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

**Raquitismo da soqueira de cana-de-açúcar: transmissão do
patógeno via sementes e avaliação quantitativa de seu controle
através da termoterapia de toletes**

Thaís Galhardo Egreja Ribeiro da Silva

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

**Piracicaba
2013**

Thaís Galhardo Egreja Ribeiro Da Silva
Engenheira Agrônoma

Raquitismo da soqueira de cana-de-açúcar: transmissão do patógeno via sementes e avaliação quantitativa de seu controle através da termoterapia de toletes

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

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

Piracicaba
2013

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

Silva, Thaís Galhardo Egreja Ribeiro da

Raquitismo da soqueira de cana-de-açúcar: transmissão do patógeno via sementes e avaliação quantitativa de seu controle através da termoterapia de toletes / Thaís Galhardo Egreja Ribeiro da Silva. - - Piracicaba, 2013.

51 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar 2. Sementes 3. Termoterapia 4. PCR em tempo real I. Título

CDD 633.61
S586r

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

Dedicatória

Ao meu avô Sylvestre Egreja, exemplo de vida.

À minha Mãe, Regina, e à minha irmã, Bruna, por todo amor.

Ao meu namorado, Felipe, pelo incentivo, paciência e amor.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela estrutura concedida para a minha formação.

Ao Professor e Orientador Luis Eduardo Aranha Camargo, pela dedicação, excelente orientação, ensinamentos e principalmente pela oportunidade em realizar este trabalho.

À toda minha família, em especial ao Henrique e a minha Avó Olga, pelo amor, apoio e dedicação.

À toda equipe do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) pelo apoio incondicional na realização deste trabalho, em especial, à Cassiara, Noemia e Sydnei.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia por toda ajuda, em especial, à Fabiana Wolak, que estava sempre pronta a ajudar.

Aos colegas do Departamento pelo companheirismo nas horas de estudo.

Aos queridos amigos do LGM: Aline Zavaglia, Débora Wassano, Fernanda Moretti, Giselle de Carvalho, Jerônimo Araújo, Leandro Dallagnol, Máisa Curtolo, Mariana Cicarelli, Raphael Severo, Rafael Popin e Thayne Munhoz por toda ajuda nos momentos difíceis, discussões e também pelos momentos de descontração.

Aos queridos amigos da graduação: Manuela Franchin, João Pedro dos Santos, Felipe Silvestre e Marcela Traldi pelo apoio.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na execução deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos para a realização do meu Mestrado.

Muito obrigada!

"Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer."

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
Referências.....	18
2 TRANSMISSÃO DE <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> VIA SEMENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	21
Resumo.....	21
Abstract.....	21
2.1 Introdução.....	22
2.2 Desenvolvimento.....	23
2.2.1 Material e métodos.....	23
2.2.1.1 Material vegetal.....	23
2.2.1.2 Preparo das amostras de sementes.....	23
2.2.1.3 Preparo das plântulas.....	24
2.2.1.4 Extração do DNA genômico de sementes e folhas dos genitores e das plântulas.....	24
2.2.1.5 Quantificação de Lxx por qPCR nos genitores, sementes e plântulas.....	24
2.2.1.6 Isolamento de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	25
2.2.1.7 PCR convencional e eletroforese em gel de agarose.....	26
2.2.2 Resultados.....	26
2.2.2.1 Curva Padrão.....	26
2.2.2.2 Genitores.....	27
2.2.2.3 Sementes.....	29
2.2.2.4 Quantificação de Lxx em plântulas aos 90 dias.....	30
2.2.2.5 Isolamento de Lxx de plantas.....	32
2.2.3 Discussão.....	33
2.3 Conclusões.....	35
Referências.....	35
3 CONTROLE DE <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR ORIUNDAS DE TOLETES SUBMETIDOS A TRATAMENTO TÉRMICO AVALIADO POR PCR QUANTITATIVO.....	39
Resumo.....	39

Abstract.....	39
3.1 Introdução.....	40
3.2 Desenvolvimento.....	42
3.2.1 Material e métodos.....	42
3.2.1.1 Material vegetal.....	42
3.2.1.2 Ensaio de avaliação da termoterapia.....	42
3.2.1.3 Quantificação de Lxx por qPCR.....	43
3.2.1.4 Análises estatísticas.....	44
3.2.2 Resultados.....	44
3.2.3 Discussão.....	47
3.3 Conclusões.....	49
Referências.....	49

RESUMO

Raquitismo da soqueira de cana-de-açúcar: transmissão do patógeno via sementes e avaliação quantitativa de seu controle através da termoterapia de toletes

Devido à sua múltipla utilidade, a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é amplamente cultivada em mais de 127 países tropicais e subtropicais. No Brasil, a cultura apresentou expansão em área plantada nos últimos anos em virtude da crescente demanda por biocombustíveis. Porém, a produção de mudas sadias tende a ser um fator limitante a este aumento de demanda, já que diversas doenças são transmitidas por toletes contaminados. Dentre estas, destaca-se o raquitismo da soqueira (RSD), causado pela bactéria fastidiosa *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) (KAO e DAMANN, 1980). De acordo com a literatura, a transmissão de Lxx se dá através de toletes contaminados e/ou instrumentos de corte, não havendo relatos sobre sua transmissão por sementes. Desta forma, seu controle se baseia no princípio da exclusão, através do uso de toletes tratados termicamente como fonte de material propagativo. Porém, não se conhece o efeito do tratamento no título de Lxx, uma vez que os relatos de eficiência da termoterapia baseiam-se em avaliações qualitativas. Em face destas informações, este estudo objetivou avaliar a transmissão de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* por sementes e também quantificar o efeito da termoterapia no título de Lxx em duas variedades de cana-de-açúcar através da PCR quantitativa em tempo real. No ensaio de transmissão via sementes, a bactéria foi detectada em altas incidências (>87%) em plantas de 90 dias oriundas de sementes coletadas de plantas infectadas e em quantidades estimadas superiores a 51 células por 100ng de DNA total de sementes. Além disso, aos 270 dias após o plantio, a bactéria foi isolada de 6 plantas. A identidade das colônias foi comprovada através de PCR convencional utilizando *primers* específicos para Lxx. Dois ensaios foram conduzidos para quantificar o efeito da termoterapia na população bacteriana. O título de Lxx foi determinado em folhas de plantas de duas variedades de cana-de-açúcar oriundas de toletes tratados termicamente ou não aos 90 dias após o plantio. O título inicial presente nos colmos utilizados como fonte de toletes interferiu na eficiência do tratamento, que reduziu a população bacteriana somente no ensaio onde os colmos apresentaram elevado título bacteriano inicial. Além disso, 70 e 55% das plantas oriundas de toletes tratados termicamente no primeiro e no segundo ensaio, respectivamente, apresentavam células de Lxx, porém em menores quantidades quando comparadas a plantas oriundas de toletes não tratados. Com isso, conclui-se que Lxx é transmitida em elevada frequência via sementes e a termoterapia, embora não tenha efeito erradicante pronunciado, é capaz de reduzir o título bacteriano no tecido vegetal.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Sementes; Termoterapia; PCR em tempo real

ABSTRACT

Ratoon stunting disease of sugarcane: seed transmission of the pathogen and quantitative evaluation of its control through heat treatment of setts

Due to its multiple uses, sugarcane (*Saccharum* spp.) is widely cultivated in more than 127 tropical and subtropical countries. In Brazil, sugarcane cropping has increased in recent years because of the growing demand for biofuels. However, the production of healthy seedlings tends to be a limiting factor to this increase, since contaminated setts transmit many diseases. Among these, the Ratoon Stunting Disease (RSD) is a major disease caused by the fastidious bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) (KAO and DAMANN, 1980). According to the literature, the transmission of Lxx occurs through contaminated setts and/or cutting tools, but there are no reports of its transmission by seeds. Therefore, its control is based on the principle of exclusion using heat-treated setts as source of propagative material. However, the quantitative effect of the treatment on the bacterial titer is not known, since reports of thermotherapy efficiency are based on qualitative assessments. This study aimed to evaluate the transmission of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by seeds and to quantify the effect of thermotherapy on Lxx in two sugarcane varieties using real-time quantitative PCR. In the test of disease transmission by seeds, the bacterium was detected in high incidences (>87%) in 90-day old plants generated from seeds collected from infected plants in quantities exceeding 51 cells per 100ng of total DNA of seeds. In addition, at 270 days after planting, the bacterium was isolated from six plants. The colony identity was confirmed by conventional PCR using Lxx-specific primers. Two trials were conducted to quantify thermotherapy effect on bacterial population. Lxx titers were determined 90 days after planting in plant leaves of two sugarcane varieties originated from setts subjected or not to heat-treatment. The initial bacterial titer in the stalks affected the treatment efficiency, which significantly reduced Lxx titers only in the trial where the stalks presented high initial bacterial levels. Moreover, 70 and 55% of the plants originated from heat-treated setts in the first and second tests, respectively, were infected with Lxx, cells; however, in smaller amounts compared to plants from untreated setts. Thus, it is concluded that Lxx is transmitted in high frequency by seeds and that the thermo treatment, although not efficient as an eradicating treatment, reduces the bacterial population in the plant tissue.

Keywords: Sugarcane; Seeds; Thermotherapy; Real time PCR

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma estimativa de produção para a safra 2013/2014 de, aproximadamente, 654 milhões de toneladas, o que representa um aumento de 11% em relação à safra de 2012/13. Também para a safra de 2013/2014, estima-se um aumento de 4,8% na área plantada, equivalente a 408 mil hectares (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013). O Centro-Sul deverá ter um incremento de 489 mil hectares e a região Norte/Nordeste 13 mil hectares. Já em áreas de renovação, há previsão de estas alcançarem 968 mil hectares, com destaque para os estados de São Paulo, Paraná, Goiás e Minas Gerais que, juntos, devem responder por 718 mil hectares (CONAB, 2013). No total, a área cultivada estimada para a safra 2013/2014 pode chegar a quase 9 milhões de hectares.

