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

**Avaliação da cinética populacional de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em resposta
a fatores do hospedeiro e do ambiente**

Adalgisa Thayne Munhoz Ramos

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2012**

Adalgisa Thayne Munhoz Ramos

Engenheira Agrônoma

Avaliação da cinética populacional de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em resposta a fatores do hospedeiro e do ambiente

Orientador:

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

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2012**

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

Ramos, Adalgisa Thayne Munhoz

Avaliação da cinética populacional de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em resposta a fatores do hospedeiro e do ambiente / Adalgisa Thayne Munhoz Ramos.- - Piracicaba, 2012.

84 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Bactérias fitopatogênicas 2. Cana-de-açúcar 3. Cinética de populações 4. Danos mecânicos 5. Estresse hídrico 6. Fluido vascular 7. Reação em Cadeia por Polimerase 8. Raquitismo das soqueiras I. Título

CDD 633.61
R175a

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

À minha mãe, Jane, pelo amor e dedicação, que me levaram a escolher sempre os melhores caminhos.

Aos meus irmãos, Rafael e Fernanda, pelo companheirismo na busca dos nossos sonhos.

Ao meu marido, Fabrício, pelo amor e compreensão.

À tia Neuza por todos os cuidados,

Dedico

Ao meu querido Tio, Carlos Alberto (*in memoriam*), por ter despertado em mim, o amor pelos estudos e pela pesquisa.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À ESALQ por todo o suporte durante a minha formação acadêmica e por todos os momentos vividos;

Ao orientador Professor Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, pela orientação, ensinamentos e amizade;

Ao Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação;

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelas valiosas contribuições ao estudo;

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular: Ana Carolina, Giselle, Jerônimo, Leandro, Fernanda, Thais, Débora, Mariana, Raphael, Rafael, Aline, Maisa e Silvânia pela amizade e oportunidade de convivência todos esses anos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia por todo o auxílio;

Ao departamento de irrigação da Esalq-USP, em especial ao Profº. Dr. José Antônio Frizzone e ao técnico do laboratório de hidráulica Gilmar Batista Grigolon;

Ao professor Paulo R. C, Castro e ao funcionário do Depto. de Ciências Biológicas Romeu Aparecido Rocha por disponibilizar o uso das estufas de seu Laboratório;

Ao professor Alfredo Seiti Urashima da Universidade Federal de São Carlos e à CanaVialis S.A., por fornecerem o material vegetal utilizado no trabalho;

Ao departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture- Agricultural Research Service* - USDA /Houma, Louisiana) - empresa de pesquisa em cana-de-açúcar, pela participação e apoio na condução do trabalho;

Ao Dr. Michael P. Grisham pela supervisão do trabalho realizado no USDA e aos demais funcionários, Kathryn, Jeri, Jennifer, Eric e à todos os outros que participaram direta ou indiretamente da execução dos trabalhos desenvolvidos na estação.

À todos os colegas do curso de pós-graduação em Fitopatologia pela amizade e bons momentos vividos;

Em especial, ao Jerônimo e Leandro pela grande contribuição na realização das análises estatísticas e trabalhos realizados na casa de vegetação;

À Giselle de Carvalho por todo o auxílio, trabalho em conjunto, experiências compartilhadas e amizade;

Ao Fabrício Packer Gonçalves por estar presente em minha vida, contribuído para o meu crescimento profissional e pessoal sempre com dedicação e carinho;

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho;

À CAPES pelo auxílio financeiro;

Ao CNPQ pela concessão da bolsa sanduiche para estágio no exterior.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
Referências	17
2 ESTRESSE HÍDRICO E INJÚRIA MECÂNICA AFETAM A CINÉTICA POPULACIONAL DE <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> in planta	21
Resumo	21
Abstract.....	21
2.1 Introdução	22
2.2 Material e Métodos	24
2.2.1 Material vegetal	24
2.2.2 Desenho experimental e indução de déficit hídrico.....	24
2.2.3. Coleta das amostras	26
2.2.4 Determinação do Conteúdo Relativo de Água (CRA)	27
2.2.5 Quantificação de Lxx em tecido foliar por meio de PCR quantitativo	27
2.2.6 Curva de Diluição Padrão de DNA de Lxx	28
2.2.7 Análises estatísticas	29
2.3 Resultados.....	29
2.3.1 Avaliação do conteúdo relativo de água (CRA) nas folhas e do desenvolvimento das plantas.....	29
2.3.2 Curva padrão de Lxx	32
2.3.3 Quantificação de Lxx em tecido foliar	33
2.4 Discussão.....	36
2.5 Conclusões.....	40
Referências	40
3 DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> É MODULADO POR COMPOSTOS DO FLUIDO VASCULAR DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	45
Resumo	45
Abstract.....	45
3.1 Introdução	46
3.2 Material e Métodos	48
3.2.1 Material Vegetal	48
3.2.2 Obtenção de isolado de Lxx	49
3.2.3 Confirmação da identidade do isolado bacteriano.....	51
3.2.4 Avaliação do efeito do fluido vascular de cana-de-açúcar no desenvolvimento de culturas de Lxx	52

3.2.5 Análise do fluido vascular das variedades de cana em cromatografia líquida de alta resolução acoplada a espectrometria de massa	53
3.3 Resultados	54
3.3.1 Confirmação da identidade do Isolado bacteriano	54
3.3.2 Efeito do fluido vascular de cana-de-açúcar no crescimento <i>in vitro</i> de Lxx.....	54
3.3.3 Análise cromatográfica acoplada a espectrometria de massa do fluido vascular das variedades resistente (CP 68-52) e suscetível (L99-233).....	58
3.4 Discussão	61
3.5 Conclusões	64
Referências	65
4 INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ABSCÍSICO NO DESENVOLVIMENTO DA POPULAÇÃO DE <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> IN PLANTA	69
Resumo.....	69
Abstract	69
4.1 Introdução	70
4. 2 Material e Métodos	72
4.2.1 Material vegetal.....	72
4.2.2 Quantificação de Lxx em tecido foliar por meio de PCR quantitativo.....	73
4.2.3 Curva de Diluição Padrão de DNA de Lxx.....	73
4.2.4 Análises estatísticas.....	73
4.3 Resultados	74
4.4 Discussão	79
4.5 Conclusões	81
Referências	81

RESUMO

Avaliação da cinética populacional de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em resposta a fatores do hospedeiro e do ambiente

O raquitismo das soqueiras (RSD), causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) é uma das principais doenças na cana-de-açúcar, contudo, as informações sobre a biologia do patógeno, bem como sobre sua interação com cana são limitadas. Desta forma, três estudos foram conduzidos com o objetivo de verificar a interferência de fatores do hospedeiro e do ambiente na cinética populacional da *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) in planta e in vitro. Num primeiro, foi quantificada, através de PCR em tempo real (qPCR), a colonização da bactéria de plantas de duas variedades submetidas a estresse por restrição hídrica e por injúria mecânica infligida através de corte da planta. Num segundo, o desenvolvimento *in vitro* da bactéria foi avaliado, por 10 dias, em resposta à adição ao meio de cultivo de fluido vascular de plantas de cana. Já o terceiro estudo avaliou o efeito do hormônio ácido abscísico (ABA) na cinética populacional de Lxx em cana. No primeiro estudo, os resultados apontaram efeito positivo tanto do estresse hídrico como da injúria no título bacteriano em plantas da variedade CB 49-260. Já na variedade RB83 5486, não houve efeito significativo destes agentes de estresse no título bacteriano. No segundo estudo, o maior desenvolvimento da população de Lxx ocorreu em meio de cultivo sem adição de fluido vascular, ao passo que o desenvolvimento da população em presença de fluido da variedade resistente não inoculada com Lxx foi maior, quando em presença de fluido de plantas da mesma variedade inoculadas com a bactéria. A adição de fluido vascular da variedade suscetível, por outro lado, inibiu substancialmente o desenvolvimento das culturas bacterianas. A análise cromatográfica do fluido vascular indicou diferenças na concentração de compostos do fluido das duas variedades, bem como entre plantas da mesma variedade inoculadas ou não com a bactéria. No terceiro estudo, apesar das variações nos títulos da Lxx detectados ao longo do tempo, tanto nas plantas testemunhas como nas plantas tratadas com ABA, não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos dentro de um período de avaliação de 4 meses. Em seu conjunto, os resultados, além de fornecerem informações inéditas sobre a interação entre Lxx e cana, ainda permitiram direcionar futuros estudos a fim de aprimorar o conhecimento sobre os mecanismos de colonização do hospedeiro desta bactéria.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Raquitismo das soqueiras; Estresse hídrico; Injúria mecânica; PCR em tempo real; Fluido vascular; Ácido abscísico

ABSTRACT

The analysis of population kinetics of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in response to factors of host and environment

Ratoon Stunting Disease (RSD) caused by the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) is a major disease in sugarcane; however, information on the biology of this pathogen and on its interaction with sugarcane is limited. Three studies were conducted to analyze effects of the host and environment on the population kinetics of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) in plant and *in vitro*. In the first treatment, we used real time PCR (qPCR) to quantify bacterial colonization in two sugarcane varieties subjected to water stress and mechanical injury. In the second treatment, we evaluated the *in vitro* growth of the bacteria for 10 days after the addition of 15% of sugarcane vascular fluid to the culture medium. The third treatment evaluated the effect of the application of abscisic acid (ABA) on Lxx colonization in sugarcane. In the first treatment, the results showed an increase in Lxx colonization in the variety CB 49-260 exposed to water stress and mechanical injury. For the variety RB83 5486, there was no significant effect of these stresses on the bacterial colonization. In the second treatment, the greatest development of Lxx population occurred in the culture medium without the addition of vascular fluid (control), while bacterial population in the presence of fluid from resistant variety non-inoculated with Lxx was greater, compared to the growth in the presence of plant fluids of the same variety inoculated with the bacteria. The addition of vascular fluid of the susceptible variety, on the other hand, significantly inhibited bacterial growth. The chromatographic analysis of the vascular fluid indicated differences in the compounds concentration in the fluid of the two varieties, as well as in plants of the same variety inoculated or not with the bacteria. In the third study, despite variations in Lxx colonization detected over time, the control plants and plants treated with ABA showed no significant differences ($p > 0.05$) among treatments during the trial period of four months. The results, in addition to providing new information about the interaction between Lxx and sugarcane, allowed to direct further studies on mechanisms of host colonization of this bacterium.

Keywords: Sugarcane; Ratoon stunting disease; Water stress; Mechanical injury; Real time PCR; Vascular fluid; Abscisic acid

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), originária da Nova Guiné, foi inicialmente levada para o Norte da África e Sul da Europa (MOZAMBANI et al., 2006), mas foi nas Américas que a cultura encontrou excelentes condições para o seu desenvolvimento. Embora, atualmente, seja cultivada em quase todos os continentes, mais de um terço da produção mundial da cultura é assegurada por três nações americanas: Brasil, México e EUA (FNP, 2010). Dentre estes países, o Brasil se destaca por ser o responsável por aproximadamente 40% da produção mundial (FAO, 2009), sendo que o Estado de São Paulo, a principal região produtora, responde por mais de 50% do total, seguido por Paraná, Minas Gerais e Goiás (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2012). Atualmente, pouco mais da metade da produção é destinada à produção de álcool e o restante à de açúcar (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB- terceiro levantamento da safra 2011/2012).

Entre as safras 2006/2007 e 2011/2012, a produção brasileira aumentou em aproximadamente 100 milhões de toneladas (CONAB, 2012), em grande parte devido ao aumento de área cultivada em mais de dois milhões de hectares, uma vez que houve uma redução na produtividade de 11,4%. Embora o principal responsável pela queda de produtividade na safra brasileira de 2011 tenha sido o clima seco, outros fatores, como os fitossanitários, devem ser ressaltados, uma vez que a severidade de algumas doenças está associada ao clima.

Assim, para que o Brasil assegure sua produtividade, o impacto das doenças deve ser minimizado, já que estas são responsáveis por 19% das perdas na produção canavieira mundial (SANTIAGO; ROSSETO, 2010). Mais de 216 doenças foram descritas para a cana-de-açúcar e pelo menos 58 são encontradas no Brasil e no mínimo 10 são consideradas de grande importância econômica (BIRCH, 2001). Dentre as principais doenças relatadas no Brasil estão o raquitismo das soqueiras, o carvão, a escaldadura das folhas, o mosaico da cana-de-açúcar e as ferrugens (SANGUINO, 1998; CONAB, 2012).

O raquitismo das soqueiras (RSD- *Ratoon Stunting Disease*), considerado uma das principais doenças da cana-de-açúcar, é causado por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) (DAVIS et al., 1980), uma bactéria gram positiva, fastidiosa, corineforme, não móvel, aeróbia obrigatória e que coloniza o xilema da planta (KAO; DAMANN, 1980). Essa doença foi relatada pela primeira vez em 1944 na Austrália, na variedade Q28 e, desde então, se espalhou por todo o mundo. Quando descrita pela primeira vez no Brasil, no município de Campos dos

Goytacazes (RJ), por Frederico Veiga, em 1956, já estava disseminada por todas as regiões canavieiras (TOKESHI, 1997). A doença não tem um sintoma característico, o que dificulta seu controle. Os sintomas incluem porte reduzido da planta em consequência do encurtamento dos colmos (BAILEY; BECHET, 1995; HOY et al., 1999). Além disto, internamente nota-se uma alteração na cor dos vasos em colmos maduros, de amarelo para vermelho-escuro (DAVIS et al., 1980; DAMANN, 1988). Através de cortes longitudinais nos colmos, também é possível observar alterações que se traduzem em pontos e vírgulas laranja-avermelhados (STEINDL, 1961). Ainda, estudos indicaram que os sintomas podem ser mais severos em hospedeiros expostos a condições de déficit hídrico e injúrias mecânicas induzidas pelo corte dos colmos (ROSSLER, 1974; BAILEY; BECHET, 1986; GILLASPIE; TEAKLE, 1989; REIS; MARIANO, 1994; GRISHAM, 1991).

A doença é de difícil diagnose, já que estes sintomas não são característicos e podem ser confundidos com sintomas causados por outros fatores, como tratos culturais inadequados ou insuficiência de água e/ou de fertilizantes, o que contribui para sua progressiva disseminação (IGLESIA, 2003; GRISHAM, 2004). Sendo assim, o RSD só pode ser seguramente diagnosticado pela detecção do patógeno (SANGUINO et al., 1998). Dentre os métodos empregados no diagnóstico de Lxx estão a microscopia de contraste de fase ou imunofluorescência, testes sorológicos e técnicas moleculares baseadas na reação polimerásica em cadeia- PCR (WORLEY; GILLASPIE JR., 1974; GIGLIOTI et al., 1999; PAN et al., 1998).

A transmissão do RSD ocorre de forma mecânica durante o corte manual da lavoura e com implementos agrícolas. A forma mais eficiente de controle do raquitismo das soqueiras é por meio do uso de variedades resistentes. No entanto, devido à difícil tarefa de selecionar variedades resistentes em função da dificuldade no diagnóstico rápido da doença, o principal método de controle passou a ser o tratamento térmico de toletes ou gemas (termoterapia) (COOPERATIVA DOS PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1989; DAMANN JR; BENDA, 1983; GRISHAM, 2004), já que a transmissão da doença se dá por material propagativo infectado. Esta prática, porém, nem sempre elimina a bactéria, além de reduzir o poder de germinação das gemas devido ao estresse térmico (GRISHAM et al., 2007; URASHIMA; GRACHET, 2012). Além disso, apesar dos cuidados no emprego da termoterapia, existem relatos da ocorrência de escapes que podem servir como fonte de inóculo tanto no viveiro como no campo (BENDA, 1994), uma vez que a bactéria também é transmitida de forma mecânica por contacto com

implementos contaminados. Desta forma, a desinfestação de materiais de corte em operações de viveiro também é uma medida de controle a ser usada complementarmente à termoterapia.

No que tange a obtenção de variedades resistentes, além da dificuldade de seleção de genótipos resistentes, alguns autores ressaltaram o diferente comportamento (resistência/suscetibilidade) de genótipos de cana-de-açúcar em função do ambiente e das condições de cultivo (BAILEY; TOUGH, 1992; COMSTOCK et al. 1996). Estudos avaliando cultivares resistentes na Flórida constataram que a resistência está presente em uma série de cultivares de cana-de-açúcar, no entanto, nenhuma cultivar é imune à infecção (COMSTOCK; LENTINI, 2005). No Brasil, ainda não existem muitos cultivares identificados como resistentes ou tolerantes ao RSD (GAGLIARDI; CAMARGO, 2009).

Em um estudo recente, utilizando dez variedades dentre as quais as seis mais plantadas, estimou-se que as perdas devido ao RSD giraram em torno de 15% (ton/ha), considerando todas as variedades e três cortes (GAGLIARDI; CAMARGO, 2009). Assumindo a produtividade atual de 68 ton/ha (CONAB, 2012), estima-se que nas lavouras brasileiras a perda de produção em média seria de mais de 70 milhões de toneladas. Na Florida (EUA) foram estimadas perdas de 5 a 15% por safra, que correspondem a US\$ 36,8 milhões (DEAN; DAVIS, 1989), e na Austrália foram estimadas perdas de US\$ 11 milhões por ano (FEGAN et al., 1998). Em condições de déficit hídrico, a doença pode levar a perdas em biomassa de 31% a 50% em variedades suscetíveis e não tolerantes (GILLASPIE; TEAKLE, 1989). Na África do Sul, por exemplo, quando foi feita a média de produtividade de diferentes variedades infectadas com Lxx, submetidas à irrigação e a um moderado déficit hídrico, observou-se uma redução de 50% em toneladas/ha nas parcelas sob estresse (BAILEY; BECHET, 1995). Nesse trabalho, os autores consideraram como moderado déficit hídrico, a condição em que as plantas foram irrigadas naturalmente pelas chuvas e ressaltaram a ocorrência de baixas precipitações em alguns períodos durante o experimento. Outro dano direto é a redução do número de cortes em talhões altamente infectados em função do comprometimento do crescimento das plantas, redução do brotamento das soqueiras e emissão dos perfilhos. Em média, a cultura permite até quatro cortes consecutivos em plantas sadias, ao passo que em talhões infectados por Lxx, este número é reduzido para aproximadamente dois, resultando no aumento de custo devido à necessidade de renovar o talhão mais precocemente (YOUNG; BRUMBLEY, 2004).

Embora as evidências que apontam para uma relação entre a ocorrência de fatores abióticos adversos e o aumento de sintomas e perdas relativas ao RSD serem inequívocas (BAILEY; BECHET, 1986; GILLASPIE; TEAKLE, 1989; REIS; MARIANO, 1994;

GRISHAM, 1991), ainda não se conhece as causas desta relação. No entanto, sabendo-se que o título bacteriano está diretamente relacionado à perda (GIGLIOTTI et al., 1997; DAVIS, 1992), levanta-se a possibilidade que fatores adversos ao hospedeiro, como déficit hídrico e injúria mecânica, poderiam favorecer a multiplicação do patógeno em seus tecidos, o que resultaria em maiores perdas. Desta forma, entender os fatores que afetam o crescimento da bactéria na cana é importante, pois pode fornecer informação para um manejo adequado.

Análises *in silico* da sequência genômica de Lxx, levantaram a hipótese de que a bactéria seria capaz de produzir e secretar um composto análogo ao ácido abscísico (ABA) a partir da rota de síntese de pigmentos isoprenóides e que este composto poderia comprometer a resposta de defesa do hospedeiro, favorecendo sua colonização (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). De fato, sobrenadante de culturas de Lxx apresentou efeito tóxico sobre a germinação de sementes de alface, corroborando com esta hipótese (CASTRO, 2012). Adicionalmente, a produção desta toxina é exacerbada quando a bactéria é cultivada sob condição de estresse osmótico induzido por polietileno glicol (CASTRO, 2012). Desta forma, a produção do composto por Lxx em plantas sob estresse hídrico, poderia acentuar os sintomas de RSD, uma vez que o ABA leva a inibição do crescimento da planta (CHAPIN et al., 1987)

Além dos fatores abióticos, o crescimento de Lxx também depende do hospedeiro (GILLASPIE; TEAKLE, 1989) e as causas determinantes deste fenômeno também são pouco compreendidas. Uma hipótese é a de que a colonização da bactéria depende da composição da seiva do xilema. Essa hipótese tem por base relatos de outras bactérias habitantes do xilema, como *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* (Lxc) e *Xylella fastidiosa*. O crescimento *in vitro* de ambas foi significativamente aumentado quando se adicionou ao meio, extratos de seiva de seus respectivos hospedeiros, no caso o capim bermuda (*Cynodon dactylon*) e videira, respectivamente (HAAPALAINEN et al., 2000; ZAINI et al., 2009).

