local	0.07284	1	0.07284	13.81	0,000
Tipo Sorgo * Local	0.04695	2	0.02347	4.45	0,013
Tipo Sorgo * Condição * Tempo * Local	0.44747	37	0.01209	2.29	0,000
Error	0.74929	142	0.00528		

Figura 3.7 - Média do diâmetro (cm) das plantas de genótipos de sorgo no experimento realizado no CTC aos 55 (A), 62 (B), 69 (C), 76 (D), 83 (E) e 90 (F) dias após a semeadura, onde “NI” representa plantas inoculadas apenas com meio MSC New e “I” plantas inoculadas com Lxx

Figura 3.8 - Média do diâmetro (cm) das plantas de genótipos de sorgo no experimento realizado na ESALQ aos 55 (A), 62 (B), 69 (C), 76 (D), 83 (E) e 90 (F) dias após a semeadura, onde “NI” representa plantas inoculadas apenas com meio MSC New e “I” plantas inoculadas com Lxx

Para massa verde não houve diferença significativa entre plantas inoculadas e não inoculadas (Tabela 2.3). Desta forma, as demais interações não foram avaliadas.

Tabela 2.3 - Análise de variâncias (ANOVA) conjunta para os experimentos realizados no CTC e na ESALQ, com a variável de crescimento massa verde

Efeito	soma de quadrados	graus de liberdade	média dos quadrados	F	p
Intercept	1288956	1	1288956	847,7566	0,000
Bloco	1200	2	600	0,3946	0,679
Local (CTC e LGM)	403753	1	403753	265,5515	0,000
Condição (inoculado Lxx e não inoculado)	626	1	626	0,4115	0,528
Tipo Sorgo (sudão; sacarino; granífero)	56671	2	28336	18,6366	0,000
Tipo Sorgo * Condição	171	2	86	0,0564	0,945
Condição * Local	10	1	10	0,0068	0,935
Tipo Sorgo * Local	208	2	104	0,0683	0,934
Tipo Sorgo * Condição * Local	56	2	28	0,0183	0,982
Error	33450	22	1520		

Nas Figuras 3.9 e 3.10, é possível observar que, independente da condição, os genótipos de sorgo no experimento 2 apresentaram maior crescimento em altura (Figura 3.9); além disso, houve diferença entre condições, onde as plantas inoculadas com Lxx apresentaram menor altura. As diferenças em diâmetro entre plantas inoculadas foram mais evidentes (Figura 3.10). O efeito do local do experimento foi menor, no entanto as diferenças entre diâmetros no experimento realizado no experimento 1 foram mais evidentes, possivelmente por se tratar de uma estufa com variação de temperatura e umidade, condições essas favoráveis ao aparecimento dos sintomas causados por Lxx.

Figura 3.9 - Altura dos genótipos de sorgo ao longo das avaliações após as inoculações dos experimentos realizados no CTC e na ESALQ. (A) sorgo sudão; (B) sorgo sacarino; (C) sorgo granífero; onde “NI CTC” representa plantas inoculadas apenas com meio MSC New no Experimento 1 realizado no CTC; “I ESALQ” plantas inoculadas com Lxx no Experimento 2 realizado na ESALQ; “NI ESALQ” plantas inoculadas apenas com meio MSC New no Experimento 2 realizado na ESALQ

Figura 3.10 - (A) Diâmetro dos genótipos de sorgo ao longo das avaliações após as inoculações dos experimentos realizados no CTC e na ESALQ. (A) sorgo sudão; (B) sorgo sacarino; (C) sorgo granífero; onde “NI CTC” representa plantas inoculadas apenas com meio MSC New no Experimento 1 realizado no CTC; “I ESALQ” plantas inoculadas com Lxx no Experimento 2 realizado na ESALQ; “NI ESALQ” plantas inoculadas apenas com meio MSC New no Experimento 2 realizado na ESALQ

3.2.3 Discussão

O presente estudo confirmou vários relatos anteriores que indicaram que Lxx infecta e coloniza sorgo (WEHLBURG, 1956; BENDA, 1975; MATSUOKA, 1972; GILLASPIE JR.; TEAKLE 1989). Há inclusive indicação de que a bactéria infecta naturalmente esta espécie (LIAO, 1981). No que tange a sintomatologia, a bactéria pode causar murcha e até morte em sorgo Sudão, sendo os sintomas mais evidentes no ponto de inoculação, onde se notou redução do diâmetro (WORLEY; GILLASPIE JR., 1974). Em complemento a estes relatos, o presente estudo avaliou o efeito da bactéria em variáveis de crescimento que são afetadas pelo RSD e também comparou diferentes genótipos de sorgo.

