

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

**Caracterização sorológica, molecular e patogênica de isolados de  
Xanthomonas albilineans (Ashby) Dowson agente causal da  
escaldadura da cana de açúcar.**

**Mariana de Souza e Silva**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia. Área de concentração:  
Fitopatologia.

**Piracicaba**

**2005**

**Mariana de Souza e Silva**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Caracterização sorológica, molecular e patogênica de isolados de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson agente causal da escaldadura da cana de açúcar.**

Orientador:  
Prof. Dr. IVAN PAULO BEDENDO

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia. Área de concentração:  
Fitopatologia.

**Piracicaba**  
**2005**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Silva, Mariana de Souza e  
Caracterização sorológica, molecular e patogênica de isolados de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson agente causal escaldadura da cana de açúcar / Mariana de Souza e Silva. - - Piracicaba, 2005.  
60 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

1. Cana-de-açúcar 2. Escaldura da folha 3. Patogenicidade 4. Reação em cadeia por polimerase 5. Variação genética em planta l. Título

CDD 633.61

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

Aos meus pais, José Antônio e Fátima,  
pelo amor, apoio e confiança que  
permitiram meu crescimento  
como ser humano, **DEDICO**.

Ao meu irmão Gustavo,  
ao meu marido Ricardo  
e ao meu filho Matheus  
**OFEREÇO**.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo força concedida nos momentos de desânimo e decepção, tornando possível a conclusão deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo, pela preciosa orientação, pela confiança, dedicação e incentivo;

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) pela gentileza de fornecer o material de cana-de-açúcar, para condução dos testes propostos neste trabalho;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado, destinada à realização deste trabalho;

A todos os funcionários e professores do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, pelo companheirismo e amizade;

As minhas amigas Raquel e Marisa pelos bons momentos juntas;

Aos meus amigos do Laboratório de Fitopatologia do CTC, Celma, Cristina, Georgete, Irani, Noemia, Thatiane, Sabrina, Silvana, Antonio, Vicente, Marcos, Rubens e Álvaro pelo bom convívio, amizade e respeito;

A todos os amigos dos demais laboratórios do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP e do Centro de Tecnologia Canavieira, que contribuíram para a realização deste trabalho;

Obrigada

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	16
2.1 Revisão de Literatura.....	16
2.1.1 A cana-de-açúcar.....	16
2.1.2 O patógeno.....	16
2.1.3 Hospedeiros alternativos.....	17
2.1.4 Importância da doença.....	17
2.1.5 Sintomatologia.....	19
2.1.6 Transmissão da bactéria.....	20
2.1.7 Métodos de detecção e identificação da bactéria.....	21
2.1.8 A resistência varietal no controle da escaldadura.....	23
2.2 Material e Métodos.....	25
2.2.1 Amostragem de plantas.....	25
2.2.2 Obtenção dos isolados de <i>X. albilineans</i> .....	27
2.2.3 Teste sorológico DOT-BLOT.....	28
2.2.4 Extração de DNA de <i>X. albilineans</i> para testes moleculares.....	29
2.2.4.1 Extração de DNA para detecção da bactéria por PCR.....	29
2.2.4.2 Extração de DNA para caracterização molecular dos isolados por rep-PCR.....	29
2.2.4.3 Detecção de <i>X. albilineans</i> por PCR.....	30
2.2.4.4 Caracterização dos isolados por rep-PCR.....	31
2.2.4.5 Caracterização dos isolados por RFLP.....	32
2.2.5 Teste de patogenicidade para isolados de <i>X. albilineans</i> .....	33
2.3 Resultados e Discussão.....	35
2.3.1 Teste sorológico DOT-BLOT.....	35
2.3.2 Detecção de <i>X. albilineans</i> por PCR.....	36

	6
2.3.3 Caracterização dos isolados por rep-PCR .....	38
2.3.4 Caracterização dos isolados por RFLP.....	47
2.3.5 Teste de patogenicidade.....	50
3 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Detecção e identificação isolados de *X. albilineans* em caldo de 52 amostras de cana-de-açúcar exibindo sintomas típicos de escaldadura, coletadas nas regiões de Piracicaba/SP, Jaú/SP e Ribeirão Preto/SP. Colunas (de cima para baixo): 1)- isolados de 1-8; 2)- isolados de 9-16; 3)- 17-24; 4)- isolados de 25-32; 5)- isolados de 33-40; 6)- isolados de 41-48; 7)- isolados de 49-52, respectivamente e os controles são as quatro últimas amostras: cultura pura de *X. albilineans*, solução tampão PBST, caldo de xilema de planta de cana infectada e caldo de xilema de planta de cana infectada diluído 1:10..... 36
- Figura 2 - Identificação de isolados de *X. albilineans* obtidos a partir de amostras sintomáticas de cana-de-açúcar com escaldadura, coletadas em Piracicaba, utilizando Bio-PCR com primers específicos. GEL 1- Colunas: 1)- Marcador molecular pGEM; 2)- Controle positivo; 3)- Controle negativo; colunas de 4 a 14)- isolados de 1-11, respectivamente; 15)- pGEM. GEL 2- Colunas: 1)- pGEM; 2)- Controle positivo; 3)- Controle negativo; colunas de 4 a 21)- isolados de 12-27, respectivamente; 22)- água; 23)- Marcador molecular pGEM..... 37
- Figura 3 - Identificação de isolados de *X. albilineans* obtidos a partir de amostras sintomáticas de cana-de-açúcar com escaldadura, coletadas em Jaú, utilizando Bio-PCR com primers específicos. Colunas: 1)- Marcador pGEM; 2)- Controle positivo; 3)- Controle negativo; 4 a 16)- isolados de 28-40, respectivamente..... 38
- Figura 4 - Identificação de isolados de *X. albilineans* obtidos a partir de amostras sintomáticas de cana-de-açúcar com escaldadura,



coletadas em Ribeirão Preto, utilizando Bio-PCR com primers específicos. Colunas: 1)- Marcador molecular pGEM; 2)- Controle positivo; 3)- Controle negativo; 4 a 13)- isolados de 41-52, respectivamente.....

38

- Figura 5 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Piracicaba, através de PCR usando primer BOX. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 ao 13)- isolado 1-12, respectivamente; 14)- marcador 1Kb..... 40
- Figura 6 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Piracicaba, através de PCR usando primer BOX. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 a 16)- isolados de 13-27, respectivamente; 17)- marcador 1Kb..... 41
- Figura 7 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Jaú, através de PCR usando primer BOX. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 a 14)- isolados de 28-40, respectivamente; 15)- marcador 1Kb..... 41
- Figura 8 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Ribeirão Preto, através de PCR usando primer BOX. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 a 14)- isolados de 41-52 respectivamente; 15)- marcador 1Kb..... 41
- Figura 9 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de

Piracicaba, através de PCR usando primer REP. Coluna: 1)-  
 marcador 1Kb; 2 ao 13)- isolado 1-12, respectivamente; 14)-  
 marcador 1Kb..... 42

Figura 10 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de  
 DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de  
 Piracicaba, através de PCR usando primer REP. Coluna: 1)-  
 marcador 1Kb; 2 a 16)- isolados de 13-27, respectivamente; 17)-  
 marcador 1Kb..... 42

Figura 11 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de  
 DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de  
 Jaú, através de PCR usando primer REP. Coluna: 1)- marcador 1Kb;  
 2 a 14)- isolados de 28-40, respectivamente; 15)- marcador 1Kb..... 42

Figura 12 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de  
 DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de  
 Ribeirão Preto, através de PCR usando primer REP. Coluna: 1)-  
 marcador 1Kb; 2 a 14)- isolados de 41-52 respectivamente; 15)-  
 marcador 1Kb..... 43

Figura 13 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de  
 DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de  
 Piracicaba, através de PCR usando primer ERIC. Coluna: 1)-  
 marcador 1Kb; 2 ao 13)- isolado 1-12, respectivamente; 14)-  
 marcador 1Kb..... 43

- Figura 14 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Piracicaba, através de PCR usando primer ERIC. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 a 16)- isolados de 13-27, respectivamente; 17)- marcador 1Kb..... 44
- Figura 15 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Jaú, através de PCR usando primer ERIC. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 a 14)- isolados de 28-40, respectivamente; 15)- marcador 1Kb..... 44
- Figura 16 - Figura 16 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Ribeirão Preto, através de PCR usando primer ERIC. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 a 14)- isolados de 41-52 respectivamente; 15)- marcador 1Kb..... 45
- Figura 17 - Dendrograma construído com o índice de Similaridade de Dice e pelo critério de agrupamento UPGMA com o emprego dos primers BOX, REP e ERIC..... 46
- Figura 18 - Perfis eletroforéticos obtidos pela digestão com a enzima *AluI* de fragmentos de DNA amplificado pelo par de primers PGBL1/PGBL2. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2)- isolado 8; 3)- isolado 11; 4)- isolado 27; 5)- isolado 29; 6)- isolado 40; 7)- isolado 41; 8)- isolado 47; 9)- isolado 51; 10)- marcador 1Kb..... 48
- Figura 19 - Perfis eletroforéticos obtidos pela digestão com a enzima *BamHI* de fragmentos de DNA amplificado pelo par de primers PGBL1/PGBL2. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2)- isolado 8; 3)- isolado 11; 4)- isolado

27; 5)- isolado 29; 6)- isolado 40; 7)- isolado 41; 8)- isolado 47; 9)-  
isolado 51; 10)- marcador 1Kb..... 49

Figura 20 - Perfis eletroforéticos obtidos pela digestão com a enzima *EcoRI* de fragmentos de DNA amplificado pelo par de primers PGBL1/PGBL2. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2)- isolado 8; 3)- isolado 11; 4)- isolado 27; 5)- isolado 29; 6)- isolado 40; 7)- isolado 41; 8)- isolado 47; 9)- isolado 51; 10)- marcador 1Kb..... 49

Figura 21 - Perfis eletroforéticos obtidos pela digestão com a enzima *HaeIII* de fragmentos de DNA amplificado pelo par de primers PGBL1/PGBL2. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2)- isolado 8; 3)- isolado 11; 4)- isolado 27; 5)- isolado 29; 6)- isolado 40; 7)- isolado 41; 8)- isolado 47; 9)- isolado 51; 10)- marcador 1Kb..... 50

Figura 22 - Reação de plantas de cana-de-açúcar, pertencentes às variedades SP 78 5495 (V1) e SP 78 4467 (V2), inoculadas com isolados de *X. albilineans* amostrados em diferentes regiões do estado de São Paulo. A inoculação de cada isolado se constituiu em um tratamento (T). A avaliação foi feita aos 90 dias após a inoculação, através de uma escala de notas variável de 1-5, de acordo com a intensidade crescente de sintomas observados nas plantas..... 52

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Relação dos isolados de <i>X. albilineans</i> , obtidos de amostras de plantas coletadas em três regiões do Estado de São Paulo.....	25
Tabela 2 - Escala de notas para avaliação de sintomas de escaldadura ocasionados por <i>Xanthomonas albilineans</i> em plantas de cana-de-açúcar.....	34
Tabela 3 - Reação de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP 78 4467 inoculada com isolados de <i>X. albilineans</i> coletados em três regiões do estado de São Paulo. A inoculação de cada isolado representou um tratamento (T). A avaliação foi feita aos 90 dias após a inoculação, através de uma escala de notas variável de 1-5, de acordo com a intensidade crescente de sintomas observados nas plantas.....	53

## RESUMO

### **Caracterização sorológica, molecular e patogênica de isolados de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson agente causal da escaudadura da cana de açúcar.**

A escaudadura das folhas, causada por *Xanthomonas albilineans*, é uma importante doença da cana-de-açúcar, a qual interfere no rendimento e na longevidade de plantas infectadas. A intensidade de doença é variável, especialmente em relação a fatores climáticos e variedades cultivadas. A quantificação de danos é difícil de ser feita através de observações de plantas no campo. O uso de variedades resistentes tem sido eficiente para controle da doença, mas a diversidade do patógeno pode promover a quebra desta resistência. Em campos comerciais localizados no Estado de São Paulo, tem sido observado que a mesma variedade de cana é resistente à escaudadura em uma região, mas suscetível em outra. Este tipo de comportamento tem sugerido a ocorrência de variantes de *X. albilineans* que podem ser responsáveis pela quebra da resistência das variedades cultivadas. Seria relevante determinar a ocorrência de variabilidade para este patógeno dentro do estado de São Paulo, pois esta informação seria útil para indicação de variedades para as diferentes regiões e para orientar programas de melhoramento visando a obtenção de variedades resistentes. Com base nestas considerações, o objetivo do presente estudo foi investigar a diversidade genética de isolados coletados em áreas comerciais, usando técnicas moleculares como PCR, rep-PCR, RFLP e testes de patogenicidade. Os resultados mostraram que todos os isolados de plantas que exibiam sintomas de escaudadura eram pertencentes à espécie *X. albilineans*. Ainda, foi possível determinar a ocorrência de diversidade genética e variabilidade patogênica entre os isolados amostrados nas diferentes regiões. Os resultados obtidos no presente trabalho podem contribuir para novas investigações visando confirmar a associação da quebra da resistência de variedades com a variabilidade do patógeno.

