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

**Termoterapia associada à cultura de tecidos para obtenção de plantas de
cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 livres de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***

Martha Monteiro Chaddad

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Agronomia. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2013**

Martha Monteiro Chaddad
Engenheira Agrônoma

Termoterapia associada à cultura de tecidos para obtenção de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 livres de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a HELAINE CARRER

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Agronomia. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2013**

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

Chaddad, Martha Monteiro

Termoterapia associada à cultura de tecidos para obtenção de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 livres de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* / Martha Monteiro Chaddad.- - Piracicaba, 2013.

76 p: il.

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

1. Saccharum officinarum 2. Cultura de tecidos 3. Gemas 4. Meristemas
5. Raquitismo das soqueiras 6. Termoterapia I. Título

CDD 633.61
C432t

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

OFEREÇO

Aos meus avós maternos Conceição Ângela (*in memorian*) e Orlando, à minha avó paterna Thereza (*in memorian*) e aos meus tios Márcia e Wagner pelo exemplo de vida, carinho e dedicação.

DEDICO

À minha mais que amada mãe, Maria Ângela, que nunca mediu esforços para apoiar a minha formação, ao meu saudoso e eterno pai, Zaidan Chaddad, exemplo de honestidade, humildade e dedicação à família e às minhas irmãs, Maristela e Ellen, pelo amor, compreensão e confiança em mim depositados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela sua compaixão, graça e bondade, sustentando-me nos momentos mais difíceis;

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Helaine Carrer por me receber em seu laboratório, confiar em meu trabalho, pela amizade, paciência e compreensão desde o período de treinamento técnico;

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo pela co-orientação, pelo auxílio nas análises estatísticas, por sua dedicação, amizade, ensinamentos e exemplo de profissionalismo;

À técnica do laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas, MSc. Valentina de Fátima De Martin, pelo auxílio nas análises laboratoriais, amizade, imensurável paciência e imenso esforço em manter o laboratório organizado e agradável;

Ao técnico do laboratório de Bioquímica e Micropropagação de Plantas, Dr. Enio Tiago de Oliveira, pela amizade, paciência, transmissão de conhecimentos, auxílio na instalação e manutenção dos experimentos e inúmeros momentos de descontração;

Ao pós-doutorando Dr. Daniel Alves Ramiro pelo auxílio na execução e interpretação das análises de PCR em tempo real, pela amizade e cooperação;

Aos doutorandos, André Luiz Barbosa e Esteban Galeano, ao Dr. Oleghe Rojas e ao técnico MSc. Antônio Francisco de Campos Amaral pela amizade, atenção e conselhos de vida e trabalho;

À doutoranda Tânia Batista e ao mestrando Guilherme Hosaka pela amizade, companheirismo e parceria nas atividades de laboratório e nas horas de almoço;

À mestranda Thaís Galhardo Egreja Ribeiro da Silva pela amizade e auxílio nas extrações de DNA e reações de PCR em tempo real;

À Dr.^a Giselle de Carvalho pela amizade e auxílio nas etapas iniciais dos experimentos deste trabalho;

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Maria Solizete G. Silva, pela amizade e auxílios prestados;

À coordenação do Programa de Pós-Graduação pela confiança e oportunidade oferecidas;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelos conhecimentos compartilhados e bons momentos vividos;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo nesses dois anos de curso;

Aos estagiários do laboratório de Bioquímica e Micropropagação de Plantas, em especial, Flávio dos Santos, Giovana Padoan Novembre, Talita Gabriela Goia, Andrea Salim e Daniela Ferraz de Campos Silva pela amizade, convivência agradável e ajuda na manutenção de minhas plantas em cultura de tecido e em casa de vegetação.

À minha grande amiga e irmã de alma, Dr.^a Roberta Corrêa Nogueirol, pelo carinho, apoio, conselhos e repreensão sempre que necessário e por me mostrar o verdadeiro sentido da palavra amizade;

E a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, também contribuíram para a realização deste trabalho.

"Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende."
(João Guimarães Rosa)

"Um sentimento de glória interior. Essa expressão é fundamental na minha vida."
(Caio Fernando Abreu)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	19
2.1 Revisão Bibliográfica.....	19
2.1.1 A cultura da cana-de-açúcar.....	19
2.1.1.1 Descrição botânica e peculiaridades fenológicas.....	19
2.1.1.2 Aspectos históricos.....	21
2.1.1.3 Cenário econômico atual.....	22
2.1.1.4 Variedade SP803280.....	25
2.1.2 O raquitismo-da-soqueira.....	25
2.1.2.1 História e distribuição.....	25
2.1.2.2 Etiologia.....	26
2.1.2.3 Sintomas.....	28
2.1.2.4 Transmissão, prevenção e controle.....	30
2.1.2.5 Diagnose.....	32
2.1.2.5.1 PCR em tempo real (RT-PCR): princípios gerais.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Experimento com ápices meristemáticos caulinares.....	39
3.1.1 Instalação.....	39
3.1.2 Isolamento dos ápices meristemáticos caulinares.....	40
3.1.3 Cultivo <i>in vitro</i> e em casa de vegetação.....	42
3.1.4 Amostragem.....	43
3.1.5 Extração e quantificação de DNA total.....	44
3.1.6 PCR em tempo real.....	45

3.1.7 Confirmação de Lxx.....	46
3.2 Experimento com gemas laterais.....	47
3.2.1 Obtenção e preparo do material vegetal.....	47
3.2.2 Isolamento das gemas e termoterapia.....	47
3.2.3 Desinfestação e inoculação.....	50
3.2.4 Cultivo <i>in vitro</i> e em casa de vegetação.....	50
3.2.5 Amostragem.....	52
3.2.6 Extração e quantificação de DNA total.....	52
3.2.7 PCR em tempo real.....	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
4.1 Experimento com meristemas apicais.....	53
4.1.1 Avaliação dos explantes.....	53
4.1.2 Determinação de Lxx em plantas de cana-de-açúcar.....	54
4.2 Experimento com gemas laterais.....	62
4.2.1 Avaliação dos explantes.....	62
4.2.2 Determinação de Lxx em plantas de cana-de-açúcar.....	64
5 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS.....	69

RESUMO

Termoterapia associada à cultura de tecidos para obtenção de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 livres de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas agroindustriais do Brasil. Como outras culturas de importância econômica, é também afetada por diversos patógenos como fungos, bactérias, vírus e fitoplasmas que podem limitar sua produção. A bactéria fastidiosa *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) é o agente causal do raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar (RSD). Esta doença não apresenta sintomas externos característicos de fácil reconhecimento. Dessa forma, a incidência do RSD pode não ser perceptível durante inspeções visuais de campo e, assim, ser facilmente disseminado de uma região para outra. A bactéria restrita ao xilema é transmitida mecanicamente de plantas infectadas para plantas saudáveis por meio da seiva presente em ferramentas de corte e em outros equipamentos durante o plantio, o cultivo e a colheita da cultura. Em razão da importância da cana-de-açúcar e do dano causado por Lxx, este trabalho visou avaliar a termoterapia e o cultivo *in vitro* em dois experimentos direcionados à obtenção de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 livres de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e, assim, fornecer subsídio para o aprimoramento das medidas atuais de controle. O primeiro experimento combinou a termoterapia de toletes de uma gema (52 °C por 30 minutos) com o cultivo de meristemas apicais de três tamanhos (0,5 mm, 1,0 mm e 1,5 mm); o segundo combinou três tempos de termoterapia (1 hora, 2 horas e 3 horas) a 50 °C em gemas laterais imaturas isoladas do tolete com o cultivo *in vitro*. No primeiro experimento, os resultados de RT-PCR das amostras coletadas aos 15 dias na casa de vegetação mostraram que os três tamanhos de meristemas produziram plantas com títulos bacterianos em média 25 vezes mais baixos que suas genitoras, mas não as isentaram completamente de Lxx, com exceção de 8 plantas que não apresentaram Lxx com 90 dias de cultivo (4 plantas provenientes do cultivo de meristemas de 0,5 mm, 1 planta de meristema de 1,0 mm e 3 plantas de meristemas de 1,5 mm). Além disso, os meristemas de 0,5 mm não necessariamente regeneraram plantas com títulos mais baixos da bactéria quando comparados com os meristemas de 1,0 mm e 1,5 mm, mostrando que estes tamanhos testados não apresentaram correlação direta com o nível de infecção da planta regenerada por eles. Em relação ao segundo experimento, os resultados de RT-PCR mostraram que o incremento no tempo de termoterapia proporcionou maior redução nos títulos bacterianos, sendo os tratamentos de 2 horas e 3 horas os mais bem sucedidos com média de redução de 80,08% e 81,73%, respectivamente, mas não foi capaz de eliminar a bactéria. Portanto, estes experimentos demonstram que a termoterapia associada ao cultivo de tecidos é uma metodologia promissora, pois apresentaram redução da presença da bactéria Lxx em plantas de cana-de-açúcar, mas por não terem sido totalmente efetivos na eliminação da mesma, reforça a necessidade de estudos complementares.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Raquitismo-da-soqueira; RT-PCR; Meristemas; Gemas; Termoterapia

ABSTRACT

Thermotherapy associated to tissue culture to obtain sugarcane plants of variety SP80-3280 free from *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Sugarcane is one of the major agro-industrial crops of Brazil. Like other crops of economic importance, it's also affected by several pathogens such as fungus, bacteria, viruses and phytoplasmas that may limit its production. The fastidious bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) is the causal agent of ratoon stunting disease in sugarcane (RSD). This disease shows no external symptoms characteristic of easy recognition. Thus, the incidence of RSD may not be noticeable during visual inspection in the field and be easily spread from one region to another. The xylem-limited bacterium is transmitted mechanically from infected plants to healthy plants by the sap present in cutting tools and others equipments for planting, growing and harvesting the crop. Due to the importance of sugarcane and the damage caused by Lxx, this work aimed to evaluate thermotherapy and *in vitro* culture in two experiments in order to obtain sugarcane plants of variety SP80-3280 free from *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and thus provide subsidy for the improvement of current control methods. The first experiment combined thermotherapy on the individual bud (52 °C for 30 minutes) and the cultivation of apical meristems of three sizes (0,5 mm, 1,0 mm and 1,5 mm); the second combined three period of thermotherapy (1 hour, 2 hours and 3 hours) at 50 °C in immature lateral buds totally isolated from the tissue source followed by *in vitro* culture. In the first experiment, the results of RT-PCR samples collected at 15 days in the greenhouse showed that the three sizes of meristems produced plants with bacterial titers on average 25 times lower than their mother plants, but not completely exempted them from Lxx, except 8 plants that showed no Lxx after 90 days of cultivation (4 plants were from cultivation of meristems with 0,5 mm, 1 plant from 1,0 mm meristem and 3 plants from 1,5 mm meristems size). Furthermore, the meristems of 0,5 mm does not necessarily regenerate plants with lower title of the bacteria compared with the meristems of 1.0 mm and 1.5 mm, showing that these sizes tested did not present direct correlation with the level of infection on the plants regenerated from them. Regarding the second experiment, RT-PCR results showed that the increase in time of thermotherapy provided greater reduction in bacterial titers, and the treatments of 2 and 3 hours were the most successful with average reduction of 80,08 % and 81,73%, respectively, but was not able to eliminate the bacteria. Therefore, these experiments showed that thermotherapy associated with tissue culture is a promising methodology because it reduced titer of Lxx in sugarcane, but were not fully effective in eliminating the same, reinforcing the need for complementary studies.

Keywords: Sugarcane; Ratoon stunting; RT-PCR; Meristems; Buds; Thermotherapy

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é um dos principais produtos agrícolas do Brasil, sendo cultivada desde a época da colonização. No início do século XVI, o açúcar valia tanto quanto o ouro em toda a Europa e, como sua produção era bastante limitada por questões climáticas e de relevo, não demorou muito para que os portugueses introduzissem a cana-de-açúcar em solo brasileiro. Em pouco tempo, esta tão promissora cultura tornou-se a principal fonte de renda de Portugal, estimulando o plantio também na América Central por parte dos franceses, espanhóis e ingleses (CAVALCANTE, 2011).

Séculos depois, a cana-de-açúcar continua se destacando no cenário econômico mundial, principalmente, após a crise do petróleo na década de 1970. A alta nos preços dos barris de petróleo, a conscientização de que o petróleo é um recurso não renovável e a preocupação ambiental em reduzir a emissão de gases do efeito estufa despertaram a atenção para a necessidade de fontes alternativas de energia tal como a cultura canavieira (IBGE, 2012).

Ocupando a posição de maior produtor mundial de etanol a partir de cana-de-açúcar, o Brasil é considerado exemplo no que diz respeito ao uso de energias renováveis uma vez que a participação destas em relação ao total de energia ofertada se mantém próxima dos 50% desde meados de 1992 (EPE, 2011). Dentre as fontes consideradas renováveis destacam-se a solar, a eólica, o biogás e a biomassa. A lenha e o carvão vegetal também são considerados fontes renováveis, porém sua produção nem sempre é feita de forma sustentável. Os derivados de cana-de-açúcar (bagaço, palha e vinhaça) correspondem a aproximadamente 18% de toda fonte renovável em uso no país (Figura 1). Em seguida, encontram-se a hidráulica (14%) e lenha e carvão vegetal (10%) (EPE, 2011).

Figura 1 - Participação das fontes renováveis no total de energia ofertada (Fonte: Balanço Energético Nacional – EPE, 2011)

Além da sua relevância como matéria-prima para a produção de açúcar, álcool e energia elétrica, a cana-de-açúcar é utilizada também na produção de aguardente, rum, vodka, rapadura, ração animal, fertilizantes, fibras sintéticas, vernizes, solventes, plastificantes, fibra de carbono, fármacos e diversos outros subprodutos destinados à indústria química e de cosméticos. Diante dessa múltipla utilidade e por ser hospedeira de uma série de patógenos, a cada ano diferentes metodologias são propostas para o estudo das principais doenças que afligem os canaviais por todo o mundo e, assim, tentar reduzir o impacto econômico gerado por elas. Neste contexto, destaca-se o raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar (*Ratoon Stunting Disease* - RSD), doença causada pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) que pode levar a perdas de produtividade superiores a 50% em genótipos susceptíveis sob condições de déficit hídrico (RICAUD; RYAN, 1989).