Por se tratar de genótipos com diferentes características e hábitos de crescimento, os resultados revelaram diferenças significativas entre os diferentes genótipos para altura e diâmetro, o que era esperado. Da mesma forma, houve variação significativa nestas variáveis em função do tempo, o que reflete o crescimento das plantas. As análises demonstraram também diferenças significativas entre os dois experimentos. No primeiro experimento, usou-se uma estufa não climatizada, onde as temperaturas médias ao longo das seis avaliações variaram de 20 a 31°C, com temperatura mínima observada de 12°C. Já no segundo, utilizou-se uma casa-de-vegetação climatizada, onde a temperatura média variou ao longo das avaliações de 28°C a 30,5°C, com temperatura mínima observada de 27°C. Sabe-se que os sintomas de RSD são mais evidentes em condições de estresse para a planta, como estresse hídrico, deficiência nutricional e outras doenças (BAILEY; BECHET, 1995; GILLASPIE; TEAKLE, 1989; COMSTOCK, 2002). Assim, a maior amplitude na variação em temperatura no experimento 1 pode ter contribuído para um maior efeito na altura e diâmetro em plantas infectadas.

A inoculação com Lxx reduziu tanto o diâmetro como a altura. No caso da massa verde, no entanto, não foi detectado efeito significativo, o que de certo modo não era esperado. Uma possível explicação para esta discrepância é que a massa verde foi avaliada na touceira toda. Assim, a perda em massa de plantas individuais pode ter sido compensada por um maior perfilhamento nas touceiras de plantas inoculadas. Embora o

número de perfilhos não tenha sido avaliado, observações visuais de fato indicaram maior perfilhamento em função da inoculação.

Esse estudo concluiu que é possível reproduzir os sintomas de RSD em sorgo sob condições controladas e aponta para a possibilidade de estudos complementares, como o efeito no número de perfilhos e uma análise da cinética da colonização da planta pela bactéria ao longo do tempo com uso de PCR quantitativo. Além disso, já que o sorgo é passível de rebrota e seu ciclo de corte é bem mais curto (90 dias), as avaliações podem também ser feitas nas socas, onde se espera que os efeitos da infecção pela bactéria sejam mais evidentes. Diferentes genótipos de sorgo podem ser usados como hospedeiros experimentais para estudo de RSD, uma vez que o sorgo tem o ciclo da cultura mais curto em relação a cana-de-açúcar, estudos nesse hospedeiro podem ser realizados com maior rapidez e com maior disponibilidade de informações genéticas para o entendimento dessa doença.

3.3 Conclusões

Conclui-se que sorgo sacarino, sorgo granífero e sorgo sudão são hospedeiros experimentais de Lxx e apresentam sintomas da doença causada pela bactéria, portanto o sorgo pode ser usado como organismo modelo de estudo de RSD.

Referências

BAILEY, R.A.; BECHET, G.R. The effect of ratoon stunting disease on the yield of some South African sugarcane varieties under irrigated and rainfed conditions. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, v. 69, p. 74-78, 1995.

BENDA, G.T.A. Studies on the with of a sorghum-sundangrass Irbid infected with ratoon stunting disease of sugarcane. **Proceedings of the American Phytopathological Society**, Beltsville, v. 2, p. 65, 1975.

CARVALHO, G. **Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-das-soqueiras**. 2012. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. Disponível em:

<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/111137/tde-18092012-141357/>>. Acesso em: 01 jul. 2013.

COMSTOCK, J.C. Ratoon stunting disease. **Sugar Tech**, New York, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2002.

DELATORRE, C.A.; SILVA, A.A. *Arabidopsis thaliana*: uma pequena planta um grande papel. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 31, n. 2, p. 58-67, 2008.