Palavras chave: Caracterização; DOT-BLOT; PCR; Patogenicidade; RFLP

## ABSTRACT

### **Serologica, molecular and pathogenic characterization of isolates of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson causal agent of the escaledadura of the sugarcane.**

Leaf scald, caused by *Xanthomonas albilineans*, is an important disease of sugarcane, that can interfere on the yield and longevity of infected plants. The disease intensity is variable, especially according to climate factors and cultivated varieties, and the damage quantification is very difficult through observation of plants in the field. Resistant varieties have been efficient to disease control, but the pathogen diversity can promote the breakdown of resistance. In commercial fields located in São Paulo State has been observed that the same sugarcane variety is resistant to leaf scald in a region, but susceptible in another one. This kind of behavior has suggested the occurrence of strains of *X. albilineans* that can be responsible for the breakdown of resistance of the cultivated varieties. It would be relevant to determine pathogen variability in São Paulo State, because that information would be useful to indicate varieties for different regions and to guide breeding programs to obtain resistant varieties. Based upon the above points, the objective of the present study was to investigate the genetic diversity of bacterial isolates collected in commercial areas, using molecular techniques as PCR, rep-PCR, RFLP, and pathogenicity assays. The results showed that all isolates from plants exhibiting typical leaf scald symptoms belonged to species *X. albilineans*. It was also possible to determine the occurrence of genetic diversity and pathogenic variability among the isolates sampled in the distinct regions. Thus, the results obtained in the present study can contribute to new investigations to confirm the association of the breakdown of resistance with the variability of the pathogen.

Keywords: Characterization; DOT-BLOT; PCR; Pathogenicity; RFLP

## 1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar tem importância econômica relevante para a agricultura desenvolvida no Estado de São Paulo. A escaldadura vem sendo apontada como uma das principais doenças da cultura, causando perdas significativas na produção. A forma mais adequada de se controlar a doença é através do uso de variedades resistentes, as quais têm se mostrado eficientes para essa finalidade. No entanto, dentro do Estado de São Paulo, algumas variedades têm se apresentado como resistentes em algumas regiões e suscetíveis em outras, evidenciando que a bactéria *X. albilineans* pode estar apresentando variabilidade. Evidências semelhantes têm sido relatadas em outros locais fora do Brasil. O conhecimento sobre a diversidade deste patógeno pode contribuir tanto para a recomendação diferenciada de variedades de cana para plantio nas diversas regiões do Estado de São Paulo, como para direcionar programas de melhoramento visando a obtenção de variedades resistentes.

Com base nestas considerações, o presente trabalho de pesquisa teve como objetivos:

- demonstrar a diversidade genética de isolados de *X. albilineans* coletados em campos comerciais localizados no Estado de São Paulo
- correlacionar a diversidade genética dos isolados da bactéria com sua patogenicidade
- relacionar a diversidade genética do patógeno com sua distribuição geográfica dentro do Estado de São Paulo
- comprovar a presença de *X. albilineans* em plantas de cana-de-açúcar exibindo sintomas típicos de escaldadura.



## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Revisão de Literatura

#### 2.1.1 A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) originou-se no sudeste da Ásia, onde é cultivada desde épocas remotas (AGROBYTE, 2002). Atualmente, encontra-se disseminada numa extensa área, apresentando melhor comportamento nas regiões tropicais em razão da ocorrência de duas estações distintas: uma quente e úmida para melhor germinação e perfilhamento e outra mais fria e seca para favorecer a maturação e acúmulo de sacarose nos colmos (ALVAREZ et al., 1995). A importância dessa cultura pode ser atribuída à sua múltipla utilização, sendo principalmente empregada como matéria prima para a produção de açúcar e álcool (AGROBYTE, 2002).

Sendo uma cultura de grande importância econômica, a cana-de-açúcar tem sido muito estudada quanto aos aspectos produtivos. As doenças se constituem num dos principais fatores que limitam o rendimento da cultura, sendo que mais de 100 doenças já foram identificadas (RAMALLO et al., 2000). Dentre elas, carvão, mosaico, escaldadura das folhas, raquitismo e ferrugem são consideradas as mais importantes, pois seus danos são altamente significativos.

#### 2.1.2 O patógeno

Wilbrink (1920) e North (1926) (DAVIS et al., 1997) foram os primeiros a demonstrar que a bactéria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson invade o xilema causando a escaldadura das folhas.

A doença pode ser encontrada em praticamente todas as regiões do mundo onde a planta é cultivada (DAVIS et al. 1997), causando sérios prejuízos econômicos, como diminuição da produtividade, necessidade de reforma precoce dos canaviais e queda de qualidade do caldo (ROTT e DAVIS, 1997; DAVIS et al., 1997; BIRCH, 2001, JAUFEERALLY-FAKIM et al., 2000).

A bactéria apresenta a forma de bastonete reto, medindo 0,25-0,30 x 0,6-1,0µm, tendo sua mobilidade promovida por um único flagelo polar, é gram-negativa, aeróbia e apresenta crescimento lento (BIRCH, 2001). As células bacterianas podem ocorrer de

forma isolada ou formando cadeias, dando origem a colônias amarelas, brilhantes, convexas, de bordos lisos, viscosas, sendo seu crescimento favorecido por temperaturas variáveis de 25 a 28°C (BIRCH, 2001).

### **2.1.3 Hospedeiros alternativos**

Além da cana-de-açúcar, seu principal hospedeiro, *X. albilineans* infecta naturalmente milho-doce, bambu, sorgo selvagem, capim-colonião, capim-elefante e algumas outras gramíneas, como *Brachiaria piligera*, *Imperata cylindrica*, *Paspalum* sp., *Rottboellia cochinchinensis* (MARTIN e ROBINSON, 1961). Particularmente, a bactéria pode sobreviver em *Imperata cylindrica* por um longo período de tempo e, conseqüentemente, esta espécie pode atuar como fonte de inóculo. Em geral, quando essas gramíneas estão infectadas, somente exibem faixas estreitas nas folhas ou o sintoma mais característico que é a estria branca (BIRCH, 2001).

### **2.1.4 Importância da doença**

A escaldadura das folhas foi identificada como uma doença bacteriana fibrovascular da cana-de-açúcar na década de 20, na Austrália e em Java. Foi descoberta pouco depois em outros locais e hoje, a doença já é conhecida em mais de 40 países (ROTT e DAVIS, 1995).

A maioria dos relatos de ocorrência da escaldadura sugere que a doença estava presente antes de ser reconhecida, sendo confundida com outros distúrbios ou em estado latente de infecção (JAUFEERALLY-FAKIM et al., 2000, AVAREZ et al., 1995). Conseqüentemente, a escaldadura deve ter sido disseminada para vários países onde variedades nobres, suscetíveis ou tolerantes, eram amplamente distribuídas, num tempo em que as medidas de quarentena eram rudimentares ou nem existiam (JAUFEERALLY-FAKIM et al., 2000).

A escaldadura foi registrada pela primeira vez nas Américas em 1943, no estado de São Paulo, no entanto, a doença já devia estar presente há alguns anos na Estação Experimental de cana-de-açúcar e em propriedades próximas, no município de Piracicaba-SP. (CASAGRANDE et al., 1997).

No Brasil, a importância da escaldadura tem sido subestimada, devido aos erros de identificação e à confusão com danos causados pelo raquitismo da soqueira (CASAGRANDE et al., 1997). Quando a doença se manifesta em variedades extremamente suscetíveis, pode causar 100% de perdas por queima completa das folhas e morte dos colmos, no entanto, mesmo variedades comerciais que apresentam certa tolerância podem ser portadoras do patógeno (DAVIS et al., 1997).

A severidade e importância da doença variam grandemente de um país para outro, dentro do mesmo país e surtos esporádicos da doença, após longos períodos de ausência, não são incomuns (JAUFEERALLY-FAKIM et al., 2000, ALVAREZ et al., 1995). Diferenças na suscetibilidade das variedades ao patógeno tem sido notada tanto entre como dentro de países, sendo esse fenômeno atribuído a fatores ambientais, variabilidade do patógeno ou mesmo reação das variedades cultivadas (ROTT e DAVIS, 1997).

Na Austrália, observações sobre a disseminação da escaldadura mostraram que a doença é favorecida por estações úmidas. Os danos causados pela doença parecem ser influenciados pelas condições ambientais prevalentes durante os estágios de maturação da safra. Estresse imposto pela seca, encharcamento e baixas temperaturas podem contribuir para aumentar a severidade da escaldadura (BIRCH, 1980).

Variações nas características do patógeno têm sido sugeridas como a causa das diferenças na severidade da doença e reações varietais (ALVAREZ et al., 1995). Variação no tamanho da colônia, mudança na forma da célula em culturas de *X. albilineans* foram notadas já em 1926 (ROTT e DAVIS, 1997). Birch (1980) demonstrou que isolados que apresentavam colônias de crescimento lento ou colônias pequenas eram mais agressivos.

Comparação da reação varietal em diferentes países sugere que “patótipos” de *X. albilineans* devem existir. A variedade B34104 se constituiu em bom exemplo, pois foi caracterizada como altamente suscetível na Guiana, mas, resistente nas Ilhas Maurício (ROTT e DAVIS, 1997).

Birch (1980) observou que os sintomas da escaldadura encontrados no Hawai eram muito menos severos que aqueles observados na Austrália. Comparando isolados desses dois países, não se encontrou variação nas características do patógeno, o que

levou à conclusão de que a variação de severidade poderia estar relacionada a características das variedades ou a fatores climáticos. No entanto, há indicações da existência de “patótipos” da bactéria dentro de um mesmo país, evidenciadas por um surto epidêmico de escaldadura em duas variedades relatadas como resistentes, nas Ilhas Maurício em 1964 (ROTT e DAVIS, 1997).

O grau de suscetibilidade de uma variedade e a proporção de variedades suscetíveis em uma área são importantes fatores determinantes da incidência e severidade da escaldadura. No passado, ocorreram sérias perdas onde variedades altamente suscetíveis eram cultivadas em extensas áreas (MARTIN e ROBINSON, 1961). A troca das variedades altamente suscetíveis por tolerantes foi muito efetiva na redução de perdas diretas causadas pela escaldadura.

### **2.1.5 Sintomatologia**

A expressão dos sintomas e sua severidade estão associados com o nível de resistência da variedade cultivada, condições ambientais e agressividade do patógeno (LOPES et al., 2001).

As plantas atacadas pela bactéria da escaldadura podem apresentar três formas de infecção, ou seja, latente, crônica e aguda, dificultando a identificação da doença (TOKESHI, 1980).

A forma latente é impossível de ser reconhecida no campo, pois a planta infectada não apresenta sintomas. Na crônica, o hospedeiro apresenta vários tipos de sintomas externos, sendo o mais típico a presença de uma fina estria branca de 1 a 2 mm de largura, paralela à nervura central, muitas vezes estendendo-se por toda a folha. Internamente, no colmo, observa-se descoloração do xilema na região nodal, estendendo-se até o entrenó. Na forma aguda, a estria pode ser mais larga, se estendendo até a bainha e o limbo foliar, podendo originar clorose parcial ou total. A morte de gema apical pode provocar uma excessiva brotação lateral nos colmos adultos, diminuindo o tamanho dos mesmos, provocando murcha e possível morte das plantas afetadas (CASAGRANDE et al., 1997).

Os colmos podem apresentar estrias vermelhas em seu interior, devido à necrose dos vasos, sendo mais comum nas regiões dos nós, no entanto, quando as condições

edafoclimáticas são muito favoráveis ao desenvolvimento da planta, pode ocorrer o desaparecimento completo desses sintomas, mesmo em variedades mais suscetíveis (CASAGRANDE et al., 1997). Segundo Martin e Robinson (1961), muitas variedades podem permanecer assintomáticas ou com sintomas pouco aparentes por longos períodos, de maneira que a doença é notada apenas quando atinge o ponto crítico, ou seja, folhas com estrias mais largas e uma excessiva brotação lateral dos colmos.

O efeito maior de doença é verificado nas soqueiras, onde podem ocorrer grandes falhas de plantio, especialmente em épocas secas (TOKESHI, 1980). Geralmente, o sintoma agudo ocorre em variedades suscetíveis, intolerantes ou com resistência intermediária, em condições extremamente favoráveis ao patógeno.

#### **2.1.6 Transmissão da bactéria**

O agente causal da escaldadura das folhas é transmitido principalmente por toletes infectados ou mecanicamente por ferramentas cortantes (ROTT e DAVIS, 1997; SAUMTALLY, et al., 1995). Algumas variedades de cana-de-açúcar conseguem se desenvolver mesmo que estejam infectadas pela bactéria, não demonstrando nenhum sintoma visual e, por isso, essas plantas representam importantes fontes de inóculo. (JAUFEEERALLY-FAKIM et al., 2000). Toletes contaminados são um importante meio de disseminação da bactéria a longas distâncias. O patógeno pode ser disseminado na colheita pelos facões de corte e colheitadeiras mecânicas, pois uma vez contaminado o instrumento de corte, a bactéria pode ser espalhada para várias touceiras. A contaminação por facão ou máquina ocorre mais rapidamente em rebentos jovens que são feridos por cima da gema apical (CASAGRANDE et al., 1997).