Desta forma, os objetivos do trabalho foram: i) avaliar títulos de Lxx em plantas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas a déficit hídrico e injúria mecânica por corte do colmo, através da quantificação, por PCR em tempo real; ii) verificar o efeito da adição de fluido vascular de variedades de cana-de-açúcar, resistente e suscetível ao RSD, no crescimento *in vitro* da bactéria, e iii) avaliar a influência do ácido abscísico na interação de Lxx com a sua hospedeira, através da quantificação, por PCR em tempo real.

Referências

- BAILEY, R.A.; BECHET, G.R. Effect of ratoon stunting disease on the yield and components of yield of sugarcane under rainfed conditions. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, v. 60, p. 143-147, 1986.
- BAILEY, R.A.; TOUGH, S.A. Ratoon stunting disease: survival of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, in field soil and its spread to newly planted sugarcane. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, v. 66, p.75-77, 1992.
- 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. Serial hot-water treatment for sugarcane disease control. In: RAO, G.P.; GILLASPIE JR., A.G.; UPADHYAYA, P.P.; BERGAMIN FILHO, A.; AGNIHOTRI, V.P.; CHEN, C.T. (Ed.). **Current trends in sugarcane pathology**. New Delhi: International Books and Periodicals Supply Service, 1994. p. 297-310.
- BIRCH, R.G. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 2, p. 1-11, 2011.
- CASTRO, F.R.O.S.R. **Caracterização do efeito tóxico de extratos de culturas líquidas de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* na germinação de sementes de alface**. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- CHAPIN, F.S.; BLOOM, A.J.; FIELD, C.B.; WARING, R.H. Plant responses to multiple environmental factors. **Bio-Science**, Reston, v. 37, p. 49-57, 1987.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar (safra2011/2012)**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2012.
- COMSTOCK, J.C.; SHINE, J.R.; DAVIS, M.J.; DEAN, J.L. Relationship between resistance to *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* colonization in sugarcane and spread of ratoon stunting disease in the field. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 704-708, 1996.
- COMSTOCK, J.C.; LENTINI, R.S. **Sugarcane ratoon stunting disease**. 2005. Disponível em: <http://eds.ufl.edu/body_SC008>. Acesso em: 01 ago. 2007.
- COOPERATIVA DOS PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Binômio tempo x temperatura no controle do raquitismo da soqueira (RSD) da cana-de-açúcar, pelo processo de termoterapia em gemas isoladas**. São Paulo, 1989. 5p. (Cadernos COPERSUCAR, Série Melhoramento, 25).
- DAMANN JR., K.E. Alkaline-induced metaxylem autofluorescence: a diagnostic symptom of ratoon stunting disease of sugarcane. **Phytopathology**. Saint Paul, v.78, p.233-236, 1988.

DAMANN JR., K.E.; BENDA, G.T.A. Evaluation of commercial heat-treatment methods for control of ratoon stunting disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v.67, p. 966-967, 1983.

DAVIS, M.J. Fastidious bacteria of plant vascular tissues and their invertebrate vector. In: BALOWS, A.; TRIPPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHIFFER, K.H. (Ed.). **Prokaryotes** 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1992. v. 3, chap. 228, p. 4030-4044.

DAVIS, M.J.; GILLASPIE, A.G.; JR. HARRIS, R.W.; LAWSON, R.H. Ratoon stunting disease of sugarcane: Isolation of the causal bacterium. **Science**, Washington, v. 210, p. 1365-1367, 1980.

DEAN, J.L.; DAVIS, M.J. Yield losses caused by ratoon stunting disease of sugarcane in Florida. **Journal American Society of Sugar Cane Technologists**, Baton Rouge, v. 10, p. 66-72, 1989.

FAO. **Agricultural Production indices, pesquisa de dados de produção e exportação de cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 05 set. 2009.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Cana-de-açúcar. In: _____. **AGRIANUAL 2010**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2010. p. 239-261.

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

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, n. 4, p. 1222-1226, 2009.

GIGLIOTI, E.A.; COMSTOCK, J.C.; DAVIS, M.J.; MATSUOKA, S.; TOKESHI, H. A comparison of staining by transpiration method and tissue blot immunoassay to screen sugarcane genotypes for resistance to ratoon stunting disease. In: ISSCT PATHOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY WORKSHOP, 1997, Durban. (Abstracts), 1997. p. 56.

GIGLIOTI, E.A.; COMSTOCK, J.C.; DAVIS, M.J.; MATSUOKA, S.; TOKESHI, H. Aplicação do tissue blot imunoassay e do método de coloração dos vasos do xilema por transpiração para avaliação da colonização de colmos de cana-de-açúcar por *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* e de seu efeito na funcionalidade do xilema. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 25, n. 2, p. 125-123, 1999.

GILLASPIE, A.G.; TEAKLE, D.S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; JR.; GILLASPIE, A.G.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of sugarcane**. New York: Elsevier Science, 1989. v. 1, p. 59-80.

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

_____. Ratoon stunting disease. In: RAO, G.P.; SAUMTALLY, A.S.; ROTT, P. (Ed.). **Sugarcane pathology: bacterial and nematode diseases**. New Hampshire: Science Publishers, 2004. p. 77-96.

GRISHAM, M.P.; PAN, Y.-B.; RICHARD, E.P. JR. Early detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 430-434, 2007.

HAAPALAINEN, M.; MATTINEN, J.; METZLER, M. The growth of a plant-parasitic bacterium, *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, is enhanced by xylem fluid components. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 56, p. 147-155, 2000.

HOY, J.W.; GRISHAM, M.P.; DAMANN, K.E. Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 1170-1175, 1999.

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.

KAO, J.; DAMANN JR., K.E. In situ localization and morphology of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. **Euphytica**, Wageningen, v. 129, p. 237-240, 1980.

MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; CAMARGO, L.E.A.; VAN SLUYS, M.A.; KITAJIMA, J.P.; TRUFFI, D.; AMARAL, A.M.; HARAKAVA, R.; OLIVEIRA, J.C.F.; WOOD, D.; OLIVEIRA, M.C.; MIYAKI, C.; TAKITA, M.A.; SILVA, A.C.R.; FURIAN, L.R.; CARRARO, D.M.; CAMAROTTE, G.; ALMEIRA JR., 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.; DE SOUZA, A.A.; TSAI, S.M.; ZANCA, A.S.; SIMPSON, A.J.G.; BRUMBLEY, S.M.; SETÚBAL, J.C. Genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, p. 827-836, 2004

MOZAMBANI, A.E.; PINTO, A.S.; SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. **Atualizações em produção de cana-de-açúcar**. Campinas: Fundação Cargil, 2006. p. 11-18.

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

REIS, A.; MARIANO, R. O gênero *Clavibacter* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 20, p. 83-88, 1994,

ROSSLER, L.A. The effects of ratoon stunting disease on three sugarcane varieties under different irrigation regimes. **Proceedings International Society Sugar-cane Technologists**, Baton Rouge, v. 15, p. 483-496, 1974.

SANGUINO, A. Situação atual da pesquisa em doenças da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 24, n. 1, p. 90-91, 1998.

SANTIAGO, A.D.; ROSSETTO, R. **Agência de Informação Embrapa: cana-de-açúcar. fitossanidade**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_51_711200516718.html>. Acesso em: 01 ago. 2010.

STEINDL, D.R.L. Ratoon stunting disease. In: MARTIN, J.P.; ABBOT, E.V.; HUGES, C.G. (Ed). **Sugarcane disease of the world**, Amsterdam, 1961. v. 1, p. 433-459.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Editora Ceres, 1997. v. 2, p. 207-225.

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 20 fev. 2012.

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, p. 54-57, 2012.

WORLEY, J.F.; GILLASPIE JR., A.J. Electron microscopy in situ of the bacterium associated with ratoon stunting disease in sugarcane. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, p. 287-295, 1975.

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

ZAINI, P.A.; DE LA FUENTE, L.; HOCH, H.C.; BURR, T.J. Grapevine xylem sap enhances biofilm development by *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 295, p. 129-134, 2009.

2 ESTRESSE HÍDRICO E INJÚRIA MECÂNICA AFETAM A CINÉTICA POPULACIONAL DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in planta

Resumo

O raquitismo das soqueiras da cana (RSD) causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é uma das principais doenças da cana-de-açúcar. Contudo, pouco ainda é conhecido sobre as condições que governam a interação entre a bactéria e seu hospedeiro. O objetivo do presente trabalho foi quantificar, por meio de PCR em tempo real, populações bacterianas em plantas de cana submetidas a estresses impostos por déficit hídrico e injúria mecânica. Para tanto, plantas das variedades CB 49-260 e RB83 5486 foram cultivadas em vasos em casa de vegetação e submetidas a dois regimes de irrigação, combinados ou não com injúria mecânica. As plantas foram mantidas sob condição de irrigação na capacidade de campo (CC) ou irrigadas a 50% da CC. A injúria deu-se através de corte no colmo rente ao solo aos 25 dias após o transplante para os vasos. O efeito dos regimes de irrigação nas plantas foi avaliado pela medição do conteúdo relativo de água nas folhas (CRA). O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com oito tratamentos e seis repetições e foi repetido uma vez. Os títulos bacterianos foram quantificados por PCR em tempo real imediatamente antes e 75 dias após o início da aplicação dos tratamentos de estresses. A avaliação do CRA confirmou a ocorrência de estresse hídrico em plantas irrigadas a 50% da CC. Na variedade CB 49-260 houve redução dos valores de CRA no tratamento irrigado a 50% da CC, combinado ou não com injúria mecânica, nos dois ensaios. Na variedade RB83 5486, houve redução do CRA nas plantas do tratamento com irrigação a 50% da CC combinada com injúria mecânica somente no primeiro ensaio e redução do CRA no tratamento somente irrigado a 50% da CC no segundo ensaio. Na variedade CB 49-260, nos dois ensaios, houve aumento no título bacteriano nas plantas submetidas aos tratamentos irrigados a 50% da CC em relação aos tratamentos irrigados a CC. Contudo, no primeiro ensaio, também houve um sensível aumento do título bacteriano nas plantas irrigadas na CC e submetidas a injúria mecânica. Na variedade RB83 5486, ao contrário, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) no título da bactéria entre os tratamentos, independente do ensaio. Além disso, nessa variedade, o título de Lxx foi menor em relação à variedade CB 49-260, para todos os tratamentos, nos dois ensaios, exceto na testemunha (irrigadas à CC e sem corte), onde não houve diferenças significativas entre os títulos bacterianos. Neste estudo foi observado que os estresses, sobretudo a restrição hídrica, levou ao aumento da população de Lxx in planta, no entanto, os efeitos dependeram da variedade.

Palavras-chave: Raquitismo das soqueiras; Cana-de-açúcar; Conteúdo relativo de água; PCR em tempo real

Abstract

Ratoon Stunting Disease (RSD) caused by the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* is a major disease of sugar cane. However, little is still known about the conditions that affect the interaction between the bacterium and its host. The aim of this study was to quantify the multiplication of Lxx in sugarcane plants subjected to stresses imposed by drought and

mechanical injury. For that purpose, plants of the varieties CB 49-260 and RB83 5486 were grown in pots in a greenhouse and were subjected to two irrigation conditions, combined or not with mechanical injury. Plants were kept under irrigation condition at field capacity (FC) or irrigated at 50% of the FC. The injury was made by cutting the stem at ground level at 25 days after transplanting. To evaluate the effect of the irrigation conditions, the relative water content (RWC) was determined in leaves. The experimental design was completely randomized with eight treatments and six replicates and was repeated once. Bacterial populations in plants were quantified by real time PCR immediately before and 75 days after the application of stresses. Measurements of RWC analysis confirmed the occurrence of water stress in plants subjected to the 50% FC treatment. For the variety CB 49-260, RWC values decreased in the treatment irrigated at 50% of FC, combined or not with mechanical injury in both trials. For the variety RB83 5486, RWC reduction was observed in plants irrigated at 50% of FC in combination with mechanical injury in the first assay, and in the treatment consisting of only irrigation at 50% of FC, in the second assay. For the variety CB 49-260, in both trials, there was an increase in bacterial population in plants irrigated at 50% of FC in relation to irrigated treatments at FC. However, in the first trial, there was also a significant increase in bacterial population in plants irrigated at FC with combination of mechanical injury. For the variety RB 83 5486, however, no significant differences ($p > 0.05$) in bacterial population was observed among treatments. Moreover, in this variety the population of Lxx was lower compared to CB 49-260 in all treatments in both trials, except for the control (irrigated at FC with no cutting), which showed no significant differences between the bacterial population. In this study, it was shown that the stresses, especially water stress, resulted in an increase of Lxx titers *in planta*, however, the effects were depended on the variety.

Keywords: Ratoon stunting disease; Sugarcane; Relative water content: Real time PCR

2.1 Introdução

O Brasil, além de ser o maior produtor de cana-de-açúcar, ainda está expandindo rapidamente sua área canavieira. Entre as safras de 2006/2007 e 2011/2012 houve um aumento em área plantada de mais dois milhões de hectares que refletiu em aumento de aproximadamente 100 milhões de toneladas na produção. Contudo, houve uma queda de produtividade de quase 11,4%, devido principalmente ao período de seca verificado nas regiões Sudeste e Centro-Oeste entre abril e outubro de 2010 (CONAB 2012). Apesar de o clima seco estar atrelado à queda de produtividade, outros fatores, como os fitossanitários, devem ser ressaltados, dado que a severidade de muitas doenças é agravada pela escassez de água, a exemplo do raquitismo das soqueiras da cana (GILLASPIE; TEAKLE, 1989).

O raquitismo das soqueiras (RSD), causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, é uma das principais doenças da cana-de-açúcar. Os sintomas incluem porte reduzido da planta em consequência do encurtamento dos colmos, que se tornam mais evidentes sob condições

de déficit hídrico (BAILEY; BECHET, 1995; HOY et al., 1999). Contudo, esses não são sintomas característicos, fato que resulta na dificuldade de diagnose da doença. Sendo assim, o RSD só pode ser seguramente diagnosticado pela detecção da Lxx (SANGUINO et al., 1998). Dentre os métodos empregados no diagnóstico estão a microscopia de contraste de fase ou imunofluorescência, testes sorológicos e técnicas moleculares baseadas na reação polimerásica em cadeia- PCR (WORLEY; GILLASPIE JR., 1974; GIGLIOTI et al., 1999; PAN et al., 1998).

A ampla disseminação da bactéria na maioria das áreas cultivadas (STEINDL, 1961; IGLESIA, 2003; GRISHAM, 2004) se deve a dois fatores principais, (i): ausência de sintomas característicos e (ii) transmissão através de cortes no colmo. Em um levantamento realizado no estado de São Paulo entre 2005 e 2007, foi registrada a incidência da bactéria em quase 25% das variedades analisadas através da técnica de imunoensaio por “dot blot”, sendo que nas três safras a Lxx foi encontrada em mais da metade do total das variedades analisadas, incluindo algumas das variedades amplamente empregadas no Estado, como RB86 7515, SP 80-3280 e RB83 5054, (RIDESA, 2012; URASHIMA et al., 2010).

A forma mais eficiente de controle do RSD é por meio do uso de variedades resistentes. No entanto, devido à difícil tarefa de selecionar genótipos resistentes em função da dificuldade no diagnóstico rápido da doença, o principal método de controle passou a ser o tratamento térmico de toletes ou gemas (termoterapia) (COOPERATIVA DOS PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1989; DAMANN JR; BENDA, 1983; GRISHAM, 2004). Esta prática, porém, nem sempre elimina a bactéria, além de reduzir o poder de germinação das gemas devido ao estresse térmico (GRISHAM et al., 2007; URASHIMA; GRACHET, 2012). Além disso, existem relatos da ocorrência de escapes que podem servir como fonte de inóculo, tanto no viveiro como no campo (BENDA, 1994).

O patógeno, depois de instalado no campo, pode ocasionar perdas significativas, principalmente se as plantas estiverem sob estresse hídrico (GILLASPIE; TEAKLE, 1989; REIS; MARIANO, 1994), podendo resultar em redução de tamanho e produção de colmos (ROSSLER, 1974) e perdas em biomassa entre 31 e 50% em variedades suscetíveis e não tolerantes ao RSD (GILLASPIE; TEAKLE, 1989). Contudo, ressalta-se que o déficit hídrico não é único fator responsável pela severidade do RSD. Alguns estudos também apontam que os sintomas são mais evidentes a partir de injúrias mecânicas, decorrentes do corte dos colmos (GRISHAM, 1991). Em uma avaliação de produção em plantas com RSD e sob déficit

hídrico, observou-se uma maior redução da produção em cana soca quando comparado à cana planta (ROSSLER, 1974).

Apesar das evidências que relacionam a severidade do RSD com as condições de estresse hídrico e injúria mecânica, ainda não há trabalhos que indiquem se estes fatores agem somente no hospedeiro ou se também agem no patógeno, favorecendo sua multiplicação. Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar, por PCR quantitativo, o impacto do déficit hídrico e da injúria mecânica na cinética populacional *in planta* de Lxx em duas variedades de cana. Os resultados indicaram que os estresses impostos às plantas, sobretudo o déficit hídrico, levaram ao aumento do título de Lxx *in planta*, contudo os efeitos foram dependentes da variedade. Desta forma, este trabalho representou uma etapa inicial em estudos complementares sobre a interação entre a Lxx e a cana-de-açúcar, além disso, permitiu elaborar estratégias de controle do RSD através do manejo do cultivo de variedades em determinadas áreas de plantio.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material vegetal

Foram utilizados colmos das variedades CB 49-260 e RB83 5486, naturalmente infectadas por Lxx. O material da primeira variedade foi coletado em dois campos experimentais localizados em Campinas e São Carlos e foram utilizados, respectivamente, no primeiro e segundo ensaios descritos abaixo. Já colmos da segunda variedade foram provenientes de um único campo experimental localizado em Piracicaba.

2.2.2 Desenho experimental e indução de déficit hídrico

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente ao acaso e consistiu de oito tratamentos repetidos seis vezes, compreendendo duas variedades e dois regimes de irrigação (com e sem déficit hídrico), combinados com injúria mecânica na planta ou não. A unidade experimental consistiu de um vaso com uma planta. O experimento foi repetido uma vez. Os colmos foram cortados em toletes de única gema e cultivados, sem prévio tratamento por termoterapia, em vasos com capacidade de 0,2 litros, utilizando substrato comercial Basaplant[®] (Base- Soluções em Substratos, Holambra, São Paulo, Brasil). Vinte dias após o plantio, as mudas foram transferidas para vasos de 22 litros contendo uma mistura de solo autoclavado (composto por solo de sub-solo, esterco bovino e areia na

proporção 2:2:1) e substrato Basaplant na proporção de 2:1 (Figura 1A e 1B). Os vasos foram adubados com 20 gramas de uma mistura de N-P-K (4-14-8).

Os regimes de irrigação foram iniciados 25 dias após o transplantio e persistiram por mais 75 dias. Os regimes foram determinados com base na medição da capacidade de campo por meio do método da pesagem de vasos. Para tal, a tensão assumida para que a mistura solo e substrato estivesse na capacidade de campo foi de 0,1 bar (EMBRAPA, 1997; BERNARDO et al., 2008). A umidade natural da mistura (solo e substrato) foi determinada através do método gravimétrico padrão de secagem em estufa (BERNARDO et al., 2008) e resultou em 15% de umidade. Concomitantemente, os vasos foram preenchidos com a mistura de forma que o peso de todos os vasos estivesse padronizado. Após o preenchimento com solo e substrato, os vasos foram mantidos em casa de vegetação por 15 dias a fim de a água presente devido a umidade natural evaporasse. Assumindo que a evaporação foi uniforme em todos os vasos, subtraiu-se 15% do peso inicial dos vasos que corresponde ao peso da água proveniente da umidade natural da mistura. Em seguida, os vasos destinados aos tratamentos irrigados à CC foram irrigados com um volume (V) de água até que o substrato alcançasse a tensão de 0,1 bar, que corresponde a 100% da CC (EMBRAPA, 1997; BERNARDO et al., 2008) medida através de tensiômetros de punção (Sonda Terra, Piracicaba –SP/Brasil) (Figura 1C). Desta forma, foi determinado o peso dos vasos quando irrigados na capacidade de campo. Para estabelecer os tratamentos com irrigação a 50% da CC, os vasos foram irrigados com metade do volume (0,5V) utilizado para manter os vasos em sua CC. Em seguida, os vasos foram pesados, para determinar o peso ideal para mantê-los sob irrigação a 50% da CC. Os tensiômetros permaneceram instalados nos vasos dos tratamentos de irrigação a 100% CC, a fim de efetuar leituras diárias de tensão da água, com tensímetro digital (Soil Control®- Instrumentos de medição e pesquisa científica, São Paulo, SP-Brasil) (Figura 2A) e desta maneira assegurar que os tratamentos irrigados à CC estivessem a uma tensão de 0,1 bar durante todo o ensaio. À medida que as plantas se desenvolveram, os pesos dos vasos foram ajustados e consequentemente o volume da água de irrigação, a fim de manter os regimes de irrigação à CC (0,1 Bar) e a 50% da CC.