Embora haja variação quanto à susceptibilidade ao RSD, ainda não existe nenhuma variedade imune (TEAKLE; SMITH; STEINDL, 1975). Devido à dificuldade em debelar a doença uma vez instalada, o único método de controle eficiente é o plantio de toletes livres do patógeno. Atualmente, as técnicas empregadas para essa finalidade são o tratamento térmico e a cultura de tecidos (HOY et al., 2003). Contudo, tanto o tratamento térmico quanto a cultura de tecidos por si só não são eficazes, ou seja, não limpam totalmente as mudas infectadas (MATSUOKA, 1971; LEE, 1988).

Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar a viabilidade de duas metodologias direcionadas à obtenção de mudas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 livres de Lxx e, assim, fornecer subsídios para o aprimoramento das atuais medidas de controle do raquitismo e estudo de novas técnicas: uma conciliando termoterapia e o cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos caulinares de tamanhos diferentes e, a outra, conciliando tempos diferentes de termoterapia com cultivo *in vitro* de gemas laterais imaturas. Visou também: 1) certificar se há dentre os avaliados um tamanho de ápice meristemático capaz de produzir mudas de cana-de-açúcar sem a presença de Lxx; 2) determinar se há correlação positiva entre os tamanhos de meristemas testados e os níveis de infecção por Lxx das mudas de cana produzidas *in vitro*; 3) e avaliar se os diferentes tempos de tratamento térmico adotados são eficientes na eliminação da bactéria quando empregados em gemas laterais isoladas, ou seja, com a menor quantidade possível de tecido do colmo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 A cultura da cana-de-açúcar

2.1.1.1 Descrição botânica e peculiaridades fenológicas

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea alógama e semiperene que pertence à divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, subclasse Commelinidae, ordem Cyperales, família Poaceae, tribo Andropogonae, subtribo Saccharinae e gênero *Saccharum* (MATSUOKA, 1996; CASTRO; KLUGE, 2001). Neste gênero, existem seis espécies descritas: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule*.

As cultivares atualmente plantadas são híbridos interespecíficos resultantes de cruzamentos entre essas espécies (IRVINE, 1999). Estudos citogenéticos afirmam que, além de serem poliplóides e aneuplóides, apresentam genoma com aproximadamente 10 Gb e bastante complexo, compreendendo pelo menos 100 cromossomos (GRIVET; ARRUDA, 2001). Tamanha complexidade é mantida pela propagação vegetativa, modalidade de reprodução assexuada utilizada comercialmente para a obtenção de mudas em larga escala. Por meio da hibridização *in situ* de DNA das variedades modernas, determinou-se que cerca de 80% de seus cromossomos são oriundos da espécie *S. officinarum*, 10% de *S. spontaneum* e os 10% restantes compreendem cromossomos recombinantes (D'HONT, 2005).

Característica de regiões tropicais e subtropicais, a cana-de-açúcar é cultivada em mais de 90 países e está difundida em uma ampla faixa de latitude (de 35° N a 30° S), adaptando-se a diversas condições de clima e solo e exigindo precipitações pluviométricas entre 1.500 mm a 2.500 mm por ciclo vegetativo (DOOREMBOS; KASSAM, 1979; TAVARES, 2009). É uma planta de grande porte que forma rizomas e touceiras, produz caules suculentos divididos em nós e entrenós, com folhas alternas e longas, bainha aberta, inflorescência do tipo panícula, com flores hermafroditas e fruto do tipo cariopse oblonga e pontiaguda (MILLER; GILBERT, 2009).

Designada como planta C4 em razão de atributos anatômicos e bioquímicos, a cana-de-açúcar possui alta capacidade fotossintética e ponto de saturação luminosa elevado, ou seja, é extremamente eficiente na conversão de energia luminosa em energia química (TAIZ; ZEIGER, 2004). Desta forma, seu crescimento e desenvolvimento são mais intensos quando

exposta a fotoperíodos de 10 a 14 horas e em regiões de clima mais quente (faixa ótima de temperatura de 25 °C a 35 °C).

De acordo com a época de plantio, a cana-planta pode ser classificada em “cana de ano” e “cana de ano e meio”. Se for plantada de setembro a outubro, sua colheita é feita geralmente nos meses de setembro e outubro do próximo ano (12 meses) e, portanto, é denominada como “cana de ano”. Caso seja plantada entre os meses de janeiro e março, a cana cresce por volta de 18 meses e recebe o nome de “cana de ano e meio”. Outras terminologias também são comumente empregadas: cana-soca (cana-planta após a primeira colheita) e ressoca (da segunda até a última colheita). Ademais, decorridos quatro a cinco cortes, a lavoura perde seu vigor e se torna inviável economicamente, podendo o produtor optar pela renovação do canavial ou rotação com outras culturas (RUDORFF, 1985).

Gascho e Shih (1983) e Câmara (1993) dividem o ciclo da cana-de-açúcar em quatro estádios fenológicos distintos (Figura 2):

- Brotação e estabelecimento da cultura – inicia-se de 20 a 30 dias após o plantio, quando o broto rompe as folhas da gema e se desenvolve em direção à superfície do solo. É quando surgem também as primeiras raízes do tolete;
- Perfilhamento – regulado por hormônios, consiste na formação de novos brotos de 40 a 60 dias após o plantio e resulta na formação da touceira;
- Crescimento dos colmos – atingido o máximo de perfilhamento, os colmos passam a ganhar altura e a acumular açúcares. Esta fenofase é marcada também pelo intenso crescimento do sistema radicular nas laterais e em profundidade;
- Maturação – ocorre da base para o ápice do colmo e caracteriza-se pelo intenso armazenamento de açúcares. É favorecida por temperaturas inferiores a 21 °C, pois estas reduzem o crescimento vegetativo.

Figura 2 - Fases de desenvolvimento da cana-de-açúcar (Fonte: GASCHO; SHIH, 1983)

É importante ressaltar que, além da época de plantio, a duração do ciclo produtivo da cana-de-açúcar depende de inúmeros outros fatores (cultivar, temperatura, luminosidade, disponibilidade hídrica, nutrição etc.) e que a compreensão a fundo da interação destes com cada uma de suas fenofases é indispensável para a elaboração de estratégias de conservação e manejo, estimativas de produção, controle fitossanitário e programas de melhoramento genético (LARCHER, 2004).

2.1.1.2 Aspectos históricos

Acredita-se que a cana-de-açúcar seja originária de Nova Guiné, ilha localizada no sudoeste do Oceano Pacífico pertencente geologicamente ao continente de Sahul, também conhecido como Grande Austrália (GOMES, 2006). Em contrapartida, alguns pesquisadores creem que o centro de origem seja a Ásia Meridional, mais precisamente no território indiano (CASCUDO, 1971; FREYRE, 1987; ANDRADE, 2004).

Entre os anos 8000 a.C. e 6000 a.C., a cana-de-açúcar expandiu-se para as ilhas Salomão, Novas Hébridas, Caledônia, Indonésia e Filipinas. Foi levada através das expedições árabes para a Europa, iniciando-se o cultivo em Andaluzia (Espanha) (FAUCONNIER; BASSEREAU, 1970). O desejo de encontrar um caminho alternativo para as regiões produtoras de especiarias na Índia aliado à necessidade por novas áreas cultiváveis levaram Portugal e Espanha a iniciarem o período que ficou conhecido como Era das Grandes Navegações.

No ano de 1500, o navegante português Pedro Álvares Cabral anunciou a descoberta do Brasil. Os processos de exploração da América e a transferência do eixo econômico mundial marcaram o começo de um novo período na economia do Velho Mundo. O cultivo das primeiras mudas de cana-de-açúcar em terras brasileiras ocorreu em 1532 após a expedição de Martim Afonso de Sousa, militar português que fundou o engenho São Jorge dos Erasmos, na capitania de São Vicente. Em 1570, já havia mais de 60 engenhos e o Brasil era considerado uma potência no setor canavieiro (JUNQUEIRA; DANTAS, 1964).

No século XIX, no entanto, o Brasil passou de maior produtor mundial para o quinto lugar devido à concorrência oferecida pelo baixo nível técnico de cultivo da beterraba em regiões bem mais próximas aos centros consumidores europeus. A abertura dos portos em 1808 e a Independência em 1822 beneficiaram a produção, mas não foram suficientes para recuperar a posição de dois séculos atrás. No século XX, houve uma retomada do cultivo de cana para abastecer o mercado interno e os estados de São Paulo e Rio de Janeiro passaram a suprir o sul do país (UNICA, 2012).

Em meados da década de 1970, a alta do preço do petróleo levou a uma inversão da conjuntura econômica mundial, criando condições para que o álcool assumisse a posição de matriz energética nacional e recebesse grande investimento do Banco Mundial. Atualmente, o setor sucroenergético continua em ascensão em virtude da preocupação com o meio ambiente e graças aos programas de melhoramento genético que desenvolvem variedades mais produtivas, com maior tolerância ao estresse hídrico, maior resistência a pragas e doenças e melhor adaptação à colheita mecanizada (ALONSO, 2009).

2.1.1.3 Cenário econômico atual

A lavoura canavieira encontra-se em progressiva expansão no Brasil e no mundo. As áreas em produção continuam crescendo nos estados da região Centro-Oeste, Sudeste e no Paraná. De acordo com a FAO (*Food and Agriculture Organization of The United Nations* –

2010), o Brasil continua ocupando a posição de maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido respectivamente pela Índia, China, Tailândia e México (Figura 3).

Figura 3 - Principais produtores mundiais de cana-de-açúcar (Fonte: FAO, 2010)

O avanço das plantações de cana-de-açúcar ocorre de maneira diferenciada em cada região. O Sudeste apresentou o maior percentual de aumento de área plantada (368.683 mil hectares), destacando-se os estados de São Paulo (246.011 mil hectares) e Minas Gerais (106.640 mil hectares). A região Centro-Oeste também apresentou crescimento significativo (233.840 mil hectares), sobressaindo os estados de Goiás (115.792 mil hectares) e Mato Grosso do Sul (65.347 mil hectares). Na região Sul, o estado que se destacou foi o Paraná, com aumento de 50.066 mil hectares. Dessa forma, o total da área em expansão em todo o país deve ficar em torno de 676 mil hectares até o final da safra (CONAB, 2012).

A safra 2010/2011 representou o recorde da produção brasileira de cana-de-açúcar com a surpreendente marca de 623,905 milhões de toneladas, consolidando ainda mais o país no topo da lista dos maiores produtores do mundo. A segunda maior colheita ocorreu na safra 2009/2010 com 604,514 milhões de toneladas e a terceira na safra 2008/2009 com 571,400 milhões de toneladas (RANKBRASIL, 2012).

De acordo com levantamento realizado em dezembro de 2012, o total de cana moída para a safra 2012/2013 está previsto em 595,13 milhões de toneladas, com aumento de 6,20% em relação à safra 2011/2012 (560,36 milhões de toneladas), o que significa que serão moídas 34,76 milhões de toneladas a mais. Deste total, estima-se que 294,40 milhões de toneladas (49,47%) sejam destinadas à produção de açúcar e 300,75 milhões de toneladas (50,53%) para a produção de 23,62 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2012).

No entanto, segundo a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA, 2012), o volume processado pelas unidades produtoras da região Centro-Sul do país desde o início da safra 2012/2013 até 01/07/12 somou 128,31 milhões de toneladas, 27,8% a menos em relação ao mesmo período do ano anterior (177,7 milhões de toneladas). O alto volume de chuvas dificultou a operacionalização da colheita na segunda quinzena de junho de 2012, obrigando a paralisação da moagem por mais dias que no mesmo mês de 2011. Ainda assim, espera-se uma produtividade agrícola superior a esta prevista em dezembro, porém com redução da qualidade da matéria-prima (Figura 4).

Produtos	Safras		Variação (%)
	2011/2012	2012/2013	
Cana-de-açúcar ¹	177.695,8	128.309,3	↓ -27,79%
Açúcar ¹	9.402,2	6.694,0	↓ -28,80%
Etanol anidro ²	2.548,7	1.456,1	↓ -42,87%
Etanol hidratado ²	4.529,2	3.364,7	↓ -25,71%
Etanol total ²	7.077,9	4.820,8	↓ -31,89%
ATR ¹	21.917,2	15.211,9	↓ -30,59%
ATR/ tonelada de cana ³	123,34	118,56	↓ -3,88%
Mix (%) açúcar	45,02%	46,18%	↑
etanol	54,98%	53,82%	↓
Litros etanol/ tonelada de cana	39,83	37,57	↓ -5,67%
Kg açúcar/ tonelada de cana	52,91	52,17	↓ -1,40%

Figura 4 - Valores acumulados até 01/07/2012 (Fonte: UNICA. Nota: ¹ – mil toneladas; ² – milhões de litros; ³ – ATR: Kg de Açúcar Total Recuperável por tonelada de cana)

2.1.1.4 Variedade SP80-3280

De acordo com o Censo Varietal realizado pela RIDESA (Rede Interuniversitária de Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro) no ano de iniciação deste trabalho (2010), as variedades SP ocupavam 28,1% da área total plantada e cultivada no Brasil, perdendo apenas para as variedades RB (52,2%). Na ocasião, SP80-3280 apresentava-se entre as 20 variedades mais plantadas no país, ocupando a 16^a posição. Desenvolvida pela Copersucar (Cooperativa de Produtores de Cana-de-Açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo), esta variedade é extremamente exigente em solos férteis e úmidos, destaca-se pelo alto teor de sacarose e produtividade em soqueira, possui perfilhamento intermediário, bom fechamento das entrelinhas, alto teor de fibras, tombamento regular e sensibilidade média a herbicidas. Apesar de ser susceptível à broca, apresenta resistência ao carvão, mosaico e ferrugem e é tolerante à escaldadura (COPLANA, 2012). Em relação ao raquitismo-da-soqueira, é classificada como de resistência intermediária (ROS, 2004).

2.1.2 O raquitismo-da-soqueira

2.1.2.1 História e distribuição

Causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) e considerado uma das mais importantes doenças da cultura da cana-de-açúcar, o raquitismo-da-soqueira (RSD) foi descrito pela primeira vez durante a primavera seca do ano de 1944 no estado australiano de Queensland, quando plantas da variedade Q28 apresentaram subdesenvolvimento e descoloração vascular (DAVIS et al., 1980a; JAMES, 1996). Em 1949, comprovou-se sua natureza infecciosa por intermédio da reprodução de sintomas em colmos sadios de cana-de-açúcar inoculados com caldo extraído de colmos afetados (STEINDL, 1949). No Brasil, foi constatado pela primeira vez em 1956 no município de Campos dos Goytacazes (Rio de Janeiro) por Frederico Veiga (TOKESHI, 1997).