As facas de corte das colheitadeiras de cana têm o potencial de espalhar o patógeno de maneira similar aos facões de corte (CASAGRANDE et al., 1997).

### 2.1.7 Métodos de detecção e identificação da bactéria

Diferentes técnicas têm sido usadas para demonstrar a presença da bactéria nos tecidos do hospedeiro, bem como sua variabilidade. São exemplos os testes de ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) usados por Irey e Comstock (1991), método da imunofluorescência dos tecidos, descrito por Leóville e Coleno (1976), isolamento em meio sólido seletivo desenvolvido por Davis et al. (1994), com base no meio sólido de Wilbrink e a técnica de RFLP (“restriction fragment length polymorphisms”), empregada por Rott e Davis (1996), Alvarez et al. (1996), Davis et al. (1997). No entanto, merece destaque a técnica de PCR (polymerase chain reaction), a qual vem obtendo grande sucesso quando usada para diagnósticos de doenças em plantas. O PCR permite a detecção da bactéria *X. albilineans* mesmo quando esta encontra-se presente em baixas concentrações nos tecidos vegetais. *Primers* desenvolvidos para *X. albilineans* mostraram ser altamente específicos para a detecção e a identificação da bactéria, em relação a outras espécies bacterianas para as quais foram testados (PAN et al., 1999).

A técnica rep-PCR tem sido muito útil para fins de determinação da identidade genômica das bactérias, pelo uso de primers de DNA (REP, ERIC E BOX-PCR) correspondentes aos elementos repetitivos que ocorrem no genoma bacteriano (LOPES et al., 1998; LOWS et al., 1994). A técnica permite distinguir estirpes relacionadas, conhecer as relações filogenéticas existentes entre estirpes e estudar a diversidade da bactéria em diferentes ecossistemas. Seqüências repetitivas de nucleotídeos se encontram distribuídas ao acaso no genoma de praticamente todas as bactérias e podem servir como locais para anelamento de primers para amplificação genômica de DNA (VERSALOVIC et al. 1991; 1994; de BRUIJN 1992). Muitas famílias de seqüências repetitivas já foram identificadas em genomas de diversas espécies bacterianas. Três famílias de seqüências repetitivas têm sido bem estudadas, ou seja, uma seqüência repetitiva extragênica palindrômica 35-40 bp (REP); uma seqüência consensual intergênica repetitiva enterobacteriana 124-127 bp (ERIC) e o elemento 154 bp BOX (VERSALOVIC et al. 1994). Essas seqüências parecem estar localizadas em posições intergênicas distintas em volta de todo o cromossomo. Os elementos repetitivos devem estar presentes nas duas orientações do cromossomo e primers de PCR foram desenhados para leitura de repetições invertidas em REP e ERIC e para a sub-unidade

boxA do BOX (VERSALOVIC et al. 1994). O uso desses primers leva à amplificação seletiva de regiões genômicas distintas localizadas entre seqüências REP, ERIC ou BOX. Os protocolos correspondentes são referidos como REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR, ou rep-PCR coletivamente (VERSALOVIC et al. 1991; 1994). As bandas amplificadas têm tamanhos diferenciados, gerando, no gel de eletroforese, padrões de identidade que lembram códigos de barra, análogos aos códigos UPC usados em lojas de conveniência e que funcionam como uma assinatura para estirpes específicas de bactérias (VERSALOVIC et al. 1994).

A ocorrência e a variabilidade de *X. albilineans* têm sido relatadas em diversos trabalhos conduzidos com as diferentes técnicas de detecção e identificação. Assim, Permaul e colaboradores, citados por Jaufeerally-Fakim et al., (2000), constataram variabilidade em cinco isolados da bactéria através de amplificações obtidas com primers. Wang et al., (1998) compararam cinco métodos de detecção e concluíram que o PCR foi o mais sensível e específico dos métodos testados, permitindo separar *X. albilineans* de outras bactérias consideradas contaminantes.

Para o melhoramento genético de variedades visando a incorporação de resistência, há interesse de se conhecer a diversidade da população bacteriana envolvida na interação patógeno-hospedeiro, pois as populações dos microrganismos podem variar geneticamente, dependendo da região geográfica. Em um trabalho realizado para caracterizar *X. albilineans* ocorrente em Mauritius, Jaufeerally-Fakim et al., (2000) compararam isolados de Mauritius com outros originários do Brasil, Florida, Guadalupe, Taiwan, África do Sul e Austrália, através de técnicas moleculares. A diversidade genética entre os isolados foi demonstrada através do PCR e da hibridização do DNA com sonda molecular. Como resultado, os isolados do Brasil, alguns da Florida, Guadalupe, Taiwan e Mauritius produziram uma banda de 5 kb na hibridização; isolados do Sul da África e outros da Florida produziram bandas de 5.2 kb; isolados da Austrália e outros da Florida, mostraram bandas de 7 kb, demonstrando a diversidade existente no patógeno. Uma investigação sobre a variabilidade genética presente em *X. albilineans*, Davis et al., (1996) analisaram 218 isolados coletados em diversos países e obtiveram 54 padrões distintos, inclusive com diferenças na patogenicidade entre isolados. Lopes et al., (1998) utilizaram na identificação de *X.*

*albilineans* testes de patogenicidade em milho doce, sistema metabólico Biolog e rep-PCR. O método Biolog permitiu a identificação do patógeno em 31% dos casos, porém os melhores resultados foram conseguidos com a aplicação dos testes de patogenicidade usando milho doce e com PCR. A técnica de PCR permitiu a obtenção de resultados em algumas horas, contribuindo para uma rápida diagnose da escaldadura das folhas da cana-de-açúcar.

### **2.1.8 A resistência varietal no controle da escaldadura**

A forma mais apropriada para controlar a doença é a utilização de variedades resistentes, porém a quebra dessa resistência têm sido relatada em diferentes países, causando grandes problemas. A quebra de resistência pode estar relacionada com a variabilidade do patógeno, inviabilizando o controle através do emprego de variedades resistentes (ROTT e DAVIS, 1995).

No Brasil, há várias evidências da ocorrência de variabilidade em *X. albilineans*, pois variedades comerciais de cana-de-açúcar consideradas resistentes e cultivadas em diferentes regiões estão desenvolvendo os sintomas da doença. Nas áreas plantadas com estas variedades, a doença vem causando danos à cultura, resultando em prejuízos ao agricultor. Esta evidência se torna ainda mais clara para o caso de determinadas variedades se mostrarem resistentes à doença em algumas regiões e muito suscetíveis em outras áreas de plantio, dentro do Estado de São Paulo (CASAGRANDE, M.V. e MORAES, V.A./ Centro de Tecnologia Canavieira (Piracicaba/SP), comunicação pessoal, 2003).

Recentes quebras de resistência em variedades comerciais na Florida, Guadalupe, República Dominicana, México, Louisiana e Mauritius (ROTT et al., 1997; SAUMTALLY et al., 1995) são fortes indícios da diversidade desta bactéria (MOHAMED et al., 1996). No caso específico da Florida, a quebra de resistência tem sido atribuída à introdução de um variante de *X. albilineans* (ROTT et al., 1997), porém esta hipótese ainda não foi definitivamente comprovada. Situação similar tem sido registrada em material de cana cultivado em Mauritius (ROTT e DAVIS, 1995).

A variabilidade entre isolados de *X. albilineans* tem sido identificada através da caracterização de morfologia de células e colônias, análise de proteínas totais, técnicas



serológicas e moleculares (ROTT e DAVIS, 1995). No entanto, a correlação entre essas características e patogenicidade não trouxe resultados conclusivos quando se avaliou isolados originários de regiões diversas. A variabilidade do patógeno pode se constituir num fator limitante da produção de cana, além de trazer sérios problemas para o desenvolvimento de variedades resistentes (DAVIS et al., 1996). Assim, o conhecimento sobre a diversidade do patógeno se constitui num ponto chave para se promover o manejo da doença (JAUFEERALLY-FAKIM et al., 2000).

## 2.2 Material e Métodos

### 2.2.1 Amostragem de plantas

Amostras foram coletadas em três regiões do Estado de São Paulo nos anos de 2003 e 2004. Um total de 52 amostras foram obtidas, sendo 27 da região de Piracicaba, 12 da área canavieira de Ribeirão Preto e 13 de lavouras instaladas na região de Jaú (Tabela 1).

As amostras foram constituídas por colmos que apresentavam sintomas visíveis da doença, tais como colmos com presença de folhas secas e brotações laterais; colmos com folhas secas, porém sem brotações laterais; e colmos que exibiam folhas com sintoma de bandeira branca. Os colmos sintomáticos foram coletados aleatoriamente nas parcelas, de acordo com as condições das gemas, sendo escolhidas aquelas de melhor aparência para posterior plantio em campo experimental.

O material coletado nos campos comerciais foi trazido para o laboratório de Fitopatologia do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), localizado em Piracicaba/SP. Os colmos foram picados em minitoletes e suas gemas plantadas em bandejas, contendo como substrato duas partes de torta de filtro e uma de composto Plantmax (Eucatex). As ferramentas utilizadas foram constantemente flambadas para a execução dos cortes, para evitar a contaminação das amostras. As mudas foram produzidas em casa de vegetação e após 3 meses de plantio, foram transplantadas para o campo experimental, com o objetivo de manter o inóculo.

Tabela 1 - Relação dos isolados de *X. albilineans*, obtidos de amostras de plantas coletadas em três regiões do Estado de São Paulo

(continua)

Número do isolado	Número CTC	Variedade	Procedência
1	1	Cruz 96-234	CTC – Piracicaba
2	17	Cruz 96-234	CTC – Piracicaba
3	24	Cruz 96-234	CTC – Piracicaba
4	31	Cruz 96-234	CTC – Piracicaba
5	39	Cruz 96-234	CTC – Piracicaba
6	45	Cruz 96-234	CTC – Piracicaba

Tabela 1 - Relação dos isolados de *X. albilineans*, obtidos de amostras de plantas coletadas em três regiões do Estado de São Paulo

(continuação)

<b>Número do isolado</b>	<b>Número CTC</b>	<b>Variedade</b>	<b>Procedência</b>
7	59	Cruz 96-234	CTC – Piracicaba
8	63	Cruz 96-234	CTC – Piracicaba
9	65	Cruz 96-234	CTC – Piracicaba
10	72	Cruz 96-234	CTC – Piracicaba
11	74	Cruz 96-234	CTC – Piracicaba
12	75	Cruz 96-234	CTC – Piracicaba
13	76	Cruz 96-234	CTC – Piracicaba
14	88	Cruz 96-234	CTC – Piracicaba
15	90	Cruz 96-234	CTC – Piracicaba
16	CP	CP 44-101	CTC – Piracicaba
17	D	SP 80-1842	CTC – Piracicaba
18	F	SP 93-3503	CTC – Piracicaba
19	G	F 11-23	CTC – Piracicaba
20	H	F 11-27	CTC – Piracicaba
21	I	F 12-11	CTC – Piracicaba
22	J	F 12-13	CTC – Piracicaba
23	K	F 12-16	CTC – Piracicaba
24	L	F 12-23	CTC – Piracicaba
25	M	F 12-33	CTC – Piracicaba
26	R	F 24-25	CTC – Piracicaba
27	T	SP 84-5560	CTC – Piracicaba
28	P	SP 90-1107	CTEJ – Jaú
29	Q	SP 78-5495	CTEJ – Jaú
30	6	CTC 93-199 X SP 83-5073	CTEJ – Jaú
31	9	SP 78-5495	CTEJ – Jaú
32	10	SP 81-3250	CTEJ – Jaú
33	11	CTC 93-199 X SP 80-3280	CTEJ – Jaú
34	12	CTC 93-199 X SP 80-3280	CTEJ – Jaú
35	13	SP 91-1049 X RB 85-5536	CTEJ – Jaú
36	14	CTC 93-199 X SP 83-5073	CTEJ – Jaú
37	15	SP 90-3723 X SP 80-3280	CTEJ – Jaú
38	21	SP 91-1049	CTEJ – Jaú

Tabela 1 - Relação dos isolados de *X. albilineans*, obtidos de amostras de plantas coletadas em três regiões do Estado de São Paulo