Porém, para que a produção nestas áreas em expansão e de renovação seja viável, é necessário o desenvolvimento de novas variedades, adaptadas as novas fronteiras agrícolas, que sejam mais produtivas e resistentes a pragas, doenças e outras adversidades. Também se deve utilizar material propagativo (toletes) sadio para o plantio, dado que doenças como mosaico (*Sugarcane mosaic virus*), escaldadura (*Xanthomonas albilineans*) e carvão (*Sporisorium scitamineum*) são algumas das enfermidades que podem ser transmitidas através de toletes provenientes de plantas contaminadas (SUMMERS; BRANDES; RANDS, 1948; RICAUD; RYAN, 1989; FERREIRA; COMSTOCK, 1989).

Além das citadas acima, outra doença transmitida por material propagativo é o raquitismo da soqueira (RSD). Esta é uma das doenças mais difundidas nas regiões canavieiras (DAVIS; BAILEY, 2000), acarretando danos superiores a 30% na produtividade (YOUNG et al., 2006). Na África do Sul, segundo Bailey e Bechet (1997), as perdas variaram de 1 a 41%, ao passo que na Austrália houve queda de produtividade de 12 a 37% (YOUNG; BRUMBLEY, 2004). Já nos Estados Unidos, segundo ensaio realizado por Grisham, Johnson e Viator (2009), variedades suscetíveis ao RSD apresentaram redução de 24% na produção de colmos e de sacarose.

A primeira descrição do RSD se deu em Queensland, na Austrália, em 1944 (JAMES, 1996; BRUMBLEY et al., 2006). Em 1989, ou seja, 45 anos após a sua primeira constatação, o RSD já havia sido relatado em 61 países. No Brasil, a

doença foi constatada pela primeira vez em Campos dos Goytacazes (RJ), em 1956 (VEIGA, 1956). O RSD é causado por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, uma bactéria fastidiosa, gram-positiva, não móvel, aeróbia obrigatória e que coloniza o xilema. O gênero pertence ao filo Actinobacteria, ordem Actinomycetales e família Microbacteriaceae. Suas células são corineformes e medem de 0,25-0,5 µm por 1-4 µm (TEAKLE; SMITH; STEINDK, 1973). As colônias apresentam aspecto circular não pigmentado, com diâmetro variando de 0,1 a 0,3 mm em meio de cultura SC (DAVIS et al., 1984).

Os sintomas externos da doença compreendem crescimento irregular, caracterizado por subdesenvolvimento da planta e encurtamento dos colmos. Já os internos ocorrem na forma de pontuações ou vírgulas avermelhadas logo abaixo dos nós, decorrentes da deposição de gomas ou formação de tiloses nos feixes do xilema, e também pela coloração rósea nos nós imaturos, próximo ao meristema apical (STEINDL, 1961). Porém, estes sintomas não são indicadores exclusivos do RSD, uma vez que outros patógenos, como *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum falcatum*, *Xanthomonas albilineans*, *X. campestris* pv. *vasculorum* e *Erwinia herbicola*, também podem provocar esta alteração na coloração dos feixes (RICAUD, 1974).

A ausência de sintomas característicos e a forma de propagação da cana-de-açúcar constituem os principais fatores de disseminação do RSD (GILLASPIE; TEAKLE, 1989). Isso porque a transmissão da bactéria ocorre por estacas ou colmos-sementes provenientes de plantas doentes e também pelo contato dos instrumentos de corte com o fluido vascular de plantas infectadas durante a colheita. Não havendo nenhum relato na literatura sobre a transmissão da bactéria via sementes de cana-de-açúcar, um dos objetivos deste trabalho foi verificar se Lxx também pode ser transmitida por sementes, justificado pelo aumento do trânsito deste material propagativo entre programas de melhoramento genético em função das restrições impostas ao uso de toletes.

Baseando-se nos modos de transmissão de Lxx, o controle do RSD tem sido realizado através de métodos baseados no princípio da exclusão, ou seja, no uso de material propagativo sadio e de instrumentos de corte desinfestados, especialmente quando usados em campos de propagação de material (viveiros). A desinfestação destes instrumentos se dá pela utilização de amônia quaternária, solução de ácido cresílico e etanol 50% (STEINDL, 1961; GILLASPIE; TEAKLE, 1989) ou através do

calor. No caso do tratamento de material propagativo, este é realizado através da termoterapia, onde os toletes permanecem imersos em água por 2h a 50,5°C (DAMANN; BENDA, 1983) ou por 30min a 52°C (COPERSUCAR, 1989). Porém, a termoterapia nos toletes não é 100% eficaz, uma vez que a temperatura utilizada está próxima tanto da capacidade de sobrevivência da bactéria como do ponto de morte térmica das gemas da cana-de-açúcar (JAMES, 1996).

Diante destas dificuldades de controle de Lxx, torna-se necessária a adoção de métodos sensíveis e confiáveis para diagnosticar e quantificar a bactéria a partir de amostras de cana-de-açúcar. Diversas técnicas vêm sendo empregadas para o diagnóstico do RSD e ainda não existe um consenso sobre o melhor método, pois a eficiência depende da distribuição e concentração da bactéria na planta, da urgência nos resultados, da quantidade de amostras, bem como da disponibilidade de equipamentos e mão de obra qualificada (GRISHAM, 2004).

Os métodos mais utilizados incluem microscopia de contraste de fase (GILLASPIE; DAVIS; WORLEY, 1973) e *dot-blot enzyme immunoassay* (DB-EIA) (HARRISON; DAVIS, 1988). No entanto, estas técnicas não possuem sensibilidade suficiente para detectar o patógeno quando presente em baixo título em tecidos vegetais (LÓPEZ et al., 2009). Com isso, métodos moleculares como a PCR convencional foram desenvolvidos utilizando *primers* específicos para Lxx (PAN et al., 1998), permitindo assim a detecção precoce do patógeno (IGLESIA, 2003). No entanto, a PCR, apesar de sensível, não fornece dados quantitativos da presença do patógeno no material vegetal.

Neste sentido, a técnica da PCR em tempo real vem sendo cada vez mais utilizada para o diagnóstico e quantificação de fitopatógenos por ser mais sensível e por possibilitar a quantificação do patógeno a partir de uma relação entre valores de Ct (*cycle threshold*) e de quantidades conhecidas de massas de DNA do organismo alvo (D'HAENE; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010). Com isso, outro objetivo deste trabalho foi quantificar o efeito da termoterapia no título de Lxx em variedades de cana-de-açúcar com diferentes níveis de resistência ao RSD através desta metodologia.

Referências

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

BRUMBLEY, S.M.; PETRASOVITS, L.A.; HERMANN, S.R.; YOUNG, A.J.; CROFT, B.J. Recent advances in the molecular biology of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease. **Australian Plant Pathology**, Queensland, v. 35, p. 681-689, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar: safra 2013/2014: segundo levantamento (Agosto/2013)**. Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2013.

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

DAVIS, M.J.; BAILEY, R.A. Ratoon stunting. In: ROTT, P., BAILEY, R.A.; COMSTOCK, J.C.; CROFT, B.J.; SAUMTALLY, A.S. (Ed.). **A guide to sugarcane diseases**. Montpellier: CIRAD; ISSCT, 2000. p. 49-54.

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

D'HAENE, B.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. **Methods**, San Diego, v. 50, p. 262-270, 2010.

FERREIRA, S.A.; COMSTOCK, J.C. Smut. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE, A.G. JR.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of sugarcane: major diseases**. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. p. 211–229.

GILLASPIE, A.G.; TEAKLE, D.S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE, A.G.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of sugarcane: major diseases**. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. p. 58-80.

GILLASPIE, A.G.; DAVIS, R.E.; WORLEY, J.E. Diagnosis of ratoon stunting disease based on the presence of specific microorganisms. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 57, p. 987-990, 1973.

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

HARRISON, N.A.; DAVIS, M.J. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p. 722-727, 1988.

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

JAMES, G. A review of ratoon stunting disease. **International Sugar Journal**, London, v. 98, n. 1174, p. 532-541, 1996.

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

PAN, Y.B.; GRISHAM, M.P.; BURNER, D.M.; DAMANN, K.E. JR.; 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.

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

RICAUD, C.; RYAN, C.C. Leaf scald. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE, A.G. JR.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of sugarcane**: major diseases. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. p. 39-58.

STEINDL, D.R.L. Ratoon stunting disease. In: MARTIN, J.P.; ABBOTT, E.V.; HUGUES, C.G. (Ed.). **Sugar cane disease of the world**. Amsterdam: Elsevier Science, 1961. v. 1, p. 433-459.

SUMMERS, E.M.; BRANDES, E.W.; RANDS, R.D. **Mosaic of sugarcane in the United States, with special reference to strains of the virus**. Washington: USDA, 1948. 124 p. (Technical Bulletin, 955).

TEAKLE, D.S.; SMITH, P.M.; STEINDK, D.R.L. Association of a small corynebacterium with the ratoon stunting disease of sugarcane. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 24, p. 869-874, 1973.

VEIGA, F.M. Notas sobre o raquitismo das socas em Campos. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 1, p. 81-83, 1956.

YOUNG, A.J.; BRUMBLEY, S.M. Ratoon stunting disease: history, management and current research. In: RAO, G.P.; SAUMTALLY, A.S.; ROTT, P. **Sugarcane pathology**. Enfield: Science Publ., 2004. v. 3: Bacteria and nematode diseases, p. 97–124.

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 (*Saccharum* interspecific hybrids). **Australasian Plant Pathology**, Queensland, v. 35, p. 503–511, 2006.