Apesar de intensas pesquisas, Lxx nunca foi encontrada afetando cana selvagem em seu centro de diversidade (Nova Guiné), o que sugere recente contato com seu hospedeiro (MAGAREY et al., 2002). Na década de 1970, o Brasil já apresentava aproximadamente 90% de seus canaviais infectados por Lxx. Acreditava-se que o RSD estava associado a um vírus devido à dificuldade de isolamento e cultivo do agente causal em meio axênico até que, em 1973, estudos revelaram uma bactéria habitante do xilema como agente etiológico da doença

(MATSUOKA, 1972; JAMES, 1996). Em 1984a, Davis et al. conseguiram isolar e identificar a bactéria com base nos postulados de Koch como *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, denominada hoje *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (EVTUSHENKO et al., 2000).

No final da década de 1980, 45 anos depois da sua descoberta, o RSD já havia sido relatado em mais de 60 países, provocando perdas acima de 50% em variedades susceptíveis ou não tolerantes submetidas a estresse hídrico (GILLASPIE; TEAKLE, 1989). No Brasil, apesar de ser considerada a principal doença da cana-de-açúcar, estimativas de perdas de produção não são tão frequentes (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Giglioti relatou em 1997 que nos últimos 30 anos a doença pode ter sido responsável por perdas superiores a US\$ 2 bilhões somente no estado de São Paulo. Acredita-se que o agente causal do RSD encontra-se distribuído por todas as regiões canavieiras do país, comprometendo diferentes genótipos sob as mais diversas condições ambientais. Em 1996, James afirmou que nos últimos 40 anos grande parte das perdas na agroindústria possivelmente foi causada pela incidência de Lxx.

2.1.2.2 Etiologia

Em homenagem a Einar Leifson, o gênero *Leifsonia* foi criado por Evtushenko et al. (2000) para agrupar bactérias gram-positivas, não esporogênicas, caracterizadas pela presença do ácido 2,4-diaminobutírico na parede celular, metaquinonas com 9 a 10 cadeias de carbono e fosfatidilglicerol e difosfatidilglicerol como principais fontes de fosfolipídios (DAVIS et al., 1980b; YOUNG et al., 1992). Dentro deste gênero, estão descritas sete espécies que foram isoladas dos mais diversos ambientes como amostras de solo e até um lago antártico (LEE et al., 1997; REDDY et al., 2003).

A espécie *Leifsonia xyli* é a única do gênero que provoca doenças em plantas e compreende duas subespécies: *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) e *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* (Lxc), ambas patogênicas às gramíneas do gênero *Cynodon* (ZERILLO, 2008). Embora endofítica, Lxc não é patogênica à cana-de-açúcar, infectando a planta apenas experimentalmente e de maneira assintomática (DAVIS et al., 1980b; LIAO; CHEN, 1981).

Leifsonia xyli subsp. *xyli*, bactéria causadora do raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar, pertence a um seleto grupo de microrganismos fitopatogênicos de crescimento fastidioso. É gram-positiva, corineforme, não móvel, aeróbica obrigatória e restrita ao xilema

das plantas. Suas células baciliformes medem 0,25 - 0,50 μm por 1 - 4 μm , com forma reta ou levemente curva e ocasionalmente dilatadas na ponta ou no meio (Figura 5). Suas colônias são minúsculas, circulares, não pigmentadas e com diâmetro entre 0,10 μm e 0,30 μm após 14 dias de cultivo em meio SC (*Soybean Corn*) (IGLESIA, 2003).

Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura de Lxx (estirpe CTCB07). a) aglomerado de células bacterianas (aumento de 15.000 vezes); b) a seta indica o formato corineforme característico da bactéria (aumento de 20.000 vezes) (Fonte: GAGLIARDI, 2003)

Informações sobre sua biologia e patogenicidade são bastante restritas, pois foi recentemente reconhecida como agente causal do raquitismo e seu crescimento *in vitro* é bem limitado (DAVIS et al., 1980b). No entanto, a conclusão de seu mapa genético em maio de 2002 tem possibilitado o desenvolvimento de inúmeras pesquisas com o intuito de identificar genes de patogenicidade e elucidar os mecanismos de interação planta-patógeno.

De acordo com MONTEIRO-VITORELLO et al. (2004), o cromossomo único e circular de Lxx CTCB07 possui 2,6 Mb, conteúdo G+C de 68% e 307 pseudogenes. Muitos desses pseudogenes, se funcionais, provavelmente estejam envolvidos na degradação de heteropolissacarídeos da planta, absorção de açúcares livres e síntese de aminoácidos. Após o sequenciamento do genoma, alguns dos genes de patogenicidade preditos parecem ter sido adquiridos por transferência lateral como genes que codificam celulase, pectinase, lisozima e dessaturase. A presença deste último pode contribuir para o nanismo haja vista que é bem possível o seu envolvimento na síntese do ácido abscísico, hormônio vegetal que inibe o crescimento das plantas.

2.1.2.3 Sintomas

A bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* caracteriza-se por colonizar o xilema das plantas de cana-de-açúcar, provocando obstrução e prejudicando o transporte de água e nutrientes (seiva bruta) até as folhas (BRUMBLEY et al., 2002). O xilema é um tecido vascular complexo formado por vários tipos celulares: traqueídes, elementos de vaso, fibras lenhosas (fibras libriformes e fibrotraqueídes) e células parenquimáticas. Os traqueídes e os elementos de vaso são as verdadeiras células condutoras responsáveis pelo movimento da seiva. As fibras lenhosas são células alongadas e bastante lignificadas responsáveis pela sustentação e eventual armazenamento. Já as parenquimáticas são as únicas células vivas do tecido e possuem função de reserva e translocação de água e solutos a curta distância (Figura 6).

Figura 6 - Corte transversal do caule de uma monocotiledônea. Xilema e floema organizados em feixes vasculares distribuídos aleatoriamente no órgão e ausência de medula e córtex

O raquitismo-da-soqueira não causa sintomas peculiares, porém como o próprio nome sugere provoca definhamento e redução no crescimento das plantas infectadas (TOKESHI; RAGO, 2005). Em campo, os sintomas mais comuns relacionados a essa doença são: crescimento irregular e retardado, colmos finos, encurtamento dos internódios, pouco perfilhamento, desuniformidade no talhão, aspecto de murcha, necrose nas pontas e nas bordas das folhas e até a morte da planta (Figura 7). Internamente, embora não haja desorganização geral do tecido, há a presença de pontuações ou vírgulas avermelhadas em

plantas adultas devido à deposição de uma substância mucilaginosa que pode bloquear os vasos, reduzindo o fluxo em até 34% (Figura 8) (TEAKLE et al., 1978). Além disso, pode ocorrer a formação de tiloses nos feixes do xilema e coloração rosada próximo ao meristema apical de plantas jovens (STEINDL, 1961).

Figura 7 - Sintomas do RSD visíveis em campo: a) crescimento irregular e retardado (touceira à esquerda); b) colmo fino e internódios curtos (colmo à direita) (Fonte: COOPERCITRUS, 2012)

Figura 8 - Sintomas internos do RSD: pontuações (a) ou vírgulas (b) avermelhadas na região do nó (Fonte: COOPERCITRUS, 2012)

Por não serem específicos, tais sintomas podem aparecer também em razão do ataque por outros patógenos como *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum falcatum*, *Xanthomonas albilineans* e *Erwinia herbicola* (RICAUD, 1974; TOKESHI, 1980). Além disso, sua manifestação e intensidade diferem em função da variedade, idade da planta, tipo de solo, condições climáticas, excesso de competição por plantas daninhas, práticas culturais inadequadas, estresse causado por herbicidas etc., dificultando a distinção de outras doenças e problemas abióticos (GRISHAM, 2004). Por vezes, a disponibilidade de água e nutrientes chega a mascarar o desenvolvimento dos sintomas e algumas cultivares acabam por suportar altas densidades populacionais da bactéria sem apresentar indícios da doença (TOKESHI; RAGO, 2005).

2.1.2.4 Transmissão, prevenção e controle

A dificuldade de identificação da doença (seja pela ausência de sintomas aparentes ou pela semelhança com outros males) somada à natureza do patógeno (habitante do xilema) favorece em muito a disseminação no campo por meio da utilização de instrumentos contaminados durante os tratos culturais e do plantio de órgãos propagativos infectados (COMSTOCK et al., 1996). Dessa forma, a transmissão ocorre exclusivamente pelo homem através do uso de colheitadeiras, plantadoras, facões e outros materiais de corte que colocam plantas saudáveis em contato com fluído vascular de plantas doentes. Mecanismos naturais de infecção são desconhecidos, muito embora nenhum estudo sistemático sobre insetos vetores ou hospedeiros alternativos tenha sido realizado (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

A permanência da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* na lavoura é garantida pelo próprio modelo de exploração da cana-de-açúcar, a monocultura. Além de desvantagens como o esgotamento do solo, desequilíbrio ambiental e redução da biodiversidade, o cultivo intensivo de uma única espécie vegetal favorece a proliferação da doença haja vista que um número cada vez maior de plantas são contaminadas por ciclo da cultura. Estudos indicam que Lxx pode sobreviver no solo por longos períodos mesmo na ausência da cultura e, por isso, recomenda-se deixar transcorrer de três a seis meses antes de um novo plantio, tempo necessário para melhorar a qualidade do canavial (TOKESHI; RAGO, 2005), mas economicamente inviável.

Em virtude da impossibilidade de erradicar a doença uma vez instalada, o controle do raquitismo baseia-se na adoção de um conjunto de medidas preventivas ou de exclusão. Todo

e qualquer tipo de máquina agrícola ou instrumento cortante utilizado no manejo e colheita deve ser desinfestado, especialmente, em campos de propagação de material. A desinfestação pode ser feita pelo calor (chama, vapor ou água quente) ou produtos químicos como amônia quartenária (NR_4^+), solução de ácido cresílico ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$) e etanol 50% ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (STEINDL, 1961; TEAKLE, 1983; GILLASPIE JR.; TEAKLE, 1989). No entanto, sabe-se que estas são práticas pouco ou nada empregadas na rotina dos grandes centros produtores, pois encarecem os custos de produção.

A eliminação do RSD pode ser alcançada com o plantio de toletes-sementes livres do patógeno. Duas técnicas são exploradas almejando a obtenção de mudas sadias: o tratamento térmico e a cultura de tecidos (HOY et al., 2003).

No tratamento térmico, trabalha-se o binômio tempo-temperatura. Os toletes-sementes são submetidos à imersão em água quente por um tempo determinado na tentativa de destruir proteínas e enzimas da bactéria. Duas combinações são empregadas no Brasil: 52 °C por 30 minutos (COPERSUCAR, 1989) ou 50 °C por 2 horas (DAMANN; BENDA, 1983). A primeira combinação é a preferencialmente adotada pelas unidades produtoras por demorar menos e permitir o tratamento de maior número de toletes por dia. Em ambos os casos, para que ocorra a destruição total das células bacterianas, há necessidade de repetição do tratamento térmico dos materiais previamente tratados, o que torna a operação trabalhosa e onerosa, além de comprometer a qualidade das gemas dos toletes. No entanto, mesmo assim o tratamento térmico por si só não é totalmente eficaz já que um residual de bactérias ativas ainda persiste dentro dos colmos tratados (GILLASPIE JR.; TEAKLE, 1989). Ademais, a combinação tempo-temperatura está próxima da capacidade de sobrevivência da bactéria e do ponto de morte térmica das gemas (JAMES, 1996). A não eliminação completa do patógeno gera escapes que servem como nova fonte de inóculo (BENDA, 1994) e, por isso, é imprescindível associar à termoterapia a prática de *roguing*, a qual consiste na remoção das plantas doentes após um exame cuidadoso e sistemático do campo de produção (TOKESHI, 1997).

A cultura de tecidos é uma técnica biotecnológica com várias aplicações práticas na agricultura. Sucintamente, consiste em cultivar segmentos de plantas (gemas, ápices caulinares, fragmentos de folhas ou raízes etc.) em recipientes assépticos contendo meio de cultura adequado para a obtenção de centenas ou milhares de plantas idênticas. Posteriormente, essas plantas são aclimatadas e levadas a campo, onde se desenvolverão

normalmente. A micropropagação é uma forma rápida de multiplicar determinado genótipo que apresenta características agronômicas desejáveis.

A limpeza clonal, uma variante da cultura de tecidos, é o procedimento mais usado para a obtenção de mudas livres de patógenos (HOY et al., 2003). Baseia-se no cultivo *in vitro* de uma pequena porção da região de crescimento da planta conhecida como meristema, o qual compreende um conjunto de células iniciais e suas derivadas diretas que ainda não sofreram diferenciação e, por isso, não é efetivamente vascularizado. Apesar de vantagens como qualidade sanitária, facilidade no transporte e homogeneidade de plantio, a adesão da propagação clonal pelo produtor esbarra no elevado custo das mudas, na necessidade de manutenção de viveiros primários e na falta de informação quanto aos benefícios anteriormente citados (GERALD, 1992).

Outra alternativa para o controle do RSD é o uso de variedades resistentes e o controle biológico. Embora até pouco tempo a produção de variedades resistentes tenha ficado em segundo plano, atualmente a maioria dos programas de melhoramento genético tem se preocupado em incluir atividades de rotina para a identificação de genótipos resistentes ou tolerantes ao raquitismo com a capacidade de limitar a frequência de infecções, a intensidade de colonização dos tecidos e as perdas ocasionadas pelo ataque da bactéria (HARRISON; DAVIS, 1988). O biocontrole por meio do uso de bactérias endofíticas é também uma promissora linha de pesquisa uma vez que consiste na aplicação de microrganismos que podem vir a competir com o patógeno pelos mesmos sítios de colonização ou induzir a resistência através da produção de bacteriocinas pelo hospedeiro (OLIVARES et al., 2000). Assim, variedades pouco resistentes ou tolerantes, mas que comportam boas características agronômicas poderão ser melhor aproveitadas.

2.1.2.5 Diagnose

Por ser o RSD uma doença sem sintomas específicos que permitam sua indubitável identificação em campo, diversas técnicas laboratoriais são utilizadas para o diagnóstico da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em viveiros de mudas e canaviais comerciais. São elas: análises de microscopia, teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), DB-EIA (*Dot-Blot Enzyme Immunoassay*), EB-EIA (*Evaporative-Binding Enzyme Immunoassay*),

TB-EIA (*Tissue-Blot Enzyme Immunoassay*) e PCR (*Polimerase Chain Reaction*) (GIGLIOTI, 1997; IGLESIA, 2003; CARNEIRO, 2004).