(conclusão)			
Número do isolado	Número CTC	Variedade	Procedência
39	22	CTC 93-199 X SP 83-5073	CTEJ – Jaú
40	23	Q 170	CTEJ – Jaú
41	S	SP 90-1644	Usina São Carlos (Ribeirão Preto)
42	U	SP 92-4230	Usina Santo Antônio AB (Ribeirão Preto)
43	V	SP 91-1049	Usina São João Dedini (Ribeirão Preto)
44	X	SP 94-3172	Usina Nova Aliança (Ribeirão Preto)
45	Z	SP 91-1301	Usina Iturama (Ribeirão Preto)
46	B	RB 85-5536	Usina Iturama (Ribeirão Preto)
47	C	SP 92-4394	Usina Iturama (Ribeirão Preto)
48	E	RB 72-454	Usina Iturama (Ribeirão Preto)
49	16	SP 91-1049	Usina Sto Antonio AB (Ribeirão Preto)
50	18	SP 91-3629	Usina São Luiz AS (Ribeirão Preto)
51	19	SP 80-1842	Usina São Carlos (Ribeirão Preto)
52	20	SP 91-3629	Usina São Luiz AS (Ribeirão Preto)

### 2.2.2 Obtenção dos isolados de *X. albilineans*

Para o isolamento da bactéria adotou-se a metodologia descrita por Wang et al. (1999). A partir de cada amostra foi retirada a parte basal dos colmos, sendo o material centrifugado para extração da seiva do xilema. Os toletes foram descascados com uma faca, colocados em tubos do tipo “Falcons” de 50 mL e centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, o caldo obtido foi riscado, com o auxílio de uma alça de platina, em meio seletivo contido em placa de Petri. O meio usado foi o XAS (DAVIS et al., 1994), composto por 10g de sacarose, 5g de bactopectona, 0.5g de  $K_2HPO_4$ , 0.25g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.05g de  $Na_2SO_3$ , 5g de KBr, 0.002g de benomyl, 15g de agar para um volume final de 1 litro de água destilada. O pH foi ajustado para 6 e o meio esterilizado a 1 atmosfera de pressão por 20 minutos. Os antibióticos ciclohexamida (0.1g), cefalexina (0.025g), novobiocina (0.03g) e kasugamicina (0.05g) foram dissolvidos em 100ml de água destilada, filtrados em um filtro de 0.22 $\mu$ m e adicionados

ao meio após a autoclavagem. Os isolados foram identificados após 5 dias de incubação a 28°C, no escuro.

A identificação da bactéria foi feita com base na taxa de crescimento, na pigmentação e morfologia das colônias, sendo as colônias típicas mantidas em glicerol a -80°C para uso nos experimentos programados. A lista de isolados esta presente na Tabela 1.

### **2.2.3 Teste sorológico DOT-BLOT**

A condução do teste sorológico foi feita com base nos procedimentos descritos por Davis et al. (1994), com algumas modificações. Uma alíquota de 100µL de suspensão bacteriana foi transferida para uma membrana de nitrocelulose (BioAgency; 0,45um). Após a aplicação das amostras e controles, saturou-se a membrana em PBST 5% por 30 minutos e, posteriormente, incubou-se a membrana em antissoro (1:10000), específico para *X. albilineans* por 60 minutos.

Após a incubação, a membrana foi lavada 3 vezes por 3 minutos com PBST. Incubada novamente com anticorpo IgG em PBST (6µL/20mL) por 60 minutos e posteriormente, lavada 3 vezes com PBST por 3 minutos.

A coloração da membrana foi feita incubando-a por 30 minutos em solução substrato (20mL) misturado com corante "fast-blue" (0,020g) e MgCl<sub>2</sub> 0,1M (100µL). Lavou-se 1 vez com PBST e incubou-se por 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio 30%. Após a incubação, a membrana foi lavada com H<sub>2</sub>O e deixada secar ao ar. O resultado do teste foi considerado positivo quando a amostra apresentou coloração azulada.

Os controles utilizados neste teste foram: cultura pura de *X. albilineans*, solução tampão PBST, caldo puro de cana de planta infectada e caldo de cana de planta infectada diluído 1:10.

## **2.2.4 Extração de DNA de *X. albilineans* para testes moleculares**

### **2.2.4.1 Extração de DNA para detecção da bactéria por PCR**

A extração foi processada segundo a metodologia utilizada por Davis et al. (1998). Para cada isolado, foi usado um volume aproximado de 0,5 mL de extrato de caldo de cana, sendo o mesmo centrifugado a 6.000rpm por 10 minutos para obtenção de um pellet. Ao pellet foi acrescentado 0,5mL de meio Wilbrink, sendo as amostras levadas para incubação a 28°C, no escuro por 2 dias, sob agitação para que ocorresse a multiplicação da bactéria.

Após o período de incubação, cada amostra foi centrifugada a 2.500rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 0.5mL do sobrenadante foi diluída com 1 mL de água deionizada e destilada, e centrifugada a 6.000rpm por 15 minutos. Posteriormente, foi descartado o sobrenadante e o pellet re-suspendido em 1 mL de TAE (0.04 M Tris-acetato; 1.0mM de EDTA pH 8.0) e centrifugado novamente a 6.000rpm por 15 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o pellet foi coberto com 0.5mL de TAE ajustado com 0.4% de “skim milk”. As amostras foram incubadas a 100°C por 10 minutos, em seguida em gelo seco/álcool por 3 minutos, novamente a 100°C por 3 minutos e em gelo seco/álcool por 3 minutos. Após esta etapa as amostras foram armazenadas a -80°C.

### **2.2.4.2 Extração de DNA para caracterização molecular dos isolados por rep-PCR**

Neste caso foi adotada a metodologia descrita por Alsubel et al. (1992). Cerca de 1.5mL da cultura da bactéria com crescimento saturado foi centrifugada a 10.000rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet re-suspendido em 567µL de TE (1mL de Tris 1M pH 7.5, 200µL de EDTA 0.5M pH 8.0, completando com H<sub>2</sub>O para 100mL) mais 30µL de SDS 10% e 3µL de proteinase K 20mg/mL (concentração final de 100µg/mL). A amostra foi incubada por 1 hora a 37°C. Após esse período, adicionou-se à amostra 100µL de NaCl 5M e 80µL de CTAB 10% (10g de CTAB 10%, 14mL de NaCl 5M, completando com H<sub>2</sub>O para 100mL), incubando-se a mesma por 10 minutos a 65°C. Foi adicionado 800µL de clorofórmio/álcool isolamílico (24:1, respectivamente), centrifugando a amostra por 5 minutos a 12.000rpm.

A fase superior foi removida para outro tubo de microcentrífuga e adicionado igual volume de clorofórmio/álcool isolamílico (24:1), centrifugando novamente por 5 minutos a 10.000rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 2 V de etanol. A mistura foi mantida à -20°C durante 2 horas, centrifugando após esse período por 5 minutos a 12.000rpm, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 600µL de etanol 70%. Nova centrifugação a 10.000rpm foi feita durante 5 minutos, à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi removido e o pellet lavado com 300µL de etanol 100% e centrifugado a 10.000rpm durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após a secagem, o pellet foi dissolvido em 50µL de 1/10 de TE + Rnase e mantido à -20°C.

#### **2.2.4.3 Detecção de *X. albilineans* por PCR**

A reação de PCR foi conduzida de acordo com os procedimentos descritos por Pan et al. (1999). Uma alíquota de 2.5µL de DNA extraído de cada amostra foi adicionada a uma mistura composta por: 2.5µL de tampão 10X PCR (Gibco BRL), 1.0µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1.0µL de cada *primer* (30 pmol/µL), 100µM de cada dNTP, 0.2µL de Taq DNA polymerase (5U/µL), totalizando um volume final de reação de 25µL. Para amplificação foram usados os primers específicos PGBL1: 5'- CTT TGG GTC TGT AGC TCA GG – 3' e PGBL2: 5'- GCC TCA AGG TCA TAT TCA GC – 3' (PAN et al., 1999). A reação foi processada em termociclador com uma etapa inicial a 95°C por 5 minutos para completa desnaturação do DNA molde, posteriormente 35 ciclos com etapas de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 42°C (para o anelamento), 30 segundos a 72°C (para a extensão do *primer*) e uma etapa final de extensão a 72°C por 2 minutos.

A amplificação foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0.04µg/µL de brometo de etídio, visualizado em transiluminador de ultravioleta. Foram considerados como resultados positivos as amostras que apresentaram no gel fragmentos de DNA, visualizados na forma de bandas, correspondentes a 350pb.

Como padrão positivo foi usado o DNA extraído de planta de cana-de-açúcar sabidamente doente, enquanto o padrão negativo foi representado pelo DNA de planta assintomática e pela água deionizada. O marcador molecular utilizado foi o PGEM.

#### 2.2.4.4 Caracterização dos isolados por rep-PCR

Após a extração do DNA genômico da bactéria, foi feito um teste rápido para quantificação do DNA presente nas amostras, usando-se um gel a 0.8% de agarose contendo 0.04µg/mL de brometo de etídio. Para cada amostra foi colocado 1µL do DNA extraído, 9µL de água esterilizada, 2µL de tampão de carregamento “blue juice”, num volume final da amostra de 12µL. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese por 1 hora e meia a 80volts em tampão TBE 0.5X. Após a corrida, a visualização foi feita em luz ultravioleta, através da observação da presença de fragmentos de DNA, na forma de bandas. Em função da intensidade de cada banda foi feita a estimativa da quantidade de DNA contida em cada amostra.

Após a quantificação, o DNA de cada o isolado bacteriano foi submetido à reação de rep-PCR para caracterização molecular, buscando-se identificar polimorfismo entre os fragmentos amplificados, seguindo-se o protocolo descrito por Lopes et al. (1998), com algumas modificações. A ocorrência de polimorfismo demonstra a variabilidade existente entre os diversos isolados.

Os *primers* utilizados nas reações foram (LOUWS et al., 1994; VERSALOVIC et al., 1994):

- ERIC (ERIC1R [5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C – 3'] e
- ERIC2 [5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G – 3']);
- BOX (BOXA1R [5'- CTA CGG CAA – GGC GAC GCC TGA CG – 3']) e;
- REP (REP1R – I [5'- III ICG ICG ICA TCI GGC – 3']) e;
- REP2 – I [5'- ICG ICT TAT CIG GCC TAC – 3'])

Cada reação foi processada utilizando um volume final de 25µL, contendo para o PCR BOX 14.8µL de água esterilizada; 2.5µL de tampão10X PCR; 1.0µL de MgCl<sub>2</sub> 50Mm; 1.5µL de dNTP 10mM; 4.0µL do *primer* BOX (solução 5 pmol/µL); 0.2µL de Amplitaq 5U/µL e 1.0µL de DNA da amostra. Para os PCRs ERIC e REP: 10.8µL de água esterilizada; 2.5µL de tampão10X PCR; 1.0µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM; 1.5µL de dNTP



10mM; 4.0 $\mu$ L de cada *primer* ERIC, ERIC2, REP, REP2 (solução 30 pmol/ $\mu$ L); 0.2 $\mu$ L de Amplitaq 5U/ $\mu$ L e 1.0 $\mu$ L de DNA da amostra.

A amplificação foi realizada em termociclador utilizando os seguintes ciclos: um ciclo inicial a 95°C por 7 minutos; 30 ciclos compostos por etapas de 94°C por 1 minuto, de 44°C, 52°C e 53°C por 1 minuto com os *primers* REP, ERIC e BOX, respectivamente, e de 65°C por 8 minutos; um ciclo final de extensão a 65°C por 15 minutos.

O produto amplificado pelo PCR foi mantido a 4°C, sendo uma alíquota de 5 $\mu$ L do produto separada para eletroforese em gel de agarose 1.5% em tampão TBE 0.5X por 14 horas a 10 volts, sendo posteriormente fotografado sob luz UV.

Os fragmentos gerados pela amplificação foram identificados de acordo com o peso molecular de cada um, assim recebendo a denominação de 1 (um) quando presentes e 0 (zero) quando ausentes. Um dendrograma foi obtido por meio de análise de matriz de similaridade gerada com a utilização do algoritmo UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) no programa NTSYS, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard.

#### **2.2.4.5 Caracterização dos isolados por RFLP**

Para a análise de RFLP, foi feita a digestão enzimática de fragmentos amplificados pelos *primers* PGBL1 e PGBL 2, os quais amplificam a região espaçadora 16S-23S rDNA. As enzimas de restrição utilizadas foram *AluI*, *BamHI*, *EcoRI* e *HaeIII*, sendo a digestão enzimática conduzida de acordo com as recomendações dos fabricantes destas endonucleases.

A digestão foi feita usando-se 3,0 $\mu$ L do DNA amplificado de cada amostra, 1,5 $\mu$ L de tampão específico para cada enzima, 0,5 $\mu$ L da enzima e 10 $\mu$ L de água. As amostras foram incubadas à uma temperatura de 37°C por 12 horas.

Os produtos de digestão foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 3%, em função do tamanho dos fragmentos gerados pela digestão enzimática. A eletroforese foi conduzida por 4 horas a 80volts em tampão 0,5XTBE. Após a eletroforese foi feita a coloração do gel com brometo de etídio e visualização dos perfis de banda em transiluminador de ultravioleta.