2 TRANSMISSÃO DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* VIA SEMENTES DE CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

A transmissão da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), agente causal do raquitismo da soqueira (RSD) em cana-de-açúcar, dá-se através do uso de toletes contaminados como material propagativo e por instrumentos de corte durante a colheita. Na atualidade, a restrição fitossanitária imposta ao trânsito de toletes pela possibilidade de veicularem vários patógenos levou a um aumento no intercâmbio de sementes entre programas de melhoramento por estas serem consideradas isentas dos mesmos. No entanto, não há relatos que atestem a não transmissão de Lxx por sementes. Desta forma, a presença de Lxx em sementes oriundas de três cruzamentos controlados entre variedades suscetíveis e sua transmissão às plântulas foi avaliada por meio de PCR em tempo real (qPCR) e confirmada por isolamento em meio de cultivo. A presença da bactéria foi analisada em folhas dos genitores dos cruzamentos, em sementes F₁ de cada cruzamento e ainda em folhas de plântulas F₁ aos 90 dias após a semeadura por PCR em tempo real. Além disso, aos 270 dias procedeu-se o isolamento da bactéria a partir de fluido vascular e de folhas de 30 plantas. Todos os genitores e as amostras de sementes testaram positivos para a bactéria. A incidência da bactéria em plântulas variou de 87 a 94%, enquanto que o número médio de células de Lxx variou de 51 a 67 células em 100ng de DNA total. A bactéria foi isolada de 6 das 30 plantas analisadas e a identidade das colônias foi confirmada por PCR concêntrico usando *primers* específicos. Conclui-se que Lxx é transmitida por sementes em elevada frequência, podendo ser detectada já aos 90 dias por qPCR em plântulas.

Palavras-chave: Doença; Raquitismo; Detecção; PCR em tempo real

Abstract

The transmission of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), causal agent of ratoon stunting disease (RSD) in sugarcane occurs through the use of contaminated setts as planting material and of cutting tools during harvest. Currently, the phytosanitary restriction imposed to the transport of setts due to the possibility of transmitting several pathogens led to an increase of exchange of seeds among breeding programs once seeds are considered pathogen-free. However, there are no reports confirming the non transmission of Lxx by seeds. Therefore, the presence of Lxx in seeds originating from three controlled crosses of susceptible varieties and its transmission to seedlings was assessed using real-time PCR (qPCR) and confirmed by isolation in growth medium. The presence of the bacterium was analyzed in leaves of parental plants, in F₁ seeds from each crossing and in leaves of F₁ seedlings 90 days after sowing by real-time PCR. In addition, isolation of Lxx was attempted from leaves and vascular fluid of 30 plants at 270 days after sowing. All the parental plants and seed samples tested positive for Lxx. The incidence of the bacterium in seedlings ranged from 87 to 94%, while the average number of Lxx cells ranged from 51 to 67 cells in 100ng of total DNA. The bacterium was isolated from six out of 30 plants analyzed and the identity of the colonies was confirmed by conventional PCR using specific *primers*. It is concluded that Lxx is transmitted by

seeds in high frequency and can be detected in seedlings at 90 days after planting by qPCR.

Keywords: Disease; Ratoon stunting disease; Detection; Real time PCR

2.1 Introdução

O raquitismo da soqueira, causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é uma das doenças da cana-de-açúcar mais difundidas nas regiões produtoras (DAVIS; BAILEY, 2000), acarretando danos superiores a 30% na produtividade (YOUNG et al., 2006). Sua primeira descrição se deu em Queensland, na Austrália, em 1944 (JAMES, 1996; BRUMBLEY et al., 2006) e, em 1989, a doença já havia sido relatada em 61 países. No Brasil, a doença foi constatada pela primeira vez em Campos dos Goytacazes (RJ), em 1956 (VEIGA, 1956). Dentre os fatores que contribuíram para sua ampla disseminação estão a ausência de sintomas característicos bem como a forma de propagação da cana-de-açúcar através de toletes (GILLASPIE; TEAKLE, 1989). Como sintomas externos pode-se citar o subdesenvolvimento da planta e encurtamento dos colmos (KAO; DAMANN, 1980) e os internos ocorrem na forma de pontuações ou vírgulas avermelhadas logo abaixo dos nós (STEINDL, 1961).

Leifsonia xyli subsp. *xyli* é uma bactéria fastidiosa, gram-positiva, imóvel, aeróbia obrigatória e que coloniza o xilema. Apresenta restrita gama de hospedeiros e é capaz de sobreviver de dois a três meses em solo após a destruição de touceiras infectadas (BAILEY; TOUGH, 1992). De acordo com a literatura, sua transmissão ocorre por estacas ou colmos-sementes provenientes de plantas doentes e também através do contato dos instrumentos de corte com o fluido vascular de plantas infectadas durante a colheita. Desta forma, o uso de material propagativo sadio torna-se extremamente importante como medida de controle de Lxx. No caso de toletes, isto pode ser obtido através do tratamento térmico de toletes ou obtenção *in vitro* de matrizes isentas do patógeno (HOY et al., 2003),

Até o presente, não há relatos de transmissão de Lxx por sementes (MAROON-LANGO et al., 2013). Muito embora este material não seja usado para fins de multiplicação comercial, o estudo da possibilidade de transmissão desta bactéria por este material é interessante não só em função da necessidade de uma melhor compreensão da biologia e da relação deste patógeno pouco estudado com

seu hospedeiro, como também pelo crescente intercâmbio de sementes entre programas de melhoramento como alternativa ao movimento de toletes, por estas serem consideradas mais seguras do ponto de vista fitossanitário (MAROON-LANGO et al., 2013).

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e métodos

2.2.1.1 Material vegetal

Três lotes de sementes de cana-de-açúcar foram obtidos de três cruzamentos recíprocos controlados, denominados 1402, 1404 e 1407, respectivamente, entre as variedades comerciais suscetíveis ao RSD CTC13 x CTC8, CTC19 x CTC9 e CTC11 x CTC20. Para cada cruzamento foram utilizados dois colmos de cada genitor oriundos da mesma touceira, totalizando quatro genitores, sendo dois utilizados como receptores e dois como doadores de pólen. Cada lote de sementes foi dividido em duas amostras, uma para quantificação de Lxx por qPCR em sementes e outra para plantio em substrato estéril e germinação em casa-de-vegetação para avaliação de plântulas aos 90 dias após a semeadura. Tecido vegetal das folhas +1 dos genitores e de plântulas, numeradas de acordo com o sistema de Kuijper (DILLEWIJN, 1952), foi coletado para análise da presença de Lxx por qPCR conforme descrito abaixo.

2.2.1.2 Preparo das amostras de sementes

Três amostras contendo 100 mg de sementes foram extraídas de cada lote e analisadas para a presença de Lxx. As glumas I e II foram cuidadosamente retiradas de modo a obter cariopses nuas, evitando assim a contaminação externa por microrganismos (MAROON-LANGO et al., 2013).

2.2.1.3 Preparo das plântulas

Cerca de 250 sementes de cada cruzamento foram semeadas individualmente em tubetes de 187,5 mL contendo substrato esterilizado Plantmax (Eucatex, São Paulo) acondicionados em bandejas para mudas de 32 células (Nutriplan, Cascavel, PR). As bandejas permaneceram em casa-de-vegetação com cobertura plástica e antessala com tela anti-afídeos. Além disso, pulverizações periódicas foram realizadas com inseticidas de amplo espectro de ação. Aos 90 dias após a semeadura, folhas +1 de 100 plântulas foram coletadas e analisadas por qPCR conforme metodologia descrita abaixo.

2.2.1.4 Extração do DNA genômico de sementes e folhas dos genitores e das plântulas

A extração do DNA de folhas e de sementes seguiu protocolo modificado de Pospiech e Neuman (1996). Foi adicionada uma etapa inicial de preparo da amostra, onde cerca de 100 mg de material vegetal foram macerados em almofariz na presença de nitrogênio líquido e transferidos para um microtubo de 1,5 mL. Em seguida, as amostras foram lavadas por duas vezes com 500µL de solução de NaCl 1M preparada em tampão T₁₀E₁₀ (10mM Tris / 10mM EDTA – pH=8,0) seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 5 min. Além disso, ao final do protocolo foi adicionada uma extração com CTAB (AUSUBEL et al., 1987) e o precipitado foi seco em estufa por 30 min a 37°C e ressuspendido em 40µL em água ultrapura estéril contendo 100µg/mL de RNase no caso de amostras de folhas e 10mg/mL no caso de sementes. Após a digestão, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Hudson, NH) e sua integridade checada em gel de agarose a 1%.

2.2.1.5 Quantificação de Lxx por qPCR nos genitores, sementes e plântulas

As reações foram realizadas em termociclador 7500 FAST (Applied Biosystems, Foster City, CA). Foi utilizado o par de *primers* específicos para Lxx, 12950F1/R1, desenvolvido por Carvalho (2012). A metodologia utilizada para preparar as reações de amplificação foi a recomendada no manual de instruções do kit Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA). As reações foram realizadas em um volume de 25µL utilizando as concentrações finais de 1X de tampão de amplificação SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,2µM de

cada *primer* 12950F1/R1 e 0,2 μ M do padrão interno de fluorescência ROX. O volume de DNA utilizado foi de 2 μ L, sendo que para a detecção em DNA de sementes e folhas de cana-de-açúcar foram utilizados 100ng de DNA total. Uma curva padrão que relaciona valores de Ct (cycle threshold) com diferentes concentrações de DNA de Lxx foi obtida utilizando 10ng 1ng 0,1ng 0,01ng e 1pg por reação. Levando em consideração as massas moleculares dos quatro nucleotídeos e a massa total do genoma de Lxx (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004), é possível estabelecer uma relação entre diferentes massas de DNA e os valores de Ct (Threshold Cycle). Desta forma, é possível estimar a quantidade de células bacterianas presentes nas amostras de DNA. O programa de amplificação consistiu de um ciclo inicial a 50⁰C por 2min e um ciclo à 95⁰C por 5min seguidos de 40 ciclos à 95⁰C por 10s e 62⁰C por 30s. A curva de dissociação foi calculada de acordo com os parâmetros *default* do equipamento.