GILLASPIE, A.G.; TEAKLE, D.S. Ratoon stunting diseases. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE, A.G.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of sugarcane: major diseases**. New York: Elsevier, 1989. p. 59-80.

GRISHAM, M.P. Effect of ratoon stunting disease on yield of sugarcane grown in multiple three-year plantings. **Phytopathology**, Houma, v. 81, n. 3, p. 337-340, 1991.

LIAO, C.H.; CHEN, T.A. Isolation, culture, and pathogenicity to Sudan Grass of a *Corynebacterium* associated with ratoon stunting of sugarcane and with bermuda grass. **Phytopathology**, New Brunswick, v. 71, p. 1303-1306, 1981.

MATSUOKA, S. Ratoon stunting disease diagnosis whit elephant-grass as an indicator plant. **Sugarcane Pathologist's Newsletter**, Hawaii, v. 8, p. 10-11, 1972.

MEINKE, D.W.; CHERRY, J.M.; DEAN, C.; ROUNSLEY, S.D.; KOORNNEEF, Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. **Science**, Washington, v. 282, n. 5389, p. 662-682, 1998.

MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; CAMARGO, L.E.A.; VAN SLUYS, M.A.; KITAJIMA, J.P.; TRUFFI, D.; AMARAL, A.M. do; HARAKAVA, R.; OLIVEIRA, J.C.F. de; WOOD, D.; OLIVEIRA, M.C. de; MIYAKI, C.; TAKITA, M.A.; SILVA, A.C.R. da; FURLAN, L.R.; CARRARO, D.M.; CAMAROTTE, G.; ALMEIDA, N.F.; CARRER, H.; COUTINHO, L.L.; EL-DORRY, H.A.; FERRO, M.I.T.; GAGLIARDI, P.R.; GIGLIOTI, E.; GOLDMAN, M.H.S.; GOLDMAN, G.H.; KIMURA, E.T.; FERRO, E.S.; KURAMAE, E.E.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F.; MAURO, S.M.Z.; MACHADO, M.A.; MARINO, C.L.; MENCK, C.F.; NUNES, L.R.; OLIVEIRA, R.C.; PEREIRA, G.G.; SIQUEIRA, W.; SOUZA, A.A. de; TSAI, S.M.; ZANCA, A.S.; SIMPSON, A.J.G.; BRUMBLEY, S.M.; SETÚBAL, J.C. The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 8, p. 827-836, 2004.

PAN, Y.B.; GRISHAM, M.P.; BURNER, D.M. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. **Plant Disease**, Saint Paul v. 82, n. 3, p. 285-290, 1998.

PAN, Y.B.; GRISHAM, M.P.; WEI, Q. PCR diagnosis of sugarcane leaf scald and ratoon stunting disease. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**. Louisiana, v. 24, p. 607–608, 2001.

PATERSON, A.H.; BOWERS, J.E.; BRUGGMANN, R.; DUBCHAK, I.; GRIMWOOD, J.; GUNDLACH, H.; HABERER, G.; HELLSTEN, U.; MITROS, T.; POLIAKOV, A.; SCHMUTZ, J.; SPANNAGL, M.; TANG, H.; WANG, X.; WICKER, T.; BHARTI, A.K.; CHAPMAN, J.; FELTUS, F.A.; GOWIK, U.; GRIGORIEV, I.V.; LYONS, E.; MAHER, C.A.; MARTIS, M.; NARECHANIA, A.; OTILLAR, R.P.; PENNING, B.W.; SALAMOV, A.A.; WANG, Y.; ZHANG, L.; CARPITA, N.C.; FREELING, M.; GINGLE, A.R.; HASH, C.T.; KELLER, B.; KLEIN, P.; KRESOVICH, S.; MCCANN, M.C.; MING, R.; PETERSON, D.G.; RAHMAN, M.; WARE, D.; WESTHOFF, P.; MAYER, K.F.X.; MESSING, J.; ROKHSAR, D.S. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. **Nature**, London, v. 457, p. 551-556, 2009. doi:10.1038/nature07723.

STATSOFT. **STATISTICA** (data analysis software system): version 7. 2015. Disponível em: <www.statsoft.com>. Acesso em: 16 mar. 2015.