Os isolados analisados foram escolhidos dentro dos três grupos distintos caracterizados pela técnica de rep-PCR, usando-se também como critério a agressividade dos mesmos em relação às plantas de cana-de-açúcar mantidas no campo. Assim, para o Grupo 1 foram escolhidos os isolados 8, 11, 27; para o Grupo 2, os isolados 29, 40, 41, 51; e para o Grupo 3, o isolado 47.

### **2.2.5 Teste de patogenicidade para os isolados de *X.albilineans***

Com o objetivo de se constatar diferença na patogenicidade ou agressividade dos isolados da bactéria, foi instalado um experimento em casa de vegetação, utilizando-se duas variedades de cana-de-açúcar, SP 78 5495 e SP 78 4467, ambas consideradas suscetíveis, sendo a segunda mais suscetível à escaldadura do que a primeira.

Os isolados utilizados no teste de patogenicidade foram escolhidos com base nos resultados obtidos na caracterização dos mesmos feita por rep-PCR. Assim, estes isolados foram escolhidos dentre aqueles que constituíram cada um dos grupos distintos obtidos pela análise dos resultados do teste de rep-PCR. Para a escolha destes isolados também foi levada em consideração a agressividade dos mesmos, observada em plantas de cana mantidas no campo. Assim, para o Grupo 1, no qual foram agrupados os isolados da região de Piracicaba, foram escolhidos os isolados 8, 11, 27; para o Grupo 2, onde foram agrupados isolados da região de Jaú e Ribeirão Preto, foram escolhidos, respectivamente, os isolados 29, 40, 41, 51; e para o Grupo 3, composto por somente dois isolados de Ribeirão Preto, foi escolhido o isolado 47.

Plantas sadias das variedades SP 78 5495 e SP 78 4467, mantidas em viveiro, forneceram os toletes para os testes de patogenicidade. Estes toletes foram inoculados através do corte do colmo com facão, cuja lâmina foi mergulhada anteriormente em caldo extraído de planta doente. Em seguida, estes toletes foram plantados em substrato constituído por duas partes de torta de filtro e uma de composto Plantmax (Eucatex), contido em bandejas de 28 células e mantidos em casa de vegetação. O facão foi lavado com uma solução 0.2% de cloreto de benzalcônico em água e flambado, a cada inoculação com os diferentes isolados.

No total, foram utilizados 1260 toletes ou gemas (45 caixas) para cada variedade de cana, sendo usados 140 toletes de cada variedade (5 caixas) para cada tratamento. Cada um dos isolados selecionados constitui um tratamento, sendo a testemunha representada pela inoculação de caldo proveniente de planta sadia. A inoculação das plantas foi feita com o caldo de planta infectada, pois de acordo com o pré-teste realizado, este tipo de inóculo promoveu melhores resultados quanto à obtenção de doença.

As avaliações do experimento foram realizadas aos 60 e 90 dias após a inoculação. Os sintomas foram observados e atribuiu-se notas de 1 a 5, de acordo com o grau de desenvolvimento dos mesmos. A escala empregada para avaliação está apresentada na Tabela 2, sendo utilizada pelo Centro de Tecnologia Canavieira para avaliar a resistência de clones à escaldadura, no programa de melhoramento.

A análise estatística foi realizada com base nos dados obtidos na avaliação do experimento feita aos 90 dias após a inoculação. O delineamento utilizado na instalação do experimento foi o de blocos ao acaso, sendo os dados analisados pelo Teste F à 5% de significância.

Tabela 2 - Escala de notas para avaliação de sintomas de escaldadura ocasionados por *Xanthomonas albilineans* em plantas de cana-de-açúcar

(continua)

Nota	Sintomas
1	Sem sintomas, folhas verdes e sem estrias, perfilhos e colmo principal sem manchas cloróticas. Amarelecimento nas pontas das folhas cortadas causado por dano mecânico.
2	Infecção localizada, aparecimento de manchas cloróticas no limbo foliar das folhas velhas, no local onde foi feita a inoculação ou alguns centímetros abaixo, sem o aparecimento de estrias ao longo das folhas.
3	Aparecimento de estrias, presença de estrias brancas e finas ao longo do limbo foliar ou manchas cloróticas no limbo foliar, no local onde foi feita a inoculação ou alguns centímetros mais abaixo, com estrias

saindo da mancha e descendo por toda a folha.

- 4 Manchas cloróticas intensas no limbo foliar em estágio evoluído de necrose (secamento do limbo), presença de estrias grossas e brancas saindo das manchas e descendo pelo limbo. Amarelecimento geral das folhas inoculadas.
- 5 Morte e seca do colmo onde ocorreu a inoculação.
- 

(conclusão)

## 2.3 Resultados e Discussão

### 2.3.1 Obtenção dos isolados e teste sorológico DOT-BLOT

Todos os 52 isolados foram obtidos de plantas que apresentavam sintomas característicos da doença, como estrias cloróticas e superbrotamento de colmos.

Os isolados provenientes das 52 amostras cresceram em meio de cultura seletivo e a identificação da bactéria, feita com base na taxa de crescimento, pigmentação e morfologia das colônias, demonstrou que todos eles eram característicos de *X. albilineans*. Os resultados do teste serológico foram positivos para todos os isolados, confirmando que o patógeno pertencia à espécie *X. albilineans* (Figura 1). A intensidade da coloração azul, observada na membrana, variou de acordo com a concentração da bactéria no caldo analisado, sendo mais intensa quando a concentração da bactéria era maior na amostra. Para os controles também pode-se observar a coloração azulada, quando positivos e, nenhuma coloração para o controle negativo composto pelo tampão PBST. Resultados similares foram obtidos por Davis et al. (1994), quando foram amostradas 27 plantas da cultivar CP 78-1247 plantada na Florida. Neste caso, os isolados cresceram em meio seletivo para *X. albilineans* e o teste serológico aplicado aos mesmos revelou resultados positivos, demonstrando que todos pertenciam a esta espécie bacteriana.

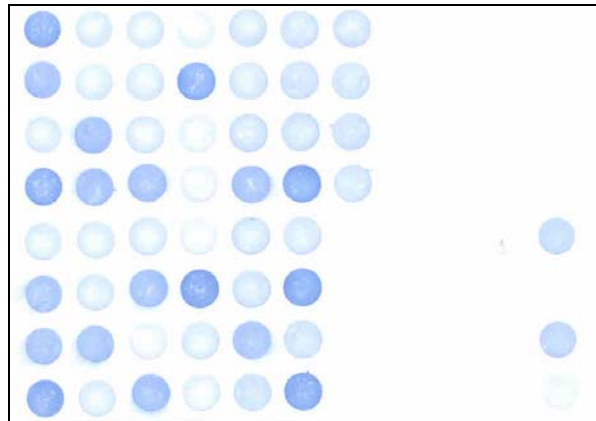


Figura 1 - Detecção e identificação de isolados de *X. albilineans* em caldo de 52 amostras de cana-de-açúcar exibindo sintomas típicos de escaldadura, coletadas nas regiões de Piracicaba/SP, Jaú/SP e Ribeirão Preto/SP. Colunas (de cima para baixo): 1)- isolados de 1-8; 2)- isolados de 9-16; 3)- 17-24; 4)- isolados de 25-32; 5)- isolados de 33-40; 6)- isolados de 41-48; 7)- isolados de 49-52, respectivamente e os controles são as quatro últimas amostras: cultura pura de *X. albilineans*, solução tampão PBST, caldo de xilema de planta de cana infectada e caldo de xilema de planta de cana infectada diluído 1:10

### 2.3.2 Detecção de *X. albilineans* por PCR

A partir de todos os isolados provenientes das 52 amostras submetidas ao teste de PCR foram constatadas amplificações do fragmento alvo de DNA, quando se utilizou os primers específicos PGBL1/PGBL2. As amplificações foram visualizadas, em gel de agarose, na forma de bandas correspondentes a fragmentos de 350 pb (Figuras 2, 3 e 4). Fragmentos de 350pb também foram observados para amostra de planta sabidamente doente e usada como controle positivo, no entanto, nenhuma amplificação ocorreu para o DNA extraído de planta assintomática e quando a água foi usada no lugar de DNA, nas reações de PCR. Estes resultados confirmaram que todos os isolados obtidos de amostras de plantas com sintomas de escaldadura eram pertencentes à espécie *X. albilineans*.

A amplificação de um fragmento genômico de aproximadamente 350pb, obtido para os isolados usados neste ensaio, corresponde ao fragmento típico de *X. albilineans* resultante do emprego dos primers PGBL1/PGBL2, como relatado para esta espécie (PAN et al.,1999). A especificidade deste par de primer para identificação de *X. albilineans* foi demonstrada quando o mesmo amplificou fragmentos genômicos de 350pb somente a partir de DNA extraído desta espécie, em comparação com outras espécies bacterianas avaliadas (PAN et al.,1999). Os resultados positivos de PCR confirmando que todos os isolados deste trabalho pertenciam à *X. albilineans* complementam aqueles já revelados pelo isolamento em meio seletivo e pelo teste sorológico. O emprego de PCR neste estudo para identificação de *X. albilineans* demonstrou a utilidade da técnica para este finalidade, confirmando a validade da sua aplicação como já relatado em outros trabalhos de mesma natureza (WANG et al.,1998).

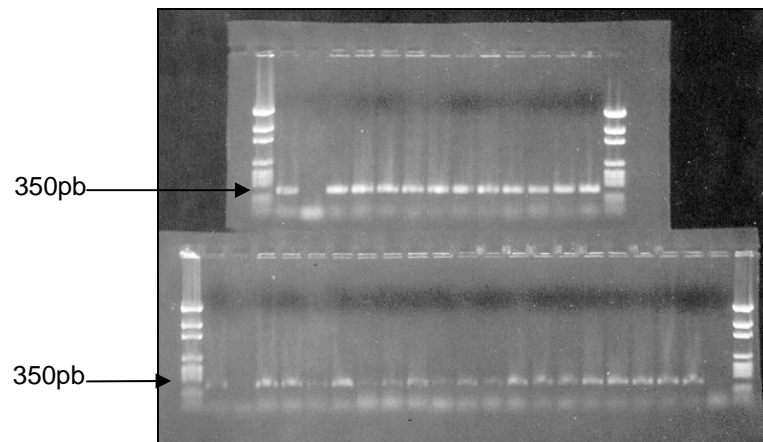


Figura 2 - Identificação de isolados de *X. albilineans* obtidos a partir de amostras sintomáticas de cana-de-açúcar com escaldadura, coletadas em Piracicaba, utilizando Bio-PCR com primers específicos. GEL 1- Colunas: 1)- Marcador molecular pGEM; 2)- Controle positivo; 3)- Controle negativo; colunas de 4 a 14)- isolados de 1-11, respectivamente; 15)- pGEM. GEL 2- Colunas: 1)- pGEM; 2)- Controle positivo; 3)- Controle negativo; colunas de 4 a 21)- isolados de 12-27, respectivamente; 22)- água; 23)- Marcador molecular pGEM

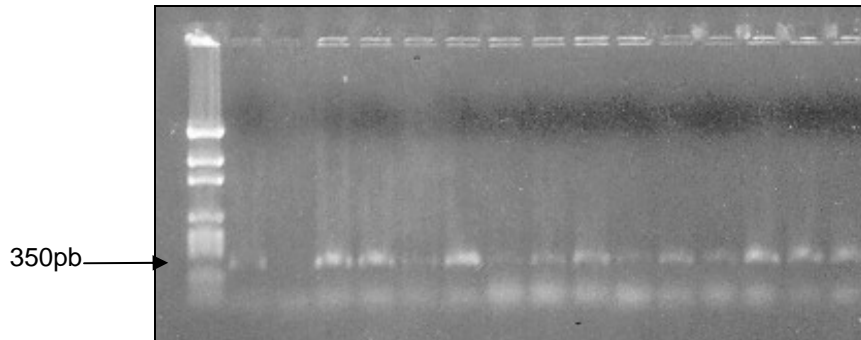


Figura 3 - Identificação de isolados de *X. albilineans* obtidos a partir de amostras sintomáticas de cana-de-açúcar com escaldadura, coletadas em Jaú, utilizando Bio-PCR com primers específicos. Colunas: 1)- Marcador pGEM; 2)- Controle positivo; 3)- Controle negativo; 4 a 16)- isolados de 28-40, respectivamente

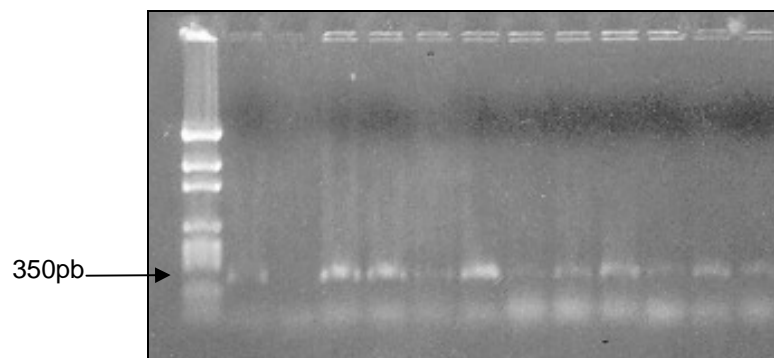


Figura 4 - Identificação de isolados de *X. albilineans* obtidos a partir de amostras sintomáticas de cana-de-açúcar com escaldadura, coletadas em Ribeirão Preto, utilizando Bio-PCR com primers específicos. Colunas: 1)- Marcador molecular pGEM; 2)- Controle positivo; 3)- Controle negativo; 4 a 13)- isolados de 41-52, respectivamente

### 2.3.3 Caracterização dos isolados por rep-PCR

A diversidade genética foi avaliada entre os 52 isolados de *X. albilineans* pela comparação de haplótipos gerados por elementos repetitivos amplificados por rep-PCR. O padrão eletroforético gerado pela amplificação destas seqüências conservadas e repetitivas resultou em múltiplos produtos com variados tamanhos ou pesos moleculares.