2.2.1.6 Isolamento de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Tentativas de isolamento de Lxx se deram a partir de folhas +1 e de colmos coletados aos 270 dias após a semeadura de 30 plantas escolhidas por apresentarem títulos elevados de Lxx conforme determinado por qPCR aos 90 dias. As folhas foram cortadas em pedaços de 5 cm e desinfestadas por uma lavagem em álcool 70% por 1min, hipoclorito 10% por 1min e três lavagens em água destilada. Após isto, as folhas foram cortadas em fragmentos menores com auxílio de lâminas estéreis em 10mL de NaCl 100mM estéril, obtendo assim uma suspensão bacteriana. Já os colmos foram desinfestados por lavagem com sabão e água corrente, álcool 70% e hipoclorito 10%, descascados com lâminas estéreis e colocados em tubo falcon de 50mL para extração do fluido vascular por centrifugação durante 5min a 3.000rpm. As suspensões obtidas das folhas e do fluido vascular foram transferidas para béqueres estéreis e filtradas com micro filtro de seringa com membrana de 0,45 μ m Millex (Millipore, Billerica, MA) diretamente em placas de petri contendo 20mL de meio sólido MSC New (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004) adicionado de 20 μ g/mL de ácido nalidíxico (BRUMBLEY et al., 2002). As placas permaneceram em estufa a 28⁰C durante 4 semanas. A confirmação da identidade das colônias foi feita por PCR convencional com *primers* específicos de Lxx descritos abaixo. Para isso, com o auxílio de uma alça de inoculação, as placas do isolamento das folhas e fluido que apresentavam colônias diminutas,

homogêneas, características de Lxx, foram raspadas e suspendidas em 50µL de NaCl estéril a 100mM.

2.2.1.7 PCR convencional e eletroforese em gel de agarose

Reações de PCR convencional foram realizadas para as amostras de tecido dos genitores e também para a confirmação da identidade das colônias oriundas do isolamento das folhas e fluido das plantas aos 270 dias após a semeadura. Nestas reações foram utilizados dois pares de *primers* específicos para Lxx, sendo o par 12950F1/R1 desenvolvido por Carvalho (2012) e o par 202F/331R desenvolvido por Grisham, Pan e Richard Jr. (2007). As reações foram realizadas em um volume de 25µL utilizando as concentrações finais de 1X de PCR Master Mix (Promega, Madison, WI), 0,25µM de cada *primer* e 2µL de solução 50ng/µL de DNA extraído de material vegetal ou ainda 2µL da suspensão de colônias bacterianas. O programa de amplificação, para ambos os *primers*, consistiu de uma desnaturação inicial de 5min a 95°C, seguida de 40 ciclos a 95°C por 10s, a 60°C por 30s e a 72°C por 10s seguidos de uma extensão final a 72°C por 5min. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 2% e tampão TBE 0,5X adicionado de Syber Safe 0,025X (Invitrogen, Carlsbad, CA).

2.2.2 Resultados

2.2.2.1 Curva Padrão

As curvas de amplificação das reações contendo diferentes massas de DNA de Lxx indicaram boa precisão nas diluições (Figura 2.1). A relação entre o Log do número de células (calculado a partir da massa de DNA) e os valores de Ct (*cycle threshold*) foi bastante precisa ($R^2=0,99$), sendo expressa pela equação $y = -0,2861x + 11,302$, onde y corresponde ao Log do número de células e x ao valor de Ct.

Figura 2.1 - Curvas de amplificação de diluições seriadas de DNA de Lxx (1:10) com o par de *primers* 12950F1/R1, sendo duas repetições por diluição (A) e curva de regressão entre valores de C_t e número (log) de células bacterianas (B), estimado pela massa de DNA

2.2.2.2 Genitores

As curvas de amplificação e de dissociação das reações de PCR utilizando DNA das plantas genitoras dos cruzamentos indicaram a presença da bactéria em todos os casos (Figura 2.2). Este resultado foi confirmado por reações de PCR convencional, que resultaram na amplificação de um fragmento de comprimento esperado de 106pb (Figura 2.3).

Figura 2.2 - Perfil de Amplificação (A) e Curva de dissociação (B) de 100ng de DNA dos genitores dos cruzamentos utilizando os *primers* 12950F1/R1

Figura 2.3 - Produtos de amplificação de amostras de DNA dos genitores usando os *primers* 12950F1/R1. 1 Kb Plus: marcador de pesos moleculares; Lxx: controle positivo; 1402 F1 e F2: genitores fêmeas do cruzamento 1402; 1402 M1 e M2: genitores machos do cruzamento 1402; 1404 F1 e F2: genitores fêmeas do cruzamento 1404; 1404 M1 e M2: genitores machos do cruzamento 1404; 1407 F1 e F2: genitores fêmeas do cruzamento 1407; 1407 M1 e M2: genitores machos do cruzamento 1407; N: controle negativo (água)

O cruzamento 1407 foi o que apresentou o maior número médio de células em 100ng de DNA total, seguido pelo cruzamento 1404 (Tabela 2.1). Considerando os valores individuais de cada genitor, é possível observar que as bandas do PCR convencional que mais se destacam no gel de agarose correspondem também às amostras que obtiveram maior título de Lxx na qPCR, no caso a F2 e o M1 do cruzamento 1407 (Figura 2.3).

Tabela 2.1 – Valores de Ct e número estimado de células de Lxx presentes em 100ng de DNA dos genitores

Cruzamento	Genitor	Ct Médio	Nº de células
1402	F1	32,85	80,10
1402	F2	32,9	77,50
1402	M1	32,9	77,50
1402	M2	33,58	49,52
1404	F1	32,99	73,04
1404	F2	33,15	65,73
1404	M1	32,96	74,50
1404	M2	32,96	74,50
1407	F1	34,19	33,13
1407	F2	32,59	95,06
1407	M1	32,66	90,78
1407	M2	32,85	80,10
Médias		33,05	70,28

2.2.2.3 Sementes

A bactéria foi detectada em todas as 9 subamostras de sementes, com um Ct médio de 32,35, equivalente a 111 células em 100ng de DNA (Figura 2.4).

Figura 2.4 - Amplificação de subamostras de sementes de cana-de-açúcar utilizando os *primers* 12950F1/R1. A – Curvas de amplificação das amostras de sementes (linhas verdes e amarelas) e de quantidades conhecidas de DNA de Lxx (linhas vermelhas). B – Curvas de dissociação das amostras de sementes (linhas verdes e amarelas) e do controle positivo (Lxx) (linhas vermelhas)

Na Tabela 2.2 estão os valores de Ct médio e número de células para as 3 amostras extraídas de cada lote de sementes. Semelhante aos resultados da análise dos genitores, o cruzamento 1407 foi o que apresentou o maior título médio de Lxx nas 3 amostras de sementes, com Ct médio de 30,21 equivalente a 454 células. Já os cruzamentos 1402 e 1404 apresentaram, respectivamente, média de 52 e 57 células de Lxx em 100ng de DNA extraídos de sementes de cana-de-açúcar.

Tabela 2.2 - Quantificação de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em 100ng de DNA de sementes de cana-de-açúcar via PCR Quantitativa em Tempo Real

Cruzamento	Amostra	Ct Médio	Nº de células
1402	1	33,93	39,32
1402	2	33,10	67,93
1402	3	33,45	53,95
1404	1	33,56	50,17
1404	2	33,85	41,45
1404	3	32,66	90,78
1407	1	28,85	1116,9
1407	2	29,40	777,43
1407	3	32,39	108,45
Média		32,35	111,02

2.2.2.4 Quantificação de Lxx em plântulas aos 90 dias

Aos 90 dias após o plantio, 229 plântulas foram analisadas e a bactéria foi detectada em elevada frequência em todos os cruzamentos (Figura 2.5). O cruzamento 1402 apresentou a maior frequência (73 plântulas positivas dentre 77 analisadas ou 94%), enquanto que no cruzamento 1404 este valor correspondeu a 91% (72 plântulas positivas em 79). Já o cruzamento 1407 foi o que obteve a menor frequência de transmissão; 63 plântulas mostraram-se positivas dentre as 73 analisadas (86,30%). Quando considerados os valores de Ct, o cruzamento 1404 foi o que apresentou o menor valor de Ct, no caso 26,33, ou seja, a plântula com o maior título bacteriano, aproximadamente 5,8 mil células. Entretanto, considerando os valores máximos de Ct obtidos, os cruzamentos 1402 e 1404 apresentaram títulos bastante semelhantes, com aproximadamente 6 células. O cruzamento 1407, que havia apresentado o maior título de Lxx nas sementes, nas plântulas foi o que apresentou os menores Cts (Tabela 2.3).

Figura 2.5 - Amplificação de amostras foliares de plântulas aos 90 dias após a semeadura, utilizando os *primers* 12950F1/R1. A – Perfil de amplificação das amostras positivas e da curva padrão. B – Curva de dissociação das amostras positivas e da curva padrão (linhas vermelhas). C – Perfil de amplificação das amostras negativas e da curva padrão (linhas vermelhas). D – Curva de dissociação das amostras negativas e da curva padrão (linhas vermelhas)

Comparando-se os valores médios de Ct das amostras de sementes e de plântulas dos cruzamentos 1402 e 1404, observou-se que o Ct médio das plântulas foi menor que nas sementes, indicando que ocorreu a multiplicação da bactéria, embora em baixa quantidade, como era esperado de seu hábito fastidioso de crescimento. Nas sementes, a média do número de células foi 52 e 57 células para os cruzamentos 1402 e 1404, respectivamente, enquanto que nas plântulas a média foi de 64 e 67 células. Já o cruzamento 1407, apresentou maior média de células nas sementes, entretanto, tal resultado pode ser reflexo da não homogeneidade de distribuição da bactéria no lote de sementes, visto que houve variação de valores entre as amostras.