WEHLBURG, C. Ratoon stunting disease in Cuba. **Sugar Journal**, Havana, v. 51, n. 3, p. 27–29, 1956.

WORLEY, J.F.; GILLASPIE JR., A.G. Electron microscopy in situ of the Bacterium associated with ratoon stunting disease in Sundangrass. **Phytopathology**, Maryland, v. 65, p. 287-295, 1974.

ANEXOS

Anexo A

Tabela A1 - Médias das observações de altura (cm) dos blocos dos diferentes genótipos de sorgo nas diferentes condições (inoculado com Lxx e não inoculados com Lxx) ao longo dos dias após a semeadura (DAS) nos **Experimento 1 e 2** realizados no CTC e ESALQ, respectivamente

Genótipo sorgo	Condição	CTC						ESALQ					
		55 DAS	62 DAS	69 DAS	76 DAS	83 DAS	90 DAS	55 DAS	62 DAS	69 DAS	76 DAS	83 DAS	90 DAS
Sudão	não inoculado Lxx	18,78	26,53	40,39	51,94	86,5	133,27	66,11	71,94	83	105,44	107,56	110,5
Sacarino	não inoculado Lxx	16,72	20,44	27,75	30,94	47,72	54,67	43,78	48,72	55,06	59,72	64,11	68,94
Granífero	não inoculado Lxx	15,64	19,61	27,28	30,83	51,83	57	43,28	46,11	48,83	54,72	57	61,33
Sudão	inoculado Lxx	18,39	27,19	39,78	52,5	85,94	116,39	51,67	61,42	78,89	101,67	104,67	108,33
Sacarino	inoculado Lxx	15,47	18,47	24,61	28,28	43,94	53,78	31,56	37,33	45,39	57,33	61,22	65,39
Granífero	inoculado Lxx	14,47	18,28	24	29,83	44,28	54,61	42	44,67	47,44	50,5	53,5	56,83

Tabela A.2 - Médias das observações de diâmetro (cm) dos blocos dos diferentes genótipos de sorgo nas diferentes condições (inoculado com Lxx e não inoculados com Lxx) ao longo dos dias após a semeadura (DAS) nos Experimento 1 e 2 realizados no CTC e ESALQ, respectivamente

Genótipo sorgo	Condição	CTC						ESALQ					
		55 DAS	62 DAS	69 DAS	76 DAS	83 DAS	90 DAS	55 DAS	62 DAS	69 DAS	76 DAS	83 DAS	90 DAS
Sudão	não inoculado Lxx	0,26	0,45	0,55	0,66	0,78	0,84	0,66	0,78	0,8	0,81	0,83	0,92
Sacarino	não inoculado Lxx	0,33	0,47	0,68	0,81	0,97	1,02	0,53	0,78	0,81	0,88	0,99	1,07
Granífero	não inoculado Lxx	0,28	0,4	0,52	0,59	0,74	0,87	0,59	0,66	0,68	0,77	0,79	0,87
Sudão	inoculado Lxx	0,24	0,41	0,46	0,54	0,56	0,63	0,51	0,61	0,66	0,68	0,73	0,86
Sacarino	inoculado Lxx	0,28	0,32	0,42	0,47	0,55	0,59	0,46	0,7	0,77	0,86	0,93	1,01
Granífero	inoculado Lxx	0,25	0,36	0,44	0,48	0,55	0,67	0,46	0,56	0,58	0,69	0,72	0,78

Tabela A.3 - Peso de massa verde (g) dos diferentes genótipos de sorgo nas diferentes condições (inoculado com Lxx e não inoculados com Lxx) no final do ciclo da cultura (90 dias após a semeadura (DAS)) nos Experimento 1 e 2 realizados no CTC e ESALQ, respectivamente

Genótipo sorgo	Condição	CTC	ESALQ
		90 DAS	90 DAS
Sudão	não inoculado Lxx	440,82	538,95
Sacarino	não inoculado Lxx	172,4	413,28
Granífero	não inoculado Lxx	171,25	405,8
Sudão	inoculado Lxx	408,62	518,15
Sacarino	inoculado Lxx	132,2	396,4
Granífero	inoculado Lxx	178,12	395,53