A análise dos padrões eletroforéticos obtidos revelou a ocorrência de diversidade genética entre os isolados originários da região de Piracicaba, Jaú e Ribeirão Preto,

tanto para o primer BOX (Figuras 5, 6, 7 e 8) como para os pares de primers REP (Figuras 9, 10, 11 e 12) e ERIC (Figuras 13, 14, 15 e 16).

Os haplótipos obtidos com os primers BOX, REP e ERIC foram analisados em conjunto e permitiram reunir os 52 isolados em três grupos distintos. O Grupo 1 foi constituído por 27 isolados, todos coletados em Piracicaba. No grupo 2 foram reunidos 23 isolados: isolados 28 ao 40, obtidos em Jaú e os isolados 41 ao 46, 49 ao 52 coletados em Ribeirão Preto. No Grupo 3 foram reunidos somente 2 isolados (47 e 48), ambos coletados em Ribeirão Preto.

Com o objetivo de relacionar a ocorrência de similaridade e diversidade genética existentes entre os isolados de *X. albilineans*, independente da região de origem, foi construída uma matriz de similaridade a partir do peso molecular dos fragmentos produzidos pela amplificação obtida com os primers BOX, REP e ERIC. Na comparação entre os padrões de banda de cada isolado, foi atribuído o número 1 (um) para presença de banda e o número 0 (zero) quando a banda estava ausente. Este tipo de avaliação gerou uma tabela a partir da qual foi obtido um dendrograma (Figura 17), através do programa de computador conhecido por NTSYS. A observação dos resultados expressos pelo dendrograma permite identificar 3 grupos distintos, sendo que cada grupo reúne isolados coletados em diferentes regiões geográficas do estado de São Paulo, como já especificado anteriormente no texto. Ressalta-se que para os isolados 31 e 45 não ocorreu amplificação de fragmento e, portanto, estes isolados não foram considerados na elaboração do dendrograma.

A análise dos resultados gerados pela aplicação da técnica de rep-PCR demonstrou que há diversidade genética entre os isolados de *X. albilineans* coletados no estado de São Paulo. Quando se procurou associar os grupos de isolados determinados pelo rep-PCR com local de origem, foram observados aspectos interessantes sobre a distribuição geográfica destes isolados. Assim, no Grupo 1 foram agregados somente os isolados coletados em Piracicaba; no Grupo 2, todos os isolados provenientes de Jaú e a maioria dos isolados originários de Ribeirão Preto; e no Grupo 3, somente dois isolados distintos de todos os demais e originários de Ribeirão Preto. Portanto, a caracterização molecular revelou que a diversidade genética dos isolados de *X. albilineans* apresenta uma certa relação com sua distribuição geográfica.



A variabilidade genética de *X. albilineans* também já foi constatada em outros países, pesquisada em trabalhos que empregaram técnicas moleculares e sorológicas para evidenciar esta característica presente no agente da escaldadura da cana-de-açúcar. Variantes desta espécie foram identificados através do uso de anticorpos monoclonais (ALVAREZ et al., 1996), enquanto pela aplicação de técnica molecular foi demonstrada a ocorrência de variação genômica intra-específica (DAVIS et al., 1997). Através da técnica de rep-PCR, foi encontrada similaridade genética entre 26 isolados de *X. albilineans*, porém foi demonstrado que estes isolados eram distintos de isolados pertencentes a outras espécies bacterianas e de outros isolados de bactérias não identificadas ocorrentes na cana-de-açúcar (LOPES et al,1998). Esta mesma técnica permitiu avaliar uma coleção de isolados de *X. albilineans*, revelando a existência de uma relação entre diversidade genética dos isolados e área geográfica de origem dos mesmos (LOPES, 1996).

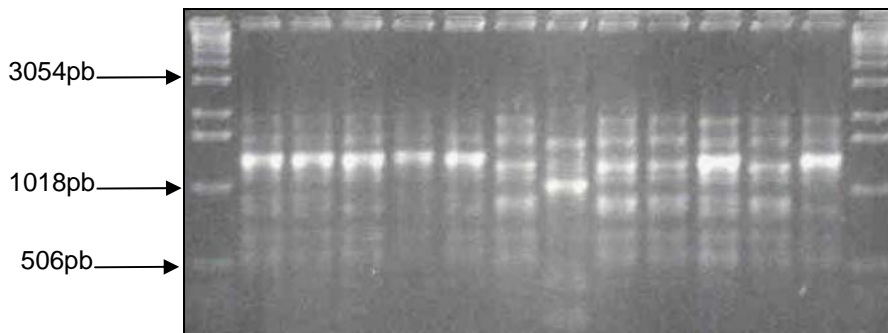


Figura 5 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Piracicaba, através de PCR usando primer BOX. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 ao 13)- isolado 1-12, respectivamente; 14)- marcador 1Kb

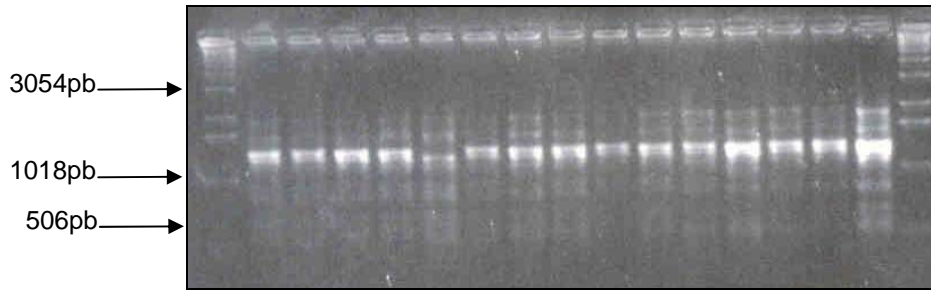


Figura 6 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Piracicaba, através de PCR usando primer BOX. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 ao 16)- isolado 13-27, respectivamente; 17)- marcador 1Kb

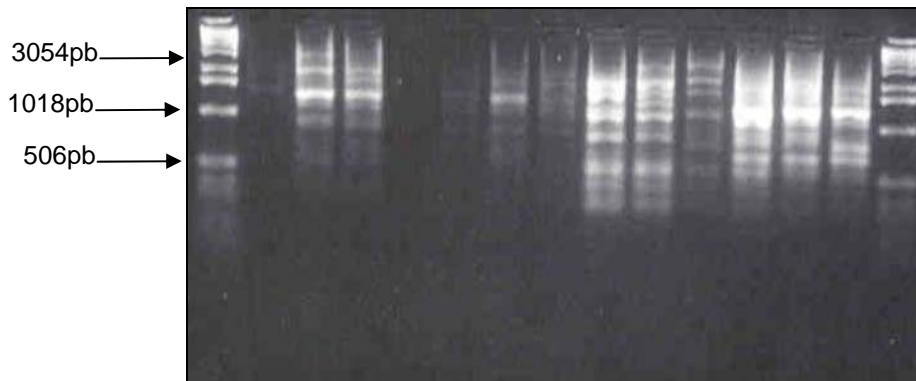


Figura 7 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Jaú, através de PCR usando primer BOX. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 a 14)- isolados de 28-40, respectivamente; 15)- marcador 1Kb

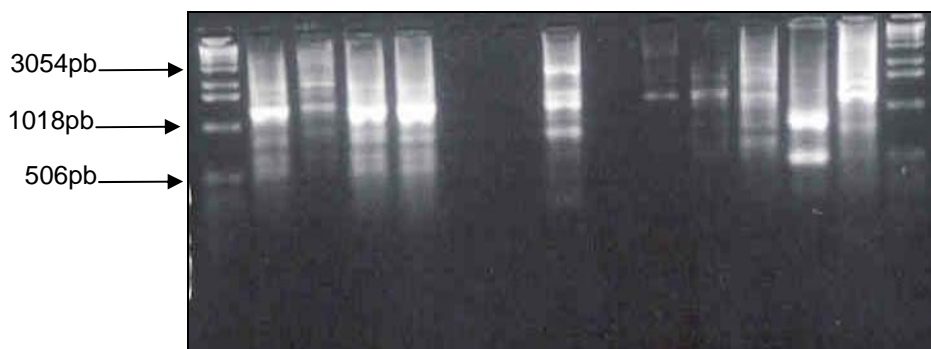


Figura 8 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Ribeirão Preto, através de PCR usando primer BOX. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 a 14)- isolados de 41-52 respectivamente; 15)- marcador 1Kb

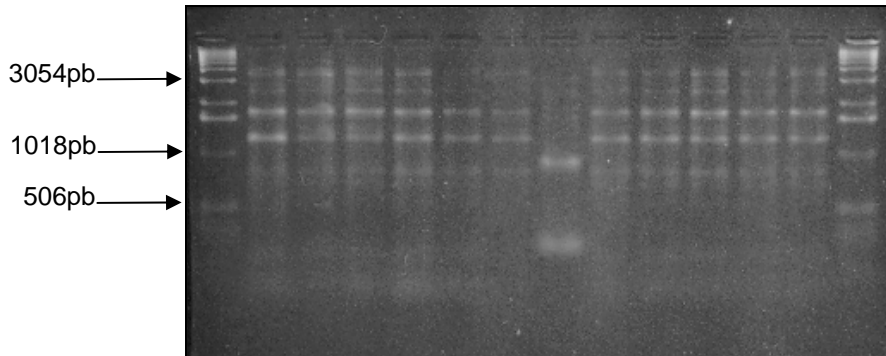


Figura 9 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Piracicaba, através de PCR usando primer REP. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 ao 13)- isolado 1-12, respectivamente; 14)- marcador 1Kb

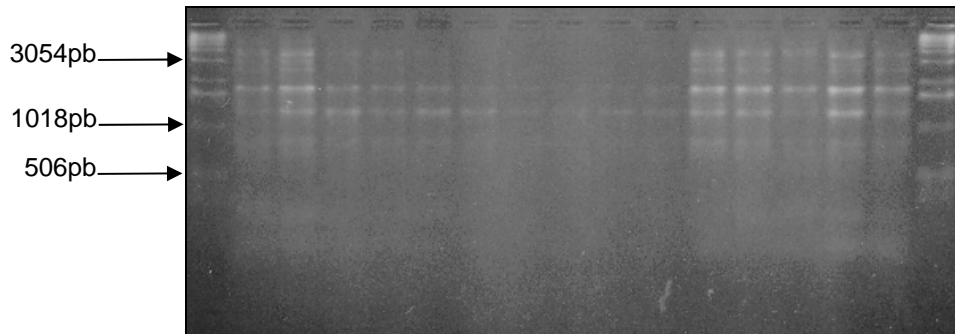


Figura 10 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Piracicaba, através de PCR usando primer REP. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 a 16)- isolados de 13-27, respectivamente; 17)- marcador 1Kb



Figura 11 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Jaú, através de PCR usando primer REP. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 a 14)- isolados de 28-40, respectivamente; 15)- marcador 1Kb

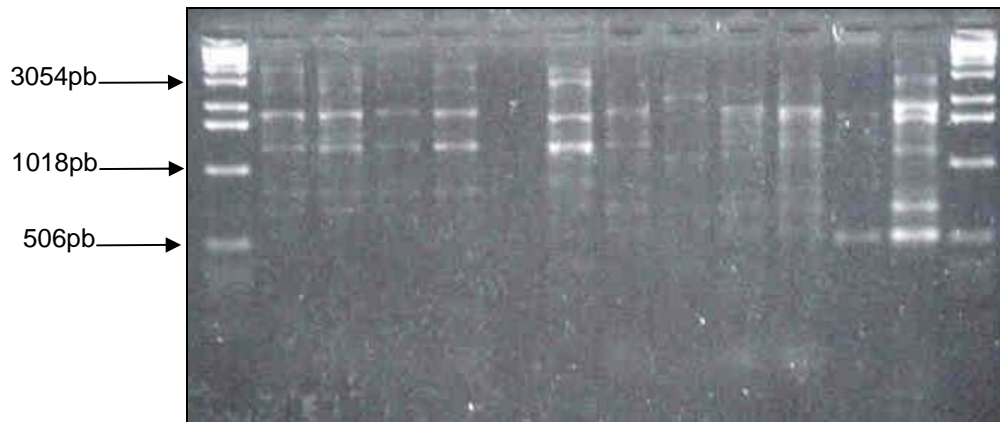


Figura 12 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Ribeirão Preto, através de PCR usando primer REP. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 a 14)- isolados de 41-52 respectivamente; 15)- marcador 1Kb