A microscopia é usada em microbiologia para detecção inicial e identificação preliminar ou definitiva de bactérias, fungos, parasitas e inclusões virais. Cinco métodos gerais de microscopia têm sido utilizados: microscopia de campo claro (luz), microscopia de campo escuro, microscopia de contraste de fase, microscopia fluorescente e microscopia eletrônica (MURRAY et al., 2006). São todas técnicas dispendiosas, cansativas e nem tão precisas já vez que dependem da interpretação do analista.

Os testes sorológicos ou imunoensaios como ELISA, DB-EIA, EB-EIA e TB-EIA baseiam-se na detecção e quantificação de antígenos e anticorpos e são os mais utilizados no monitoramento da bactéria Lxx (GAGLIARDI et al., 2006). Apesar de sua relativa simplicidade, apresentam como desvantagem o fato de serem eficazes somente em amostras de plantas com alto grau de infecção.

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é comumente empregada em laboratórios de pesquisa para diversas tarefas como quantificação de expressão gênica, análises de microarranjo, controle de qualidade e validação de ensaio, genotipagem, análises de microRNA, quantificação viral, sequenciamento de genes, diagnóstico de doenças, criação de organismos transgênicos etc. É um método molecular de amplificação e de detecção de ácidos nucléicos. A RT-PCR (*Real-time Polymerase Chain Reaction*) é o que existe de mais moderno nesta tecnologia e está sendo cada vez mais aplicada no reconhecimento de patógenos de plantas graças a sua alta sensibilidade e especificidade (GAO et al., 2004; LEKANNE-DEPREZ et al., 2002). Quando comparada à PCR convencional, possibilita o acompanhamento e a quantificação do produto formado com base na intensidade de fluorescência, a obtenção de resultados reproduzíveis de maneira mais rápida e precisa e não requer a análise dos produtos de reação em géis de agarose. No entanto, a RT-PCR se depara também com algumas desvantagens: sujeita à variação intra e interensaio, alto custo do equipamento e necessidade de habilidade técnica e suporte.

Dessa forma, é importante frisar que a escolha do método de detecção depende de inúmeros fatores como o nível de infecção da planta hospedeira, urgência de resultados, quantidade de amostras, disponibilidade do equipamento e mão de obra qualificada.

2.1.2.5.1 PCR em tempo real (RT-PCR): princípios gerais

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi desenvolvida na década de 1980 pelo bioquímico estadunidense Kary Mullis, laureado com o Nobel de Química em 1993. É uma metodologia que permite a multiplicação de ácidos nucleicos usando os elementos básicos do mecanismo de replicação natural do material genético nas células (NOVAIS et al., 2004).

Com o advento da PCR em tempo real (RT-PCR), tornou-se possível monitorar a amplificação de DNA ou cDNA enquanto a reação ocorre, ao contrário da PCR convencional, cujos resultados são coletados somente depois que a reação se completa, sendo impossível determinar a concentração inicial de ácidos nucleicos.

A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação com termociclador para a excitação da fluorescência e computador para aquisição de dados (NOVAIS et al., 2004). Atualmente, existe disponível no mercado uma infinidade de kits para RT-PCR dos mais variados fabricantes. De modo geral, a grande maioria desses kits possui quase todos os reagentes necessários para o preparo do mix de reação: DNA-polimerase termoestável (Taq), *buffer* (estabilizador de pH), dNTP's (desoxirribonucleotídeos de adenina, guanina, citosina e timina), fluoróforo, ROX (normalizador da fluorescência) e água livre de nuclease.

A corrida de PCR pode ser dividida basicamente em três fases (Figura 9):

- Exponencial – a quantidade de produtos de PCR dobra a cada ciclo devido a grande quantidade de reagentes disponíveis (alta eficiência);
- Linear – as reações de formação dos produtos de PCR tendem a diminuir (baixa eficiência);
- Platô – as reações se estabilizam e nenhum produto é mais formado. É nesta fase que a PCR convencional gera suas medições.

Figura 9 – Gráfico relacionando a quantidade de produtos de PCR (eixo das ordenadas) e o número de ciclos (eixo das abscissas). Destaque para as fases da PCR: Exponencial, Linear e Platô (Fonte: APPLIED BIOSYSTEMS, 2012)

O gráfico acima demonstra que amostras com a mesma quantidade de DNA no início da reação (replicatas) podem apresentar quantidades diferentes de produtos de PCR na fase platô, única etapa em que são obtidos os resultados da PCR convencional. Isso se deve às variações da cinética das reações e garante à PCR em tempo real maior confiabilidade de dados quando comparada à PCR tradicional.

Na RT-PCR, dois valores são calculados na fase exponencial. A linha *Threshold* representa a quantidade de amplificado que emite pela primeira vez um sinal de fluorescência detectável pelo equipamento e o ciclo no qual a amostra atinge este nível recebe o nome de *Cycle Threshold* ou simplesmente Ct (Figura 10). O valor de Ct é inversamente proporcional à quantidade de produto detectado e uma redução de x para $x - 1$ no valor de Ct corresponde a um aumento de duas vezes na quantidade de DNA amplificado.

Figura 10 - O ciclo de PCR no qual a amostra alcança intensidade de fluorescência acima do *background* é o Ciclo *Threshold* ou Ct (Fonte: APPLIED BIOSYSTEMS, 2012)

Toda PCR em tempo real contém uma molécula fluorescente repórter para monitorar o acúmulo de produtos de PCR como a sonda TaqMan® e o corante SYBR® Green (APPLIED BIOSYSTEMS, 2012). Com o intuito de testar a viabilidade de métodos de eliminação da bactéria Lxx em tecidos iniciais de crescimento (meristemas) de plantas de cana-de-açúcar, utilizou-se neste estudo a técnica de RT-PCR. Por ter sido o fluoróforo empregado nas análises moleculares do presente trabalho, será dada breve atenção a algumas características e princípios de funcionamento somente do SYBR® Green.

O uso do SYBR® Green em máquinas de PCR em tempo real apresenta vantagens como a amplificação de qualquer sequência de DNA de cadeia dupla, menor custo de execução em relação à sonda e fácil manuseio. No entanto, tal corante pode gerar sinais falso-positivos devido à presença de dímeros de *primers*, *hairpins* ou amplificações inespecíficas.

Quando o corante é adicionado à amostra de interesse, ele imediatamente se liga à dupla fita de DNA, emitindo luz em comprimento de onda específico. Com a desnaturação pelo calor da dupla fita de DNA em duas cadeias simples, as moléculas de SYBR® Green são liberadas e o sinal de fluorescência cai. Posteriormente, inicia-se a hibridização, durante a qual os *primers* ficam pareados com sequências homólogas do DNA de fita simples. Já na fase de extensão ou polimerização, ocorre a síntese de nova fita dupla de DNA catalisada pela enzima Taq DNA-polimerase. Mais moléculas de SYBR® Green se ligam às duplas hélices formadas recentemente e, assim, a reação é monitorada continuamente e o aumento da fluorescência é observado em tempo real.

Para a obtenção de resultados reproduzíveis e com exatidão, é essencial que a eficiência da reação esteja próxima de 100%, o que significa que a quantidade de DNA deve duplicar a cada ciclo de amplificação. A eficiência é determinada através do valor de inclinação da reta de uma curva-padrão (*Standard Curve*) e a pureza do produto é verificada a partir de uma curva de dissociação (*Melt Curve*), a qual revela se existe mais de um produto amplificado. A curva de dissociação de uma reação específica caracteriza-se pela formação de um pico único e, portanto, de uma única temperatura de dissociação (temperatura de *melting*) da dupla fita de DNA (BUSTIN, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Piracicaba, SP). Nos experimentos, foi utilizada a variedade SP80-3280 de cana-de-açúcar. A escolha desta variedade se fez com base em seu potencial comercial e em sua susceptibilidade à bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Enquanto um primeiro experimento se fez a partir de plantas obtidas do cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos caulinares, o segundo fundamentou-se em plantas originadas por meio do cultivo *in vitro* de gemas laterais imaturas (meristemas do colmo). A descrição completa de cada procedimento encontra-se nos itens a seguir.

3.1 Experimento com ápices meristemáticos caulinares

3.1.1 Instalação

Plantas da variedade SP80-3280 com aproximadamente oito meses de idade, provenientes da Estação Experimental da Fazenda Areão (Campus “Luiz de Queiroz” – Piracicaba, SP), foram colhidas e cortadas em toletes de apenas uma gema, os quais foram lavados com quartenário de amônio (cloreto de alquil dimetil benzil amônio diluído na proporção 1:100), cuidadosamente escovados para a remoção de impurezas sólidas e enxaguados em água corrente. Com comprimento médio de 6 cm, os toletes foram embalados em sacos plásticos reticulados para facilitar o manuseio e submetidos ao tratamento térmico em aparelho banho-maria (*Thermo Scientific*, Modelo 260) contendo água destilada à temperatura de 52 °C por 30 minutos. Posteriormente, foram imersos em solução fungicida (Metiltiofan – 0,9 g L⁻¹) por 3 minutos, distribuídos em bandejas plásticas contendo substrato Basaplant e colocados em casa de vegetação. Produziu-se um total de 14 bandejas com 30 toletes cada (Figura 11). A irrigação era realizada manualmente todos os dias no início da manhã e no fim da tarde, evitando-se encharcar o substrato.

Figura 11 - Toletes de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 antes de serem encobertos por substrato e alocados na casa de vegetação

3.1.2 Isolamento dos ápices meristemáticos caulinares

Por volta de 20 dias após a instalação, as brotações das gemas já apresentavam tamanho suficiente (cerca de 30 cm de altura) para o isolamento de seus meristemas (Figura 12), sendo removidas através de cortes bem rentes à superfície dos toletes com lâminas de bisturi individuais a fim de evitar a contaminação cruzada. Na ocasião, fez-se também a amostragem de seus tecidos foliares para verificar por meio da técnica de PCR em tempo real se tais plantas (denominadas de plantas matrizes) estavam infectadas por Lxx. Em seguida, as brotações foram reduzidas a cartuchos foliares (com aproximadamente 8 cm de comprimento) que, após lavagem em água corrente, foram desbastados (remoção de duas a três camadas de folhas) e desinfestados. O procedimento de desinfestação foi realizado em câmara de fluxo laminar imergindo os cartuchos por 1 minuto em etanol 70%, 20 minutos em Qboa 20% (solução comercial de hipoclorito de sódio) e, finalmente, duas lavagens com água deionizada autoclavada (120 °C e 1 atm por 20 minutos).

Figura 12 - Brotações de toletes da variedade SP80-3280 com aproximadamente 30 cm de altura prontas para a extração de seus meristemas apicais

Com os cartuchos foliares desinfestados, iniciou-se o isolamento propriamente dito dos meristemas. Por se tratarem de estruturas muito pequenas, os meristemas foram isolados com o auxílio de lupa, facilitando assim a visualização e a remoção do maior número possível de camadas foliares, sempre com cuidado para não danificar o tecido. Além disso, os cartuchos permaneceram o tempo todo em solução autoclavada de ácido cítrico (150 mg L^{-1}) para minimizar danos por oxidação haja vista que tal procedimento demanda bastante cautela, habilidade e tempo. É importante ressaltar que, durante a dissecação dos meristemas, tomou-se o cuidado de utilizar uma lâmina nova de bisturi para cada explante uma vez que a principal via de transmissão da bactéria Lxx é o uso de instrumentos de corte contaminados com fluido vascular de plantas doentes.

Isolou-se o total de 96 meristemas de três tamanhos diferentes: 32 meristemas de aproximadamente 0,5 mm, 32 meristemas de aproximadamente 1,0 mm e 32 meristemas de aproximadamente 1,5 mm denominados como P (Pequeno), M (Médio) e G (Grande), respectivamente.

3.1.3 Cultivo *in vitro* e em casa de vegetação

Os meristemas foram colocados individualmente em tubos de ensaio contendo cerca de 10 mL de meio de cultura autoclavado (120 °C e 1 atm por 20 minutos) preparado a partir de sais e vitaminas MS (Murashige & Skoog), sacarose (30 g L⁻¹), ácido cítrico (150 mg L⁻¹), carvão ativado (1 g L⁻¹), *Phytigel* (2,3 g L⁻¹) e com pH ajustado para 5,8. Após 72 horas no escuro, foram transferidos para o mesmo meio de cultura agora acrescido de BAP (6-benzilaminopurina - 3 mg L⁻¹) e mantidos em sala de crescimento com iluminação (fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C e intensidade luminosa de 40 μmol cm⁻² s⁻¹), visando a indução de brotações.

Para os explantes não terem seu desenvolvimento limitado, ao atingirem aproximadamente 4 cm de altura foram transferidos dos tubos de ensaio para recipientes de vidro maiores. Os subcultivos eram feitos a cada 15 dias ou sempre que necessário, ou seja, quando o meio começava a apresentar coloração amarronzada devido ao acúmulo de compostos fenólicos ou quando havia a presença de tecidos mortos.

Objetivando determinar as taxas de contaminação por bactéria e/ou fungo, 45 dias após a inoculação foi realizada a avaliação dos explantes, constatando-se que 18 explantes do tipo P, 11 explantes do tipo M e 12 explantes do tipo G não contaminaram e brotaram, podendo ser empregados nas análises subsequentes do experimento. Um dos principais inconvenientes desta fase é a demora da diferenciação do tecido meristemático em meio de cultura (FORTES; PEREIRA, 2003). Isto ocorre por que os explantes são muito pequenos e apresentam dificuldades de sobreviver e se desenvolver *in vitro*. Sendo assim, a etapa de diferenciação costuma variar de 45 a 60 dias dependendo da cultivar e, após este período, necessitam geralmente de mais 30 dias para a formação de brotações (CONCEIÇÃO et al., 1999).

Cerca de 90 dias após a inoculação, os meristemas sadios (sem contaminação e com brotações) já haviam regenerado plantas com raízes bem desenvolvidas (denominadas de plantas filhas), tornando possível a aclimação em casa de vegetação. Um perfilho de cada planta filha *in vitro* foi selecionado, colocado em bandeja plástica de células individuais contendo substrato Basaplant (Figura 13) e mantido sob armação metálica coberta por plástico transparente durante duas semanas. Adaptados a esta nova condição, foram transferidos individualmente para vasos contendo terra previamente autoclavada (solo de barranco, húmus de minhoca e areia fina na proporção 1:1:1).