A injúria mecânica foi imposta através de um corte no colmo, feito 5 centímetros acima do solo com o auxílio de uma lâmina estéril. Para cada colmo cortado foi utilizada uma lâmina individual (Figura 2B). O início desse tratamento também se deu aos 25 dias após o transplantio das mudas para vasos de 22L.

2.2.3 Coleta das amostras

Imediatamente antes do início dos regimes de irrigação, que correspondeu a 25 dias após o transplântio, folhas + 1 (*Kuijper*) (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008) foram coletadas de cada planta para quantificar Lxx por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), a fim de confirmar a presença da bactéria em todas as plantas. Este tempo de coleta foi denominado tempo zero (0 dia após estresse - DAE). A segunda coleta foi realizada seguindo o mesmo procedimento da primeira e ocorreu aos 75 dias após o início da aplicação dos tratamentos (75 DAE). O material desta segunda coleta, além de usado para quantificação da bactéria, também foi utilizado para determinação do conteúdo relativo de água (CRA), conforme descrito a seguir.

Figura 1- Etapas do processo de obtenção e estabelecimento das mudas e instalação do tensiômetro. (A): Mudas de cana plantadas em vasos de 0,2 litros; (B): Transplante das mudas para vasos de 22 litros após 20 dias do plantio das gemas; (C): Instalação dos tensiômetros nos vasos

Figura 2 – Aplicação dos tratamentos de estresses aos 25 dias após o transplântio. (A): Verificação da tensão da água para iniciar a imposição dos regimes hídricos. (B): Injúria mecânica imposta através do corte do colmo 5 cm acima do solo

2.2.4 Determinação do Conteúdo Relativo de Água (CRA)

O conteúdo relativo de água na folha (CRA) foi determinado seguindo o protocolo descrito por Barrs e Weatherley (1962). As análises foram realizadas com o objetivo de verificar se o regime de irrigação a 50% da CC resultou em déficit hídrico na planta. As folhas +1 das seis plantas (repetições) de cada tratamento, totalizando 48 amostras, foram coletadas no período entre 12:00 e 14:00 horas, acondicionadas em caixa de isopor com gelo e levadas ao laboratório. Uma porção de 7 cm² de folha de cada amostra foi cortada e reservada para essa avaliação e o restante foi destinado às análises de quantificação da Lxx. O corte foi feito na parte mediana da folha no sentido da nervura central para a borda. Em seguida, as amostras foram pesadas, a fim de obter seu peso fresco (PF). Após, as amostras foram acondicionadas em frascos do tipo erlenmeyer contendo água deionizada por 4 horas a temperatura ambiente, para alcançarem o estado túrgido. O nível da água nos frascos foi de 2 cm de altura e eles permaneceram fechados com filme plástico durante o período de hidratação das folhas. Passado esse tempo, as amostras foram retiradas do recipiente, o excesso de água foi removido com o auxílio de um papel de filtro e em seguida foram pesadas a fim de determinar seu peso túrgido (PT). As amostras então foram acondicionadas em placas de Petri e levadas para estufa (ar seco) a 80°C por 24 horas. Após, as amostras foliares foram novamente pesadas e obteve-se o peso seco (PS). Os valores obtidos do peso fresco, túrgido e seco de cada amostra foram utilizados para determinar o conteúdo relativo de água na folha, através da seguinte fórmula (BARRS; WEATHERLEY, 1962).

$$\text{CRA (\%)} = [(PF - PS) / (PT - PS)] \times 100 \quad (1)$$

2.2.5 Quantificação de Lxx em tecido foliar por meio de PCR quantitativo

A extração de DNA das plantas seguiu o protocolo proposto por Pospiech e Neuman (1995) modificado pela adição de uma etapa de lavagem com CTAB (brometo do hexadecyl-trimethyl-ammonium) conforme Ausubel et al. (1987). Amostras de 100 mg de tecido vegetal fresco, previamente maceradas em nitrogênio líquido, foram lavadas duas vezes em 500 µL de solução de NaCl 1M, preparada em tampão T₁₀E₁₀ (10mM Tris/10mM EDTA – pH 8). Após centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado. O tecido vegetal foi ressuspensionado em 337,5 µL de solução SET (NaCl 75 mM, EDTA 25mM, Tris-base 20 mM – pH 7,5), acrescida de 1 mg/mL de lisozima e incubado por 2 horas. Foram

adicionados 35 µL de SDS 10% acrescido de 0,5 mg/mL de proteinase K e a solução foi novamente incubada por 2 horas. Após, adicionou-se 125 µL de NaCl 5M e 375 µL de clorofórmio e o conteúdo foi incubado a temperatura ambiente por 30 minutos, seguido por centrifugação a 5.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido em tubo de 1,5 mL contendo 375 µL de isopropanol gelado. Essa mistura foi incubada a -8°C por 12 horas e o DNA recuperado por centrifugação a 10.000 rpm por 20 minutos. Os precipitados foram secos em estufa a 37°C por aproximadamente 30 minutos e ressuspensos em 200 µL de T₁₀E₁₀ (sem *RNAse*). O DNA foi purificado pela adição de 100µL de NaCl 5M e 80µL de CTAB 10%, preparado em NaCl 1M. O conteúdo foi misturado lentamente por inversão e aquecido por 10 minutos a 65°C, seguido de adição de 600 µL de clorofórmio e centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido em um novo tubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol gelado. A mistura foi incubada por 2 horas a -20°C e o DNA recuperado por nova centrifugação. Os precipitados foram lavados duas vezes em 500 µL de solução de etanol 70% e após secagem em estufa foram ressuspensos em 40 µL de água Milli Q autoclavada acrescida de 10 µg/mL de *RNAse*. Amostras do DNA foram visualizadas através de eletroforese em gel de agarose 2% e quantificadas em espectrofotômetro (nanodrop 1000 Thermo Scientific, Wilmington, USA).

O DNA vegetal foi utilizado para quantificar a bactéria por meio de PCR quantitativo (qPCR), usando o par de iniciadores Lxx12950F1 (5'-GCACATCGATCTGGAAAAAAGG-3') e Lxx12950R1 (5'-CCGCAGTCTCACGCATACC-3'), segundo condições descritas por Carvalho (2012). As reações foram realizadas em termociclador 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) com o kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA- US). Cada reação foi composta por 100 ng de DNA vegetal, 12,5 µL de SuperMix (1X), 0,5 µL de cada iniciadores (0,2 µM), 0,5 µL de ROX (50nM de uma solução referência interna de fluorescência) e 9 µL de água, totalizando um volume final de 25 µL. O programa de amplificação constou de um ciclo de remoção de resíduos de uracila a 50 °C por 2 minutos e de um ciclo à 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos à 95°C por 10 segundos e 60°C por 30 segundos. Foram realizadas quatro réplicas técnicas para cada amostra.

2.2.6 Curva de Diluição Padrão de DNA de Lxx

A determinação da curva de diluição de DNA de Lxx foi realizada com o objetivo de relacionar os valores de Ct (*Threshold Cycle*) das reações de qPCR com diferentes

concentrações de DNA puro de Lxx, o que permite estimar a concentração de DNA de Lxx presente nas amostras de DNA de folhas de cana-de-açúcar infectadas com a bactéria. Para tanto, a reação de qPCR foi feita da mesma forma conforme o item 2.2.6, incluindo o par de iniciadores Lxx12950F1 e Lxx12950R1 e 2 µL de cada diluição de DNA. Na construção da curva padrão de diluição de DNA de Lxx, as concentrações utilizadas de DNA da bactéria foram 1ng/µL, 1×10^{-1} ng/µL, 1×10^{-2} ng/µL, 1×10^{-3} ng/µL e 1×10^{-4} ng/µL. As reações foram realizadas em duplicata.

2.2.7 Análises estatísticas

As análises de variância (ANOVA) foram realizadas no programa SAS versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, USA). Os resultados avaliados referem-se ao logaritmo da variação (Δ_{Lxx}) da concentração de DNA de Lxx nos tecidos vegetais entre os tempos zero (0DAE) e 1 (75DAE). O cálculo do Δ_{Lxx} foi necessário devido as diferentes concentrações iniciais de DNA de Lxx entre as amostras no tempo zero (0DAE). Desta forma, para cada amostra, o Δ_{Lxx} foi calculado seguindo a equação (2):

$$\Delta_{Lxx} = (75DAE+1)-(0DAE+1)/(0DAE+1) \quad (2)$$

As médias resultantes da variação (Δ_{Lxx}) da concentração de DNA de Lxx foram comparadas entre os tratamentos e entre as variedades, pelo teste de Tukey (0,05).

Para o conteúdo relativo de água (CRA) as análises foram efetuadas no programa R (versão 2.15) e os dados analisados em números decimais. O CRA não foi analisado no tempo zero (zero DAE). As médias dos valores de CRA foram comparadas entre os tratamentos e entre as variedades, pelo teste de Tukey (0,05).

2.3 Resultados

2.3.1 Avaliação do conteúdo relativo de água (CRA) nas folhas e do desenvolvimento das plantas

Apesar dos dados terem sido transformados em números decimais para a análise de variância (ANOVA), os resultados estão apresentados em valores originais (porcentagem) (Tabela 1). Os valores de CRA das variedades foram analisados em conjunto para cada ensaio, através do programa R (versão 2.15). As análises de variância foram realizadas

separadamente para cada ensaio devido a presença de diferenças significativas no teste de homogeneidade de variâncias (Teste de Bartlett). Os coeficientes de variação do primeiro e segundo ensaio foram de 5,9% e 6,4%, respectivamente.

As análises do conteúdo relativo de água na folha (CRA) confirmaram que os tratamentos com regime de irrigação a 50% da capacidade de campo (CC) resultaram em déficit de água nas plantas. Na variedade CB 49-260, o CRA dos tratamentos irrigados à CC foi significativamente ($p > 0,05$) superior ao dos tratamentos irrigados a 50% da CC em ambos os ensaios (Tabela 1). Na variedade RB83 5486, no primeiro ensaio, o CRA dos tratamentos irrigados à CC foi significativamente ($p > 0,05$) superior apenas ao CRA do tratamento irrigado a 50% da CC com injúria mecânica. Já no segundo ensaio, o CRA dos tratamentos irrigados à CC desta variedade foi significativamente superior ($p > 0,05$) apenas ao tratamento irrigado a 50% da CC sem injúria mecânica. Por outro lado, não houve diferenças significativas nos valores de CRA entre os tratamentos irrigados à CC com ou sem injúria mecânica, dentro de cada variedade e entre as variedades, em ambos os ensaios. Também não foram observadas diferenças nos valores de CRA entre variedades dentro de tratamentos em ambos os ensaios (Tabela 1).

Tabela 1- Conteúdo Relativo de Água (CRA em porcentagem) em folhas de plantas de cana-de-açúcar irrigadas à CC ou a 50% da CC e expostas a injúria mecânica por corte ou não

Variedade	Tratamentos	CRA(%)	
		1º Ensaio	2º Ensaio
CB 49-260	Irigado à CC (T1)	94,95 a	97,49 a
	Irigado à CC + IM(T2)	92,24 a	99,22 a
	Irigado a 50% CC (T3)	79,35 d	80,45 c
	Irigado a 50% CC + IM (T4)	84,34 cd	86,84 bc
RB83 5486	Irigado à CC (T1)	91,17 ab	92,77 ab
	Irigado à CC + IM (T2)	90,20 abc	97,56 a
	Irigado a 50% CC (T3)	84,93 bcd	78,04 c
	Irigado a 50% CC + IM (T4)	79,45 d	85,33 bc
		CV(%): 5,6	CV(%): 6,4

Médias seguidas por letras iguais na coluna, não diferem entre os tratamentos e entre as variedades em cada ensaio, pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

IM: Injúria mecânica provocada por corte

Visualmente, plantas dos tratamentos irrigados a 50% da CC apresentaram desenvolvimento reduzido em comparação às plantas dos tratamentos irrigados à CC em ambas as variedades, nos dois ensaios (Figura 3). Além disso, houve diminuição da área foliar e perfilhamento, ao passo que nos tratamentos com irrigação à CC, as plantas permaneceram mais vigorosas e sem alteração da cor (Figura3).

Figura 3 - Aspecto morfológico das plantas, 75 dias após serem submetidas aos tratamentos de estresses (75 DAE): irrigado à CC ou irrigados a 50% da CC, combinados ou não com injúria mecânica. A e C: variedade CB 49-260 e B e D: variedade RB83 5486. A e B: 1º Ensaio; C e D: 2º Ensaio. (T1): Plantas irrigadas a capacidade de campo; (T2): Plantas irrigadas à CC e submetidas a injúria mecânica; (T3): plantas irrigadas a 50% da CC e (T4): plantas irrigadas a 50% da CC e submetidas a injúria mecânica

2.3.2 Curva padrão de Lxx

A relação entre diferentes concentrações de DNA de Lxx com valores de C_t foi altamente significativa ($R^2=0,9962$) e foi expressa pela equação (3):

$$y = -3,757x + 19,655$$

Onde y representa os valores de C_t e x os valores do logaritmo da concentração de DNA (ng/ μ L) da Lxx.

Figura 4- Curvas de amplificação (A) e de Dissociação (B) de reações de qPCR utilizando DNA de Lxx puro em várias concentrações. Cada concentração foi testada em duplicata

Figura 5- Correlação entre concentrações conhecidas de DNA de Lxx (1ng/ μ L; 1x10⁻¹ng/ μ L; 1x10⁻² ng/ μ L; 1x10⁻³ ng/ μ L e 1x10⁻⁴ ng/ μ L) e valores dos C_t s correspondentes. As reações de qPCR foram realizadas em duplicata para cada concentração de DNA de Lxx

2.3.3 Quantificação de Lxx em tecido foliar

Em função de haver diferenças significativas em relação a homogeneidade de variâncias entre os ensaios segundo teste de Cochran & Bartlett, optou-se por realizar a análise de variância separadamente. A partir das análises dos valores de C_t obtidos nas reações de qPCR dos materiais vegetais e com o auxílio da curva padrão de diluição do DNA de Lxx (Figura 5), a concentração de DNA bacteriano foi estimada em cada amostra para cada tempo (0DAE e 75DAE) nos dois ensaios.

Devido à elevada amplitude dos valores dificultar a interpretação dos resultados, os valores da variação (Δ_{Lxx}) da concentração de DNA foram transformados em logaritmo (Log). Como esta transformação resultou em valores negativos, somou-se uma constante ($K=5$) aos valores a fim de facilitar a apresentação dos resultados. Os resultados foram comparados entre tratamentos dentro de cada variedade e entre variedades dentro de cada tratamento pelo teste de Tukey (0,05).

Tabela 2- Variação (Δ_{Lxx}) da concentração de DNA (ng/ μ L) de Lxx presente no tecido vegetal entre os tempos 0 (0DAE) e 1 (75 DAE) calculada no ensaio 1

Variedade	Tratamentos	Concentração DNA (ng/ μ L)	Variedade	Tratamentos	Concentração DNA (ng/ μ L)
CB 49 260	Irr. à CC	$0,04 \times 10^{-2}$ aA	RB 83 5486	Irr. à CC	$0,04 \times 10^{-2}$ aA
	Irr. à CC +IM	$0,6 \times 10^{-2}$ bB		Irr. à CC +IM	$0,09 \times 10^{-2}$ aA
	Irr. 50% CC	$3,9 \times 10^{-2}$ cB		Irr. 50% CC	$0,05 \times 10^{-2}$ aA
	Irr. 50% CC+ IM	$2,8 \times 10^{-2}$ cB		Irr. 50% CC+ IM	$0,05 \times 10^{-2}$ aA

Letras minúsculas representam as diferenças entre os tratamentos na coluna e as letras maiúsculas, representam as diferenças entre as variedades nas linhas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

IM: Injúria Mecânica provocada por corte

Tabela 3- Variação (Δ_{Lxx}) da concentração do DNA (ng/ μ L) de Lxx presente no tecido vegetal entre os tempos 0 (0DAE) e 1 (75 DAE) calculada no ensaio 2

Variedade	Tratamentos	Concentração DNA (ng/ μ L)	Variedade	Tratamentos	Concentração DNA (ng/ μ L)
CB 49 260	Irr. à CC	$0,08 \times 10^{-1}$ aA	RB 83 5486	Irr. à CC	$0,04 \times 10^{-1}$ aA
	Irr. à CC +IM	$0,2 \times 10^{-1}$ aB		Irr. à CC +IM	$0,05 \times 10^{-1}$ aA
	Irr. 50% CC	$2,6 \times 10^{-1}$ bB		Irr. 50% CC	$0,013 \times 10^{-1}$ aA
	Irr. 50% CC+ IM	$1,7 \times 10^{-1}$ bB		Irr. 50% CC+ IM	$0,0006 \times 10^{-1}$ aA

Letras minúsculas representam as diferenças entre os tratamentos na coluna e as letras maiúsculas, representam as diferenças entre as variedades nas linhas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

IM: Injúria Mecânica provocada por corte

No primeiro ensaio, para plantas da variedade CB 49-260 irrigadas a 50% da CC (com e sem injúria mecânica) foi detectado maior título bacteriano ($p < 0,05$), em relação às plantas dos tratamentos com irrigação à CC (Tabela 2; Figura 6) e não houve diferenças significativas entre os tratamentos irrigados a 50% da CC (Figura 6). Contudo, a concentração final de DNA de Lxx em plantas expostas a irrigação à CC com injúria mecânica foi significativamente superior à concentração encontrada nas plantas testemunhas (irrigadas à CC sem injúria mecânica). Já no segundo ensaio, houve um aumento da concentração de DNA da Lxx, nesta variedade, somente nos tratamentos irrigados a 50% da CC (combinados ou não com injúria mecânica) (Figura 7; Tabela 3).

Na variedade RB83 5486, nos dois ensaios, a concentração de DNA de Lxx não diferiu significativamente entre os tratamentos (Tabelas 2 e 3; Figuras 6 e 7). Esta variedade também apresentou concentrações de DNA de Lxx inferiores à variedade CB 49-260 para todos os tratamentos, nos dois ensaios, exceto na testemunha (plantas irrigadas à CC sem injúria mecânica), onde não houve diferenças entre as variedades (Figuras 6 e 7; Tabelas 2 e 3).

Em relação ao desenvolvimento das plantas ao final de cada ensaio, na variedade CB 49-260, observou-se uma correlação com o título de Lxx encontrado para cada tratamento. No primeiro ensaio, por exemplo, onde foi encontrado maior título bacteriano em plantas do tratamento irrigado à CC com injúria mecânica (Tabela 2), também foi observada redução do crescimento quando tais plantas foram comparadas à testemunha (irrigação à CC sem injúria mecânica) (Figura 3A). Interessante foi que no segundo ensaio, onde não houve diferenças nas concentrações de DNA de Lxx entre esses dois tratamentos, o crescimento das plantas foi similar (Figura 3C; Tabela 2). Na variedade RB83 5486, apesar das diferenças morfológicas entre os tratamentos nos dois ensaios (Figuras 3B e 3D), não foi possível correlacionar o crescimento das plantas com a concentração de DNA de Lxx (Tabelas 2 e 3; Figuras 6 e 7). Destes resultados infere-se que o incremento no título de Lxx *in planta* está relacionado não só à ocorrência de déficit hídrico na planta, mas também as características da variedade em relação a resistência/suscetibilidade à bactéria e ao estresse hídrico.