Tabela 2.3 - Quantificação de *Lxx* em 100ng de DNA de plântulas de cana-de-açúcar oriundas de três cruzamentos 90 dias após a semeadura

Cruzamento	Nº de plântulas analisadas	Valores de Ct		Nº de células		% de plântulas positivas
		Mín	Máx	Mín	Máx	
1402	77	28,01	36,69	6,38	1942,40	94,80
1404	79	26,33	36,61	6,73	5874,72	91,14
1407	73	30,10	37,65	3,39	490,22	86,30
Médias		33,26		61,14		91,21

2.2.2.5 Isolamento de Lxx de plantas

Aos 270 dias após a semeadura, procedeu-se o isolamento de Lxx de tecido foliar e de colmos de 30 plantas selecionadas por conterem altos títulos de Lxx. (dados não apresentados). Foi possível isolar a bactéria de seis plantas, sendo 2 de cada cruzamento. Quatro isolamentos foram oriundos de folhas e dois de fluido. A confirmação da identidade destas culturas foi realizada via PCR convencional, com dois pares de *primers* 12950F1/R1 (CARVALHO, 2012) e Lxx202F/331R (GRISHAM; PAN; RICHARD JR., 2007) onde foram gerados fragmentos de tamanhos esperados (Figuras 2.6 e 2.7).

Figura 2.6 - Produtos de amplificação obtido de amostras de isolamento de Lxx usando os *primers* 202F/331R. Linha 1: marcador 1Kb Plus; Linha 2: Controle positivo (Lxx); Linhas 3 e 4: Placa nº 1 do cruzamento 1402; Linhas 5 e 6: Placa nº 2 do cruzamento 1402; Linhas 7 e 8: Placa nº 3 do cruzamento 1404; Linhas 9 e 10: Placa nº 4 do cruzamento 1404; Linhas 11 e 12: Placa nº 5 do cruzamento 1407; Linhas 13 e 14: Placa nº 6 do cruzamento 1407; Linhas 15 e 16: Controles negativos (água)

Figura 2.7 - Produtos de amplificação obtido de amostras de isolamento de Lxx usando os *primers* 12950F1/R1. Linha 1: marcador 1Kb Plus; Linha 2: Controle positivo (Lxx); Linhas 3 e 4: Placa nº 1 do cruzamento 1402; Linhas 5 e 6: Placa nº 2 do cruzamento 1402; Linhas 7 e 8: Placa nº 3 do cruzamento 1404; Linhas 9 e 10: Placa nº 4 do cruzamento 1404; Linhas 11 e 12: Placa nº 5 do cruzamento 1407; Linhas 13 e 14: Placa nº 6 do cruzamento 1407; Linhas 15 e 16: Controles negativos (água)

2.2.3 Discussão

A transmissão do raquitismo da soqueira se dá por estacas ou colmoses provenientes de plantas doentes e também através do contato dos instrumentos de corte com o fluido vascular de plantas infectadas durante a colheita. A transmissão através de instrumentos de corte foi comprovada, pela primeira vez, em 1949 (STEINDL, 1949), antes mesmo do agente causal da doença ser identificado (DAVIS et al., 1980). De acordo com a literatura, nenhum outro meio de transmissão do RSD foi avaliado, sendo este o primeiro trabalho a relatar a transmissão de Lxx via sementes.

Existem poucas informações sobre a transmissão de patógenos bacterianos em sementes de cana-de-açúcar. Entretanto, com relação aos fungos, diversos gêneros foram relatados como contaminantes externos (WAHID et al., 1988), entre os quais temos *Alternaria* sp., *Helminthosporium* sp., *Curvularia* sp., *Pythium* sp., *Bipolaris* sp., *Colletotrichum* sp. e *Fusarium* sp., entre outros (WISMER, 1960; LOVELESS; SMITH, 1965; SINGH; SINGH, 1968; MARTINS; MENTEN; SANGUINO, 2009). Sabe-se que esporos de fungos e bactérias podem ser fixados nas cerdas de origem na base das glumelas e com isso pode ocorrer a infecção das glumas, na parte externa das sementes. Além disso, outro importante meio de infecção das sementes por fitopatógenos é o sistema vascular (NEERGAARD, 1977), fato que justifica a transmissão de Lxx por esta ser uma bactéria restrita ao xilema.

Na literatura, dentre as bactérias transmitidas por sementes, o maior número de espécies conhecidas pertence aos gêneros *Xanthomonas*, *Pseudomonas* e *Clavibacter*, não havendo nenhum relato da transmissão de nenhuma espécie de *Leifsonia* (MACHADO, 2000). Para a cultura da cana-de-açúcar existe somente um artigo reportando a transmissão da bactéria *Xanthomonas albilineans*, agente causal da escaudadura, através de sementes. Duttamajumder (1990) isolou a bactéria das inflorescências de duas variedades de cana-de-açúcar com sintomas de escaudadura e também de plântulas F₁ oriundas das inflorescências contaminadas, comprovando assim a transmissão.

Sabe-se que os patógenos, de uma maneira geral, podem ser transportados via sementes de três maneiras: em mistura com o lote de sementes, aderidos passivamente à superfície ou ainda no interior destas. Porém, nenhuma das três

maneiras implica na transmissão à progênie (MACHADO, 2000). Um dos métodos mais utilizados para avaliar a transmissão de patógenos via sementes é a avaliação das plântulas oriundas do lote de sementes (WALCOTT, 2003). Tal método foi o empregado neste trabalho e com isso foi possível determinar as taxas de transmissão de Lxx. Os três cruzamentos apresentaram elevada frequência de transmissão, chegando a 94%, como no cruzamento 1404. Porém, na literatura não se encontram valores tão elevados de transmissão para patógenos bacterianos vasculares. Li et al. (2003) confirmaram a transmissão *Xylella fastidiosa* via sementes de citros através do isolamento da bactéria de plântulas e confirmação da sua identidade por PCR, obtendo uma taxa de transmissão de 23,6%. Diversos trabalhos foram desenvolvidos para determinar a transmissão do agente causal do greening, 'Canidatus Liberibacter asiaticus' (HARTUNG et al., 2010; ALBRECHT; BOWMAN, 2009; GRAHAM et al., 2008) e a porcentagem máxima de transmissão obtida foi 7,6% (HILF, 2011).

Diversos patógenos podem ser transportados pelas sementes, mas não transmitidos. A transmissão via sementes é um processo complexo que depende de diversas interações entre o ambiente, a espécie e o patógeno. Os principais fatores que influenciam a taxa de transmissão de patógenos por sementes são a quantidade de inóculo e a localização do mesmo nas sementes (AGARWAL; SINCLAIR, 1987). Sabe-se que as chances de transmissão são mais elevadas quanto mais internamente alojado está o patógeno (MACHADO, 2000), fato este que justifica as baixas taxas de transmissão citadas acima, pois em análise das diversas partes das sementes (tegumento e embrião), Hilf (2011) e Li et al. (2003) encontraram mais amostras positivas em tegumentos, o qual localiza-se mais externamente à semente. Neste trabalho não foi possível verificar o local de presença da bactéria devido o tamanho diminuto das sementes de cana-de-açúcar, mas com as elevadas taxas de transmissão, é possível que a bactéria esteja alojada no embrião da semente.

Pouco se sabe sobre a origem de Lxx, entretanto, é improvável que esta esteja associada a um dos principais genitores dos atuais híbridos de cana-de-açúcar, a espécie *Saccharum officinarum*, pois a bactéria nunca foi encontrada em populações desta espécie em Nova Guiné, seu centro de origem (HUGHES, 1955). Em contrapartida, estudos realizados com clones de *Saccharum spontaneum*, outro importante genitor dos híbridos atuais, mostraram que Lxx se adapta melhor a esta espécie quando comparada com *S. officinarum*. Além disso, estas duas espécies

foram cruzadas por volta de 1920 para produzir os primeiros híbridos de cana-de-açúcar, período este que coincide com os primeiros relatos de queda de produtividade e problemas com soqueiras (KING; STEINDL, 1953). Atrelado a isso, Young et al. (2006) não detectaram nenhuma variação entre 105 isolados de Lxx obtidos de 9 países, o que sugere uma rápida disseminação a partir de uma única fonte. Embora especulativas, essas informações dão suporte à hipótese de que a transmissão de Lxx via sementes, desde os primeiros cruzamentos realizados em 1920, tenha contribuído para a ampla ocorrência da doença em todos os países produtores de cana-de-açúcar.

2.3 Conclusões

Conclui-se que a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é transmitida via sementes de cana-de-açúcar em alta frequência e pode ser detectada em plântulas aos 90 dias por qPCR.

Referências

AGARWAL, V.K.; SINCLAIR, J.B. **Principles of seed pathology**. Boca Raton: CRC Press, 1987. v. 2, 539 p.

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. *Candidatus Liberibacter asiaticus* and huanglongbing effects on citrus seeds and seedlings. **HortScience**, Alexandria, v. 44, p. 1967-1973, 2009.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. Preparation of genomic DNA from plant tissue. In: RICHARDS, E.; REICHARDT, M.; ROGERS, S. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley, 1987. p. 312-333.

BAILEY, R.A.; TOUGH, S.A. Rapid spread of ratoon stunting disease during manual harvesting of sugarcane and the effect of knife cleaning on the rate of spread. **Proceedings of the South African Sugar Technologist's Association**, Durban, v. 66, p. 78-81, 1992.

BRUMBLEY, S.M.; PETRASOVITS, A.A.; BIRCH, R.G.; TAYLOR, P.W.J. 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, p. 262-268, 2002.

BRUMBLEY, S.M.; PETRASOVITS, L.A.; HERMANN, S.R.; YOUNG, A.J.; CROFT, B.J. Recent advances in the molecular biology of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease. **Australian Plant Pathology**, Queensland, v. 35, p. 681-689, 2006.

CARVALHO, G. **Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-das-soqueiras**. 2012. 147 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

DAVIS, M.J.; BAILEY, R.A. Ratoon stunting. In: ROTT, P.; BAILEY, R.A.; COMSTOCK, J.C.; CROFT, B.J.; SAUMTALLY, A.S. (Ed.). **A guide to sugarcane diseases**. Montpellier: CIRAD; ISSCT, 2000. p. 49-54.