Figura 13 – Perfilhos das plantas filhas *in vitro* recém-transferidos para a casa de vegetação

Nas bandejas plásticas, os perfilhos eram irrigados manualmente duas vezes ao dia (início da manhã e final da tarde), sempre com cuidado para não deixar o substrato encharcado. Já em vasos, passou-se a utilizar sistema de irrigação por gotejamento programado para manter a capacidade de campo. Ademais, a cada 20 dias fazia-se a limpeza dos vasos e a poda das plantas, eliminando-se folhas secas e outros materiais indesejáveis. Vale lembrar que todo instrumento de corte utilizado durante o processo de limpeza era higienizado de uma planta para outra com etanol 70%.

3.1.4 Amostragem

Os perfilhos das plantas filhas foram amostrados aos 15 e 90 dias de cultivo em casa de vegetação, coletando-se de cada um deles fragmento de aproximadamente 10 cm de comprimento da folha mais jovem totalmente expandida (folha +1). As amostras foram embaladas, identificadas e mantidas em nitrogênio líquido até o término da coleta. Posteriormente, foram estocadas em freezer -80 °C, onde permaneceram até o início das análises moleculares.

3.1.5 Extração e quantificação de DNA total

Todo material foliar amostrado foi macerado em nitrogênio líquido. Com o objetivo de promover a extração da maior quantidade possível de DNA da planta e da bactéria (este se presente na amostra), utilizou-se um protocolo desenvolvido por pesquisadores do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP. O protocolo encontra-se descrito a seguir com os reagentes balanceados para 75 mg de tecido vegetal:

- Lavar 2 vezes o tecido foliar macerado em solução de NaCl 1M preparada em tampão T₁₀E₁₀ (10 mM Tris/10 mM EDTA – pH 8,0). Usar 500 µl por lavagem, centrifugando a 12.000 rpm por 5 minutos depois de cada lavagem. Descarte o sobrenadante;
- Ressuspender o precipitado em 337,5 µl de solução SET (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, Tris-base 20 mM – pH 7,5) acrescentado de 1 mg mL⁻¹ de lisozima e incubar a 37 °C por 2 horas em banho-maria. A enzima deve ser acrescentada na hora;
- Adicionar 35 µl de SDS 10% mais 0,5 mg mL⁻¹ de proteinase K e incubar a 55 °C por 2 horas em banho-maria;
- Adicionar 125 µl de NaCl 5M e 375 µl de clorofórmio e incubar o conteúdo a temperatura ambiente por 30 minutos na capela;
- Centrifugar a 5.000 rpm por 15 minutos, recolher o sobrenadante e colocar em novo tubo de *Eppendorf*;
- Precipitar o DNA adicionando 375 µl de isopropanol gelado e deixar por 2 horas a – 20 °C ou por 12 horas (*overnight*) a – 8 °C;
- Centrifugar a 10.000 rpm por 20 minutos;
- Descartar o conteúdo deixando apenas o *pellet* no tubo. Secar em temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora ou em estufa a 37 °C por aproximadamente 30 minutos;
- Ressuspender o DNA em 200 µl de T₁₀E₁₀ (sem RNase), misturar com cuidado e iniciar o processo de limpeza com CTAB;
- Adicionar 100 µl de NaCl 5M e misturar lentamente por inversão;
- Adicionar 80 µl de CTAB 10% em NaCl 1M e misturar por inversão novamente;
- Aquecer por 10 minutos a 65 °C em bloco de banho seco;
- Adicionar 600 µl de clorofórmio;

- Centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm e separar o sobrenadante em novo tubo de *Eppendorf*;
- Adicionar 600 µl de isopropanol gelado e deixar por 2 horas a – 20 °C ou por 12 horas (*overnight*) a – 8 °C;
- Centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm. Descartar o sobrenadante, deixando apenas o precipitado no tubo;
- Lavar o precipitado 2 vezes com etanol 70% gelado (escorrer o álcool na parede do tubo sem perturbar muito o *pellet*), utilizando 500 µl em cada lavagem. Centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos a cada lavagem;
- Secar em temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora ou em estufa a 37 °C por aproximadamente 30 minutos;
- Eluir em 40 µl de H₂O milli-Q autoclavada com RNase a 10 µg mL⁻¹;
- Armazenar em freezer a – 20 °C.

Após a extração, as amostras de DNA total foram quantificadas em aparelho *NanoDrop (Thermo Scientific)*, cuja calibração foi feita com a mesma solução de eluição utilizada no final do protocolo acima descrito. As leituras foram realizadas com o volume de 1,5 µl e, posteriormente, todas as amostras foram diluídas a 50 ng µl⁻¹. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1%.

3.1.6 PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em termociclador do modelo *StepOnePlus (Applied Biosystems)*, o qual foi programado para trabalhar nas seguintes condições: modo *Quantitation Standard Curve* com reagente *SYBR® Green*, desnaturação a 95 °C por 2 minutos e 40 ciclos de anelamento e extensão a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 45 segundos. A análise das curvas de dissociação (*Melting Curve*) foi feita para verificar a especificidade dos *primers*.

Todas as reações foram realizadas em duplicata e preparadas com reagentes do kit *Plantinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* da *Invitrogen*. Cada reação era composta por: 12,5 µl de SuperMix, 0,5 µl de solução ROX a 25 µM, 0,5 µl de Lxx 12950F1 a 10 µM, 0,5 µl de Lxx 12950R1 a 10 µM, 2,0 µl de DNA e 9,0 µl de água livre de nuclease, totalizando um volume de 25 µl. A curva-padrão foi preparada com diluições seriadas na

proporção 1:10 a partir de DNA puro da estirpe CTCB07 de Lxx fornecido pelo laboratório de Genética Molecular do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP.

Assim como o DNA bacteriano, o par de *primers* Lxx 12950F1/R1 também foi fornecido por pesquisadores do laboratório citado anteriormente, sendo construído através dos *softwares* *Primer 3 V.4* (ROZEN et al., 2000) e *Primer Express V 3.0* (*Applied Biosystems*) a partir de uma sequência de genes únicos de Lxx que não possuía similaridade a outras depositadas no *GenBank* (banco de dados de sequências de DNA e de aminoácidos do Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA – NCBI). Sua escolha se fez com base na comparação de resultados de diversos testes de especificidade realizados também com outros pares de *primers*, não apresentando a formação de dímeros e amplificações com DNA de Lxx e de isolados endofíticos de colmos de variedades comerciais de cana-de-açúcar (CARVALHO, 2012). O tamanho do fragmento gerado por estes *primers* é de 106 pb e a temperatura de dissociação é de 84,5 °C. Suas sequências estão descritas a seguir:

- F1 - 5'-GCACATCGATCTGGAAAAAAGG-3';
- R1 - 5'-CCGCAGTCTCACGCATACC-3'

3.1.7 Confirmação de Lxx

Para confirmar a identidade do fragmento amplificado nas reações de qPCR, submeteu-se ao PCR convencional e ao sequenciamento duas amostras de DNA total de plantas com níveis divergentes de infecção por Lxx (uma com baixa infecção e outra com alta infecção). As reações de PCR foram realizadas em termociclador *PTC-200 Peltier Thermal Cycler*, preparadas com *Taq DNA-polymerase* (*Promega*) e seguiram o protocolo: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 40 segundos, anelamento a 58 °C por 40 segundos, extensão a 72 °C por 45 segundos e extensão final a 72 °C por 10 minutos. O par de *primers* utilizado foi o mesmo empregado nas reações de PCR em tempo real (ver item 3.1.6), cujo tamanho do fragmento amplificado é de 106 pb. Como controle negativo usou-se água (mix da reação apenas) e, como controle positivo, DNA da estirpe CTCB07 de Lxx a 0,375 ng μl^{-1} . Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese, purificados com o kit *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems*) de acordo com as normas do fabricante e sequenciados em aparelho *3130xl Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*). As sequências foram analisadas através da ferramenta *BLAST* presente no banco de dados do NCBI.

3.2 Experimento com gemas laterais

3.2.1 Obtenção e preparo do material vegetal

Na Estação Experimental da Fazenda Areão, plantas da variedade SP80-3280 com cerca de oito meses de idade foram colhidas e cortadas em toletes de uma gema, os quais foram lavados e escovados em água corrente assim como descrito no experimento anterior (ver item 3.1.1). Fragmentos de aproximadamente 10 cm de comprimento da folha mais jovem totalmente expandida (folha +1) foram coletados dessas plantas (denominadas de plantas matrizes) para confirmação da infecção por Lxx através da técnica de PCR em tempo real. Durante a seleção das gemas, deu-se preferência pelas cinco primeiras numeradas a partir do meristema apical, pois são jovens, estão menos sujeitas a injúrias e apresentam maior vigor de brotação. Após a lavagem, os toletes foram embalados em sacos plásticos reticulados, devidamente identificados e imersos em solução fungicida (Metiltiofan – $0,9 \text{ g L}^{-1}$) por 3 minutos. Levando-se em conta as perdas por contaminação, separou-se grande quantidade de gemas por três dias consecutivos formando os seguintes grupos: primeiro grupo, 135 gemas obtidas de 20 plantas; segundo grupo, 180 gemas obtidas de 24 plantas; e terceiro grupo, 276 gemas obtidas de 32 plantas.

3.2.2 Isolamento das gemas e termoterapia

Imediatamente após a imersão dos toletes em fungicida, as gemas laterais foram isoladas através da remoção do excesso de tecido do colmo, colocadas em placas de vidro com solução autoclavada (120°C e 1 atm por 20 minutos) de ácido cítrico (150 mg L^{-1}) para reduzir a oxidação (Figura 14) e, em seguida, desbastadas.

Figura 14 – Isolamento das gemas laterais: a) eliminação do excesso de tecido do colmo; b) gemas isoladas em solução autoclavada de ácido cítrico (150 mg L^{-1})

Como as gemas possuem muitas reentrâncias que servem de guarida para inúmeros microrganismos, foram removidas de duas a três camadas de folhas (denominadas catáfilos) e a porção de colmo ainda presente em cada uma delas foi reduzida o máximo possível sem prejudicar a integridade do meristema (Figura 15). Optou-se por retirar, no máximo, três catáfilos nesta etapa do experimento por receio de que o tratamento térmico interferisse na capacidade de brotação das gemas.

Figura 15 – Gemas desbastadas em solução de ácido cítrico (150 mg L^{-1}) prontas para o tratamento térmico

O tratamento térmico consistiu em manter as gemas em aparelho banho-maria (*Thermo Scientific*, Modelo 260) contendo água destilada a 50 °C por três tempos diferentes: T1 = 1 hora, T2 = 2 horas, T3 = 3 horas. No tratamento controle (T0), não foi aplicado tratamento térmico. As gemas foram colocadas em saquinhos feitos com gaze e dispostas conforme apresentado na Figura 16. No primeiro grupo de gemas isoladas, os tratamentos T0, T1, T2 e T3 eram compostos por 31, 34, 34 e 36 gemas, respectivamente. No segundo grupo, eram compostos por 45, 46, 45 e 44 gemas. Já no terceiro grupo por 70, 74, 68 e 64 gemas, respectivamente.

Figura 16 – Saquinhos de gaze com as gemas ancorados por um arame para que não entrassem em contato com as laterais e o fundo do aparelho banho-maria

Vale ressaltar que, assim como procedido no experimento com meristemas apicais, tomou-se o cuidado de higienizar com etanol 70% todos os instrumentos utilizados no processo de isolamento das gemas de tolete em tolete e, durante o desbaste, foi utilizada uma lâmina nova de bisturi para cada gema.

3.2.3 Desinfestação e inoculação

Após a termoterapia, as gemas foram desinfestadas na câmara de fluxo laminar: 1 minuto em etanol 70%, 20 minutos em Qboa 20% (solução comercial de hipoclorito de sódio) e duas lavagens com água deionizada autoclavada. Em seguida, foram colocadas em solução autoclavada de ácido cítrico (150 mg L^{-1}) para minimizar a oxidação dos tecidos e aí permaneceram até que se removesse mais dois ou três catáfilos com o auxílio de lupa e bisturi e fossem transferidas para tubos de ensaio contendo cerca de 10 ml de meio de cultura autoclavado (120°C e 1 atm por 20 minutos) preparado com sais e vitaminas MS (Murashige & Skoog), sacarose (30 g L^{-1}), ácido cítrico (150 mg L^{-1}), carvão ativado (1 g L^{-1}), *Phytigel* ($2,3 \text{ g L}^{-1}$) e com pH ajustado para 5,8.

3.2.4 Cultivo *in vitro* e em casa de vegetação

Assim que inoculadas, as gemas permaneceram por 72 horas no escuro para minimizar os efeitos da oxidação. Passado este período, foram transferidas para novos tubos de ensaio contendo o meio de cultura descrito no item 3.2.3 adicionado de BAP (6-benzilaminopurina - 3 mg L^{-1}) e mantidas em sala de crescimento com iluminação (fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para a proliferação de brotações.

Conforme feito no experimento de meristemas apicais (ver item 3.1.3), as repicagens e transferências para novos meios de cultura foram realizadas a cada 15 dias ou sempre que necessário. Quando a parte aérea alcançou em torno de 4 cm de altura (Figura 17), as plântulas foram transferidas para recipientes de vidro maiores, onde puderam crescer e perfilhar.

Figura 17 - Broto de gema da variedade SP80-3280 com 4 cm de altura aos 45 dias de cultivo *in vitro*

Com o intuito de comparar as taxas de contaminação (por bactéria e/ou fungo) dos quatro tratamentos aplicados (T0, T1, T2 e T3), fez-se avaliação dos explantes 45 dias após a inoculação. Para a condução do experimento foram selecionados aleatoriamente 48 explantes sadios (sem contaminação) em processo de brotação de maneira que cada tratamento fosse composto por 12 plantas/repetições. Aproximadamente 90 dias após a inoculação, as plantas obtidas *in vitro* (plantas filhas) já apresentavam perfilhos enraizados prontos para a aclimação em casa de vegetação. Dessa forma, um perfilho de cada planta filha foi selecionado, colocado em bandeja de células individuais contendo substrato Basaplant e mantido sob armação metálica coberta por plástico transparente por 15 dias. Passado este período, todos os perfilhos foram transferidos individualmente para vasos com terra autoclavada (solo de barranco, húmus de minhoca e areia fina na proporção 1:1:1). A irrigação nas bandejas era feita todos os dias manualmente no período da manhã e da tarde enquanto que, nos vasos, utilizou-se gotejadores automáticos. A manutenção das plantas em casa de vegetação (limpeza dos vasos, remoção de folhas mortas etc.) era feita a cada 20 dias sempre com o cuidado de higienizar os instrumentos de corte com álcool 70% de uma planta para outra.