Figura 6- **1º Ensaio** - Log da variação (Δ_{Lxx}) da concentração de DNA de Lxx (ng/ μ L) em plantas das variedades CB 49-260 e RB83 5486 nos tempos zero (0 dias após estresse - DAE) e 1 (75 dias após estresses - DAE). As letras minúsculas representam comparações de médias entre os tratamentos na mesma variedade e as letras maiúsculas comparações de médias entre variedades para cada tratamento pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Irr: Plantas irrigadas à capacidade de campo (T1); Irr/IM: Plantas irrigadas à CC e submetidas a um corte no colmo rente ao solo (T2); DH: plantas irrigadas a 50% da CC (T3) e DH/IM: plantas irrigadas a 50% da CC e submetidas a um corte no colmo rente ao (T4)

Figura 7- **2º Ensaio** - Log da variação (Δ_{Lxx}) da concentração de DNA de Lxx (ng/ μ L) em plantas das variedades CB 49-260 e RB83 5486 nos tempos zero (0 dias após estresse - DAE) e 1 (75 dias após estresses - DAE). As letras minúsculas representam comparações de médias entre os tratamentos na mesma variedade e as letras maiúsculas comparações de médias entre variedades para cada tratamento pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Irr: Plantas irrigadas à capacidade de campo (T1); Irr/IM: Plantas irrigadas à CC e submetidas a um corte no colmo rente ao solo (T2); DH: plantas irrigadas a 50% da CC (T3) e DH/IM: plantas irrigadas a 50% da CC e submetidas a um corte no colmo rente ao (T4)

2.4 Discussão

Os efeitos do déficit hídrico sobre a predisposição de plantas a doenças são amplamente relatados em diferentes patossistemas, indo daqueles em que participam patógenos fúngicos causadores de podridão de raízes e de colmos, àqueles que envolvem bactérias patogênicas foliares e restritas aos vasos do xilema (BOYER, 1995; BEATTIE, 2011). *Fusarium roseum* f. sp. *cerealis*, por exemplo, causa significativa podridão em raízes de trigo apenas quando as plantas estão sob déficit hídrico (COOK, 1973). Em plantas de videira submetidas a estresse hídrico, foi verificado que apenas o fato dos vasos serem obstruídos pela colonização de *X. fastidiosa* pode ser suficiente para induzir os sintomas da doença de Pierce, ao passo que, em plantas bem irrigadas foi sugerido haver a necessidade de mecanismos adicionais para que ocorra a indução de sintomas desta doença (CHOAT et al., 2009). Inúmeras são as mudanças que ocorrem no hospedeiro sob condições de déficit hídrico (BOYER, 1995), sendo que uma das primeiras é a redução do crescimento do hospedeiro (WESTGATE; BOYER, 1985). Apesar destas evidências, relacionar o estresse hídrico com a ocorrência de determinadas doenças ou o aumento da sua severidade não é uma tarefa fácil, uma vez que a resposta da planta ao estresse varia em relação ao estágio fenológico em que o estresse foi aplicado, tempo de exposição ao estresse e características genéticas em nível de variedade (MEDICE et al., 2003; SCHMITZ et al., 2009; PRABU et al., 2011).

No presente trabalho, a ocorrência de déficit hídrico nas plantas expostas a irrigação a 50% da CC foi confirmada através da análise do CRA. No entanto, as diferenças no valor do CRA entre os tratamentos não foi tão evidente quando comparada a outros trabalhos, onde os valores de CRA em plantas de cana submetidas ao déficit hídrico foram de até 40% (PRABU et al., 2011; ISKANDAR et al., 2011). Contudo, nesses trabalhos, o déficit hídrico foi imposto pela ausência total de irrigação por um determinado período, diferente do método empregado no presente estudo, que consistiu na manutenção da quantidade de água no solo em valores que correspondem a 50% da CC por meio de gravimetria. Além disso, esses valores de CRA podem variar dependendo da cultura, do estágio fenológico da planta e das características da própria variedade. Em milho, por exemplo, o CRA apresentado após nove dias consecutivos de déficit hídrico chega a 79% durante o estágio vegetativo e a 67,1% durante o estágio reprodutivo (MEDICE et al., 2003). No presente estudo as avaliações foram realizadas por quatro meses, ou seja, no período em que as plantas estavam na fase de alongamento do colmo (GASCHO; SHIH, 1983).

Outra dificuldade encontrada para relacionar déficit hídrico e suscetibilidade do hospedeiro à doenças, está no método de avaliação da colonização do hospedeiro. No patossistema Lxx e cana-de-açúcar, onde a diagnose da doença é feita pela detecção da bactéria (SANGUINO et al., 1998), técnicas moleculares, como o PCR em tempo real (qPCR), representam importantes ferramentas para estudos mais detalhados, possibilitando relacionar o efeito do déficit hídrico sobre a doença através da quantificação do título bacteriano na planta (GRISHAM et al., 2007; CARVALHO, 2012) e não apenas por sintomas (ROSSLER, 1974) ou perdas (GILLASPIE; TEAKLE, 1989; BAILEY; BECHET, 1995). Desta forma, o uso de qPCR para as quantificações da bactéria *in planta* neste trabalho permitiu a obtenção de informações mais precisas.

As análises da variedade CB 49-260, classificada como padrão de suscetibilidade ao RSD (MATSUOKA, 1980; GAGLIARDI; CAMARGO, 2009), demonstraram a ocorrência de diferenças significativas no incremento do título da Lxx em plantas submetidas aos estresses, sobretudo o de déficit hídrico, quando comparadas as planta testemunhas nos dois ensaios. Nesse sentido, considerando que o título de Lxx presente na cana está diretamente relacionado às perdas (GIGLIOTTI et al., 1997; DAVIS, 1992) e que um dos principais sintomas do RSD, representado pelo porte reduzido das plantas (BAILEY; BECHET, 1995; HOY et al., 1999), também reflete em perdas, sugere-se que o alto título bacteriano pode contribuir para a maior severidade da doença. Além disso, as consequências decorrentes do alto título de Lxx somado às perdas ocasionadas pelo déficit hídrico em si podem culminar em prejuízos desastrosos na cultura. Na África do Sul, foi observado que os sintomas do raquitismo das soqueiras foram mais evidentes em plantas submetidas a déficit hídrico do que em plantas irrigadas parcialmente e não foi observado sintomas em plantas irrigadas (ROSSLER, 1974). Já Bailey e Bechet (1995), quantificaram, em função da presença de Lxx, uma redução de produtividade (toneladas/ha) de 9% em cana-planta e 16% em cana de primeira soca, ambas irrigadas, ao passo que, em plantas com déficit hídrico, a redução em cana-planta foi de 18%.

Na variedade RB83 5486, por outro lado, o déficit hídrico não resultou no aumento do título de Lxx. Isso pode ser explicado ao menos por dois fatores, os quais podem ter atuado em conjunto e referem-se às características genéticas da variedade, a qual foi classificada como moderadamente suscetível à infecção por Lxx (GAGLIARDI; CAMARGO, 2009) e tolerante ao déficit hídrico (SCHMITZ et al., 2009). Nesse sentido, acredita-se que o tempo em que essa variedade foi exposta ao déficit, atrelada às características genéticas da variedade possa ter desfavorecido o avanço da colonização da bactéria nas plantas. Essa variedade não

apresentou diferenças significativas em produção e diâmetro de colmos quando exposta a condições de sequeiro ou irrigação (MACEDO et al., 2012), evidenciando sua tolerância à restrição hídrica. Além disso, a mesma variedade foi avaliada em condições de campo para a interação entre condições de cultivo em sequeiro e irrigado e altura das plantas. Os resultados mostraram que, apesar da interação positiva, as diferenças de altura foram pouco evidentes entre os tratamentos (MACEDO et al., 2012). Contudo, esses resultados diferiram dos apresentados neste trabalho, onde foi demonstrado que em condições de casa de vegetação, plantas desta variedade sob estresse hídrico apresentaram a altura reduzida, redução da área foliar e de perfilhamento, sintomas característicos de plantas de cana sob déficit hídrico (SHIGAKI et al., 2004; CASAGRANDE; VASCONCELOS, 2008). No entanto, a ausência de diferenças no título de Lxx em plantas dessa variedade sugere que a tolerância ao déficit hídrico pode ter representado um fator de favorecimento nas respostas de defesa do hospedeiro e a característica de moderada suscetibilidade ao RSD possivelmente também contribuiu para impedir o aumento da população de Lxx.

Diante do exposto, sugere-se que, dependendo da variedade, a alta disponibilidade de água ou a tolerância ao estresse hídrico contribuíram para reduzir os títulos de Lxx na planta. Em alguns patossistemas cujos patógenos também são restritos ao xilema, como com a bactéria *Xylella fastidiosa* em videira (MCELRONE, 2001), hera-americana (MCELRONE; FORSETH, 2004), cafeeiro (QUEIROZ-VOLTAN et al., 2004) e citros (MACHADO et al., 2007), foram apontados como principais fatores predisponentes de suscetibilidade, a combinação entre a obstrução dos vasos do xilema e a redução do fluxo de água e nutrientes em decorrência do déficit hídrico. Nesse sentido, foram propostos dois principais mecanismos para explicar como plantas sob estresse hídrico podem se tornar mais suscetíveis aos patógenos: (i) a redução na geração de produtos fotossintéticos causada pela falta de água impossibilita a defesa da planta contra patógenos e/ou (ii) o crescimento da planta é reduzido, porém sem interferir na habilidade de multiplicação do patógeno, levando ao aumento do progresso da doença e da severidade dos sintomas no hospedeiro (BOYER, 1995). No presente estudo, o mecanismo (i) foi demonstrado pelas plantas dos tratamentos irrigados à CC, as quais se apresentaram mais vigorosas e sem alteração de cor, sugerindo que as plantas irrigadas apresentaram maior habilidade em gerar os produtos fotoassimilados. Além disso, na variedade CB 49-260, os menores títulos de Lxx quantificados nas plantas irrigadas a CC em relação às plantas com restrição hídrica, corroboram com a hipótese de que uma irrigação adequada pode auxiliar no sistema de defesa do hospedeiro. Entretanto, os mecanismos propostos por Boyer (1995) não se aplicaram à variedade RB86 5483, dado que apesar dos

efeitos negativos da restrição hídrica no desenvolvimento da planta, não houve diferenças no título de Lxx entre os tratamentos. Essa ausência de correlação ocorreu porque provavelmente o autor não considerou variedades tolerantes ao déficit hídrico em suas observações.

Ainda, a partir de estudos com árvores do gênero *Quercus* e o fungo patogênico *Biscogniauxia mediterrânea*, sugeriu-se que a condição de estresse hídrico sofrida pelo hospedeiro pode levar o patógeno a migrar de uma relação endofítica para uma relação patogênica com seu hospedeiro (DESPREZ-LOUSTAU et al., 2006). Interessante é que a subespécie *Lxc* também apresenta comportamento endofítico na colonização do capim bermuda (*Cynodon dactylon*), seu principal hospedeiro (ZERILLO, et al., 2008). Brumbley e colaboradores (2006) sugeriram que a Lxx comporta-se como uma bactéria endofítica da espécie de cana, *Saccharum spontaneum*. Neste ponto, seria possível considerar que o déficit hídrico, além de influenciar a resposta de defesa da cana, também poderia estimular mecanismos de patogenicidade de Lxx. Essa hipótese foi formulada a partir de evidências de que estes estímulos são percebidos por bactérias através de um complexo sistema sensorial, que modulam sua virulência (ARCHER, 1996). Em *Salmonella*, por exemplo, inúmeros genes são induzidos por estresse provocado pela ausência de fontes de carbono, nitrogênio ou fosfato (ARCHER, 1996).

No que tange a relação entre o estresse provocado por injúria mecânica e o aumento do título da Lxx verificado apenas na variedade CB 49-260 no primeiro ensaio é que se conclui que o déficit hídrico foi o principal fator que levou ao aumento do título bacteriano *in planta*. Apesar disso, considera-se que se mais cortes tivessem sido realizados (simulando maior número de socas), possivelmente o título bacteriano aumentaria, mesmo em plantas irrigadas (ROSSLER, 1974; BAILEY; TOUGHT, 1992), uma vez que já foi demonstrado que o dano do raquitismo (ton/ha) é mais evidente após vários cortes de soca (APONTE; ORDOSGOITII, 1991).

Este trabalho foi o primeiro a relacionar os estresses de déficit hídrico e injúria mecânica com o título de Lxx *in planta*, através da quantificação do título bacteriano em plantas sob esses estresses. Além disso, os resultados complementaram os relatos que abordam o efeito desses estresses no aumento da severidade de sintomas do RSD (ROSSLER, 1974; BAILEY; BECHET, 1995; GRISHAM et al., 1991). Finalmente, considerando que a área destinada ao cultivo de cana está em expansão no Brasil e que algumas dessas áreas exploradas possam sofrer restrição hídrica, como exemplo, a região Nordeste (CONAB, 2012), espera-se que em consequência desse estresse, os danos acarretados pelo RSD sejam altos. Assim, uma forma de mitigar esse problema seria empregar variedades tolerantes ao

déficit hídrico, já que, como sugerido neste estudo, parece haver uma relação entre esta característica e a resistência à colonização por Lxx sob condições de restrição hídrica. Para a avaliação do efeito da injúria mecânica sobre o título de Lxx *in planta* sugere-se que futuros ensaios, sejam realizados em campo e por um período maior, a fim de possibilitar que os colmos sejam submetidos a mais de um corte.

2.5 Conclusões

- 1- Tanto o déficit hídrico como a injúria mecânica resultam num aumento do título da Lxx *in planta*, mas este efeito depende da variedade;
- 2- O incremento do título da Lxx foi menor na variedade RB83 5486 em comparação a CB 49-260, quando as condições de estresses foram impostas por um período de 75 dias;
- 3- A partir dos resultados obtidos foi possível inferir que o RSD tende a ser mais severo em regiões onde há déficit hídrico, uma vez que sob essa condição há a predisposição ao aumento do título de Lxx *in planta*.

Referências

- APONTE, A.; ORDOGOITII, A. Resultados de lãs investigaciones em enfermedades de La caña de azúcar em Venezuela em El período 1986-1989. **Caña de Azúcar**. Caracas, v. 9, p. 53-65, 1991.
- ARCHER, D.L. Preservation microbiology and safety: Evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. **Trends in Food Science & Technology**. Cambridge, v. 3, n. 7, p. 91-95, 1996.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K.. In: **Current protocols in molecular biology**. John Wiley Press, New York, p. 321-233, 1987.
- 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 Aassociation**, Durban, v. 69, p. 74-78. 1995.
- BAILEY, R.A.; TOUGH, S.A. Ratoon stunting disease: survival of *Clavibacter xyli* subsp *xyli*, in field soil and its spread to newly planted sugarcane. **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association**, Durban, n. 6, p. 75-77, 1992.

BARRS, H.D, WEATHERLEY, P.E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. **Australian Journal of Biological Sciences**. Melbourne, v. 15, p. 413-428, 1962.

BEATTIE, G.A. Water relations in the interaction of foliar bacterial pathogens with plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 533-555, 2011.

BENDA, G.T.A. Serial hot-water treatment for sugarcane disease control. In: RAO, G.P.; GILLASPIE JR., A.G.; UPADHYAYA, P.P.; BERGAMIN FILHO, A.; AGNIHOTRI, V.P.; CHEN, C.T. (Ed.). **Current trends in sugarcane pathology**. New Delhi: International Books and Periodicals Supply Service, 1994. p. 297-310.

BERNARDO, S.; SOARES, A.S.; MANTOVANI, E.C. **Manual de irrigação**. 8. ed. Viçosa: Editora UFV, 2008 . 625 p.

BOYER, J.S. Biochemical and biophysical aspects of water deficits and the predisposition to disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 251-274, 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 reposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo das soqueiras**. 2012. 146 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CASAGRANDE, A.A.; VASCONCELOS, A.C.M. de. Fisiologia da parte aérea. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M. de; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p. 57-78.

CHOAT, B.; GAMBETTA, G.A.; WADA, H.; SHACKEL, K.A.; MATTHEWS, M.A. The effects of Pierce’s disease on leaf and petiole hydraulic conductance in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, v. 136, n.9 , p. 384-94. 2009.

COOK, R.J. Influence of low plant and soil water potentials on diseases caused by soilborne fungi. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, p. 451-58, 1973.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar (safra2011/2012)**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2012.

COOPERATIVA DOS PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Binômio tempo x temperatura no controle do raquitismo da soqueira (RSD) da cana-de-açúcar, pelo processo de termoterapia em gemas isoladas**. São Paulo, 1989. 5 p. (Cadernos COPERSUCAR, Série Melhoramento, 25).

DAMANN JR., K.E.; BENDA, G.T.A. Evaluation of commercial heat-treatment methods for control of ratoon stunting disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, p. 966-967, 1983.

DESPREZ-LOUSTAU, M.-L.; MARÇAIS, B.; NAGELEISEN, L.-M.; PIOU, D.; VANNINI, A. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees, **Annals of Forest Science**, Les Ulis, v. 63, p. 595-610. 2006.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisas em Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1997. 212 p.

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, n. 4, p. 1222-1226, 2009.

GASCHO, G.J.; SHIH, S.F. Sugarcane. In: TEARE, I.D.; PEET, M.M. (Ed.). **Crop-water relations**. New York: Wiley-Interscience, 1983. p. 445-479.

GIGLIOTI, E.A.; COMSTOCK, J.C.; DAVIS, M.J.; MATSUOKA, S.; TOKESHI, H. Aplicação do tissue blot imunoassay e do método de coloração dos vasos do xilema por transpiração para avaliação da colonização de colmos de cana-de-açúcar por *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* e de seu efeito na funcionalidade do xilema. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 25, n. 2, p. 125-123, 1999.

GILLASPIE, A.G.; TEAKLE, D.S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T. JR.; GILLASPIE, A.G.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of sugarcane**. New York: Elsevier Science, 1989. v. 1, p. 59-80.

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

_____. Ratoon stunting disease. In: RAO, G.P.; SAUMTALLY, A.S.; ROTT, P. (Ed.). **Sugarcane pathology: bacterial and nematode diseases**. New York: Science Publishers, 2004. p. 77-96.

GRISHAM, M.P.; PAN, Y.-B.; RICHARD, E.P. JR. Early detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 430-434, 2007.

HOY, J.W.; GRISHAM, M.P.; DAMANN, K.E. Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 1170-1175, 1999.

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.

ISKANDAR, H.M.; CASU, R.E.; FLETCHER, A.T.; SCHMIDT, S.; XU, J.; MACLEAN, D.J.; MANNERS, J.M.; BONNETT, G.D. Identification of drought-response genes and a study of their expression during sucrose accumulation and water deficit in sugarcane culms. **BMC Plant Biology**, Amsterdam, v. 11, p. 12, 2011.

MACÊDO, G.A.R.; COSTA, E.L.; VIANA, M.C.M.; FERREIRA, J.J.; PIRES, J.F.; FREIRE, F.M. Características agronômicas e químicas das variedades de cana-de-açúcar RB83 5486 e RB86 7515 sob irrigação e sequeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, n. 6, p. 599–603, 2012.

MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F.; RIBEIRO, R.V.; MEDINA, C.L.; STUCHI, E.S. ; PAVANI, L.C. Deficiência hídrica agrava os sintomas fisiológicos da clorose variegada dos citros em laranja 'Natal'. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 373-379, 2007.

MATSUOKA, S. Microplots for screening sugarcane varieties for tolerance to ratoon stunting disease. **Proceedings International Society of Sugar Cane Technologists**, Baton Rouge, v. 17, p. 1628-1638, 1980.

McELRONE, A.J.; FORSETH, I.N. Photosynthetic response of a temperate liana to *Xylella fastidiosa* infection and water stress. **Journal of Phytopathology**. Berlin, v. 152, p. 9-20, 2004.

McELRONE, A.J.; SHERALD, J.L.; FORSETH, I.N. Effects of water stress on symptomatology and growth of *Parthenocissus quinquefolia* infected by *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 1160-1164, 2001.

MCELRONE, A.J.; SHERALD, J.L.; FORSETH, I.N. Interactive effects of water stress and xylem-limited bacterial infection on the water relations of a host vine. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 381, p. 419-430, 2003.

MEDICE, L.O.; MACHADO, A.T.; AZEVEDO, R.A.; PIMENTEL, C. Glutamine synthetase activity, relative water content and water potential in maize submitted to drought. **Biologia Plantarum**. Praha, v. 47, n. 2, p. 301-304, 2003.

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

POSPIECH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. **Trends in Genetics**. London, v. 11, n. 6, p. 217-218, 1995.

PRABU, G.; KAWAR, P.G.; PAGARIYA, M.C.; PRASAD, D.T. Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 29, p. 291–304, 2011.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; CABRAL, L.P.; PARADELA-FILHO, O. Comparações sazonais do efeito da *Xylella fastidiosa* em cultivares de cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 3, p. 381-393, 2004.