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

DILLEWIJN, C. van. **Botany of sugarcane**. Waltham: Chronica Botanica, 1952. 371p.

DUTTAMAJUMDER, S.K. Fluff transmission of *Xanthomonas albilineans*: the incitant of leaf scald disease of sugarcane. **Current Science**, Bangalore, v. 59, p. 744-745, 1990.

GILLASPIE, A.G.; TEAKLE, D.S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE, A.G.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of sugarcane: major diseases**. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. p. 58-80.

GRAHAM, J.; IREY, M.S.; DAWSON, W.O.; HALL, D.; DUAN, Y.P. Assessment of transmission of *Liberibacter asiaticus* from seed to seedlings of ‘Pineapple’ sweet orange and Carrizo citrange. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings...** St. Paul: Plant Management Network, 2008. p. 199-200. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/proceedings/irchlb/2008/presentations/IRCHLB.5.12.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2013.

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.

HARTUNG, J.S.; HALBERT, S.E.; PELZ-STELINKSI, K.; BRLANSKY, R.H.; CHEN, C.; GMITTER, F.G. Lack of evidence for transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ through citrus seed taken from affected fruit. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p. 1200-1205, 2010.

HILF, M.E. Colonization of citrus coats by ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’: implications for seed transmission of the bacterium. **Phytopathology**, Saint Paul, v.101, n. 10, p. 1242-1250, 2011.

HOY, J.W.; BISCHOFF, K.P.; MILLIGAN, S.B.; GRAVOIS, K.A. Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. **Euphytica**, Wageningen, v. 129, p. 237-240, 2003.

HUGHES, C.G. Ratoon stunting disease of sugar cane. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, North Ryde, v. 10, p. 3–9, 1955.

JAMES, G. A review of ratoon stunting disease. **International Sugar Journal**, London, v. 98, n. 1174, p. 532-541, 1996.

KAO, J.; DAMANN, K.E. JR. Microcolonies of the bacterium associated with ratoon stunting disease found in sugarcane xylem matrix. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, p. 545-551, 1980.

KING, N.J.; STEINDL, D.R.L. The relationship between varietal yield deterioration and ratoon stunting disease. **Cane Growers' Quarterly Bulletin**, Queensland, v. 17, p. 64–73, 1953.

LI, W.B.; PRIA, W.D.; LACAVA, P.M.; QIN, X.; HARTUNG, J.S. Presence of *Xylella fastidiosa* in sweet orange fruit and seeds and its transmission to seedlings. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 8, p. 953-958, 2003.

LOVELESS, A.R.; SMITH, C.E.M. Seedling blight of sugar-cane: a new disease caused by *Helminthosporium sacchari* Butler. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 44, n. 4, p. 419-424, 1956.

MACHADO, J.C. Patologia de sementes: significado e atribuições. In: CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. p. 522-588.

MAROON-LANGO, C.J.; HOY, J.W.; COMSTOCK, J.C.; GRISHAM, M.P.; MOCK, R.; HALE, A.; AFGHAN, S.; CROFT, B.J.; DE LA CUEVA, F.; HOFFMANN, H.; KENNEDY, A.; OROZCO, H.; SAUMTALLY, S.; VICTORIA, J.; VISWANATHAN, R. Current knowledge and practices related to seed transmission of sugarcane pathogens and movement of seed. **Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists**, Baton Rouge, v. 33, p. 20-29, 2013.

MARTINS, T.D.; MENTEN, J.O.M.; SANGUINO, A. Sugarcane seedborne (caryopses) fungi: detection, incidence, and relations between fungicidal incidence and seed production conditions. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 35, p. 173-178, 2009.

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

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. New York: John Wiley, 1977. v. 1, 1219 p.

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

SINGH, G.P.; SINGH, N. Blight of sugar cane seedlings in Uttar Pradesh. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 21, p. 113-115, 1968.

STEINDL, D.R.L. Q28 disease. **Cane Growers Quarterly Bulletin**, Queensland, v. 12, p. 191-193, 1949.

_____. Ratoon stunting disease. In: MARTIN, J.P.; ABBOTT, E.V.; HUGUES, C.G. (Ed.). **Sugar cane disease of the world**. Amsterdam: Elsevier Science, 1961. v. 1, p. 433-459.

VEIGA, F.M. Notas sobre o raquitismo das socas em Campos. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 1, p. 81-83, 1956.

WAHID, A.; ALI, S.; SALEEM, A.; MURTAZA, M. Seed borne microflora of sugarcane fuzz. **Pakistan Journal of Agricultural Research**, Faisalabad, v. 9, p. 427-428, 1988.

WISMER, C.A. A promising new fungicide for the control of *Pythium* root rot of sugar cane seedlings in flats. **Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists**, Baton Rouge, v. 10, p. 1133-1137, 1960.

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 (*Saccharum* interspecific hybrids). **Australasian Plant Pathology**, Queensland, v. 35, p. 503-511, 2006.

3 CONTROLE DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR ORIUNDAS DE TOLETES SUBMETIDOS A TRATAMENTO TÉRMICO AVALIADO POR PCR QUANTITATIVO

Resumo

O principal método adotado para controle do raquitismo da soqueira de cana-de-açúcar, causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, é o tratamento térmico de toletes. Porém, não se conhece o efeito deste tratamento no título de Lxx, uma vez que os relatos de avaliação da eficiência da termoterapia baseiam-se em avaliações qualitativas. Desta forma, o efeito do tratamento na população da bactéria foi quantificado em duas variedades de cana-de-açúcar em dois ensaios. Os títulos bacterianos foram quantificados por PCR quantitativo em folhas +1 de plantas oriundas de toletes tratados ou não, 90 dias após o plantio. A eficácia da termoterapia foi variável, dependendo da variedade e do título bacteriano presente no material de origem dos toletes utilizados nos ensaios. Além disso, o tratamento não erradicou a bactéria, muito embora o número de plantas negativas tenha sido maior entre as que receberam tratamento térmico. Entretanto, os títulos bacterianos em plantas oriundas de toletes colhidos de material com altos níveis populacionais foram significativamente maiores em plantas não submetida ao tratamento. Com isso, conclui-se que a redução na população bacteriana ocasionada pelo tratamento térmico de toletes justifica o emprego deste método de controle especialmente se aliado ao número de ciclos de cultivo, dado que esta estratégia pode reduzir os títulos bacterianos a níveis aceitáveis.

Palavras-chave: Raquitismo; Controle; Termoterapia; PCR em tempo real

Abstract

The main control method of the ratoon stunting disease of sugarcane, caused by the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, is through the heat treatment of setts. However, the effects of this treatment on the bacterial titer are not known, since reports on the efficiency of this treatment are based on qualitative assessments. Therefore, the effect of thermotherapy on bacterial population was quantified in two sugarcane varieties in two trials. The bacterial titers were determined by quantitative PCR in leaves +1 of plants originated from setts submitted or not to heat treatment 90 days after planting. The efficiency of the treatment was variable, depending on the variety and on the bacterial titer in the stalks from which setts were collected. In addition, the treatment did not eradicate the bacterium, although the number of negative plants was higher among those that received heat treatment. Notwithstanding, in plants originated from setts with high population levels, the bacterial titers were significantly lower in treated plants than in untreated ones. Thus, it is concluded that the reduction in bacterial population caused by heat treatment of setts justifies its use as a control method specially if combined with a reduction in the number of ratoon croppings, as this may be a strategy to reduce bacterial titers to acceptable levels.

Keywords: Ratoon stunting disease; Control; Thermotherapy; Real-time PCR

3.1 Introdução

A área a ser cultivada com cana-de-açúcar no Brasil na safra 2013/2014 foi estimada em 8.893 mil hectares, o que corresponde a um aumento de 4,8% em relação à safra passada. Este crescimento é reflexo da expansão da cultura na região Centro-Sul, a qual deverá ter um incremento de 489,34 mil hectares ou 17,91% nas áreas de canaviais. Os estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul deverão ser os estados com maior acréscimo com 141, 106, 101 e 43 mil hectares, respectivamente (CONAB, 2013).

Porém, apesar da expansão em área cultivada e o consequente aumento da produção, estimado em 11% para próxima safra (654 milhões de t), a produtividade dos canaviais apresentou intenso declínio nos últimos anos. Na safra de 2009/2010, por exemplo, a produtividade média do país foi de 81,4 t/ha; já na safra 2010/2011 caiu para 77,5 t/ha e seguiu em declínio, atingindo 67,1 t/ha na safra 2011/2012 (BRASIL, 2012). Em função disto, foram realizados investimentos na implantação dos novos canaviais e nas áreas de renovação, donde se espera reflexo positivo na produtividade, que deve aumentar em 5,9% na safra 2013/2014 (CONAB, 2013). Entretanto, este incremento é dependente do plantio de material sadio, dado que toletes contaminados podem transmitir diversos patógenos (SUMMERS; BRANDES; RANDS, 1948; RICAUD; RYAN, 1989; FERREIRA; COMSTOCK, 1989).

Neste contexto, uma das principais doenças da cana-de-açúcar, o raquitismo da soqueira, causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, torna-se um fator limitante ao esperado aumento da produtividade, pois as perdas em biomassa devidas à doença podem ser superiores a 30% (YOUNG et al., 2006). Para que isso não ocorra, o principal princípio empregado no controle do raquitismo é o da exclusão através do plantio de material vegetal livre do patógeno. Atualmente duas técnicas são utilizadas para produção de plantas sadias: tratamento térmico dos toletes e obtenção *in vitro* de matrizes isentas do patógeno (HOY et al., 2003).