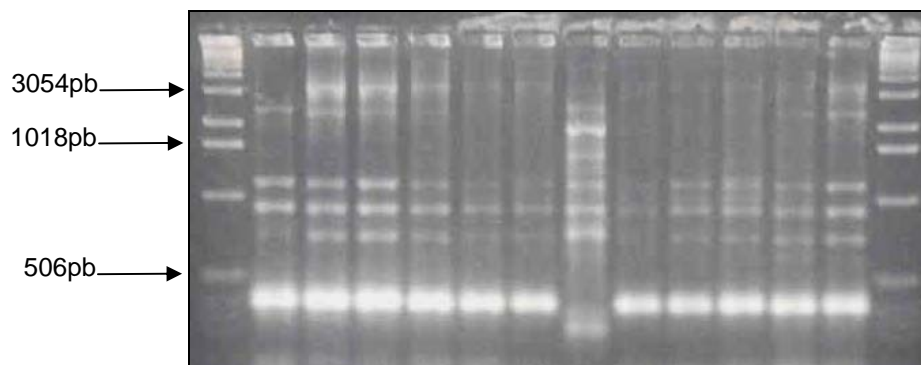


Figura 13 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Piracicaba, através de PCR usando primer ERIC. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 ao 13)- isolado 1-12, respectivamente; 14)- marcador 1Kb

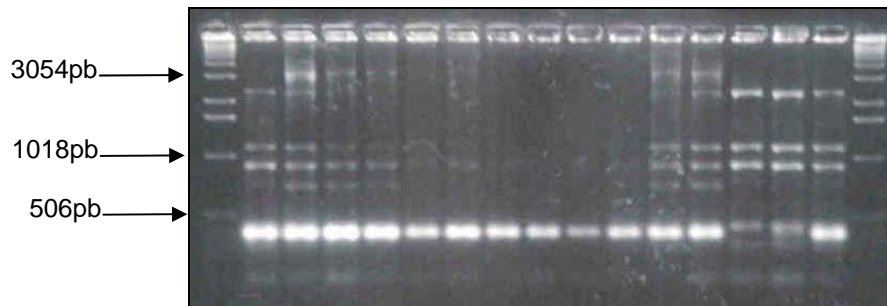


Figura 14 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Piracicaba, através de PCR usando primer ERIC. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 a 16)- isolados de 13-27, respectivamente; 17)- marcador 1Kb



Figura 15 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Jaú, através de PCR usando primer ERIC. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 a 14)- isolados de 28-40, respectivamente; 15)- marcador 1Kb

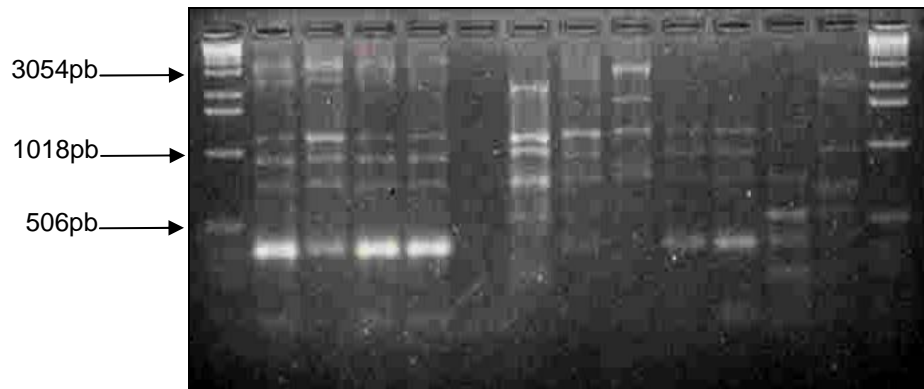


Figura 16 - Perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA de isolados de *Xanthomonas albilineans* coletados na região de Ribeirão Preto, através de PCR usando primer ERIC. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2 a 14)- isolados de 41-52 respectivamente; 15)- marcador 1Kb

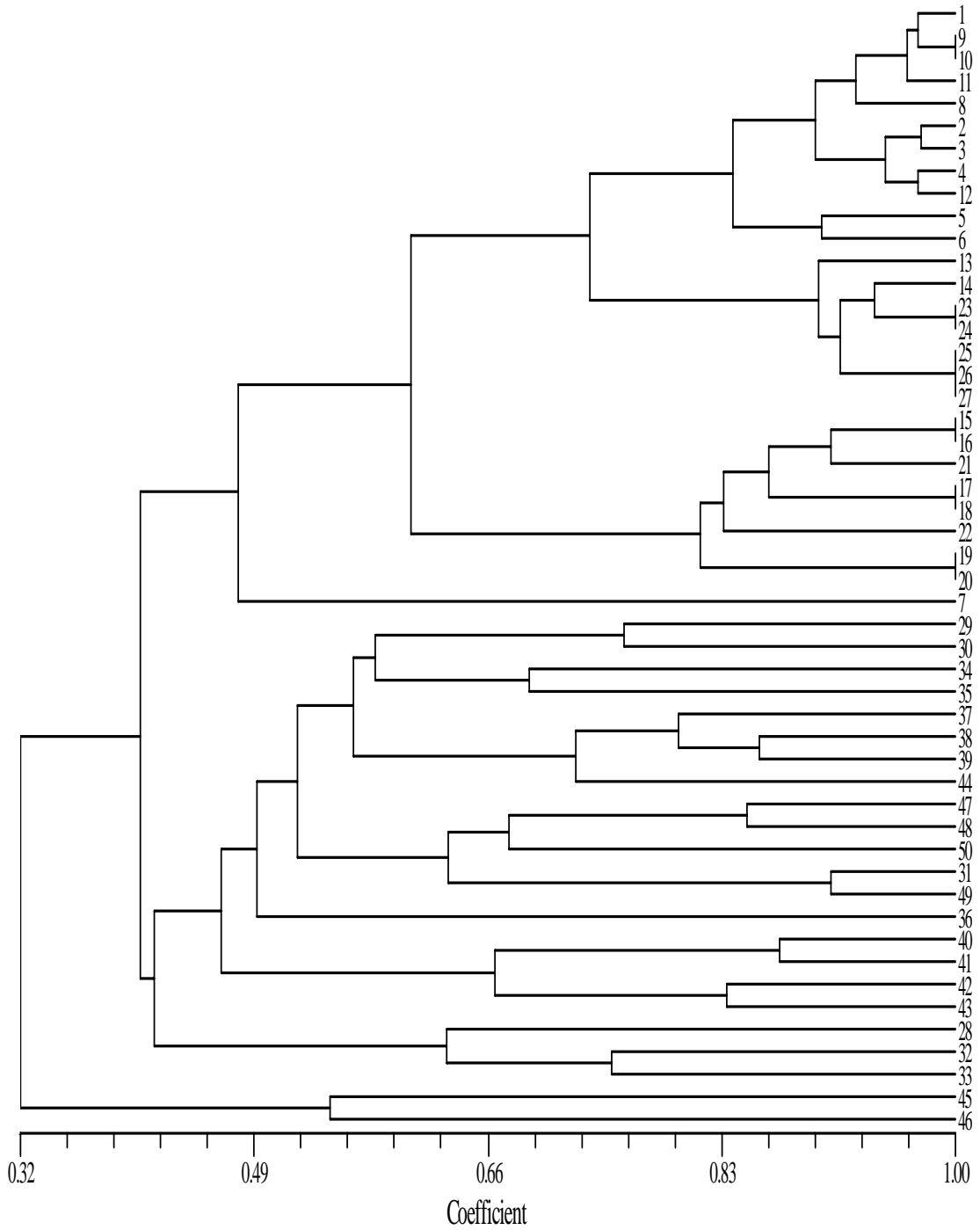


Figura 17 - Dendrograma construído com base no Coeficiente de Similaridade de Dice e pelo critério de agrupamento UPGMA, com o emprego dos primers BOX, REP e ERIC

#### 2.3.4 Caracterização dos isolados por RFLP

Com base no dendrograma gerado pelos resultados do rep-PCR, foram escolhidos 8 isolados para a realização das análises de RFLP. Pode-se observar no dendrograma a existência de três grupos, dentro dos quais os isolados mostraram perfis eletroforéticos semelhante. A partir de cada grupo, foram escolhidos os isolados que causaram os sintomas mais característicos da doença nas plantas mantidas no campo. Assim, do Grupo 1, no qual se encontram agrupados todos os isolados da região de Piracicaba, foram escolhidos os isolados 8, 11, 27; do Grupo 2, onde foram reunidos isolados da região de Jaú e Ribeirão Preto, foram escolhidos, respectivamente, os isolados 29, 40 e 41, 51; e do grupo 3, constituído somente por dois isolados de Ribeirão Preto, foi escolhido o isolado 47.

A técnica de RFLP, para cada isolado, foi conduzida através da digestão enzimática dos fragmentos de aproximadamente 350pb, amplificados pelos *primers* PGBL1 e PGBL 2. As enzimas de restrição utilizadas foram *AluI*, *BamHI*, *EcoRI* e *HaeIII*, relatadas freqüentemente como apropriadas para identificação molecular de bactérias.

A análise de RFLP revelou que a digestão enzimática promovida pelas diferentes endonucleases, isoladamente, gerou padrões eletroforéticos idênticos para os isolados avaliados. As enzimas *AluI*, *BamHI*, *EcoRI* geraram um fragmento de aproximadamente 350pb, mostrando que não encontraram sítio de restrição para clivagem do fragmento de DNA amplificado no PCR. A enzima *HaeIII* encontrou um sítio de restrição no fragmento amplificado e gerou, para todos os isolados, dois fragmentos, os quais foram observados na forma de bandas no gel de acrilamida. Portanto, nas condições deste ensaio, os isolados de *X. albilineans* foram indistinguíveis entre si, não tendo sido possível demonstrar a ocorrência de diversidade genética entre os mesmos. Uma interpretação para este tipo de resultado seria o fato do fragmento amplificado pelos primers PGBL1/PGBL2 possuir um número relativamente pequeno de pares de bases, o que restringiria a ocorrência de sítios de restrição para atuação das enzimas. Assim sendo, não houve geração de fragmentos genômicos de tamanhos diferenciados, comprometendo a obtenção de resultados (Figuras 18, 19, 20 e 21). O uso destas enzimas, no presente caso, não foi apropriado, pois comprometeram a eficiência da



técnica de RFLP, a qual se baseia justamente na análise de padrões eletroforéticos gerados por fragmentos de diferentes tamanhos ou pesos moleculares.

No entanto, a técnica tem sido útil para demonstrar a diversidade genética existente entre isolados de *X. albilineans*. O emprego da técnica de RFLP, conduzida com DNA total da bactéria e com a endonuclease *SpeI*, permitiu separar em oito grupos distintos os 218 isolados coletados em 31 locais, caracterizando a diversidade genética existente entre os isolados deste patógeno (DAVIS et al., 1997). Neste caso, o sucesso do emprego da técnica pode ser creditado à ocorrência de vários sítios de restrição ao longo do material genético íntegro da bactéria. A aplicação desta mesma técnica, usando DNA total da bactéria e a endonuclease *EcoRI*, também foi útil para segregar isolados da bactéria em dois grupos distintos, quando se investigou a variabilidade do patógeno como possível causa de quebra de resistência de variedade de cana-de-açúcar à escaldadura, na região do Caribe (ROTT e DAVIS, 1996). Isolados de *X. albilineans* foram reunidos em três grupos através de análise de RFLP usando DNA total e *EcoRI*, inclusive permitindo relacionar grupo de variabilidade e região de origem destes isolados (ALVAREZ et al., 1996).