REIS, A.; MARIANO, R. O gênero *Clavibacter* no Brasil. **Summa Phytopathologica**. Jaguariuna, v. 20, p. 83-88, 1994.

REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTICO. Disponível em:

<<http://www.ridesa.com.br/ckfinder/userfiles/files/Revista%20Censo%20Varietal%202011.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2012.

ROSSLER, L.A. The effects of ratoon stunting disease on three sugarcane varieties under different irrigation regimes. **Proceedings International Society Sugar-cane Technologists**, Baton Rouge, v.15. p. 483-496, 1974.

SANGUINO, A. Situação atual da pesquisa em doenças da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 24, n. 1, p. 90-91, 1998.

SCARPARI, M.S.; BEAUCLAIR, E.G.F. Anatomia e botânica. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p. 45-56.

SCHMITZ, G.A.F.; BOLONHEZI, A.C.; SOUZA, W.C.R.; TEIXEIRA, E.B.; MARRETTE, M.E. Desenvolvimento de soqueira de variedades de cana-de-açúcar em solo originalmente coberto por cerrado. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA UNESP, 21., 2009, São José do Rio Preto. **Resumo expandido - Anais 2009**. p. 5456-5459.

SHIGAKI, F.; FREITAS, N.; BERTO, A.; CEDDIA, M.B.; ZONTA, E.; LIMA, E. Influência do estresse hídrico nos parâmetros de crescimento, acúmulo de N e produtividade de diferentes variedades de cana-de-açúcar em Miracema – RJ. **Revista Universidade Rural**. Série Ciências da Vida, Seropédica, v. 24, n. 1, p. 63-71, 2004.

STEINDL, D.R.L. Ratoon stunting disease. In: MARTIN, J.P.; ABBOT, E.V.; HUGES, C.G. (Ed.). **Sugarcane disease of the world**. Amsterdam 1961. v. 1, p. 433-459.

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, p. 54-57, 2012.

URASHIMA, A.S.; GANEM- JÚNIOR E.J.; MARCHETTI, L.B.L.; GAGLIARDI, P.R. Incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em variedades de cana-de-açúcar a serem empregados para multiplicação no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 36, n. 4, p. 322-328, 2010.

WESTGATE, M.E.; BOYER, J.S. Carbohydrate reserves and reproductive development at low water potentials in maize. **Crop Science**. Madison, v. 25, p. 762-769, 1985.

WORLEY, J.F.; GILLASPIE JR., A.J. Electron microscopy in situ of the bacterium associated with ratoon stunting disease in sungrass. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, p. 287-295, 1975.

ZERILLO, M.M.; SLUYS, M-A.V.; CAMARGO, L.E.A.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B. Characterization of new IS elements and studies of their dispersion in two subspecies of *Leifsonia xyli*. **BMC Microbiology**. London, v. 8, p. 127, 2008.

3 DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Leifsonia xyli subsp. xyli* É MODULADO POR COMPOSTOS DO FLUIDO VASCULAR DE CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

A presença de um elevado número de pseudogenes no genoma de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx) pode estar associada ao seu crescimento fastidioso. Nesse sentido, foi levantada a hipótese de que compostos presentes no fluido vascular da cana-de-açúcar possam favorecer o desenvolvimento da bactéria. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi verificar se a adição de fluido vascular ao meio de cultura exerce algum efeito no desenvolvimento de culturas de Lxx. Para tanto, a bactéria foi cultivada em meio líquido contendo fluido vascular extraído de plantas de uma variedade suscetível ou de uma resistente à Lxx previamente submetidas a termoterapia e posteriormente inoculadas com Lxx ou não. O fluido vascular foi adicionado na concentração final de 15%. Em seguida, uma alíquota (1%) de pré-inóculo da bactéria foi transferida aos meios de cultivo. O tratamento controle consistiu de meio de cultura sem adição de fluido. Em todos os tratamentos os frascos foram incubados a 28°C sob agitação de 130 rpm por 10 dias. O desenvolvimento das culturas foi medido diariamente através de leituras em espectrofotômetro (600nm). Cada tratamento foi repetido três vezes e o ensaio foi repetido uma vez. O maior desenvolvimento de Lxx ocorreu no tratamento controle e o segundo em meio acrescido de fluido vascular da variedade resistente. Neste caso, o desenvolvimento da cultura foi mais rápido na presença de fluido da variedade resistente não inoculada comparado ao desenvolvimento na presença de fluido de plantas da mesma variedade inoculadas com a bactéria. Não houve desenvolvimento da população de Lxx em meio de cultivo com fluido vascular da variedade suscetível, independente da origem do mesmo, se de plantas inoculadas ou não. A análise cromatográfica dos fluidos tanto de plantas resistentes como de suscetíveis, inoculadas e não inoculadas, mostrou a presença dos mesmos compostos. No entanto, houve variações na concentração desses compostos entre os tratamentos. Os resultados demonstraram que os compostos presentes no fluido de cana podem interferir no desenvolvimento de culturas Lxx. Contudo, esse efeito depende da concentração dos compostos e do genótipo da planta hospedeira.

Palavras-chave: Raquitismo das soqueiras; Xilema; Cromatografia líquida; Curva de crescimento

Abstract

The presence of a high number of pseudogenes in the genome of *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx) may be associated with its fastidious growth. Thus, compounds found in the vascular fluid of sugarcane may favor bacterial development. Therefore, this study investigated whether the addition of vascular fluid to the medium affects the growth rate of Lxx cultures. For that purpose, the bacterium was grown in liquid medium containing vascular fluid extracted from plants of two varieties, one considered susceptible and the other resistant to Lxx. The two varieties were previously subjected to thermotherapy and

subsequently inoculated or not with Lxx. The vascular fluid of these plants was added to the culture medium at a concentration of 15% and the medium was inoculated with an aliquot (1% v/v) of pre-inoculum. The control consisted of medium without the addition of fluid. In all treatments, the cultures were incubated at 28°C under shaking at 130 rpm for 10 days. Culture growth was measured daily through readings in a spectrophotometer (600nm). Each treatment was replicated three times and the test was repeated once. The highest population growth occurred in the control treatment and the second highest was observed in the presence of vascular fluid of the resistant variety. Culture growth was faster in the presence of fluid from the non-inoculated resistant variety compared to growth in the presence of fluid plants of the same variety inoculated with Lxx. There was no growth in the culture medium with vascular fluid from the susceptible variety, regardless of the fluid used (from inoculated plants or not). The chromatographic analysis of plant fluids of both the susceptible and the resistant varieties, inoculated or not with Lxx, indicated the presence of the same compounds but variations in the concentration of some of these compounds were observed. The results showed that the compounds present in the sugarcane fluid could interfere in the in vitro growth of Lxx. However, this effect depends on the concentration and on the genotype of the host plant.

Keywords: Ratoon stunting disease; Xylem; Liquid chromatography; Growth curve

3.1 Introdução

A bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* pode ser isolada de cana-de-açúcar e cultivada em meio complexo à temperatura de 28-30°C, atingindo seu crescimento exponencial em torno de 7-8 dias (COMSTOCK; LENTINI, 1991). Em meio de cultura MSC, as colônias diminutas apresentam aspecto circular não pigmentado, com diâmetro variando de 0,1 a 0,3 mm (DAVIS et al., 1984). Já foram descritas várias espécies pertencentes ao gênero, isoladas de diferentes amostras, como solo, plantas, água e até de um lago antártico (JANSEN et al., 2002). A espécie *Leifsonia xyli* compreende duas subespécies: *L. xyli* subsp. *xyli* e *L. xyli* subsp. *cynodontis* (*Lxc*), sendo esta última patogênica a gramíneas do gênero *Cynodon*, capim bermuda ou grama seda (EVTUSHENKO et al., 2000).

O habitat de Lxx é restrito aos tecidos do xilema (WEAVER et al., 1977) e, até o momento, a bactéria foi apenas identificada em associação com a cana-de-açúcar, não sendo encontrada no solo. Porém, não foram realizados estudos em relação a insetos vetores e plantas hospedeiras alternativas (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Sua colonização não resulta em sintomas característicos em cana, o que dificulta seu controle e diagnose, além de favorecer a disseminação da bactéria (IGLESIA, 2003; GRISHAM, 2004). O principal sintoma é o porte reduzido da planta em consequência do encurtamento dos colmos. Porém,

este sintoma só se torna mais evidente quando o hospedeiro é exposto a condições de déficit hídrico (BAILEY; BECHET, 1995; HOY et al., 1999) e/ou a partir de injúrias mecânicas decorrentes do corte dos colmos da cana planta (GRISHAM, 1991).

Foi demonstrado que isolados de Lxx apresentaram grande grau de similaridade, tanto em morfologia como na reação sorológica e composição bioquímica, sendo este último representado por células bacterianas facilmente descoradas por ácidos, oxidase negativa e catalase positiva (DAVIS et al., 1980, 1984). Tais observações foram confirmadas em um estudo que verificou a ausência de variações genéticas entre isolados de Lxx obtidos de diferentes regiões do mundo (YOUNG et al., 2006). Essas informações, atreladas ao fato dessa bactéria não ter sido encontrada infectando canas selvagens no centro de diversidade dessa cultura, sugere que a relação entre o patógeno e o hospedeiro seja recente (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

A análise da sequência do genoma de Lxx possibilitou aprimorar o meio de cultivo *in vitro* da bactéria. Nesta análise, foram encontrados vários pseudogenes, fato que explica seu crescimento fastidioso, uma vez que alguns desses genes não funcionais estão relacionados a vias metabólicas importantes, como a de síntese de cisteína e de metionina (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). A fim de confirmar a relação entre a ocorrência de tais pseudogenes e o crescimento fastidioso da bactéria, os autores demonstraram que o desenvolvimento da população de Lxx foi favorecido pela incorporação do aminoácido metionina ao meio de cultivo.

Entretanto, dada a importância da doença que causa, informações adicionais sobre a biologia e patogenicidade de Lxx são necessárias, pois existem poucos trabalhos disponíveis na literatura sobre sua interação com a cana-de-açúcar. Evidências anteriores sugeriram que o desenvolvimento *in vitro* de culturas de Lxx pode ser favorecido pela adição de fluido vascular do hospedeiro ao meio de cultivo. Neste caso, a cultura bacteriana alcançou a fase exponencial de crescimento em um período mais curto comparado ao seu crescimento na ausência do fluido. No entanto, este efeito se mostrou dependente da variedade de onde o fluido foi extraído. Além disso, esses resultados foram apenas preliminares (MONTEIRO-VITORELLO – dados não publicados; BELOTI, 2008). Em trabalhos realizados com outras bactérias colonizadoras do sistema vascular, fato semelhante também foi verificado. O desenvolvimento de culturas de *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis*, por exemplo, foi favorecido pela adição de fluido vascular de xilema de milho ou extrato de raiz de seu principal hospedeiro, o capim bermuda (*Cynodon dactylon*). Os compostos encontrados no fluido do xilema de milho e que estimularam o crescimento de Lxc foram caracterizados um como

sendo de natureza orgânica, de baixo peso molecular e altamente hidrofílico e o outro, uma provável proteína sensível ao calor (HAAPALAINEN et al., 2000). O desenvolvimento de culturas de *Xylella fastidiosa* em meio de cultivo PD2 (DAVIS et al., 1981) também foi favorecido pela adição de fluido vascular de videira, em concentrações de 50 a 90% (vol/vol). Além disso, houve um incremento na taxa de formação e agregação de biofilme quando as células foram cultivadas em presença de 90% de fluido vascular (ZAINI et al., 2009).

Desta forma, sugere-se que compostos presentes no fluido vascular da cana possam favorecer o desenvolvimento *in vitro* da bactéria. Sendo essa hipótese verdadeira, o tempo necessário para o cultivo da Lxx poderia ser reduzido. Além disso, e mais importante, o conhecimento desse(s) composto(s) poderia colaborar nos estudos das relações entre a cana e a Lxx. Nesse sentido, especula-se que algumas substâncias produzidas pelo hospedeiro, possam interferir na colonização de Lxx, de forma a atuar como um dos fatores relacionados à característica de resistência ou suscetibilidade em variedades de cana ao RSD.

Assim, o objetivo desta etapa do trabalho foi comparar o desenvolvimento *in vitro* da bactéria na presença de fluido vascular de plantas de duas variedades de cana-de-açúcar, uma resistente e outra suscetível ao RSD, em relação ao desenvolvimento bacteriano em meio de cultivo sem adição de fluido.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material Vegetal

Foram utilizadas duas variedades, CP52-68 e L99-233, classificadas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture - USDA*), respectivamente como resistente e suscetível ao RSD. A classificação das variedades foi feita com base na porcentagem de feixes vasculares colonizados pela bactéria (GRISHAM, 1991; GRISHAM et al., 2009). O material propagativo de cada variedade foi obtido de viveiro, constando de duas subdivisões, onde metade da área foi constituída de plantas oriundas de gemas termotratadas (52°C por 30 minutos) e a outra constituída de plantas oriundas de gemas termotratadas e posteriormente inoculadas com Lxx, todas de mesma idade. A inoculação foi feita através da imersão de toletes de três gemas em caldo de cana infectada com a Lxx, antes do plantio dos toletes.

3.2.2 Obtenção de isolado de Lxx

A estirpe bacteriana Ho-01 foi isolada de colmos, do terço inferior de plantas da variedade L62-96, os quais foram previamente lavados e cortados. O fluido vascular foi extraído da região de entre-nós dos colmos após esterilização superficial por flambagem através de bomba de pressão positiva. Em seguida, o fluido foi filtrado em membrana 0,45µm e transferido para meio MSC sólido adicionado de 0,5g/L de metionina (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004) e acrescido de ácido nalidíxico a uma concentração final de 20 µg/mL (BRUMBLEY et al., 2002). O meio foi mantido em incubadora a 28°C por 15 dias, período necessário para a visualização de colônias características (Figura 8). A identidade do isolado foi confirmada por PCR com iniciadores específicos e sequenciamento do fragmento resultante conforme descrito adiante.

O meio líquido básico (DAVIS et al., 1984) é constituído por 8,0 g de peptona de soja (Biobrás), 30 mL de solução 0,1% de hemina bovina (Inlab) em NaOH 0,05 N, 0,2 g MgSO₄ .7 H₂O 0,01 M, 13 mL de K₂HPO₄ (0,1 M), 87 mL de KH₂PO₄ (0,1M) e 800 mL de água Milli Q. Após o pH ser ajustado para 7,5 com NaOH (1M), o meio foi esterilizado via autoclavagem. Finalmente, após o resfriamento do meio a aproximadamente 50°C, foram adicionados 100 mL de uma solução estéril contendo 5,0 g de glicose (Merck), 0,5 g de cisteína (Sigma), e 2,0 g de albumina bovina (Inlab) – fração V. A modificação de Monteiro-Vitorello et al. (2004) consistiu na adição de metionina (0,5 g/100 mL meio). O protocolo para o meio MSC sólido é semelhante ao do MSC líquido, exceto pela adição de 17g de corn meal agar (Sigma) e 8 g de agar bacteriológico (Sigma) logo após a etapa de ajuste de pH.

Figura 8 - Etapas do procedimento de isolamento de Lxx. (A):Viveiro de onde foram coletados os colmos; (B): Corte do terço inferior dos colmos ; (C): Obtenção dos toletes e desinfestação superficial; (D): Extração do fluido vascular com o auxílio de uma bomba de pressão positiva; (E): Filtragem do fluido em membrana 0,45µm e coletado em tubo estéril; (F): Distribuição de 100µL do filtrado em meio de cultura MSC sólido; (G): Incubação das placas de Petri a 28°C por 15 dias; (H): Visualização das colônias características da Lxx

3.2.3 Confirmação da identidade do isolado bacteriano

Colônias bacterianas foram suspensas em água destilada estéril em tubos de 2 mL e centrifugadas por 5 minutos a 12.000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, uma microesfera revestida por cobre (Biospec Products, Bartlesville, Oklahoma/US) foi adicionada ao tubo na presença de 1 mL de CTAB 2% acrescido de 2 μ L/mL de mercaptoetanol. O conteúdo foi misturado, por 1 minuto, com o auxílio de um agitador “bead-beater” (Glen Mills Inc. US) e incubado a 60°C por 30 minutos. Em cada tubo adicionou-se 750 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e misturou-se 30 vezes por inversão. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 600 μ L do sobrenadante foi transferida para novo tubo de 1,5 mL, adicionada de 500 μ L de isopropanol gelado e incubada por 2 horas a -20°C. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm em centrífuga de bancada por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Realizou-se a etapa de lavagem do precipitado com etanol 76% acrescido de 10mM de acetato de sódio, seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi seco em centrífuga com vácuo por 15 minutos e ressuspendido em 40 μ L de solução de água destilada estéril e RNase a uma concentração final de 10 μ g/mL. Amostras do DNA foram visualizadas através de eletroforese em gel de agarose 2% e quantificadas em espectrofotômetro (nanodrop 1000 Thermo Scientific, Wilmington, US).

Nas reações de PCR foi utilizado o par de iniciadores Cxx1 (5'-CCGAAGTGAGCAGATTGACC-3')/ Cxx2 (5'-ACCCTGTGTTGTTTTCAACG-3') (PAN et al., 1998). As reações foram realizadas com 100ng de DNA bacteriano em micro-tubos contendo tampão de amplificação GoTaq (1x) (Promega, Estados Unidos) e 100 pmol de cada iniciador. O volume final da reação foi de 20 μ L. A reação foi realizada utilizando os seguintes ciclos: um ciclo inicial à 95°C por 5 minutos seguido de 40 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 segundo, hibridização a 57°C por 1 segundo e extensão a 72°C por 30 segundos finalizados por um ciclo de extensão a 72°C por 5 minutos. Uma alíquota de 2 μ L do produto da PCR foi separada para visualização em eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

A identidade do isolado também foi confirmada pelo sequenciamento do fragmento gerado pela amplificação com iniciadores universais para a região ribossomal 16S RNA, 63F (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') e 778R (5'-AGG GTA TCT AAT CCT GTT TGC-3') (MARCHESI et al., 1998). A reação de PCR foi purificada, utilizando o kit de Purificação QuiaQuick (Quiagem, Alemanha) e o produto submetido ao sequenciamento,

realizado pela empresa MCLab (Califórnia-USA). As sequências foram comparadas com aquelas disponíveis no Genbank.

3.2.4 Avaliação do efeito do fluido vascular de cana-de-açúcar no desenvolvimento de culturas de Lxx

Para a coleta de fluido vascular, as canas foram colhidas, lavadas e o fluido extraído com o auxílio de uma mangueira de borracha e uma bomba de pressão positiva. Para a extração do fluido, somente foi utilizada a região do entrenó dos toletes, obtidos do terço inferior das plantas. As ferramentas utilizadas para o corte das canas foram previamente flambadas com álcool 90% para desinfestação superficial. O fluido foi centrifugado a 3500 rpm por 15 min em centrífuga de bancada e filtrado, primeiro em membrana de 0,45 μ M e em seguida em membrana de 0,22 μ M, antes de ser adicionado ao meio MSC modificado.

Uma colônia de Lxx estirpe Ho-01 foi transferida para meio MSC líquido modificado e incubada sob agitação a 130 rpm e 28°C por um período de 6 a 8 dias. Decorrido esse período, uma alíquota de 100 μ L deste pré-inóculo foi transferida para meio MSC sólido modificado com o objetivo de verificar colônias características da bactéria, excluindo assim a possibilidade de contaminação, e o restante do meio foi utilizado como inóculo para a análise das curvas de crescimento.

Alíquotas de 1,2 mL (1%) do pré-inóculo foram transferidas para 120 mL de meio MSC líquido modificado e outros 1,2 mL para 120 mL de meio MSC líquido modificado acrescido de fluido vascular de cana-de-açúcar, coletado de plantas das duas variedades, inoculadas ou não com Lxx na concentração de 15%. O volume do frasco de cada tratamento foi dividido em 30 tubos do tipo Falcon de 50 mL. Dessa forma, cada tubo foi preenchido com um volume de aproximadamente 5 mL. Para a leitura normalizadora (branco) do espectrofotômetro, foi utilizado meio MSC sem adição de fluido vascular e/ou acrescido de fluido da variedade resistente ou suscetível sem a presença da bactéria, dependendo do tratamento analisado. As alíquotas de 30 mL dos tratamentos, destinadas às leituras normalizadoras foram divididas em 10 tubos Falcon. Assim, reduziu-se o risco de contaminação, pois cada tubo, contendo o branco e cada tubo de cada repetição dos tratamentos foi descartado diariamente após a leitura em espectrofotômetro. Todos os tubos foram incubados a 28°C sob agitação (130 rpm).