3.2.5 Amostragem

Os perfilhos das plantas filhas foram amostrados ao completarem 90 dias de permanência na casa de vegetação, removendo-se fragmentos de aproximadamente 10 cm de comprimento das folhas mais jovens totalmente expandidas (folhas +1). O material foliar coletado foi devidamente embalado, identificado e armazenado em freezer -80 °C até o início das análises moleculares.

3.2.6 Extração e quantificação de DNA total

Semelhantemente ao experimento de meristemas apicais, todas as amostras coletadas foram maceradas em nitrogênio líquido. Foi utilizado o mesmo protocolo de extração de DNA descrito no item 3.1.5 deste trabalho. Além disso, a quantificação e a avaliação da qualidade das amostras de DNA total também foram realizadas conforme relatado no item 3.1.5, com exceção da diluição, a qual foi feita a 20 ng μl^{-1} .

3.2.7 PCR em tempo real

As reações de qPCR foram realizadas em termociclador do modelo *StepOnePlus* (*Applied Biosystems*), cuja programação seguiu os parâmetros utilizados no experimento com ápices meristemáticos caulinares (ver item 3.1.6). Os *primers*, o DNA de Lxx (estirpe CTCB07) e o kit de reagentes também foram os mesmos. Cada reação foi preparada da seguinte forma: 12,5 μl de SuperMix, 0,3 μl de solução ROX a 25 μM , 0,3 μl de Lxx 12950F1 a 10 μM , 0,3 μl de Lxx 12950R1 a 10 μM , 5,0 μl de DNA e 6,6 μl de água livre de nuclease, totalizando um volume de 25 μl . A curva-padrão foi preparada com diluições seriadas do DNA bacteriano na proporção 1:10 e todas as reações foram realizadas em duplicata. A especificidade dos *primers* foi determinada através da curva de *Melting*, a qual foi calculada de acordo com os parâmetros *default* do equipamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Experimento com meristemas apicais

4.1.1 Avaliação dos explantes

Do total de 420 toletes previamente lavados com quartenário de amônio, submetidos ao tratamento térmico (52° C por 30 minutos) e colocados para germinar sob condições controladas em casa de vegetação, obteve-se 96 meristemas apicais. Tais meristemas foram isolados quando as plantas atingiram cerca de 30 cm de altura, sendo que apenas 41 (42,71%) puderam ser utilizados nas etapas seguintes do experimento devido às perdas em cultura de tecido por contaminação (bacteriana e/ou fúngica) e oxidação.

Dos 32 meristemas de tamanho P (aproximadamente 0,5 mm), 5 (15,63%) apresentaram contaminação bacteriana e 9 (28,13%) oxidaram totalmente (Tabela 1). Dos 32 meristemas de tamanho M (aproximadamente 1,0 mm), 14 (43,75%) contaminaram por bactéria e 7 (21,88%) oxidaram. Entre os 32 meristemas de tamanho G (aproximadamente 1,5 mm), 14 (43,75%) apresentaram contaminação por bactéria a exemplo dos meristemas de tamanho M e 5 (15,63%) oxidaram. Em relação à contaminação fúngica, os meristemas de tamanho G foram os únicos que apresentaram tal adversidade com apenas 1 explante perdido (3,13%).

Tabela 1 - Representação das taxas de contaminação (bactéria e fungo), oxidação, perda total e de sobreviventes dos meristemas de tamanho P, M e G

Meristema	Total	Bactéria	Fungo	Oxidados	Perda total	Sobreviventes
P	32	5 (15,63%)	0 (0,00%)	9 (28,13%)	14 (43,75%)	18 (56,25%)
M	32	14 (43,75%)	0 (0,00%)	7 (21,88%)	21 (65,63%)	11 (34,38%)
G	32	14 (43,75%)	1 (3,13%)	5 (15,63%)	20 (62,50%)	12 (37,50%)

Conforme esperado, os meristemas de tamanho P apresentaram menor perda por contaminação bacteriana em comparação aos meristemas de tamanho M e G (cerca de 2,80 vezes menor). Em contrapartida, a perda por oxidação foi aproximadamente 1,29 e 1,80 vezes maior em relação aos meristemas do tipo M e G, respectivamente.

Os números apresentados condizem com diversos estudos já realizados, pois demonstram a tendência de que explantes menores diminuem consideravelmente as taxas de contaminação das culturas *in vitro* (TORRES et al., 1998). O fato de carregarem menos tecido para as condições assépticas reduz a quantidade de contaminantes superficiais, aumentando as chances de se obter regenerantes isentos de microrganismos.

Ao contrário da relação discutida no parágrafo anterior, os meristemas do tratamento P foram os mais afetados pela oxidação dos tecidos. Esse comportamento pode ser explicado pela necessidade de maior manipulação dos explantes para a obtenção de ápices meristemáticos de menor dimensão, aumentando a ocorrência de ferimentos durante o processo de isolamento. Por meio desses ferimentos são liberados no meio de cultura exsudados (fenóis) que, em contato com íons metálicos de componentes do próprio meio, provocam o escurecimento e inibem o desenvolvimento dos explantes (DAWSON; MAGEE, 1955; MASON, 1955). A adição de substâncias ao meio de cultivo como o ácido cítrico, conforme foi feito neste trabalho, tem o objetivo de controlar a oxidação fenólica (atua como agente quelante de metais) (PASQUAL et al., 1997), a qual é agravada à medida que a luminosidade aumenta. É por esta razão que se recomenda a ambientação dos meristemas no escuro ou em local pouco iluminado durante os primeiros dias após o isolamento.

4.1.2 Determinação de Lxx em plantas de cana-de-açúcar

Para verificar a presença de infecção por Lxx nas plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação, foi realizada análise de PCR em tempo real das amostras de DNA total obtidas a partir dos fragmentos de folhas coletados na ocasião do isolamento dos meristemas apicais. Em experimentos como este, a confirmação da presença da bactéria nas plantas matrizes é imprescindível, pois somente assim é possível afirmar se a metodologia adotada é de fato eficiente na redução dos níveis de infecção ou na eliminação total do patógeno nas mudas de cana-de-açúcar.

Entre as 41 plantas matrizes analisadas, apenas uma (fornecedora de um meristema de tamanho M) apresentou qPCR negativo para a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e, por isso, foi desconsiderada juntamente com a planta filha proveniente do cultivo *in vitro* de seu meristema apical. Todas as matrizes apresentaram Ct (*Cycle Threshold*) dentro do intervalo de valores da curva-padrão (Figura 18), curvas de *Melting* com picos na temperatura de dissociação esperada de 84,5 °C e média de 8.608 células de Lxx em 100 ng de DNA total

(Tabela 2). As médias calculadas separadamente para as plantas matrizes que forneceram meristemas de tamanho P, M e G foram de 12.310, 3.769 e 7.087 células de Lxx, respectivamente. O número de células de Lxx foi obtido com base nas massas moleculares dos quatro nucleotídeos (A - adenina, C - citosina, G - guanina e T - timina), sabendo-se que a estirpe CTCB07 possui um único cromossomo com 2.584.158 pb e conteúdo G+C de 68% (CARVALHO, 2012).

Figura 18 – (A) Curva-padrão correlacionando valores de Ct (eixo das ordenadas) e massas conhecidas de DNA de Lxx de 0,126 pg a 1,26 ng (eixo das abscissas). $R^2 = 0,999$ e eficiência de reação de 99,9%; (B) Curvas de dissociação (*Melt Curve*) das amostras em diluição seriada (1:10) de DNA de Lxx utilizadas na construção da curva-padrão com picos na temperatura de dissociação dos *primers* (84,5 °C)

De cada planta filha formada *in vitro* a partir dos meristemas apicais isolados, selecionou-se um perfilho para a realização dos ensaios de qPCR nos tempos de 15 e 90 dias de permanência em casa de vegetação. As análises de PCR em tempo real das amostras de DNA aos 15 dias revelaram que todos os perfilhos das plantas filhas ainda continham a bactéria (média de 343 células de Lxx em 100 ng de DNA total), apesar do tratamento térmico

dos toletes e do cultivo de meristemas *in vitro*. No entanto, houve uma redução de aproximadamente 25 vezes no nível de infecção em relação às plantas matrizes. No tempo de 90 dias, os perfilhos apresentaram média de 45 células de Lxx, mostrando redução de infecção ainda mais significativa que aos 15 dias em relação às plantas matrizes (quase 200 vezes menor).

Tabela 2 – Média do número de células de Lxx presentes nas plantas matrizes e em perfilhos de suas plantas filhas aos 15 e 90 dias de cultivo em casa de vegetação

Perfilhos	Matrizes	Perfilhos de 15 dias	Perfilhos de 90 dias
P	12.310	404	48
M	3.769	299	87
G	7.087	289	5
P + M + G	8.608	343	45

Para verificar se houve diferença significativa no nível de infecção por Lxx entre os três tratamentos dentro de cada tempo de coleta (15 e 90 dias), foi feita a análise de variância (ANOVA) de modelo linear generalizado, considerando números de repetições diferentes (18, 10 e 12 para os tratamentos P, M e G, respectivamente) e a normalização do número de células bacterianas nos perfilhos das plantas filhas pelo número de células bacterianas nas plantas matrizes (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise de variância do número de células de Lxx presentes nos perfilhos das plantas filhas aos 15 e 90 dias de cultivo na casa de vegetação. Nível de significância de 5%

Tempo de coleta	Número de células	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	p
15 dias	Entre tratamentos (P, M, G)	12,1955	2	6,0977	2,798952	0,073799
	Erro	80,6075	37	2,1786		
90 dias	Entre tratamentos (P, M, G)	1,6541	2	0,8270	12,832949	0,000058
	Erro	2,3845	37	0,0644		

No tempo de 15 dias, não houve diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de significância ($p > 5\%$). A Figura 19 representa a plotagem dos tratamentos de acordo com os valores estatísticos encontrados, confirmando a análise de variância descrita. Os intervalos de confiança dos três tratamentos se sobrepõem, os valores médios estão bem próximos entre si e as plantas do tratamento G tenderam a apresentar títulos de Lxx mais elevados. Os pontos situados acima da caixa do tratamento G representam indivíduos com valores discrepantes (*outliers*) em relação ao restante do grupo.

Figura 19 – *Boxplot* da distribuição dos dados obtidos a partir da análise de variância (ANOVA). Eixo das ordenadas: número normalizado de células de Lxx presentes nos perfis das plantas filhas no tempo de 15 dias em casa de vegetação. Eixo das abscissas: Tratamento P; Tratamento M; Tratamento G

Em contraposição, no tempo de 90 dias, observou-se diferença significativa ($p < 5\%$), rejeitando-se a hipótese de nulidade de que as médias são todas iguais. Com base na Figura 20, nota-se que esta diferença se deve às plantas do tratamento M, que apresentaram títulos de Lxx mais contrastantes em relação às plantas dos tratamentos P e G, conferindo-lhes um intervalo de confiança muito maior. As plantas dos tratamentos P e G apresentaram *boxplots* que pouco diferem entre si, ou seja, intervalos de confiança pequenos que se sobrepõem e valores médios bem próximos.

Figura 20 – *Boxplot* da distribuição dos dados obtidos a partir da análise de variância (ANOVA). Eixo das ordenadas: número normalizado de células de Lxx presentes nos perfis dos plantas filhas no tempo de 90 dias em casa de vegetação. Eixo das abscissas: Tratamento P; Tratamento M; Tratamento G

Dentre os 40 perfilhos, 27 deles continham títulos extremamente baixos de Lxx no tempo de 90 dias (média de 4 células em 100 ng de DNA total), sendo 11 plantas originadas de meristemas de tamanho P, 4 plantas de meristemas de tamanho M e todas as 12 plantas de meristemas de tamanho G. As amostras de DNA dessas plantas apresentaram valores de Ct superiores ao Ct do ponto de menor concentração da curva-padrão e, por isso, presumiu-se que tais valores pudessem estar relacionados com a formação de dímeros ou qualquer outro produto inespecífico. No entanto, ao verificar as curvas de *Melting*, notou-se que todas as amostras possuíam picos na temperatura de dissociação do produto de amplificação dos *primers* (84,5 °C), com exceção de 4 amostras de plantas de meristemas P, 1 amostra de planta de meristema M e 3 amostras de plantas provenientes de meristemas de tamanho G. Dessa forma, estes 8 perfilhos foram os únicos considerados livres de Lxx ao final dos 90 dias de cultivo na casa de vegetação.

Apesar de as curvas de *Melting* terem apresentado picos na temperatura específica de dissociação dos *primers*, para que não houvesse dúvidas de que o produto de amplificação das

amostras de DNA total dos perfilhos com títulos bacterianos muito baixos aos 90 dias realmente pertenciam à sequência-alvo do DNA de Lxx, duas amostras foram selecionadas para PCR convencional e posterior sequenciamento: uma amostra de DNA de perfilho com 90 dias detectado por qPCR com baixa infecção (1,1 células de Lxx em 100 ng de DNA total) e outra de DNA de planta matriz com alta infecção (59.105 células de Lxx em 100 ng de DNA total). Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese e todos apresentaram bandas na região equivalente à banda da bactéria Lxx (controle positivo – 106 pb) (Figura 21). Além disso, os fragmentos de DNA amplificados, quando sequenciados e comparados com outros isolados no banco de dados do NCBI, apresentaram similaridade entre 98% e 100% com Lxx, confirmando a presença da bactéria nas duas amostras de planta (Figura 22).

Figura 21 - Gel de agarose 2% do produto amplificado por PCR convencional, evidenciando a presença da bactéria Lxx em todas as amostras testadas. Kb: marcador molecular 1 Kb DNA Ladder Plus; (1), (2) e (3): amostra com baixo título de Lxx; (4) e (5): amostra com elevado título de Lxx; (+): controle positivo; (-): controle negativo

Figura 22 – Resultado obtido através da ferramenta *BLAST* no banco de dados do NCBI (*GenBank*) após análise da sequência do produto de PCR gerado pelas amostras de DNA dos perfilhos com baixa (A) e alta (B) infecção por Lxx. A amostra do perfilho com baixa infecção apresentou identidade de 98% com a bactéria Lxx, enquanto que a amostra do perfilho com alta infecção obteve 100% de identidade

A redução no título de células bacterianas dos 15 para os 90 dias contrariou a hipótese de aumento da infecção com o passar do tempo. As causas diretas que levaram a tal comportamento são desconhecidas, mas acredita-se que possam ter a ver com a resistência atribuída à variedade de cana-de-açúcar em questão (SP80-3280), com o desempenho fastidioso da própria bactéria ou até mesmo com a época de transferência dos perfilhos para a casa de vegetação e de coleta do material foliar.