Para o tratamento térmico, trabalha-se o binômio tempo de exposição x temperatura na tentativa de inativar a bactéria sem prejudicar a viabilidade das gemas dos toletes. Assim, diversas metodologias podem ser utilizadas: ar quente a 58°C por 8h, vapor quente a 53°C por 4h, água quente a 50°C por 2h (DAMANN; BENDA, 1983), água quente a 50°C por 3h (JOHNSON; TYAGI, 2010), água quente a 52°C por 30min (COPERSUCAR, 1989), além do tratamento com água quente

acrescida dos ácidos peracético, clorídrico ou sulfato dodecil de sódio (SDS), conforme proposto por Fernandes Jr. et al. (2010).

Na literatura existem diversos trabalhos sobre o uso da termoterapia no controle do raquitismo da soqueira. No entanto, nestes, a eficácia dos tratamentos baseou-se em avaliações qualitativas da incidência de plantas sintomáticas ou assintomáticas, porém infectadas, neste caso através da microscopia, sorologia ou PCR convencional. Resultados mostram que a termoterapia nos toletes não é 100% eficaz, havendo uma frequência de escape de 17 a 33% (DAMANN; BENDA, 1983; JOHNSON; TYAGI, 2010; FERNANDES JR. et al., 2010; URASHIMA; GRACHET, 2012; GRISHAM; PAN; RICHARD JR., 2007). Além disto, o tratamento pode ainda causar inviabilidade das gemas, uma vez que as temperaturas utilizadas estão próximas tanto da capacidade de sobrevivência da bactéria como do ponto de morte térmica das células meristemáticas (JAMES, 1996).

O objetivo do presente trabalho foi quantificar o efeito da termoterapia no título de Lxx em folhas de variedades de cana-de-açúcar utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Como mencionado acima, diversas técnicas são utilizadas para diagnóstico da bactéria, porém, demandam mais tempo, são mais trabalhosas, menos sensíveis, não quantitativas e estão sujeitas a problemas de contaminação cruzada (REISCHL; WITTWER; COCKERILL, 2002). Já a qPCR apresenta maior sensibilidade, pois é capaz de distinguir precisamente e medir sequências de ácidos nucleicos específicas em uma amostra, mesmo em quantidades muito pequenas. Como monitora o progresso da amplificação através de fluoróforos, a rapidez com que o sinal fluorescente atinge um nível de limiar ("cycle threshold" ou Ct) está correlacionada com a quantidade de alvo original na sequência, permitindo a quantificação. Além disto, pode ser realizada somente em uma reação e não requer manipulações pós-PCR, minimizando assim as possibilidades de contaminação cruzada. Com isso, a técnica da PCR em tempo real vem sendo cada vez mais utilizada para o diagnóstico e quantificação de fitopatógenos (D'HAENE; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010).

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e métodos

3.2.1.1 Material vegetal

Foram utilizados colmos oriundos de touceiras únicas das variedades SP80-3280 e SP70-3370 dos quais foram colhidos quatro toletes de uma gema oriundos do terço inferior de cada colmo (Figura 3.1 e Figura 3.2 - A) por estes conterem maiores concentrações da bactéria (BAILEY, 1977). Os colmos foram colhidos de cana planta com 10 meses de idade ou de plantas de primeira soqueira com 8 meses de idade, dependendo do ensaio, todos oriundos de campos experimentais localizados em Piracicaba (SP).

Figura 3.1 - Planejamento do ensaio visando avaliar o efeito do tratamento término no título de Lxx "in planta"

3.2.1.2 Ensaio de avaliação da termoterapia

Os toletes de única gema foram misturados e separados aleatoriamente em dois lotes de 30 cada (Figura 3.2 - B), sendo que um lote foi submetido a tratamento térmico por 52^oC durante 30 minutos (COPERSUCAR, 1989; Figura 3.2 - C) e o outro não foi tratado termicamente. Os toletes foram plantados em bandejas de 28

células de 220mL cada, contendo substrato Multiplante (Terra do Paraíso) (Figura 3.2 - D). Nas bandejas, as plântulas foram fertilizadas uma vez com 20g de sulfato de amônio por bandeja.

Aos 30 dias após o plantio, 10 plantas de cada tratamento/variedade, contendo de 2 a 3 folhas, foram selecionadas, transplantadas para vasos de 10 litros contendo substrato Multiplante (Terra do Paraíso), fertilizadas periodicamente com sulfato de amônia (Figura 3.2 - E) e posteriormente avaliadas quanto ao título de Lxx.

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação e consistiu de quatro tratamentos, representados pela combinação de duas variedades e dois tratamentos térmicos (tratado e não tratado), onde cada vaso correspondeu a uma repetição disposta de maneira inteiramente ao acaso (Figura 3.2 - F). O ensaio foi repetido uma vez, com a diferença que no primeiro foram usados toletes de cana planta e no segundo de plantas de primeira soqueira, conforme mencionado anteriormente.

Figura 3.2 - Esquema do ensaio de termoterapia. A – corte dos colmos para individualização das gemas do terço inferior; B – mistura das gemas cortadas para tratamento térmico; C – tratamento térmico; D – plantio das gemas em bandejas de 28 células; E – seleção de plantas para instalação do ensaio; F – Disposição dos vasos na casa-de-vegetação

3.2.1.3 Quantificação de Lxx por qPCR

O número de células de Lxx foi determinado por qPCR aos 90 dias após o plantio em folhas +1 conforme descrito no capítulo anterior. Para certificação da presença da bactéria no material vegetal de onde os toletes foram coletados, esta também foi quantificada em 10 colmos escolhidos ao acaso daqueles utilizados para obtenção dos toletes. Neste caso, a quantificação foi feita em aproximadamente

500ul de fluido vascular, extraídos do entrenó mais próximo das gemas coletadas. Para extração do fluido, utilizou-se compressor de baixa pressão adaptado de uma teteira de ordenha na extremidade da mangueira. O fluido foi armazenado em micro tubos de 1,5mL a -80°C . O DNA foi extraído tanto de folhas como de fluido conforme protocolo descrito por Pospiech e Neuman (1996) seguido de uma extração com CTAB (AUSUBEL et al., 1987).

3.2.1.4 Análises estatísticas

Histogramas do número de células bacterianas foram elaborados a fim de comparar o efeito do tratamento térmico nos títulos bacterianos para cada variedade e ensaio. Estas distribuições de frequências foram testadas pelo teste U de Mann-Whitney entre duas amostras (SPRENT; SMEETON, 2001). Optou-se por este teste não-paramétrico uma vez que o número de células de *Lxx in planta* não segue distribuição normal (DAVIS; DEAN; HARRISON, 1988).

3.2.2 Resultados

Houve variação nos títulos bacterianos entre os materiais vegetais utilizados para coleta dos toletes e instalação dos ensaios (Tabela 3.1). O título bacteriano foi menor em material de cana planta usado no primeiro ensaio comparado ao material de primeira soqueira utilizado no segundo.

Tabela 3.1 - Mediana do número de células de *Lxx* em 100 ng de DNA extraídos de fluido vascular de colmos das variedades SP80-3280 e SP70-3370 usadas como fonte de toletes para os dois ensaios

Variedade	Mediana do número de células de <i>Lxx</i>	
	Ensaio 1	Ensaio 2
SP80-3280	134.8	5034.3
SP70-3370	307.1	316350.6

Em ambos os ensaios e para as duas variedades, o número mediano de células foi inferior em plantas oriundas de toletes tratados termicamente (Tabela 3.2). No entanto, comparações das distribuições de frequências indicaram diferenças entre plantas tratadas e não tratadas para ambas as variedades, somente no segundo ensaio (Figura 3.3). Em todas as distribuições, a maioria das plantas

tratadas termicamente apresentou títulos que variaram de 0 a 200 células de Lxx, exceto no primeiro ensaio para a variedade SP80-3280, onde foi identificada uma planta na classe de 401-600 células e outra na última classe (>1400 células).

Tabela 3.2 - Mediana do número de células de Lxx em 100 ng de DNA extraídos aos 90 dias após o plantio de folhas +1 de plantas das variedades SP80-3280 e SP70-3370 oriundas de toletes tratados termicamente (TT) ou não (NT)

Tratamentos	Mediana do n ^o de células/100ng de DNA Total			
	Ensaio 1		Ensaio 2	
	SP80-3280	SP70-3370	SP80-3280	SP70-3370
TT	46.5	6.1	3.9	5.4
NT	225.4	117.3	31.9	749.4

Outro resultado interessante diz respeito ao número de plantas onde a bactéria não foi detectada, que foi maior em plantas tratadas termicamente (Tabela 3.3). No primeiro ensaio, dentre as duas variedades foram encontradas 6 plantas negativas entre as 20 tratadas termicamente e 4 entre as 20 não tratadas. Já no ensaio 2 foram detectadas 9 plantas negativas entre as tratadas e apenas 2 entre as não tratadas.

Tabela 3.3 - Número de plantas negativas para Lxx dentre as 10 tratadas (TT) ou não tratadas (NT) das variedades SP80-3280 e SP70-3370 nos ensaios 1 e 2

Tratamentos	Número de plantas livres de Lxx			
	Ensaio 1		Ensaio 2	
	SP80-3280	SP70-3370	SP80-3280	SP70-3370
TT	1	5	5	4
NT	2	2	2	0

Figura 3.3 - Distribuição de frequências do número de células de Lxx em 100ng de DNA total extraídos de folhas +1 aos 90 dias após o plantio de plantas oriundas de toletes tratados termicamente (TT) ou não (NT) em dois ensaios. A - variedade SP80-3280 no ensaio 1; B - variedade SP80-3280 no ensaio 2; C - variedade SP70-3370 no ensaio 1; D - variedade SP70-3370 no ensaio 2. As linhas tracejadas representam a mediana do título de Lxx em plantas oriundas de toletes tratados termicamente e as linhas contínuas a mediana do título de Lxx em plantas oriundas de toletes não tratados

3.2.3 Discussão

A erradicação de Lxx de material propagativo por meio da termoterapia foi primeiramente recomendada como estratégia de controle por Steindl (1961) e até hoje é usada em escala comercial (URASHIMA; GRACHET, 2012). Na literatura existem diversos relatos que avaliam a eficiência de diferentes combinações de temperatura e tempo de exposição ao calor. Entretanto, nenhum destes quantificou o efeito do tratamento na população bacteriana *in planta*, dado que as metodologias utilizadas para avaliação foram de natureza qualitativa, como análises microscópicas, *dot-blot enzyme immunoassay* e contagem do número de plantas com sintomas (DAMANN; BENDA, 1983; GRISHAM; PAN; RICHARD JR., 2007; GUILLEN et al., 2007; FERNANDES JR. et al., 2010; URASHIMA; GRACHET, 2012). Sendo assim, este foi o primeiro trabalho que quantificou o efeito da termoterapia através da técnica da PCR quantitativa. Como a distribuição do número de células bacterianas não foi normal foi necessário utilizar o teste não paramétrico U de Mann-Whitney. O caráter não normal de médias de densidades populacionais de Lxx *in planta* já havia sido relatado (DAVIS; DEAN; HARRISON, 1988) e provavelmente está relacionado à distribuição irregular da bactéria nos tecidos, como já observado anteriormente (BAILEY, 1977), e também às variações sazonais que afetam o crescimento bacteriano.