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com cinco tratamentos e três repetições. Os ensaios foram conduzidos em duas etapas, sendo que na primeira avaliou-se o

efeito da adição de fluido vascular de plantas não inoculadas com Lxx, provenientes de variedade resistente ou suscetível comparado ao desenvolvimento em meio sem adição de fluido (controle). Na segunda etapa, avaliou-se o efeito da adição de fluido vascular de plantas inoculadas com Lxx, provenientes das mesmas variedades comparado ao mesmo controle usado anteriormente. O desenvolvimento da população bacteriana foi avaliado diariamente, durante dez dias, através da leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000) a um comprimento de onda de 600 nm. O ensaio foi repetido uma vez.

3.2.5 Análise do fluido vascular das variedades de cana em cromatografia líquida de alta resolução acoplada a espectrometria de massa

Amostras de 10 mL de fluido vascular de cada tratamento foi analisado por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC/MS/MS). Essas análises foram realizadas no laboratório de química do USDA, localizado em New Orleans/Louisiana. As amostras foram mantidas em 8°C até o momento da análise. Uma alíquota de 1 µL foi transferida para a coluna enriquecida via bomba de capilaridade 1200, operando em corrente de 4 µL/minuto em equipamento Agilent 1200 LC System e Agilent 6520Q-TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). A separação cromatográfica foi feita através de um chip, consistindo de 40 nL em uma coluna C18 enriquecida e uma coluna analítica de 43 mm com poros 300Å.

Concomitante, uma nano bomba 1260 foi operada a uma corrente de 600nL/min. A mistura de solvente isocrático foi realizada em 97% de solvente A (100% água; 0,1% ácido fórmico) por 10 minutos. Em seguida, reduziu-se o solvente A para 40% por 20 minutos e após, 20% por 22 minutos. Então novamente se utilizou 97% do solvente A por mais 25 minutos. Em seguida, adicionou-se 3% de solvente B (90% acetonitrila, 10% água e 0,1% de ácido fórmico) entre 0 e 10 minutos; 60% por 20 minutos, 80% de 22-24 min e finalmente 3% por 25 minutos. Após a corrida, aguardou-se 4 minutos, a fim de equilibrar a coluna.

A fonte da espectrometria de massa foi operada a 300°C com 5L/minuto em corrente de N₂ e um fragmentador de voltagem de 175V. O N₂ foi empregado para colisão de gás, com energia de colisão variando em função da massa e carga, usando uma inclinação de 3,7V/100Da e um deslocamento de 2,5 V. Ambos sistemas Quad e Tof operaram em um modo íon positivo. Os componentes de referência de 322.048121Da e 1221.990637Da foram adicionados por gotejamento contínuo dentro da fonte para a calibração da massa. A

varredura inicial da espectrofotometria de massa foi realizada a partir de uma relação de massa e carga (m/z) 200 a 1600 e até tres íons carregados foram selecionados para a análise MS/MS.

3.3 Resultados

3.3.1 Confirmação da identidade do Isolado bacteriano

Após o sequenciamento dos fragmentos de DNA do isolado de Lxx (isolado Ho-01), as sequências foram comparadas com aquelas disponíveis no Genbank (número de acesso do genoma completo: AE016822.1 e E-value: 0,00) e apresentaram 100% de similaridade com a espécie *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

3.3.2 Efeito do fluido vascular de cana-de-açúcar no crescimento *in vitro* de Lxx

Em cada ensaio, o pH do meio variou entre 6.9 e 7.3, considerando todos os tratamentos. Essa pequena variação levou à exclusão da possibilidade de interferência do pH no crescimento da bactéria no meio de cultivo, após a adição do fluido vascular. Os valores de densidade ótica (D.O) apresentados nos gráficos representam a média das leituras das três repetições de cada tratamento.

Os resultados da adição de 15% de fluido vascular oriundos de plantas não inoculadas (Figuras 9A e 9B) demonstraram que o maior desenvolvimento bacteriano ocorreu em meio de cultivo sem adição de fluido vascular, seguido por meio acrescido de fluido da variedade resistente. Notou-se também que praticamente não houve crescimento em meio acrescido de fluido da variedade suscetível. No primeiro ensaio desse experimento (Figura 9A), o crescimento bacteriano em presença de fluido vascular de plantas não inoculadas, provenientes das variedades suscetível e resistente, alcançou uma $D.O_{(600nm)}$ de 0,061 e 0,657, respectivamente, ao passo que em meio de cultivo sem adição de fluido (controle), a cultura atingiu uma $D.O_{(600nm)}$ de 1,18. No segundo ensaio, a $D.O_{(600nm)}$ medida para o desenvolvimento da população de Lxx em presença de fluido vascular de plantas não inoculadas da variedade suscetível foi de 0,25; da variedade resistente de 0,92 e do controle de 1,18 (Figura 9B). Neste ensaio, as leituras foram realizadas até o sétimo dia, devido a ocorrência de contaminação no meio de cultura acrescido de fluido vascular da variedade suscetível.

Figura 9 – Curva de crescimento de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em meio de cultura MSC sem adição de fluido (linha azul), em meio de cultura MSC com adição de 15% de fluido vascular de cana não inoculada, pertencente a variedade resistente (linha verde) e suscetível (linha vermelha) ao raquitismo das soqueiras. (A): primeiro ensaio e (B): segundo ensaio

No primeiro ensaio do experimento com fluido de plantas inoculadas, a $D.O_{(600nm)}$ medida para a cultura de Lxx em meio acrescido de fluido da variedade suscetível foi de 0,04; em meio acrescido de fluido da variedade resistente, de 0,24 e no controle a $D.O_{(600nm)}$ foi de 1,19 (Figura 10A). No segundo ensaio desse experimento, a $D.O_{(600nm)}$ do controle permaneceu elevada, sendo de 0,94, a $D.O_{(600nm)}$ do tratamento com fluido da variedade suscetível, também permaneceu a menor, apresentando valor de 0,13, contudo, a $D.O_{(600nm)}$ do tratamento com fluido da variedade resistente apresentou um valor elevado em relação à do primeiro ensaio, sendo de 0,653 (Figura 10B). Ou seja, no segundo ensaio, a cultura alcançou um maior crescimento em presença de fluido vascular da variedade resistente em relação ao primeiro.

Figura 10 – Curva de crescimento de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em meio de cultura MSC sem adição de fluido (linha azul), em meio de cultura MSC com adição de 15% de fluido vascular de cana inoculada, pertencente a variedade resistente (linha verde) e suscetível (linha vermelha) ao raquitismo das soqueiras. (A): primeiro ensaio e (B): segundo ensaio

Os resultados demonstraram que o desenvolvimento da cultura de Lxx foi sempre maior em meio onde não foi adicionado fluido vascular (controle), seguido pelo segundo maior desenvolvimento em presença de meio acrescido de fluido vascular da variedade resistente. A D.O medida ao fim dos ensaios foi maior no tratamento composto pela adição de fluido vascular de plantas não inoculadas pertencentes a variedade resistente (Figura 9) comparado a adição de fluido de plantas da mesma variedade inoculadas (Figura 10). O desenvolvimento bacteriano foi inibido pela presença de fluido vascular da variedade suscetível, independente de as plantas terem sido inoculadas ou não.

3.3.3 Análise cromatográfica acoplada a espectrometria de massa do fluido vascular das variedades resistente (CP 68-52) e suscetível (L99-233)

Na análise cromatográfica entre os fluidos das variedades resistente e suscetível, independente do tratamento que receberam, observou-se que os componentes detectados no fluido vascular, representados pelos picos presentes nos gráficos, são os mesmos. Ou seja, apresentaram o mesmo tempo de retenção, porém, de acordo com o tratamento diferiram em relação às concentrações, expressas pelo tamanho do pico (Figura 11).

Nas variedades não inoculadas foi visualizado um pico sensivelmente maior na variedade resistente no tempo de retenção de 2 minutos (Figuras 11A e 11B). Entretanto, nos tempos entre 14 e 15 minutos, o pico formado na variedade suscetível foi maior, na ordem de aproximadamente $0,2 \times 10^6$, em relação ao pico formado na variedade resistente. Finalmente, o último pico que diferiu entre as variedades foi formado próximo ao tempo de retenção em 20 minutos e novamente foi maior na variedade suscetível, também na ordem de aproximadamente $0,2 \times 10^6$ (Figuras 11A e 11B). Já na análise do fluido vascular proveniente de plantas inoculadas, na variedade resistente foi encontrado apenas um pico em evidência, nos tempos de retenção entre 14 e 15 minutos (Figura 11C). Em contrapartida, no fluido da variedade suscetível inoculada, os picos próximos aos tempos de retenção de 2 minutos e entre 17 e 18 minutos, foram maiores em, aproximadamente, $0,4 \times 10^6$ e $0,3 \times 10^6$, respectivamente, em comparação aos encontrados na variedade resistente inoculada (Figuras 11C e 11D).

Nas análises de cromatografia entre os tratamentos compostos pela inoculação ou não da Lxx, também foram verificadas diferenças de concentrações dos componentes detectados nos fluidos, independentemente da variedade ser resistente ou suscetível. No entanto, as diferenças foram mais pronunciadas na variedade resistente (Figuras 11A e 11C) em

comparação à suscetível (Figuras 11B e 11D). Na variedade resistente, ocorreu uma inversão na concentração dos compostos representados pelos picos nos tempos de retenção entre 1 e 2 minutos, 14 e 15 e, 20 minutos. Quando não houve inoculação, ocorreu um aumento, em torno de 2,5 vezes, na altura do pico, formado entre os tempos de retenção entre 1 e 2 minutos, ao passo que, a altura dos picos formados nos tempos de retenção entre 14 e 15 minutos e 20 minutos foi reduzida em relação ao fluido de plantas inoculadas com a Lxx. Na variedade suscetível também houve diferenças na concentração dos compostos detectados nas amostras de fluido, oriundos de plantas inoculadas e não inoculadas, as quais estão representadas pela altura dos picos nos tempos de retenção entre 17 e 18 minutos e 20 minutos (Figuras 11B e 11D).

Figura 11- Análise cromatográfica acoplada a espectrometria de massa LC/MS/MS do fluido vascular de variedades de cana-de-açúcar. (A): Fluido vascular da variedade resistente - não inoculada; (B): Fluido vascular da variedade suscetível- não inoculada; (C): Fluido vascular da variedade resistente- inoculada com Lxx; (D): Fluido vascular da variedade suscetível -inoculada com Lxx

3.4 Discussão

Além da interação entre *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e cana, outros importantes patossistemas compreendem bactérias que colonizam o xilema, como *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* (DAVIS et al., 1984), *Xyllela fastidiosa* (DAVIS; THOMSON, 1977), *Xanthomonas albilineas* (BIRCH; PATIL, 1987) e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (TABEL, 1967). Apesar da importância econômica das culturas colonizadas por essas bactérias, as informações em torno da interação com seus hospedeiros durante a colonização ainda são limitadas (GOODMAN et al., 1986). Diferentes estudos têm sido realizados a fim de explicar quais seriam as vantagens da colonização dessas bactérias em um meio tão escasso em nutrientes, como o do xilema. Nesse sentido, alguns progressos foram alcançados, como no caso de *Xyllela fastidiosa* e *Xanthomonas albilineas* em que foi levantada a hipótese de que a especialização na colonização do xilema poderia ser um meio de evadir ou dificultar sua detecção pelo sistema de defesa das plantas (PIERETTI et al., 2009). Contudo, questões em relação ao modo como as bactérias absorvem os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento e se características presentes nos vasos podem determinar a resistência ou suscetibilidade do hospedeiro ainda requerem explicações mais detalhadas.

Na tentativa de responder tais questionamentos, alguns trabalhos realizados com os patossistemas *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* X capim bermuda e *Xyllela fastidiosa* X videira, demonstraram que a adição de fluido vascular do hospedeiro, especialmente proveniente de variedade suscetível, favoreceu o desenvolvimento *in vitro* da população bacteriana em detrimento ao meio de cultura sem este composto (LIN et al., 2008; ZAINI et al., 2009; HAAPALAINEN et al., 2000). No entanto, no presente trabalho, ao contrário dos relatos citados acima, verificou-se maior desenvolvimento da cultura em meio sem adição de fluido, ou seja, a adição de fluido vascular do hospedeiro não favoreceu o desenvolvimento *in vitro* da população bacteriana. Mais surpreendente foi que o desenvolvimento de Lxx foi negativamente afetado pela adição de fluido da variedade suscetível. Diante desse resultado, algumas hipóteses foram propostas a fim de explicar quais fatores presentes no fluido vascular da cana poderiam ter inibido o desenvolvimento *in vitro* da população de Lxx. A primeira está relacionada ao processo de extração do fluido vascular, o qual pode ter permitido que outras substâncias, além das presentes no xilema, fossem extraídas, principalmente componentes do floema. Em cucurbitáceas, exsudados do colmo contendo componentes proteicos com resíduos de açúcares inibiram o crescimento de *F. oxysporum* (BILES et al., 1990). Também em *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* foi verificado que a presença de alguns açúcares como o

manitol, mesmo em baixa concentração, inibiu o crescimento da bactéria (HAAPALAINEN et al., 2000). Apesar disso, os autores demonstraram que mesmo utilizando fluido vascular de milho, o qual, devido ao método de extração, provavelmente foi composto por uma mistura de componentes do xilema e floema, houve um favorecimento do desenvolvimento de culturas de Lxc em relação ao meio de cultivo sem adição de fluido (HAAPALAINEN et al., 2000). Outra explicação é que pode ter havido perda de fatores de crescimento bacteriano durante o processo de extração, dada a característica de instabilidade de alguns componentes químicos presentes no fluido vascular (HAAPALAINEN et al., 2000). Além disso, as substâncias presentes no xilema apresentam uma natureza dinâmica, ou seja, a presença de alguns compostos, bem como suas concentrações, no interior do xilema podem variar, dependendo, por exemplo, do período do dia e da temperatura no momento da extração (ANDERSEN et al., 2007).

Fato intrigante foi que houve acentuada inibição do desenvolvimento da população da Lxx em presença de fluido vascular da variedade suscetível comparado ao da variedade resistente. Esses resultados não corroboraram com outros trabalhos que demonstraram que a adição de fluido vascular de variedades hospedeiras suscetíveis favoreceu o desenvolvimento *in vitro* dos patógenos (HAAPALAINEN et al., 2000; ZAINI et al., 2009). Uma das possíveis causas que explicaria as diferentes respostas no desenvolvimento da população de Lxx em presença de fluido de plantas suscetíveis e resistentes está relacionada às diferenças de concentrações de alguns compostos presentes nos fluidos, detectados através das análises cromatográficas. Pelas análises, foi demonstrado que, apesar dos mesmos compostos estarem presentes no fluido de ambas as variedades, houve diferenças em relação à concentração dos compostos entre as variedades e entre os tratamentos inoculado e não inoculado. Os compostos foram assumidos serem os mesmos, devido apresentarem formação de picos no mesmo tempo de retenção. Desta forma, observou-se que entre as variedades suscetível e resistente não inoculadas, os principais compostos que diferiram em concentração foram representados pelos picos formados nos tempos de retenção em 14-15 minutos e 20 minutos, onde os picos formados na variedade resistente não inoculada foram menores do que os formados na suscetível não inoculada, indicado que estes sejam compostos que possivelmente contribuíram para a inibição do desenvolvimento da bactéria. Em contrapartida, na comparação entre as variedades resistente e suscetível inoculadas, os compostos que possivelmente contribuíram na inibição do desenvolvimento da cultura foram representados pelos picos formados, em maior altura, nos tempos de retenção em 1-2 minutos e 17-18 minutos na variedade suscetível inoculada.

No que tange a variedade resistente, na comparação entre a adição de fluido de plantas inoculadas ou não, verificou-se que o desenvolvimento da cultura de Lxx foi maior em presença de fluido proveniente de plantas não inoculadas. Esses resultados não corroboraram com os apontados por Haapalainen et al. (2000), onde não foram observadas diferenças no desenvolvimento de culturas de Lxc, quando foi adicionado ao meio de cultivo, fluido vascular de milho infectado ou não com a bactéria. Interessante foi que na análise cromatográfica foram observadas diferenças nas concentrações de alguns compostos, entre plantas inoculadas e não inoculadas dessa variedade. Nesse sentido, foi levantada a hipótese de que a maior concentração dos compostos detectados nos tempos de retenção entre 14 -15 minutos e/ou em 20 minutos, na análise do fluido de plantas inoculadas, poderia ter atuado como um fator de inibição, ao passo que o composto detectado em maior concentração no tempo de retenção em 2 minutos, na análise de plantas não inoculadas, poderia ter favorecido o desenvolvimento bacteriano.

Considerando que muitas proteínas como peroxidases, quitinases e serina proteases, encontradas no fluido do xilema parecem ser conservadas entre diferentes espécies de plantas e que a maioria dessas proteínas estão envolvidas com o sistema de reparo e defesa (BUHTZ, et al., 2004), parece razoável supor que em plantas inoculadas, estes produtos possam estar em maior concentração do que em plantas não inoculadas e que, desta forma, inibiram o desenvolvimento *in vitro* da bactéria. Essa suposição foi amparada pelo resultado de análises realizadas, através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, do fluido de xilema de tomate infectado com *Fusarium oxysporum* e apontaram a presença de 13 proteínas, as quais não foram encontradas no fluido de plantas de tomate sem infecção, dentre as quais se destacaram as peroxidases e quitinases (HOUTERMAN et al., 2007). Adicionalmente, em arroz, foi observado o acúmulo de peroxidases nos vasos do xilema após infecção de *Xanthomonas oryzae* (YOUNG et al., 1995). As peroxidases presentes na parede das células de plantas foram relacionadas à resistência a patógenos, em muitas espécies hospedeiras (YOUNG et al., 1995).

Além das mudanças bioquímicas, há evidências de que a interação entre o patógeno e seu hospedeiro dentro dos vasos do xilema pode ser influenciada pela arquitetura dos vasos, determinando, ao menos em parte, o grau de suscetibilidade ou resistência no hospedeiro (REP et al., 2002). Em cana-de-açúcar foi verificado que diferenças nos níveis de ramificações no metaxilema e consequente reduzida taxa de fluxo de água estão relacionadas ao aumento de resistência a Lxx e a *X. albilineans* (TEAKLE et al., 1978; ROTT et al., 1997). Ainda, metaxilemas compostos por poros pequenos também conferiram maior resistência a

Lxx através do rápido bloqueio dos poros pela formação de gomas e tiloses (TEAKLE et al., 1978). Em videiras, a maior tolerância à doença de Pierce foi determinada pela restrição da disseminação da bactéria nos vasos, imposta pela formação de tiloses e gomas (MOLLENHAUER; HOPKINS, 1976). E em arroz, o bloqueio da disseminação de *X. oryzae* através da lignificação nos vasos também foi relacionado a resistência da variedade (HILAIRE, 2001). Desta forma, sugere-se que a característica de resistência/suscetibilidade de uma variedade a um determinado patógeno não seja exclusivamente reflexo da composição de seu fluido vascular, mas também possa estar relacionada à arquitetura dos vasos do xilema e à habilidade da bactéria utilizar nutrientes provenientes de tecidos ao redor do xilema (PIERETTI et al., 2009). Neste caso, isso poderia explicar o fato da adição de fluido vascular de variedades suscetível ou resistente não ter favorecido o desenvolvimento de Lxx em detrimento ao meio de cultivo sem adição de fluido. Contudo, a correlação entre as concentrações de compostos presentes no fluido vascular e o desenvolvimento *in vitro* da bactéria sob os diferentes tratamentos indicam que tais compostos possam também estar envolvidos, mas, no entanto, dependem de uma determinada concentração, para provocarem alguma interferência no desenvolvimento de Lxx. Nesse sentido, a purificação desses componentes para a aplicação em estudos adicionais poderia fornecer pistas sobre a interferência de cada componente isoladamente e em conjunto, não apenas sobre o desenvolvimento *in vitro* da população de Lxx, mas também no sucesso da colonização da bactéria na planta.

3.5 Conclusões

- 1- A adição de fluido vascular de cana não favoreceu o desenvolvimento *in vitro* de Lxx;
- 2- Não houve relação entre os tratamentos representados pelo fluido vascular de plantas inoculadas ou não da variedade suscetível e o desenvolvimento da cultura bacteriana;
- 3- Através das análises cromatográficas foi evidenciado haver correlação entre a concentração dos compostos presentes nos fluidos, especialmente da variedade resistente, e o desenvolvimento de Lxx;

4- Outros fatores, além dos presentes no fluido vascular, podem ser os responsáveis pelo sucesso da colonização de *Lxx in planta*, determinando os níveis de resistência, das variedades de cana, ao RSD.