Diversos trabalhos já demonstraram que a resistência de variedades de cana-de-açúcar ao raquitismo-da-soqueira está relacionada com a redução da densidade populacional de Lxx nos tecidos vasculares (BAYLEI, 1977; DAVIS et al., 1988; GILLASPIE JR. et al., 1976; KOIKE et al., 1982). Dessa forma, as variedades denominadas resistentes seriam aquelas com a capacidade de restringir o desenvolvimento do patógeno e a colonização de seus tecidos, levando a menores perdas de produção.

Em experimento com plantas da variedade SP80-3280 inoculadas apenas com meio de cultura e com meio contendo Lxx, Carvalho (2012) demonstrou que esta variedade se

comporta como resistente em relação à variedade RB835486 uma vez que, 60 dias após a inoculação, consegue manter os níveis endofíticos de Lxx sob controle na ausência de fatores que alterem o título bacteriano que, no caso, foi a inoculação somente com meio. Comportamento semelhante pode ser atribuído aos perfilhos das plantas filhas da variedade SP80-3280 deste estudo, sugerindo a ativação de algum mecanismo de defesa por parte do hospedeiro capaz de limitar o crescimento do patógeno dos 15 aos 90 dias de permanência na casa de vegetação.

O hábito de crescimento fastidioso da bactéria Lxx também pode ajudar na compreensão da redução dos níveis de infecção dos perfilhos ao longo do tempo. A fim de estabelecer uma curva de crescimento de Lxx e demonstrar seu comportamento fastidioso, ROSA (2006) realizou por um período de 10 dias leituras de densidade óptica em espectrofotômetro (600 nm) de alíquotas de 5 ml de meio de cultura contendo inóculo da bactéria mantido a 28 °C sob agitação de 30 rpm. Posteriormente, alicotou 100 µl do meio e fez diluições seriadas, as quais foram plaqueadas e incubadas para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Com base nessas medições, calculou que o tempo de geração de UFC para Lxx é de 6,9 horas, o que é considerado muito demorado em comparação com *Escherichia coli* (não fastidiosa), cujo tempo de geração é de 15 minutos (CHALKLEY; KOORNHOF, 1985).

Por apresentar esse crescimento lento, pode-se dizer que a bactéria Lxx não foi capaz de acompanhar o crescimento dos perfilhos na casa de vegetação, sofrendo um efeito diluidor dos 15 para os 90 dias. No cultivo *in vitro*, o ritmo lento de regeneração e crescimento dos tecidos meristemáticos e o estresse mecânico dos subcultivos podem ter levado à detecção de títulos bacterianos mais elevados (média de 343 células de Lxx) nas coletas de 15 dias, quando as plantas ainda possuíam porte pequeno (cerca de 30 cm de altura). No entanto, a partir dos 15 dias, com o crescimento vegetativo dos perfilhos cada vez mais intenso, a relação número de células de Lxx por área de tecido foliar foi diminuindo, proporcionando a detecção de títulos bem mais baixos no tempo de 90 dias (média de 45 células de Lxx). Aumento nos títulos de Lxx talvez pudesse ser observado em amostragens mais tardias (além dos 90 dias), com o amadurecimento dos tecidos e a estabilização do crescimento das plantas. As análises de quantificação de Lxx no tecido foliar das plantas *in vitro* não foram realizadas em razão de limitações técnicas, mas adicionar esta análise num estudo futuro certamente contribuiria para reforçar esse conceito de diluição.

Assim como os diversos fatores acima descritos, a época do ano em que a coleta das amostras de tecido foliar foi realizada também pode ter influenciado nos títulos bacterianos, provocando decréscimos como o evidenciado nas plantas deste experimento. Hoffman et al. (2013) demonstraram por meio de resultados de qPCR que a manutenção de plantas de citrus em câmaras de crescimento com temperatura elevada e controlada (40-42 °C) por um período mínimo de 48 horas foi capaz de reduzir significativamente ou eliminar totalmente a bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), causadora do “Amarelão” ou “Greening”. No presente estudo, os perfilhos foram transferidos para a casa de vegetação no mês de novembro/2010 e tiveram suas amostras foliares coletadas nos meses de dezembro/2010 e fevereiro/2011, característicos de altas temperaturas na região de Piracicaba/SP. De acordo com levantamento feito pelo Laboratório de Processamento de Dados Meteorológicos do Departamento de Engenharia de Biosistemas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ, 2012), as temperaturas médias mensais nos meses de novembro/2010, dezembro/2010 e fevereiro/2011 na cidade de Piracicaba foram de 24,0 °C, 25,3 °C e 26,0 °C, respectivamente. Por ser uma bactéria fastidiosa como Las, é possível que Lxx tenha se comportado de maneira semelhante ao ponto de os títulos nos perfilhos reduzirem após a exposição dos mesmos às altas temperaturas no interior da casa de vegetação. Sistemas de produção em ambiente protegido são intrinsicamente dependentes de fatores externos, como o clima, e de fatores internos, como o material de cobertura da casa de vegetação e os mecanismos de controle climático (ventiladores, exaustores etc.), compondo um ambiente dinâmico e complexo (SONI et al., 2005). A temperatura é uma das principais variáveis que exercem influência na resposta das plantas a determinados tratamentos e, apesar disso, muitos pesquisadores consideram uniforme o clima no interior das estufas (KITTA; BARTZANAS, 2007).

4.2 Experimento com gemas laterais

4.2.1 Avaliação dos explantes

O experimento com gemas laterais teve como objetivo testar três tipos de tratamento térmico (ver item 3.2.2) em gemas laterais isoladas de plantas maduras de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280. Levando em consideração as perdas por contaminação, foi isolada grande quantidade de gemas por três dias consecutivos, formando os seguintes grupos: primeiro grupo, 135 gemas obtidas de 20 plantas; segundo grupo, 180 gemas obtidas de 24 plantas; e terceiro grupo, 276 gemas obtidas de 32 plantas. No primeiro grupo, os tratamentos

T0, T1, T2 e T3 eram compostos por 31, 34, 34 e 36 gemas, respectivamente. No segundo grupo, eram compostos por 45, 46, 45 e 44 gemas. Já no terceiro grupo por 70, 74, 68 e 64 gemas, respectivamente.

No primeiro grupo de gemas isoladas, a avaliação realizada aos 45 dias após a inoculação revelou que 38 gemas (28,15%) contaminaram por bactérias, 13 gemas (9,63%) por fungos e 9 gemas (6,67%) por bactérias e fungos, restando 75 gemas sadias (55,56% sem contaminação). Em relação a cada tratamento, o percentual de gemas contaminadas e sadias pode ser visualizado na Tabela 4. A taxa de brotação em relação ao número total de explantes (135) foi de 50,37%. Dentre as 75 gemas sadias, 29 (38,67%) brotaram.

Tabela 4 - Representação das taxas de contaminação e de explantes sadios por tratamento do primeiro grupo de gemas isoladas

Condição do explante	Tratamentos			
	T0	T1	T2	T3
Bactéria	25,81%	38,24%	32,35%	16,67%
Fungo	9,68%	8,82%	8,82%	11,11%
Bactéria + Fungo	25,81%	2,94%	0,00%	0,00%
Sadios	38,71%	50,00%	58,82%	72,22%

No segundo grupo, importunamente, todas as gemas ou contaminaram ou morreram e foram descartadas. Já no terceiro grupo, a avaliação no 45º dia após a inoculação revelou que 90 gemas (32,61%) contaminaram por bactéria, 18 gemas (6,52%) contaminaram por fungo e 5 gemas (1,81%) contaminaram por bactéria e fungo, restando 163 gemas sadias (59,06%). O percentual de explantes contaminados e sadios por tratamento pode ser observado na Tabela 5. A taxa de brotação calculada em relação ao número total de explantes (276) foi de 58,34%. Dentre as 163 gemas sadias, 115 (70,55%) brotaram.

Tabela 5 – Representação das taxas de contaminação e de explantes sadios por tratamento do terceiro grupo de gemas isoladas

Condição do explante	Tratamentos			
	T0	T1	T2	T3
Bactéria	32,86%	44,59%	38,24%	12,50%
Fungo	5,71%	6,76%	8,82%	4,69%
Bactéria + Fungo	7,14%	0,00%	0,00%	0,00%
Sadios	54,28%	48,65%	52,94%	82,82%

Analizando os tratamentos individualmente, nota-se no primeiro grupo de gemas isoladas redução progressiva nos níveis gerais de contaminação do tratamento T0 para o T3 (de 61,30% para 27,78%) ao mesmo tempo em que ocorreu aumento da porcentagem de explantes sadios, demonstrando que o incremento no tempo de termoterapia influenciou positivamente a obtenção de regenerantes não contaminados. Ademais, as gemas tratadas termicamente por 3 horas (T3) apresentaram a menor taxa de contaminação por bactéria (16,67%), evidenciando que este tratamento foi mais eficaz na eliminação desse tipo de microrganismo. No terceiro grupo de gemas, não se observa essa redução progressiva nos níveis de contaminação. Os tratamentos T0, T1 e T2 apresentaram porcentagens de contaminação relativamente próximas entre si (45,71%, 51,35% e 47,06%, respectivamente), porém as taxas de contaminação de T1 e T2 se mostraram ligeiramente superiores à taxa de T0. Em conformidade com o ocorrido no primeiro grupo de gemas, o tratamento T3 também foi mais eficiente na eliminação de contaminantes bacterianos (12,50%) e proporcionou a obtenção de maior quantidade de explantes sadios (82,82%). Dessa forma, pode-se afirmar que, em ambos os grupos, o tratamento térmico de 3 horas foi mais vantajoso.

4.2.2 Determinação de Lxx em plantas de cana-de-açúcar

As 48 plantas matrizes dos explantes selecionados para a condução do experimento foram qPCR-positivas para Lxx. Suas amostras de DNA apresentaram Ct (*Cycle Threshold*) dentro do intervalo de valores da curva-padrão, curvas de *Melting* com picos na temperatura de dissociação dos *primers* (84,5 °C) e média de 58.320 células de Lxx em 100 ng de DNA total (Figura 23). As quantidades médias de células bacterianas nas matrizes das plantas filhas dos tratamentos T0, T1, T2 e T3 foram de 701, 628, 150.405 e 81.547 células de Lxx em 100 ng de DNA total, respectivamente. O cálculo do número de células foi feito conforme descrito no item 4.1.2 deste trabalho.

Figura 23 – (A) Curva-padrão correlacionando valores de Ct (eixo das ordenadas) e massas conhecidas de DNA de Lxx de 0,0142 pg a 1,42 ng (eixo das abscissas). $R^2 = 0,996$ e eficiência da reação de 106,9%; (B) Curvas de dissociação (*Melt Curve*) das amostras em diluição seriada (1:10) de DNA de Lxx empregadas na construção da curva-padrão com picos na temperatura de dissociação dos *primers* (84,5 °C)

Assim como as matrizes, todos os perfilhos das plantas filhas apresentaram após 90 dias na casa de vegetação qPCR positivo para Lxx e média de 300 células bacterianas, mostrando que o tratamento térmico mesmo quando aplicado nas gemas isoladas dos tecidos do colmo não foi capaz de erradicar o patógeno. As médias dos perfilhos de cada tratamento foram de 288, 239, 407 e 265 células de Lxx para T0, T1, T2 e T3, respectivamente. Com base nessas informações, verifica-se que houve decréscimo nos níveis de infecção das matrizes para as plantas filhas, firmando que a termoterapia, apesar de não eliminar o agente infeccioso, promove a redução dos títulos bacterianos.

As médias das porcentagens de redução nos níveis de infecção por Lxx foram de 49,59%, 53,57%, 80,08% e 81,73% para os tratamentos T0, T1, T2 e T3, respectivamente. A análise de variância (ANOVA) feita ao nível de 5% de significância revelou a existência de diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 5\%$). O teste de comparação de médias

(Tukey) demonstrou que o tratamento controle T0 não difere do tratamento T1 e que o tratamento T2 não difere do tratamento T3. No entanto, quando se compara os tratamentos T0 e T1 com os tratamentos T2 e T3, notam-se diferenças significativas (Figura 24).

Figura 24 – Porcentagens de redução no nível de infecção por Lxx proporcionadas pelo tratamento controle (T0) e pelos tratamentos térmicos de 1 hora (T1), 2 horas (T2) e 3 horas (T3). Médias de cada tratamento seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey

Esses resultados contrariam diversos estudos já realizados ao demonstrarem que o tratamento térmico não proporciona a limpeza absoluta das mudas de cana-de-açúcar (DAMANN; BENDA, 1983; BENDA, 1994) e reforçam a necessidade de se usar técnicas de maior sensibilidade de detecção da bactéria para diagnóstico da doença, pois grande parte do material propagativo considerado livre de Lxx utilizado no plantio em diversas regiões do país na realidade possui títulos bacterianos muito baixos, que são difíceis de serem detectados. Fernandes Jr. et al. (2010), por exemplo, relataram a eliminação completa de Lxx em toletes da variedade CB49-260 submetidos às mesmas condições do tratamento T2 deste trabalho. Porém, o método de detecção adotado por eles na ocasião foi o teste sorológico (*dot blot*), o qual é eficiente apenas em plantas com alto grau de infecção. Ao mencionarem trabalhos que detectaram Lxx em amostras tratadas a 50 °C por 2 horas, os próprios autores admitem que, se tivessem feito análises de PCR em tempo real, muito provavelmente acusariam a presença de Lxx.