Diversos estudos foram desenvolvidos em torno de variações do binômio tempo x temperatura para o controle de Lxx a fim de se determinar condições ótimas de inativação térmica das células bacterianas que resultassem em interferências mínimas no desenvolvimento das gemas. Em sua maioria, estes relatos apontam que o tratamento térmico não apresenta eficiência de 100% na erradicação de Lxx. Damann e Benda (1983), por exemplo, avaliaram três métodos: água quente a 50°C por 2 horas, vapor quente a 53°C por 4 horas e ar quente a 58°C por 8 horas. Os toletes tratados com ar quente não sobreviveram após o tratamento. Já entre toletes tratados com água houve 17% de escape, enquanto que entre os tratados com vapor quente esta taxa foi de 16%. Guillen et al. (2007) utilizaram água quente a 50,5°C por 2 ou 3 horas e câmara úmida a 44°C durante 4 horas seguida por mais 4 horas a 25°C. O tratamento de água quente por 3 horas mostrou-se inviável, pois nenhuma planta sobreviveu, além disso, os tratamentos com água quente por duas horas e o que utilizou câmara úmida não foram eficientes, pois 100% das amostras

testaram positivas para Lxx através da análise por Dot-Blot. No Brasil, as condições mais comumente empregadas são água quente a 50°C por 2 horas (DAMANN; BENDA, 1983) ou a 52°C por 30 minutos (COPERSUCAR, 1989), sendo o segundo método o mais utilizado por demandar menos tempo, permitindo assim o tratamento de mais gemas. Além destes, Fernandes Jr. et al. (2010) propuseram o tratamento com solução 2% de ácido peracético a 52°C por 5 minutos, solução de ácido clorídrico 1% ou ainda a combinação de sulfato dodecil de sódio (SDS) 1% e ácido peracético 2% no tratamento a 52°C por 10 minutos. O tratamento usual com água quente a 50°C por 2 horas foi o único que atingiu 100% de plantas livres de Lxx, segundo testes de dot-blot, ao passo que nos demais as taxas de escape variaram entre 19 e 25%, não diferindo estatisticamente entre si. Entretanto, a erradicação da bactéria não foi verificada em outros trabalhos onde foram usadas as mesmas condições. Damann e Benda (1983), Grisham, Pan e Richard Jr. (2007), Guillen et al. (2007) e Urashima e Grachet (2012), por exemplo, utilizaram o mesmo binômio tempo x temperatura e encontraram taxas de escape que variaram de 17 (DAMANN; BENDA, 1983) a 100% (GUILLEN et al., 2007).

Tomando-se os resultados dos ensaios e variedades em conjunto, as taxas de escape relatadas neste trabalho variaram entre 55 e 70% e foram bem superiores às relatadas na maioria dos estudos anteriores. A possível causa dessa diferença foi o emprego de um método de detecção mais sensível comparado ao PCR convencional e tissue blot (GRISHAM; PAN; RICHARD JR., 2007), especialmente em materiais vegetais com baixos títulos bacterianos. Além disso, é necessário investigar o efeito de outras características intrínsecas às variedades na eficiência da termoterapia, tais como tamanho de tolete e morfologia de gemas.

Embora o tratamento térmico de toletes não tenha sido eficaz na erradicação da bactéria, ele reduziu significativamente a população bacteriana. No entanto, esta redução só foi detectada no segundo ensaio, onde foi usado cana de primeira soca com altos títulos bacterianos como fonte de material propagativo. Neste ensaio, tomando-se os valores medianos do número de células bacterianas no caso da variedade SP80-3280, por exemplo, 50% das plantas tratadas apresentaram títulos menores que 4 células, comparado a 31 em não tratadas. Para a variedade SP70-3370, estes valores foram mais discrepantes, de 6 e 749 células, respectivamente. Já no primeiro ensaio, se houve algum efeito da termoterapia no título bacteriano, não foi possível detectá-lo, seja por que a bactéria estava em níveis muito baixos no

tecido e o método não foi capaz de quantificá-la precisamente, seja por que a termoterapia nas condições adotadas não foi eficaz perante títulos muito baixos. Neste caso, é interessante investigar se condições alternativas de tratamento, seja por elevação da temperatura ou do tempo de exposição ao calor ou ainda por sucessivos tratamentos térmicos, são mais eficazes quando aplicadas em colmos com baixo título de Lxx. De qualquer modo, a redução na população bacteriana ocasionada pelo termotratoamento de toletes justifica o emprego deste método de controle, uma vez que as perdas em produtividade estão diretamente correlacionadas ao título bacteriano nos tecidos da planta (BAILEY, 1977; DAVIS; DEAN; HARRISON, 1988; MCFARLANE, 2002). Assim, o emprego da técnica aliado à crescente retomada de renovação dos canaviais, a qual reduz a idade média dos mesmos (CONAB, 2013), pode constituir uma estratégia que reduza os títulos bacterianos a níveis aceitáveis.

3.3 Conclusões

O título inicial dos colmos utilizados nos ensaios interferiu na eficiência da termoterapia.

O tratamento a 52⁰C por 30 minutos não foi capaz de erradicar a bactéria de todos os toletes tratados, entretanto foi capaz de reduzir o título bacteriano significativamente no segundo ensaio.

Referências

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. Preparation of genomic DNA from plant tissue. In: RICHARDS, E.; REICHARDT, M.; ROGERS, S. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley, 1987. p. 312-333.

BAILEY, R.A. The systemic distribution and relative occurrence of bacteria in sugarcane varieties affected by ratoon stunting disease. **Proceedings of the South Africa Technologist Association**, Durban, v. 6, p. 466-467, 1977.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Evolução da produtividade da cana-de-açúcar por corte**. Brasília, 2012. 5 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar: safra 2013/2014: segundo levantamento (Agosto/2013).** Brasília, 2013. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2013.

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

DAVIS, M.J.; DEAN, J.L.; HARRISON, N.A. Quantitative variability of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* populations in sugarcane cultivars differing in resistance to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 4, p. 462-468, 1988.

D'HAENE, B.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. **Methods**, San Diego, v. 50, p. 262-270, 2010.

FERNANDES JR., A.R.; GANEM JR., E.J.; MARCHETTI, L.B.L.; URASHIMA, A.S. Avaliação de diferentes tratamentos térmicos no controle do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, p. 116–120, 2010.

FERREIRA, S.A.; COMSTOCK, J.C. Smut. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE, A.G. JR.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of sugarcane: major diseases.** Amsterdam: Elsevier Science, 1989. p. 211–229.

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.

GUILLEN, D.; HERNÁNDEZ, R.; RODRÍGUEZ, L.; GÓMEZ, R. Detección de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* en caña de azúcar (*Saccharum* spp.), saneamiento mediante técnicas biotecnológicas. **BioTecnología**, Cuernavaca, v. 11, n. 2, p. 8 -17, 2007.

HOY, J.W.; BISCHOFF, K.P.; MILLIGAN, S.B.; GRAVOIS, K.A. Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. **Euphytica**, Wageningen, v. 129, p. 237-240, 2003.

JAMES, G. A review of ratoon stunting disease. **International Sugar Journal**, London, v. 98, n. 1174, p. 532-541, 1996.

JOHNSON, S.S.; TYAGI, A.P. Effect of ratoon stunting disease of sugarcane yield in Fiji. **The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences**, Fiji, v. 28 p. 69-73, 2010.

MCFARLANE, S.A. The relationship between extents of colonisation by *Leifsonia xyli subsp. xyli* and yield loss in different sugarcane varieties. **Proceedings of the South African Sugar Technology Association**, Durban, v. 76, p. 281–284, 2002.

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

REISCHL, U.; WITTEWER, C.T.; COCKERILL, F. **Rapid Cycle Real-time PCR: methods and applications; microbiology and food analysis**. New York: Springer-Verlag, 2002. 200 p.

RICAUD, C.; RYAN, C.C. Leaf scald. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE, A.G. JR.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of sugarcane: major diseases**. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. p. 39–58.

SPRENT, P.; SMEETON, N.C. **Applied nonparametric statistical methods**. 3rd ed., Boca Raton: Chapman & Hall, 2001. 530 p.

STEINDL, D.R.L. Ratoon stunting disease. In: MARTIN, J.P.; ABBOTT, E.V.; HUGUES, C.G. (Ed.). **Sugar cane disease of the world**. Amsterdam: Elsevier Science, 1961. v. 1, p. 433-459.

SUMMERS, E.M.; BRANDES, E.W.; RANDS, R.D. **Mosaic of sugarcane in the United States, with special reference to strains of the virus**. Washington: USDA, 1948. 124 p. (Technical Bulletin, 955).

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

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 (*Saccharum* interspecific hybrids). **Australasian Plant Pathology**, Queensland, v. 35, p. 503–511, 2006.