Referências

- ANDERSEN, P.C.; BRODBECK, B.V.; ODEN, S.; SHRINER, A.; LEITE, B. Influence of xylem fluid chemistry on planktonic growth, biofilm formation and aggregation of *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 274, p. 210–217, 2007.
- 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.
- BELOTI, L.L. **Análise *in vitro* da expressão de genes de adaptação e de patogenicidade de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em presença de fluido vascular de cana-de-açúcar**. 2008. 51p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- BILES, C.L.; MARTYN, R.D.; NETZER, D. In vitro inhibitory activity of xylem exudates from cucurbits towards *Fusarium oxysporum* microconidia. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v.18, p.41–49, 1990.
- BIRCH, R.G.; PATIL, S.S. Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 207-214, 1987
- BRUMBLEY, S.M.; PETRASOVITS, L.A.; BIRCH, R.G.; TAYLOR, P.W. Transformation and transposon mutagenesis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease of sugarcane. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 3, p. 262–268, 2002.
- 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.
- BUHTZ, A.; KOLASA, A.; ARLT, K.; WALZ, C.; KEHR, J. Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. **Planta**, Berlin, v. 219, p. 610–618, 2004.
- COMSTOCK, J.C.; LENTINI, R.S. **Sugarcane ratoon stunting disease**. 1991. Disponível em: <http://eds.ufl.edu/body_SC002>. Acesso em: 10 out. 2009.
- DAVIS, M.J.; THOMSON, S.V. Pierce disease isolation of the causal agent from grape vines. **Proceedings of the American Phytopathological Society**, Cincinnati, v. 4, p. 138, 1977.
- DAVIS, M.J.; WHITCOMB, R.F.; GILLASPIE JR., A.G. Fastidious bacteria of plant vascular tissue and invertebrates (including so-called rickettsia-like bacteria). In: STARR,

M.P.; STOLP, H.; TRUPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G. (Ed.). **The prokaryotes, a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria**. Berlin: Springer-Verlag, 1981. p. 2172-2188.

DAVIS, M.J.; GILLASPIE, A.G. JR.; HARRIS, R.W.; LAWSON, R.H. Ratton stunting disease of sugarcane: Isolation of the causal bacterium. **Science**, Washington, v. 210, p. 1365-1367.1980.

DAVIS, M.J.; GILLASPIE, A.G.,JR.; VIDAVER, A.K.; HARRIS, R.W. Clavibacter a new genus containing some phytopathogenic cory- neform bacteria, including Clavibacter xyli subsp. xyli sp. nov., subsp. nov. and Clavibacter xyli subsp. cynodontis subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v. 34, p. 107-117, 1984.

EVTUSHENKO, L.I.; DOROFEEVA, L.V.; SUBBOTIN, S. A.; COLE, J.R. Y TIEDJE, J.M.): *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode gall on *Poa annua*, and reclassification of “*Corinebacterium aquaticum*” Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen.nov.,comb.nov. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v. 50, p. 371-380, 2000.

GOODMAN, R.N.; KIRALY, Z.; WOOD, K.R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia: University of Missouri Press, 1986. 435p.

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

_____. Ratoon stunting disease. In: RAO, G.P.; SAUMTALLY, A.S.; ROTT, P. (Ed.). **Sugarcane pathology: bacterial and nematode diseases**. New Hampshire: Science Publishers, 2004. p. 77-96.

GRISHAM, M.P.; JOHNSON, R.M.; VIATOR, R.V. Effect of ratoon stunting disease on yield of recently released sugarcane cultivars in Louisiana. **Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists**, Baton Rouge, v. 29, p. 119-127, 2009.

HAAPALAINEN, M.; MATTINEN, J.; METZLER, M. The growth of a plant-parasitic bacterium, *Clavibacter xyli* subsp *cynodontis*, is enhanced by xylem fluid components. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 56, p. 147-155, 2000.

HILAIRE, E.; YOUNG, S.A.; WILLARD, L.H.; McGEE, J.D.; SWEAT, T.; CHITOOR, M.; GUIKEMA, J.A.; LEACH, J.E. Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in Xylem Parenchyma cells and xylem wall thickening. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, n. 12, p. 1411–1419, 2001.

HOUTERMAN, P.; SPEIJER, D.; DEKKER, H.; DE KOSTER, C.G.; CORNELISSEN, B.J.C.; REP, M. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 8, n. 2, p. 215–221, 2007.

HOY, J.W.; GRISHAM, M.P.; DAMANN, K.E. Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 1170-1175, 1999.

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.

JANSEN, P.H.; YATES, P.S.; GRINTON, B.E.; TAYLOR, P.M.; SAIT, M. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the division *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 2391-2396, 2002.

LIN, H.; CHENG, D.; WALKER, A.; STENGER, D.C.; CIVEROLO, E.L. **Effects of grape xylem sap and cell wall constituents on in vitro growth and cell wall degrading gene expression of *xylella fastidiosa***. Washington: USDA, 2008. p.118-122 (USDA REPORT).

MARCHESI, J.R.; SATO, T.W.A.J.; MARTIN, T.A.; FRY, J.C.; HIOM, S.J.; WADE, W.G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S Rna. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 2, p. 795-799, 1998.

MOLLENHAUER, H.H.; HOPKINS, D.L. Xilem morphology of Pierce's disease-infected grapevines with different levels of tolerance. **Physiological Plant Pathology**, London. v. 9, p. 95-100, 1976.

MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; CAMARGO, L.E.A.; VAN SLUYS, M.A.; KITAJIMA, J.P.; TRUFFI, D.; AMARAL, A.M.; HARAKAVA, R.; OLIVEIRA, J.C.F.; WOOD, D.; OLIVEIRA, M.C.; MIYAKI, C.; TAKITA, M.A.; SILVA, A.C.R.; FURIAN, L.R.; CARRARO, D.M.; CAMAROTTE, G.; ALMEIRA JR., 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.; DE SOUZA, A.A.; TSAI, S.M.; ZANCA, A.S.; SIMPSON, A.J.G.; BRUMBLEY, S.M.; SETÚBAL, J.C. Genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, p. 827-836, 2004.

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

PIERETTI, I.; ROYER, M.; BARBE, V.; CARRERE, S.; KOEBNIK, R.; COCIANCICH, S.; COULOUX, A.; DARRASSE, A.; GOUZY, J.; JACQUES, M.-A.; LAUBER, E.; MANCEAU, C.; MANGENOT, S.; POUSSIER, S.; SEGURENS, B.; SZUREK, B.; VERDIER, V.; ARLAT, M.; ROTT, P. The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 616, 2009.

REP, M.; DEKKER, H.L.; VOSSEN, J.H.; DE BOER, A.D.; HOUTERMAN, P.M.; SPEIJER, D.; BACK, J.W.; DE KOSTER, C.G.; CORNELISSEN, B.J.C. Mass spectrometric

identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 130, p. 904–917, 2002.

ROTT, P.; MOHAMED, I. S.; KLETT, P.; SOUPA, D.; DE SAINT-ALBIN, A.; FELDMANN, P.; LETOURMY, P. Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 1202-1213, 1997.

TABEI, H. Anatomical studies of rice plant affected with bacterial leaf blight. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 33, p. 12-16, 1967.

TEAKLE, D.S.; APPLETON, J.M.; STEINDL, D.R.L. An anatomical basis for resistance of sugarcane to ratoon stunting disease. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 12, p. 83-91, 1978.

WEAVER, L.; TEAKLE, D.S.; HAYWARD, A.C. Ultrastructural studies on the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 28, p. 843-852, 1977.

YOUNG, A.J.; PETRASOVITS, L.A.; CROFT, B.J.; GILLINGS, M.; BRUMBLEY, S.M. Genetic uniformity of international isolates of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane. **Australasian Plant Pathology**. Collingwood, v. 35, p. 503-511, 2006.

YOUNG, S.A.G.U.O.A.; GUIKEMA, J.A.; WHITE, F.F.; LEACH, J.E. Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 107, p. 1333–1341, 1995.

ZAINI, P.A.; DE LA FUENTE, L.; HOCH, H.C.; BURR, T.J. Grapevine xylem sap enhances biofilm development by *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 295, p. 129–134, 2009.

4 INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ABCÍSIKO NO DESENVOLVIMENTO DA POPULAÇÃO DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* IN PLANTA

Resumo

A partir da hipótese de que a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) produz uma toxina análoga ao ácido abscísico (ABA), sugeriu-se que este composto pudesse atuar como mecanismo de patogenidade, reduzindo a resposta de defesa do hospedeiro e consequentemente favorecendo o desenvolvimento do patógeno *in planta*. A fim de testar essa hipótese, avaliou-se a ação do ABA na colonização de cana por Lxx através da quantificação da bactéria por PCR em tempo real. Para tanto, plantas da variedade suscetível a Lxx CB 49-260 foram cultivadas em vasos, mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada e regularmente tratadas com ABA. A aplicação de 100 µM de ABA em solução de etanol 0,1% (v/v) e 0,01% de Tween 20 (v/v) foi realizada semanalmente por 4 meses, através de pulverização foliar. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com dois tratamentos: aplicação de 100 µM de ABA e um tratamento controle, representado por plantas tratadas apenas com etanol 0,1%. Cada tratamento constou de 10 repetições. A primeira aplicação de ABA ocorreu aos 60 dias após o plantio das gemas. Para a análise do efeito deste composto na colonização das plantas por Lxx, foram efetuadas 4 coletas de folhas, a primeira aos 60 dias após o plantio e antes da aplicação do ABA e as outras aos 30, 60 e 90 dias após a primeira aplicação do ABA. Os títulos bacterianos nestas amostras foram quantificados por PCR quantitativo em tempo real. Em média, os títulos bacterianos iniciais das plantas dos dois tratamentos foram similares. Trinta dias após a primeira aplicação de ABA, houve uma redução do título bacteriano em ambos os tratamentos em relação à avaliação inicial. Aos 60 dias, houve um sensível aumento do título de Lxx em ambos os tratamentos e, aos 90 dias, observou-se um aumento na população de Lxx tanto nas plantas testemunhas, como nas tratadas. Nesse período, apesar da concentração de Lxx em plantas testemunhas ter sido o dobro da encontrada em plantas tratadas com ABA, não houve diferenças significativas. Esses resultados indicaram que os intervalos adotados para avaliação podem não ter sido adequados para esse patossistema.

Palavras chave: Cana-de-açúcar; Raquitismo das soqueiras; Hormônio; PCR em tempo real

Abstract

From the hypothesis that the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (LXX) produces a toxin analogous to abscisic acid (ABA), it is suggested that this compound acts as a mechanism of pathogenicity, reducing the response of host defenses and therefore, favoring the *in plant* growth of the pathogen. To test this hypothesis, we evaluated the effects of exogenous applications of ABA in the colonization of sugarcane by Lxx quantified by real-time PCR. For that purpose, plants of the variety CB 49-260 susceptible to Lxx were grown in pots, kept in a greenhouse with controlled temperature, and regularly treated with ABA. The application of 100 µM of ABA in 0.1% (v/v) ethanol solution and 0.01% of Tween 20 (v/v) was performed weekly for four months (foliar spraying). The experimental design was completely randomized with two treatments: one treatment with the application of 100 µM of ABA and the control treatment represented by plants treated only with 0.1% ethanol. Each

treatment consisted of 10 repetitions. The first application of ABA occurred at 60 days after transplanting. To analyze the effect of this compound on *Lxx* titers, leaves were sampled first at 60 days after planting and before the application of ABA and at 30, 60 and 90 days after the first application. Initial bacterial titers in the plants of the two treatments were similar. Thirty days after the first application of ABA, there was a reduction in the bacterial population in both treatments compared to the initial evaluation. At 60 days, there was a slight increase in both treatments and at 90 days an increase was observed in both treatments. During this period, although the *Lxx* concentration in the control plants doubled compared to plants treated with ABA, this difference was not statically significant. This result indicated that the intervals adopted for the evaluation may not be suitable for this pathosystem.

Keywords: Sugarcane; Ratoon stunting disease; Hormone; Real time PCR

4.1 Introdução

Algumas hipóteses acerca dos mecanismos de patogenicidade da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) foram formuladas a partir da análise *in silico* da sequência de seu genoma (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). A principal diz respeito a possível produção de um composto análogo ao ácido abscísico (ABA) a partir da rota de síntese de pigmentos isoprenóides e que este seria utilizado pela bactéria como um efector para comprometer a resposta de defesa do hospedeiro, favorecendo sua colonização (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). De fato, sobrenadante de culturas de *Lxx* afetou negativamente a germinação de sementes de alface, corroborando com esta hipótese (CASTRO, 2012). Adicionalmente, a produção deste composto é exacerbada quando a bactéria é cultivada sob condição de estresse osmótico induzido por polietileno glicol (CASTRO, 2012). Outra observação é que a aplicação de sobrenadante de culturas de *Lxx* resultou no fechamento estomatal de células epidérmicas foliares de plantas de tomate mutantes na síntese deste hormônio. A produção deste composto na planta poderia reduzir a resposta de defesa do hospedeiro, inibindo o crescimento da planta e acentuando os sintomas da doença causada por *Lxx*, caracterizada por um sub-desenvolvimento generalizado da planta. Essa teoria foi fundamentada em outros trabalhos, cujos relatos claramente demonstraram que plantas (cevada, batata, soja, tabaco e tomate) tratadas exogenamente com ABA, antes da inoculação, apresentaram-se mais suscetíveis a vários patógenos (MCDONALD; CAHILL, 1999; HERRERA-MEDINA et al., 2007).

Embora diferentes estudos tenham mostrado a relação do ABA com a planta sob estresse biótico, os resultados são controversos e dependentes do patossistema em estudo. Na

literatura há exemplos que relacionam a presença de ABA ao aumento da suscetibilidade do hospedeiro e exemplos que abordam o contrário, os seja, relacionam esse hormônio ao aumento da resistência do hospedeiro, por exemplo, através de mecanismos como a indução da síntese de proteínas relacionadas a patogênese (“PR-proteínas”) (STINTZI et al., 1993). Uma das hipóteses para as diferentes respostas de interação patógeno-hospedeiro em presença do ABA, pode ser a possível relação do período específico de cada interação planta-patógeno, bem como, aos eventos subsequentes da patogênese, sugerindo que em rápidas interações, a presença do ABA pode favorecer os patógenos. Em contrapartida, em interações mais lentas como as biotróficas, a presença do ABA pode favorecer o hospedeiro na resposta de defesa (MCDONAND; CAHILL, 1999). Além disso, o ABA pode favorecer ambos, patógeno e hospedeiro. Fungos micorrízicos, produtores de ABA, apresentaram maior facilidade em colonizar plantas hospedeiras (DANNEBERG et al., 1993).

Dentre os relatos sobre a influência do ABA no aumento da suscetibilidade do hospedeiro, destaca-se o que aborda a ocorrência de interação negativa entre a via de sinalização mediada por ABA e a por ácido salicílico (AUDENAERT et al., 2002). Essa teoria já foi demonstrada em diversos patossistemas, incluindo *P. parasítica* em tomate (BOSTOCK, 1999), *P. infestans* em batata (HENFLING et al., 1980), e *Peronospora tabacina* em tabaco (SALT et al., 1986). Além disso, no patossistema *P. sojae* e soja foi demonstrado que folhas que receberam norflurazon (inibidor da síntese de ABA) apresentaram resultado semelhante ao tratamento de hipocótilos tratados com o fungicida metalaxyl (indicado para o controle de oomycetos). Isso mostra que a inibição da síntese de ABA no hospedeiro foi suficiente para controlar o avanço do patógeno, proporcionando ação similar ao de um fungicida (MCDONAND; CAHILL, 1999). Por outro lado, há os exemplos que ilustram que esse hormônio proporciona o aumento da resistência do hospedeiro a patógenos. Neste caso, foi observado um aumento no nível de ABA endógeno em plantas, em resposta a infecção com vírus, bactérias e fungos (WHENHAM et al., 1986; STEADMAN; SEQUEIRA, 1970; KETTNER; DÖRFFLING, 1995). Na interação entre *Colletotrichum lindemuthianum* e feijão foi demonstrado que a aplicação exógena de ABA no hospedeiro induziu a resistência, levando a redução da severidade dos sintomas nos hipocótilos (DUNN et al., 1990). No patossistema, videira e *Xylella fastidiosa*, foi observada uma alta porcentagem de recuperação de plantas que receberam o ABA (MEYER; KIRKPATRICK, 2011). Contudo esses resultados foram positivamente relacionados à ocorrência de baixas temperaturas, levantando a dúvida se o efeito do ABA foi indireto, reduzindo o estresse abiótico na planta ou direto na resposta de defesa do hospedeiro contra o patógeno (MEYER;

KIRKPATRICK, 2011). A indução de defesa nas plantas contra patógenos pode ser influenciada pela ocorrência de estresses abióticos, uma vez que sob tal condição desencadeia-se na planta uma modificação sistêmica de fito-hormônios, como ABA, etileno e citocininas (BRAY, 1993).

O ABA é um hormônio que pode ser sintetizado em quase todos os tecidos fotossintéticos (MEYER; KIRKPATRICK, 2011) e diversos estudos tem mostrado que a produção desse hormônio está associada a ocorrência de estresse abiótico. Nesse sentido, já foi observado que o nível do ABA nas plantas pode se elevar em condições de estresse por frio e está associado à indução da síntese de algumas proteínas, como as de choque de frio (CHEN et al., 1983; BRAVO et al., 1998). Além disso, está a relação do ABA com o estresse hídrico. Neste caso, o ABA pode ser produzido em raízes de plantas sob estresse hídrico e translocado pelo xilema para as folhas (ZHANG; ZHANG, 1997). Isso leva à rápida redução do potencial osmótico das células-guarda, o que causa a perda de turgor e fechamento estomatal. Desta forma, o aumento da produção de ABA em plantas sob estresse hídrico atrelado ao fato dos sintomas de RSD serem mais severos em plantas expostas a essa condição abiótica (ROSSLER, 1974; BAILEY; BECHET, 1986; GILLASPIE; TEAKLE, 1989), reforçam as evidências propostas por Monteiro-Vitorello et al. (2004) de que o ABA atua como um mecanismo de patogenicidade na interação entre *Lxx* e cana.

Diante do exposto tem-se que a influência do ABA, na interação planta - patógeno pode variar, dependendo do patógeno, do hospedeiro e do ambiente. Desta forma, o objetivo desta etapa do trabalho foi determinar o efeito do ABA na interação *Lxx* e cana, através da aplicação exógena do hormônio e, posterior quantificação da bactéria, por PCR quantitativo em tempo real.

4. 2 Material e Métodos

4.2.1 Material vegetal

O experimento foi conduzido com plantas da variedade CB 49-260, classificada como padrão de suscetibilidade ao raquitismo das soqueiras - RSD (GAGLIARDI; CAMARGO, 2009) obtidas de canas cultivadas em um campo experimental localizado em Piracicaba-SP. Toletes com uma gema, provenientes de plantas infectadas pela bactéria foram cultivados em substrato comercial Basaplant[®] (Base- Soluções em Substratos, Holambra, São Paulo, Brasil) em vasos de 22 litros. Sessenta dias após o plantio, quando as plantas apresentavam entre 4 e 6 seis folhas, destacou-se a folha denominada +1 (Kuijper) (SCARPARI; BEAUCLAIR,

2008) de todas as plantas para quantificação do título bacteriano através de PCR em tempo real. Essas amostras foram utilizadas como referência para avaliar comparativamente a colonização de *Lxx in planta* após a aplicação do ABA. Em seguida, foi feita a primeira aplicação de ABA (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) na concentração de 100 μ M diluído em etanol 0,1% (v/v) e acrescido de 0,01% (v/v) de Tween 20 (HERRERA-MEDINA et al., 2007; AUDENAERT et al., 2002). Nas plantas testemunhas, aplicou-se solução de etanol 0,1%, acrescido de 0,01% (v/v) de Tween 20. As aplicações de ABA foram realizadas semanalmente até completar quatro meses, através da pulverização de 50 mL da solução de ABA em cada planta. Folhas +1 foram coletadas aos 30, 60 e 90 dias após a primeira aplicação de ABA para a quantificação do título bacteriano.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com dois tratamentos: (i) plantas pulverizadas com 50mL de uma solução de 100 μ M de ABA diluído em 0,1% etanol e (ii) plantas pulverizadas com 50 mL de solução de etanol 0,1% (testemunha). Cada tratamento foi repetido dez vezes e as plantas foram mantidas em casa de vegetação.