5 CONCLUSÕES

Perante os resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que:

- Para aumentar as chances de se obter mudas de cana-de-açúcar livres de Lxx, deve-se partir de meristemas com tamanho inferior a 0,5 mm;
- Ápices meristemáticos de tamanho $\geq 0,5$ mm isolados de plantas provenientes de toletes de uma gema tratados termicamente (52 °C por 30 minutos) produzem plantas com títulos menores de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em relação às plantas genitoras, mas não necessariamente livres de tal patógeno;
- Os meristemas de 0,5 mm não necessariamente regeneraram plantas com títulos mais baixos da bactéria quando comparados com os meristemas de 1,0 mm e 1,5 mm, mostrando que estes tamanhos testados não apresentaram correlação positiva com o nível de infecção da planta regenerada por eles;
- Os tratamentos térmicos de 2 horas (T2) e 3 horas (T3) a 50 °C não eliminaram as bactérias de Lxx das mudas de cana-de-açúcar mesmo quando aplicados em gemas laterais isoladas do colmo. No entanto, proporcionaram as maiores médias de redução (80,08% e 81,73% para T2 e T3, respectivamente) nos níveis de infecção das plantas filhas, mostrando-se mais eficientes que o tratamento de 1 hora;
- Dependendo da resistência ao patógeno atribuída à variedade, plantas com títulos bacterianos muito baixos podem não desenvolver o raquitismo, mas continuarão sendo fontes potenciais de agentes causadores de infecção, tornando ainda assim necessária a rotina de prevenção da doença;
- É importante que os centros produtores de cana-de-açúcar, antes de liberarem toletes-sementes para o plantio, executem análises de PCR em tempo real, cujo método é eficaz em detectar quantidades ínfimas de Lxx.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, O. Raio x dos canaviais: censo revela variedades mais cultivadas. **Revista Canavieiros**, Sertãozinho, v.39, n.4, p. 20-21, set. 2009.
- ANDRADE, M.C. (Ed.). **Pernambuco cinco séculos de colonização**. João Pessoa: Grafset, 2004. 168p.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Disponível em: <http://www.appliedbiosystems.com.br/site/abhome.jsp>. Acesso em: 27 ago. 2012.
- BAYLEI, R.A. The systemic distribution and relative occurrence of bacteria in sugarcane varieties affected by ratoon stunting disease. **Proceedings of the South African Technologists Association**, Mont Edgecombe, v. 6, n. 9, p. 466-467, 1977.
- 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.
- BRUMBLEY, S.M.; PETRASOVITS, L.A.; BIRCH, R.C.; TAYLOR, P.W.J. Transformation and transposon mutagenesis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease of sugarcane. **The American Phytopathological Society**, Queensland, v. 15, n. 3, p. 262-268, 2002.
- BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular endocrinology**, London, v. 25, p. 169-193, 2000.
- CÂMARA, G.M.S. Ecofisiologia da cultura da cana-de-açúcar. In: CÂMARA, G.M.S.; OLIVEIRA, E.A.M. **Produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: FEALQ, 1993. p. 31-64.
- CARNEIRO, J.B.; SILVEIRA, S.F.; SOUZA FILHO, G.A.; OLIVARES, F.L.; GIGLIOTI, E. A. Especificidade de anti-soro policlonal a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 614-619, 2004.
- CARVALHO, G. de. **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. 144p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- CASCUDO, L.C. **Sociologia do açúcar**: pesquisa e dedução. Rio de Janeiro: Instituto do Açúcar e Alcool, 1971. 478p.
- CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A. (Ed.). **Ecofisiologia de culturas extrativas: cana-de-açúcar, seringueira, coqueiro, dendzeneiro e oliveira**. Cosmópolis: Stoller do Brasil, 2001. 138p.
- CAVALCANTE, M.S. **A verdadeira história da cachaça**. São Paulo: Sá Editora, 2011. 608p.

CHALKLEY, L.J.; KOORNHOF, H.J. Antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* determined by the killing curve method: antibiotic comparisons and synergistic interactions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 28, p. 331-342, 1985.

COMSTOCK, J.C.; SHINE, J.M.; 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, n. 6, p.704-708, 1996.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira, cana-de-açúcar safra 2012/2013, terceiro levantamento, dezembro/2012**. Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab, 2012. 18 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_12_10_34_43_boletim_cana_portugues_12_2012.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2013.

CONCEIÇÃO, A.M.; FORTES, G.R.L.; SILVA, J.B. Influência do ácido acetilsalicílico, da sacarose e da temperatura na conservação *in vitro* de segmentos caulinares de batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 182-185, 1999.

COOPERATIVA AGROINDUSTRIAL. Disponível em: <<http://www.coplana.com>>. Acesso em: 13 ago. 2012.

COOPERCITRUS REVISTA AGROPECUÁRIA. Disponível em: <<http://revistacoopercitrus.com.br/?pag=materia&codigo=6178>>. Acesso em: 20 ago. 2012.

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. 5p. (Cadernos COPERSUCAR, Série Melhoramento, 25).

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

DAVIS, M.J.; DEAN, J.L. Comparison of diagnostic techniques for determining incidence of ratoon stunting disease of sugarcane in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 68, p. 896-899, 1984b.

DAVIS, M.J.; DEAN, J.L.; HARRISON, N.A. Distribution of *Clavibacter xyli* subsp. *Xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in resistance to ratoon stunting disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 72, p. 443-448, 1988.

DAVIS, M.J.; GILLASPIE JR., 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, 1980b.

DAVIS, M.J.; GILASPIE JR., 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 Bermuda grass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 34, p. 107-117, 1984a.

DAVIS, M.J.; PURCEL, A.H.; THOMSON, S.V. Isolation media for the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, Lancaster, v. 70, p. 425-429, 1980a.

DAWSON, C.R.; MAGEE, R.J. Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase). In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N.O. (Ed.). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, 1955. p. 817-826.

D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetics and Genome Research**, Basel, v. 109, p. 27-33, 2005.

DOORENBOS, J.; KASSAM, A.H. **Yield response to water**. Rome: FAO, 1979. 193p.

EPE. **Balanco Energético Nacional**. Empresa de Pesquisa Energética. Rio de Janeiro: EPE, 2011. 267 p. Disponível em: <<http://ben.epe.gov.br/BENRelatorioFinal2011.aspx>>. Acesso em: 15 ago. 2012.

ESALQ. Disponível em: <<http://www.leb.esalq.usp.br/postocon.html>>. Acesso em: 23 out. 2012.

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

FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 17 ago. 2012.

FAUCONIER, R.; BASSEREAU, D. **La canne à sucre**. Paris: Maisonneuve et Larose, 1970. 468p.

FERNANDES JR., A.R.; GANEM JR., E.J.; MARCHETTI, L.B.L.; URACHIMA, A.S. Avaliação de diferentes tratamentos térmicos no controle do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 60-64, 2010.

FORTES, G.R.L.; PEREIRA, J.E.S. Batata-semente pré-básica: Cultura de Tecidos. In: PEREIRA, A.S.; DANIELS, J. (Ed.). **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Clima Temperado, 2003. p. 421-433.

FREYRE, G. (Ed.). **Açúcar em torno da etnografia da história e da sociologia do doce no Nordeste canavieiro do Brasil**. Recife: Massangana, 1987. 213 p.

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.

GAGLIARDI, P.R. **Análise estrutural e comparativa do genoma de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 2003. 61p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

GAGLIARDI, P.R.; PACE, F.A.; FERREIRA, A.J. Comparação de três métodos de diagnose para a detecção da *Leifsonia xyli* subsp *xyli*, agente casual do raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, 2006. Suplemento.

GAO, X.; JACKSON, T.A.; LAMBERT, K.N.; LI, S.; HARTMAN, G.L.; NIBLACK, T.L. Detection and quantification of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in soybean roots with real-time quantitative polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Urbana, v. 88, p. 1372-1380, 2004.

GERALD, L.T.S. Biofábrica de cana-de-açúcar. **Álcool & Açúcar**, São Paulo, v. 63, p. 26-32, 1992.

GIGLIOTI, E.A. **Método conciliado para avaliar os efeitos da colonização de colmos de cana-de-açúcar por *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* na funcionalidade do xilema**. 1997. 134p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

GILLASPIE JR., A.G.; FLAX, G.; KOIKE, H. Relationship between numbers of diagnostic bacteria and injury by ratoon stunting disease in sugarcane. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 60, n. 7, p. 573-575, 1976.

GILLASPIE JR., A.G.; TEAKLE, D.S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD, C.; EGAN, B. T.; GILLASPIE JR., A.G. **Diseases of sugarcane: major diseases**. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. p. 59-80.

GOMES, G. (Ed.). **Engenho e arquitetura**. Recife: Massangana, 2006. 411p.

GRISHAM, M.P. Ratoon stunting disease. In: RAO, G.P.; SAUMTALLY, A.S.; ROTT, P. **Sugarcane pathology**. Enfield: Science Publishers, 2004. p. 77-96.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, n. 5, p. 122-127, 2001.

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

HOFFMAN, M.T.; DOUD, M.S.; WILLIAMS, L.; ZHANG, M.; DING, F.; STOVER, E.; HALL, D.G.; ZHANG, S.; JONES, L.; GOOCH, M.; FLEITES, L.; DIXON, W.; GABRIEL, D.; DUAN, Y.P. Heat treatment eliminates ‘*Ca.Liberibacter asiaticus*’ from infected citrus trees under controlled conditions. **Phytopathology**, Florida, v. 103, n. 1, p. 15-25, 2013.

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

IBGE. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. 350 p. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 15 ago. 2012.

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.

IRVINE, J.E. Saccharim species as horticultural classes. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 98, p. 186-194, 1999.

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

JUNQUEIRA, A.A.B.; DANTAS, B. A cana-de-açúcar no Brasil. In: MALAVOLTA, E. (Ed.). **Cultura e adubação da cana-de-açúcar**. São Paulo: Instituto Brasileiro de Potassa, 1964. p. 27-60.

KITTAS, C.; BARTZANAS, T. Greenhouse microclimate and dehumidification effectiveness under different ventilator configurations. **Building and Environment**, Thailand, v. 42, n. 10, p. 3774-3784, 2007.

KOIKE, H. Interaction between mosaic and ratoon stunting disease on two commercial sugarcane clones. **Sugarcane Pathologist's Newsletter**, Beltsville, v. 29, p. 44-48, 1982.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2004. 531p.

LEE, I.M.; BARTOSZYK, I.M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; DAVIS, R.E. Phylogeny and classification of bacteria in the genera *Clavibacter* and *Rathayibacter* on the basis of 16S rRNA gene sequence analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 2631-2636, 1997.

LEE, T.S.G. Produção de mudas sadias de cana-de-açúcar através de cultura de tecidos. **Álcool e Açúcar**, Piracicaba, n. 45, p. 20-29, 1988.

LEKANNE-DEPREZ, R.H.; FIJNVANDRAAT, A.C.; RUIJTER, J.M.; MOORMAN, A.F. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green depends on cDNA conditions. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, n.307, p. 63-69, 2002.

LIAO, C.H.; CHEN, T.A. Isolation, culture and pathogenicity to Sudan grass of *Corynebacterium* associated with ratoon stunting of sugarcane and with bermuda grass. **The American of Phytopathological Society**, Saint Paul, v. 71, p. 1303-1306, 1981.

MAGAREY, R.C.; SUMA, S.; IRAWAN; KUNIATA, L.S.; ALLSOPP, P.G. Diseases and pests encountered during a survey of Saccharum germplasm 'in the wild' in Papua New Guinea. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Australia, p. 219-227, 2002.

MASON, H.S. Comparative Biochemistry of the Phenolase Complex. In: NORD, F.F. (Ed.). **Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry**. New York: Interscience Publishers, 1955. p. 105-184.

MATSUOKA, S. **Incidência do vírus do raquitismo da soqueira em canas provenientes de material propagativo tratado termicamente**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1971. 2p.

MATSUOKA, S. **Raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar: diagnose da moléstia e estudos sobre o agente causal**. 1972. 77p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.

MATSUOKA, S. Botânica e ecofisiologia da cana-de-açúcar. In: CURSO DE QUALIFICAÇÃO EM PLANTAS INDUSTRIAIS – CANA-DE-AÇÚCAR. Maringá: UFPR/SENAR, 1996. 34p.

MILLER, J.D.; GILBERT, R.A. **Sugarcane botany: a brief view**. Gainesville: University of Florida IFAS Extension, [2009?].

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

Molecular Plant-Microbe Interactions, Saint Paul, v. 17, n. 8, p. 827-836, 2004.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. Princípios e aplicações de microscopia. **Microbiologia médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2006. p. 165-166.

NOVAIS, C.M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 7, n. 33, p. 10-13, 2004.

OLIVARES, F.L.; REIS, V.M.; FACANHA, A.R. The role of endophytic diazotrops in sugarcane rootmorphogenesis and development. In: FINAN, T.M.; O'BRIAN, M.R.; LAYZELL, D.B.; VESSEY, J.K.; NEWTON, W. (Ed). **Nitrogen fixation: Global perspectives**. Oxon: CAB International, 2000. p. 476-477.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicação**. Lavras: UFLA, 1997. 159p.

RANKBRASIL RECORDES BRASILEIROS. Disponível em: <<http://www.rankbrasil.com.br>>. Acesso em: 17 ago. 2012.

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

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

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

RIDESA. Disponível em: <<http://pmgca.dbv.cca.ufscar.br/index.php>>. Acesso em: 23 ago. 2012.

ROS, P.B. **Avaliação da resistência de variedades de cana-de-açúcar ao raquitismo-da-soqueira com base na taxa de colonização dos colmos por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 2004. 58p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

ROSA, D.D. **Uma abordagem genômica para o entendimento do crescimento fastidioso de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 2006. 79 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

ROZEN, S.; SKALESTSKY, H.J. In: KRAWETZ, S; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press, 2000. p. 365-386.

RUDORFF, B.F.T. **Dados Landsat na estimativa da produtividade agrícola da cana-de-açúcar**. 1985. 114p. Dissertação (Mestrado em Sensoriamento Remoto) – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 1985.

SONI, P.; SALOKHE, V.M.; TANTAU, H.J. Effect of Screen Mesh Size on Vertical Temperature Distribution in Naturally Ventilated Tropical Greenhouses. **Biosystems Engineering**, Thailand, v. 92, n. 4, p. 469-482, 2005.

STEINDL, D.R.L. Q28 disease. **Cane Grow**, Melbourne, v. 12, n. 4, p. 191-193, 1949.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TAVARES, A.C.S. **Sensibilidade da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) ao excesso de água no solo**. 2009. 220p. Tese (Doutorado em Irrigação e Drenagem) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

TEAKLE, D.S. The sugarcane ratoon stunting disease bacterium. In: FAHY, P.C.; PERSLEY, G.J. (Ed.). **Plant bacterial diseases: a diagnostic guide**. North Ryde: Academic Press, 1983. p. 247-257.

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

TEAKLE, D.S.; SMITH, P.M.; STEINDL, D.R.L. Ratoon stunting disease of sugarcane: possible correlation of resistance with vascular anatomy. **Phytopathology**, Queensland, v. 65, n. 2, p. 138-141, 1975.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F. (Coord.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, 1980. cap. 12, p. 141-206.

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

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, 2005. p.181-196.

TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S.P.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH. 1998. v. 1, p. 133-145.

UNICA. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 17 ago. 2012.

YOUNG, J.M.; TOKIKAWA, Y.; GARDAN, L.; STEAD, D.E. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 67-105, 1992.

ZERILLO, M.M. **Análise genômica macro comparativa entre *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* e *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 2008. 159p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.