Ao final do experimento, mediu-se a altura e o diâmetro do colmo de cada planta em três alturas diferentes, sendo 10, 30 e 60 centímetros acima do solo.

4.2.2 Quantificação de *Lxx* em tecido foliar por meio de PCR quantitativo

O método utilizado para a quantificação de *Lxx* em tecido foliar foi exatamente o mesmo descrito no item 2.2.5

4.2.3 Curva de Diluição Padrão de DNA de *Lxx*

A Curva de diluição padrão de DNA de *Lxx* foi confeccionada seguindo o método descrito no item 2.2.6

4.2.4 Análises estatísticas

Para a análise de variância (ANOVA) os resultados foram transformados segundo o método de Box-Cox, utilizando o programa R (versão 2.15) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p=0,05$). As alturas e diâmetros dos colmos das plantas foram submetidas à análise de variância pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2000) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p=0,05$).

4.3 Resultados

Em função da elevada amplitude dos dados, os valores foram transformados em logaritmo (Log). A transformação em Log de concentrações em $\text{ng}/\mu\text{L}$ resultou em valores negativos. Por esta razão, aos valores transformados foi somada uma constante ($K=5$) a fim de facilitar a apresentação dos resultados.

Aos 60 dias após a primeira aplicação da solução de ABA já foi possível observar o porte reduzido das plantas que receberam o hormônio em relação às plantas testemunhas (Figura 12A). Aos 120 dias após a primeira aplicação do hormônio, observou-se que, além do porte reduzido, as plantas tratadas também apresentaram amarelecimento nas folhas (Figura 12B). Houve diferenças significativas entre a altura média das plantas tratadas e não tratadas com ABA (Figura 12). A altura média das plantas testemunhas foi de 2 metros, ao passo que a altura média das plantas que receberam pulverizações semanais de ABA foi de 1,55 metros (Figura 13). O diâmetro dos colmos, medido a 10 cm do solo, foi significativamente reduzido nas plantas que receberam ABA (Figura 14), sendo de 15,5 mm em plantas tratadas com ABA e de 19,76 mm nas não tratadas (Figura 14). No entanto, não houve diferença significativa no diâmetro médio dos colmos medidos a 30 e 60 cm do solo (Figura 14).

Figura 12 - Plantas de cana de açúcar da variedade CB 49 260 que receberam aplicação de $100 \mu\text{M}$ de ABA plantas testemunhas comparadas aos sessenta (A) e 120 dias (B) após o início da aplicação de ABA

Figura 13- Altura das plantas aos 120 dias após o início da aplicação de ABA. Médias seguidas das mesmas letras não diferem pelo teste de tukey a 5%

Figura 14- Diâmetro do colmo aos 120 dias após o início da aplicação de ABA. Médias seguidas das mesmas letras não diferem pelo teste de tukey a 5%

A curva padrão de diluição do DNA de Lxx foi construída a partir de 1 ng/μL de DNA puro da bactéria, seguido de diluições (1:10) até 10^{-4} ng/μL (Figura 15). A relação entre diferentes concentrações de DNA de Lxx com valores de C_t foi altamente significativa ($R^2=0,988$) (Figura 16) e foi expressa pela equação (4):

$$y = -3,494x + 18,32 \quad (4)$$

Onde, y, correspondeu aos valores de C_t e x, correspondeu aos valores do Log da concentração de DNA (ng/μL) da Lxx.

Figura 15 - Curvas de amplificação (A) e de Dissociação (B) de reações de qPCR utilizando DNA de Lxx puro nas concentrações 1 ng/μL; 1×10^{-1} ng/μL; 1×10^{-2} ng/μL; 1×10^{-3} ng/μL e 1×10^{-4} ng/μL. Cada concentração foi testada em duplicata

Figura 16 - Correlação entre concentrações conhecidas de DNA de Lxx (1ng/μL; 1×10^{-1} ng/μL; 1×10^{-2} ng/μL; 1×10^{-3} ng/μL e 1×10^{-4} ng/μL) e valores de C_t . As reações de qPCR foram realizadas em duplicata para cada concentração de DNA de Lxx

Os resultados do efeito da aplicação exógena de ABA sobre a interação *Lxx* e cana estão apresentados por valores de *Ct* (*Threshold Cycle*) (Tabela 4; Figura 17A). Além disso, os valores de *Ct* foram transformados em logaritmo da concentração de DNA (ng/μL) (Figura 17B), através do auxílio da curva padrão de DNA puro de *Lxx* (Figura 16). Devido ter sido somado aos valores de Log uma constante (K=5), os resultados foram também apresentados em valores de concentração de DNA (ng/μL) (Tabela 4).

A primeira quantificação do título bacteriano foi realizada 60 dias após o plantio das gemas e antes da aplicação do ácido abscísico (ABA). Esse tempo foi denominado de tempo (T0). No tempo zero, o título bacteriano médio foi similar entre os dois tratamentos (Tabela 4). Trinta dias após o início das aplicações de ABA (T30), observou-se uma tendência de redução no título de *Lxx*, em relação à quantificação inicial, tanto nas plantas testemunhas, como nas que receberam ABA, contudo não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 4; Figura 17). Em concentração de DNA da bactéria propriamente dito, essa redução foi de 30% para as plantas tratadas com ABA e de 50% para as plantas testemunhas. Aos 60 dias após a primeira aplicação do ABA (T60), houve uma tendência a um ligeiro aumento no título de *Lxx* em ambos tratamentos, embora sem apresentar diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 4; Figura 17). Aos 90 dias após o início do tratamento (T90), foi o período em que ocorreu uma diferença de título de *Lxx* mais evidente entre os tratamentos, neste foi quantificado o dobro do título de *Lxx* presente nas plantas testemunhas em relação às tratadas com ABA, contudo devido ao alto desvio padrão entre as repetições, não foi possível detectar diferenças significativas entre os valores (Tabela 4; Figura 17).

Tabela 4 - Número de ciclos da reação de qPCR em tempo real em *Threshold Cycle* (*Ct*), após a aplicação do ABA na variedade suscetível ao RSD (CB 40-260). Valores de *Cts* foram transformados em concentração de DNA (ng/μL)

Tempo	Testemunha				ABA 100 μM			
	Ct	DP (Ct)	Concentração DNA (ng/ μL)	DP (ng)	Ct	DP (Ct)	Concentração DNA (ng/ μL)	DP (ng)
T0	26,64 Aa	2,36	1,1x10 ⁻² Aa	0,01	26,44 Aa	1,97	1,0x10 ⁻² Aa	0,001
T30	28,39 Aa	2,31	0,5x10 ⁻² Aa	0,0009	28,26 Aa	1,90	0,3x10 ⁻² Aa	0,0003
T60	27,72 Aa	1,38	0,4x10 ⁻² Aa	0,0003	27,49 Aa	1,32	0,4x10 ⁻² Aa	0,0003
T90	26,20 Aa	2,43	2,0x10 ⁻² Aa	0,002	27,78 Aa	2,80	1,0x10 ⁻² Aa	0,001

DP: Desvio Padrão

Para efeito da análise estatística os dados foram transformados, utilizando as transformações recomendadas pelo Box-Cox do programa R, as médias apresentadas são as originais.

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

Figura 17- Evolução do título de *Lxx* em plantas de cana da variedade CB 49-260, após a aplicação exógena de ABA (100µM), medidos através dos valores de *Ct* (A) e transformados em Log da concentração de DNA + 5 (B)

Para efeito da análise estatística os dados foram transformados, utilizando as transformações recomendadas pelo Box-Cox do programa R, as médias apresentadas são as originais.

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

4.4 Discussão

A ação do ABA na interação planta-patógeno é alvo de inúmeros estudos e conclusões contraditórias. Nesse sentido, destacam-se as evidências sobre a interferência deste hormônio na defesa do hospedeiro, como relatado em plantas de batata tratadas com o ABA - previamente à infecção com *Phytophthora infestans* ou *Cladosporium cucumerinum* - que resultou na inibição do acúmulo de fitoalexinas e redução da resistência aos patógenos (HENFLING et al., 1980). Também foi relatado efeito negativo do hormônio na defesa de *Arabidopsis* contra *P. syringae* pv. *tomato* (MELOTTO et al., 2006). Além disso, aplicações exógenas de ABA reprimiram a expressão da fenilalanina amônia -lyase (*PAL*), interferindo diretamente na defesa da planta contra o patógeno (FLORS et al., 2009). Ainda, uma única aplicação de ABA em plantas de tomate selvagens e plantas de tomate *sitiens* (mutantes deficientes em ABA) foi suficiente para torná-las mais suscetíveis a *Erwinia chrysanthemi* (ASSELBERGH et al., 2007). Desta forma, tem-se que em muitos dos exemplos encontrados na literatura, o ABA está apontado como fator de suscetibilidade, principalmente devido a interferência na regulação do acúmulo de ácido salicílico (SA), o qual está diretamente relacionado à resistência sistêmica adquirida (SAR) (FAN et al., 2009).

No presente estudo, o efeito da aplicação exógena de ABA ficou evidenciado pela diferença na altura e no diâmetro do colmo entre plantas tratadas e não tratadas com o hormônio. Estudos fisiológicos em plantas com alterações nos níveis hormonais, especialmente ABA e citocininas, demonstraram que a maior concentração desses hormônios de fato leva à redução de crescimento e da capacidade de captação de nutrientes, além de reduzir a taxa fotossintética (CHAPIN et al., 1987). Apesar do efeito negativo sobre as plantas, não foi verificado efeito da aplicação do hormônio na população bacteriana *in planta*. No entanto, pode-se inferir uma tendência de aumento no título da bactéria, muito embora não significativa, a partir de noventa dias após a primeira aplicação. Isso indica que, se períodos maiores de avaliações fossem realizados, possivelmente o efeito desse hormônio seria notado. O longo período necessário para ocorrerem alterações significativas no título de Lxx nas plantas submetidas aos tratamentos, pode estar associado ao hábito de crescimento fastidioso da bactéria (GILASPIE; TEAKLE, 1989). Além disso, foi observado alto desvio padrão entre repetições, dificultando uma interpretação precisa sobre o efeito do ABA no desenvolvimento da bactéria *in planta*.

Algumas hipóteses podem ser levantadas a fim de explicar estes resultados, dentre as quais estão as relacionadas ao método de aplicação do hormônio. Na interação videira e

Xylella fastidiosa, a maior eficiência do hormônio ocorreu pela aplicação por irrigação (MEYER; KIRKPATRICK, 2011). Porém, em um trabalho prévio no patossistema *Lxx* e cana-de-açúcar (dados não publicados), observou-se que as perdas da solução por drenagem eram altas, o que certamente limitou a disponibilidade do hormônio para a planta. Desta forma, para o presente trabalho decidiu-se pela pulverização foliar, método que também implica em perdas da solução durante a aplicação. Por esta razão, para tentar minimizar os efeitos da perda, foi aplicada uma dose elevada de ABA (100 μ M) (AUDENAERT et al., 2002) a fim de garantir que a planta absorvesse uma concentração elevada do hormônio. A aplicação semanal foi baseada em um trabalho que avaliou a interação entre tomate e fungos micorrízicos (HERRERA-MEDINA, et. al., 2007), deste modo, também não se sabe se o intervalo adotado foi o ideal para o patossistema em questão. Outra possibilidade de interferência nos resultados refere-se à relação entre o modo de ação do ABA e o patossistema envolvido. No caso de *Lxx*, que possui hábito de crescimento lento, decidiu-se por avaliações mensais, no entanto, este pode não ter sido o intervalo mais adequado. Há relatos que descrevem que dependendo do patógeno, os intervalos entre a aplicação do hormônio e a avaliação podem variar entre uma semana e 10 meses (MEYER; KIRKPATRICK, 2011).

A partir do pressuposto de que hormônios de plantas não interferem diretamente no desenvolvimento dos patógenos e sim modulam o balanço hormonal em seus hospedeiros, interferindo em sua defesa (ROBERT-SEILANIANZ et al., 2007), sugere-se que ensaios adicionais devam explorar diferentes genótipos de cana, métodos de aplicação do ABA e intervalos de avaliação. A possibilidade de essas variáveis terem influenciado os resultados do presente trabalho foi levanta com base em estudos que demonstraram que a regulação provocada pelo ABA na resposta à patógenos ou insetos, é altamente dependente da espécie da planta (FLORS et al., 2009), da concentração endógena do ABA, do período necessário para o patógeno causar doença (MOHR; CAHILL, 2003) e/ou do modo de vida do patógeno (ROBERT-SEILANIANZ et al., 2011). Além disso, outros fatores experimentais, podem também ter dificultado a interpretação dos resultados, como a variedade escolhida, a qual representa uma suscetível padrão a *Lxx*. Desta forma, no início do ensaio o título bacteriano já estava alto, assim, mesmo que o ABA favorecesse a colonização da *Lxx*, o aumento do título bacteriano poderia não ter sido expresso em seu potencial máximo, devido a saturação da população bacteriana já presente antes da aplicação do hormônio. Por outro lado, se uma variedade tolerante ou resistente ao raquitismo das soqueiras da cana fosse escolhida, haveria o risco de ocorrer baixa colonização de *Lxx*, podendo comprometer o ensaio.

4.5 Conclusões

- 1- Apesar do efeito do ABA no crescimento das plantas, não foram identificadas diferenças significativas na ação do hormônio sobre a cinética populacional da *Lxx in planta*, durante os tempos analisados;
- 2- A tendência à redução do título de Lxx após 90 dias do início do tratamento das plantas com ABA levantou a hipótese de que a presença do hormônio pode interferir no desenvolvimento da população de Lxx. Contudo ensaios adicionais devem ser realizados a fim de complementar os resultados obtidos nesse trabalho;
- 3- Em outros ensaios sugere-se que sejam avaliados, mais de uma variedade, diferentes doses do hormônio e intervalos de aplicação e avaliação superiores a 90 dias.

Referências

- ASSELBERGH, B.; CURVERS, K.; FRANCA, S.C.; AUDENAERT, K.; VUYLSTEKE, M.; VAN BREUSEGEM, F.; HOFTE, M. Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 144, p. 1863–1877, 2007.
- AUDENAERT, K.; GEERT, DE MEYER, G.B.; HOFTE, M.M. Absciscic acid determines basal susceptibility of tomato to botrytis cinerea and suppresses salicylic acid- dependent signaling mechanisms. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 128, p. 491–501, 2002.
- BAILEY, R.A.; BECHET, G.R. Effect of ratoon stunting disease on the yield and components of yield of sugarcane under rainfed conditions. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, v. 60, p. 143-147, 1986.
- BOSTOCK, R.M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 99-109, 1999.
- BRAVO, L.A.; ZUNIGA, G.E.; ALBERDI, M.; CARCUERA, L.S. The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation in barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 103, p. 17-23, 1998.
- BRAY, E.A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 103, p. 1035-1040, 1993.
- CASTRO, F.R.O.S.R. **Caracterização do efeito tóxico de extratos de culturas líquidas de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* na germinação de sementes de alface**. 2012. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- CHAPIN, F.S.; BLOOM, A.J.; FIELD, C.B.; WARING, R.H. Plant responses to multiple environmental factors. **Bio-Science**, Reston, v. 37, p. 49-57, 1987.

CHEN, T.H.H.; GUSTA, L.V. Absciscic acid-induced freezing resistance in cultured plant cells. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 73, p. 71-75, 1983.

DANNEBERG, G.; LATUS, Z.; ZIMMER, W.; HUNDESHAGEN, B.; SCHNEIDERPOETSCH, H.; BOTHE, H. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.). **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 141, p. 33-39, 1993.

DUNN, R.M.; HEDDEN, P.; BAILEY, J.A. A physiologically induced resistance of *Phaseolus vulgaris* to a compatible race of *Colletotrichum lindemuthianum* is associated with increases in ABA content. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 36, p. 339-349, 1990.

FAN, J.; HILL, L.; CROOKS, C.; DOERNER, P.; LAMB, C. Absciscic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 150, p. 1750-1761, 2009.

FERREIRA, D.F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2000. 66 p.

FLORS, V.; TON, J.; MAUCH-MANI, B. Role of absciscic acid in disease resistance. In: YOSHIOKA, K.; SHINOZAKI, K (Ed.). **Signal crosstalk in plant stress responses**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2009. p. 1-17.

FLORS, V.; TON, J.; JAKAB, G.; MAUCHI-MANI, B. Absciscic acid and callose: team players in defence against pathogens? **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, p. 377-383, 2005.

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, n. 4, p. 1222-1226, jul. 2009.

GILLASPIE, A.G.; TEAKLE, D.S. Ratton stunting disease. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T. JR.; GILLASPIE, A.G.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of sugarcane**. New York: Elsevier Science, 1989.v. 1, p. 59-80.

HENFLING, J.W.D.M.; BOSTOCK, R.; KUC, J. Effects of absciscic acid on rishitin and lubimin accumulation and resistance to *Phytophthora infestans* and *Cladosporium cucumerinum* in potato tuber tissue slices. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, p. 1074-1078, 1980.

HERRERA-MEDINA, M.J.; STEINKELLNER, S.; VIERHEILIG, H.; BOTE, J.A.O.; GARRIDO, J.M.G. Absciscic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. **New Phytologist**, Cambridge, v. 175, p. 554-564, 2007.

KETTNER, J.; DÖRFFLING, K. Biosynthesis and metabolism of absciscic acid in tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. **Planta**, Berlin, v.196, p. 627-634, 1995.

McDONALD, K.L.; CAHILL, D.M. Influence of abscisic acid and the abscisic acid biosynthesis inhibitor, norflurazon, on interactions between *Phytophthora sojae* and soybean (Glycine max). **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 651–658, 1999.

MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; KOCZAN, J.; NOMURA, K.; HE, S.Y. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell**, Cambridge, v. 126, p. 969–980, 2006.

MEYER, M.M.; KIRKPATRICK, B.C. Exogenous applications of abscisic acid increase curing of Pierce's disease-affected grapevines growing in pots. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, p. 173-177, 2011.

MOHR, P.G.; CAHILL, D.M. Absciscic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Peronospora parasitica*. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 30, p. 461-469, 2003.

MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; CAMARGO, L.E.A.; VAN SLUYS, M.A.; KITAJIMA, J.P.; TRUFFI, D.; AMARAL, A.M.; HARAKAVA, R.; OLIVEIRA, J.C.F.; WOOD, D.; OLIVEIRA, M.C.; MIYAKI, C.; TAKITA, M.A.; SILVA, A.C.R.; FURIAN, L.R.; CARRARO, D.M.; CAMAROTTE, G.; ALMEIRA JR., 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.; DE SOUZA, A.A.; TSAI, S.M.; ZANCA, A.S.; SIMPSON, A.J.G.; BRUMBLEY, S.M.; SETÚBAL, J.C. (2004) Genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, p. 827-836, 2004.

ROBERT-SEILANIAN, A.; NAVARRO, L.; BARI, R.; JONES, J.D.G. Pathological hormone imbalances. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, p. 372–379, 2007.

ROBERT-SEILANIAN, A.; GRANT, M.; JONES, J.D.G. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 317–343, 2011.

ROSSLER, L.A. The effects of ratoon stunting disease on three sugarcane varieties under different irrigation regimes. **Proceedings International Society Sugar-cane Technologists**, Baton Rouge, v. 15, p. 483-496, 1974.

SALT, S.D.; TUZUN, S.; KUC, J. Effects of β -ionone and abscisic acid on the growth of tobacco and resistance to blue mold: mimicry of effects of stem infection by *Peronospora tabacina* Adam. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Berlin, v. 28, p. 287–297, 1986.

SCARPARI, M.S.; BEAUCLAIR, E.G.F. Anatomia e botânica. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p. 45-56.

STEADMAN, J.R., SEQUEIRA, L. Absciscic acid in tobacco plants: tentative identification and its relation to stunting induced by *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 45, p. 691–697, 1970.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, Paris, v. 75, p. 687–706, 1993.

WHENHAM, R.J.; FRASER, R.S.S.; BROWN, L.P.; PAYNE, J.A. Tobacco mosaic virus-induced increase in absciscic acid concentration in tobacco leaves: intracellular location in light and darkgreen areas, and relationship to symptom development. **Planta**, Berlin, v. 168, p. 592–598, 1986.

ZHANG, J.; JIA, W.; ZHANG, D. Export and metabolism of xylem delivered ABA in attached maize leaves under different transpiration fluxes and xylem ABA concentration. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p. 1557–1564, 1997.