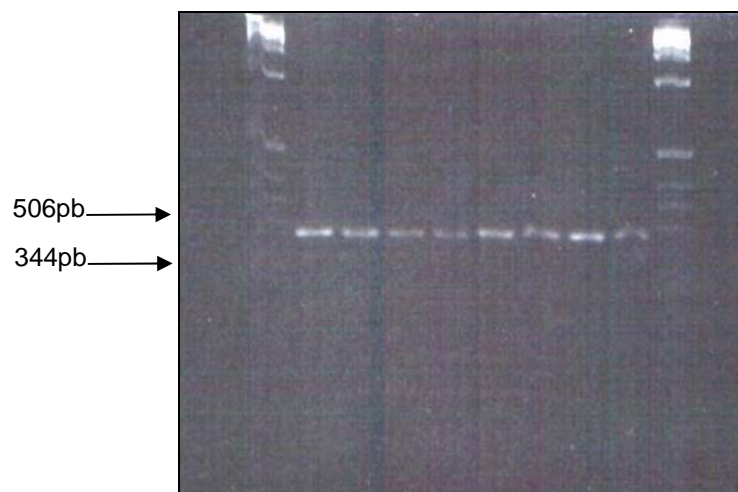


Figura 18 - Perfis eletroforéticos obtidos pela digestão com a enzima *AluI* de fragmentos de DNA amplificado pelo par de primers PGBL1/PGBL2. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2)- isolado 8; 3)- isolado 11; 4)- isolado 27; 5)- isolado 29; 6)- isolado 40; 7)- isolado 41; 8)- isolado 47; 9)- isolado 51; 10)- marcador 1Kb

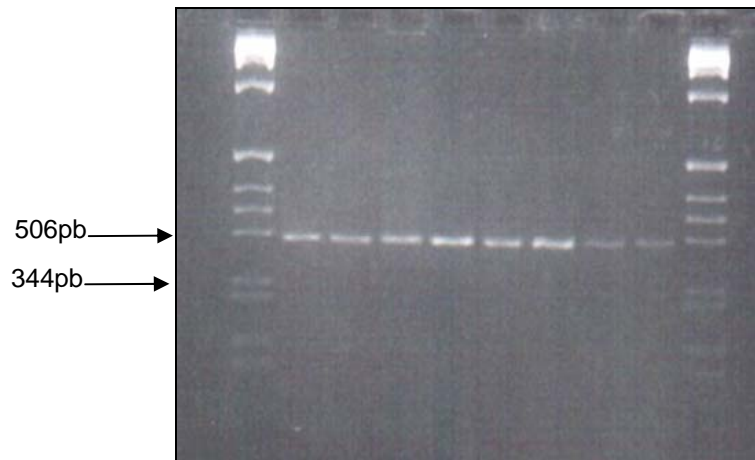


Figura 19 - Perfis eletroforéticos obtidos pela digestão com a enzima *Bam*HI de fragmentos de DNA amplificado pelo par de primers PGBL1/PGBL2. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2)- isolado 8; 3)- isolado 11; 4)- isolado 27; 5)- isolado 29; 6)- isolado 40; 7)- isolado 41; 8)- isolado 47; 9)- isolado 51; 10)- marcador 1Kb

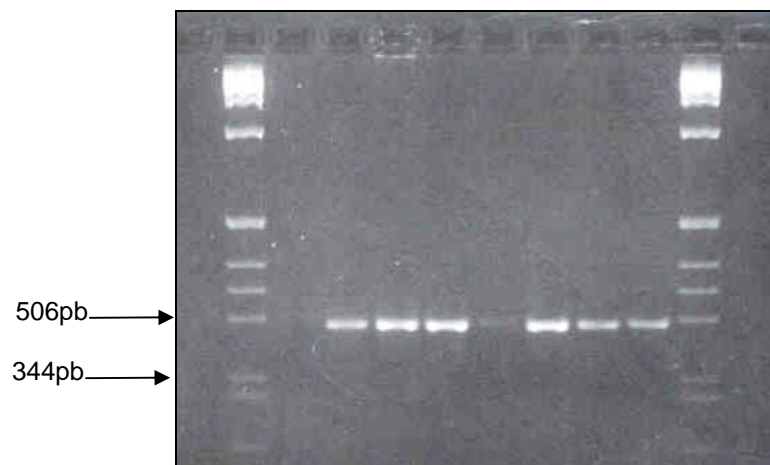


Figura 20 - Perfis eletroforéticos obtidos pela digestão com a enzima *Eco*RI de fragmentos de DNA amplificado pelo par de primers PGBL1/PGBL2. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2)- isolado 8; 3)- isolado 11; 4)- isolado 27; 5)- isolado 29; 6)- isolado 40; 7)- isolado 41; 8)- isolado 47; 9)- isolado 51; 10)- marcador 1Kb

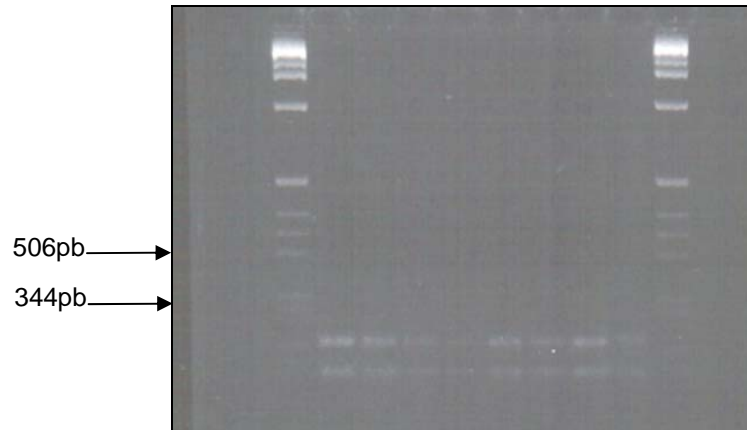


Figura 21 - Perfis eletroforéticos obtidos pela digestão com a enzima *HaeIII* de fragmentos de DNA amplificado pelo par de primers PGBL1/PGBL2. Coluna: 1)- marcador 1Kb; 2)- isolado 8; 3)- isolado 11; 4)- isolado 27; 5)- isolado 29; 6)- isolado 40; 7)- isolado 41; 8)- isolado 47; 9)- isolado 51; 10)- marcador 1Kb

### 2.3.5 Teste de patogenicidade

Com base no rep-PCR e no dendograma, os isolados foram reunidos em três grupos distintos. Para o teste de patogenicidade foram escolhidos os isolados 8, 11 e 27 pertencentes ao Grupo 1, coletados na região de Piracicaba; os isolados 29 e 40, originários da região de Jaú, 41 e 51, da região de Ribeirão Preto, todos pertencentes ao Grupo 2; e o isolado 47 pertencente ao Grupo 3, procedente de Ribeirão Preto.

Os isolados foram inoculados através de corte de colmos sadios provenientes de plantas das variedades SP 78 5495 e SP 78 4467. O caldo usado para inocular cada isolado foi obtido de plantas infectadas por cada um destes isolados, mantidas no campo. Como testemunha, foi usado caldo obtido de plantas sadias das duas variedades anteriormente referidas. A inoculação de cada isolado representou um tratamento. Desta forma, o tratamento **T1** correspondeu à inoculação do isolado 8, **T2** ao isolado 11, **T3** ao isolado 27, **T4** ao isolado 40, **T5** ao isolado 29, **T6** ao isolado 41, **T7** ao isolado 51, **T8** ao isolado 47, **T9** foi uma das testemunhas, representada pela inoculação de caldo sadio obtido da variedade SP 78 5495 e **T10** outra testemunha, representada pela inoculação de caldo sadio obtido da variedade SP 78 4467.

Os resultados do teste de patogenicidade foram analisados com base na avaliação feita aos 90 dias após a inoculação, através da escala de notas representativa da sintomatologia exibida pela planta. Aos 90 dias, as plantas exibiram

sintomas mais característicos da doença e permitiram melhor observação do efeito de cada isolado sobre a planta inoculada.

As duas variedades apresentaram comportamento diverso em relação ao patógeno (Figura 22). A variedade SP78 4467 se mostrou mais suscetível que a variedade SP78 5495, confirmando as informações anteriores de que, mesmo sendo ambas suscetíveis, a variedade SP78 4467 possuía maior grau de suscetibilidade. Por esta razão, os dados obtidos com a variedade SP78 4467 foram utilizados para análise, pois nesta variedade a intensidade de doença foi mais alta, facilitando a interpretação dos resultados.

Todos os isolados testados se mostraram patogênicos, no entanto a agressividade dos mesmos variou, mostrando que uns são capazes de causar sintomas mais intensos do que outros. Estes resultados demonstraram a ocorrência de variabilidade entre os isolados e a análise estatística dos dados obtidos na variedade SP78 4467 permitiu identificar os isolados mais agressivos e os menos agressivos (Tabela 3). A variabilidade dos isolados em relação à variedade SP78 5495 (menos suscetível) também pode ser verificada, confirmado os resultados obtidos com a variedade mais suscetível.

Os isolados T6 e T7, provenientes de Ribeirão Preto, se mostraram mais agressivos que os isolados T4, T3 e T8, respectivamente, originários Jaú, Piracicaba e Ribeirão Preto. No entanto, os isolados T6 e T7 não diferiram dos isolados T1, T2 e T5, sendo os dois primeiros coletados em Piracicaba e o outro procedente de Jaú. O isolado T8, obtido em Ribeirão Preto, foi o isolado significativamente menos agressivo em comparação com os demais isolados avaliados. A agressividade foi variável entre os isolados, considerados individualmente, inclusive de forma significativa demonstrada pela análise estatística, porém não foi possível reunir os isolados em grupos suficientemente distintos. Neste aspecto, os resultados mostraram claramente que o isolado T8 foi o único que diferiu em agressividade de todos os demais isolados dentro daqueles testados.

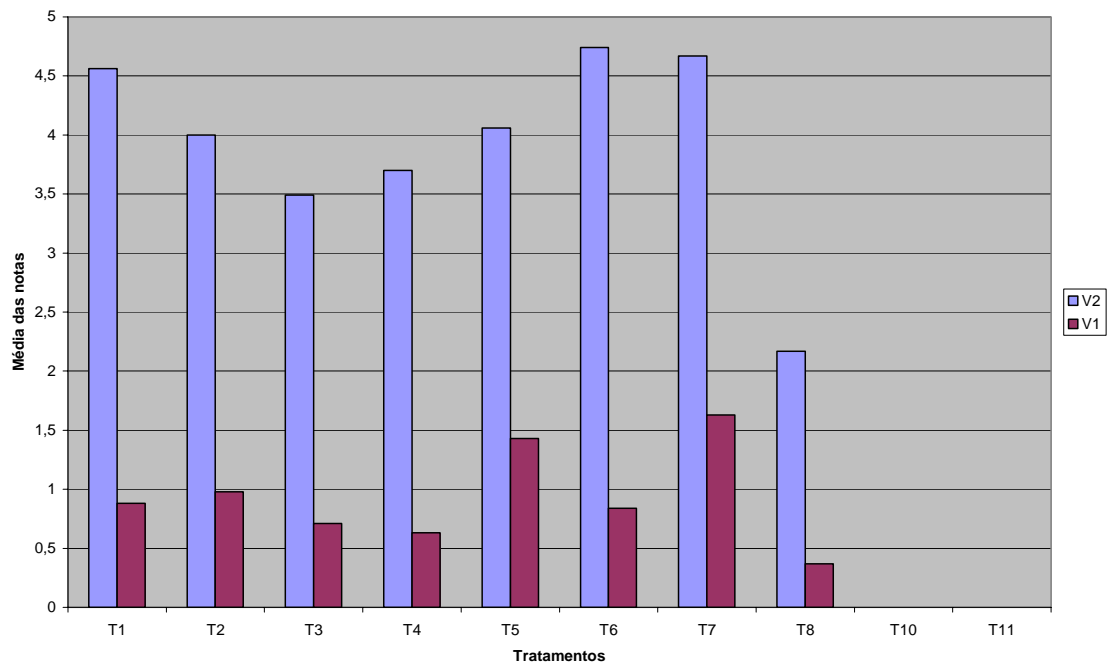


Figura 22 - Reação de plantas de cana-de-açúcar, pertencentes às variedades SP 78 5495 (V1) e SP 78 4467 (V2), inoculadas com isolados de *X. albilineans* amostrados em diferentes regiões do estado de São Paulo. A inoculação de cada isolado se constituiu em um tratamento (T). A avaliação foi feita aos 90 dias após a inoculação, através de uma escala de notas variável de 1-5, de acordo com a intensidade crescente de sintomas observados nas plantas

Tabela 3 - Reação de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP 78 4467 inoculada com isolados de *X. albilineans* coletados em três regiões do estado de São Paulo. A inoculação de cada isolado representou um tratamento (T). A avaliação foi feita aos 90 dias após a inoculação, através de uma escala de notas variável de 1-5, de acordo com a intensidade crescente de sintomas observados nas plantas

Tratamento	Isolado	Grupo de diversidade	Intensidade de sintoma
T6	41	2	4,74 a*
T7	51	2	4,67a
T1	8	1	4,56ab
T5	29	2	4,06ab
T2	11	1	4,00abc
T4	40	2	3,70bc
T3	27	1	3,49c
T8	47	3	2,17d
d.m.s (5%)			0,88

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si

Embora tenha sido demonstrado que os isolados apresentaram variabilidade em agressividade, não foi possível demonstrar que esta agressividade possa estar relacionada com região geográfica de onde os mesmos foram coletados. Assim, com base na análise dos dados, pode-se afirmar que isolados com maior ou menor agressividade estão distribuídos aleatoriamente nas áreas amostradas. Um exemplo disto foi a constatação de que os dois isolados mais agressivos e o isolado menos agressivo, dentre aqueles testados, foram amostrados justamente na mesma região geográfica, ou seja, na região de Ribeirão Preto. A variabilidade em agressividade, assim como demonstrada no presente estudo, também foi encontrada por Mohamed et al. (1996), entre isolados de *X. albilineans* obtidos de diferentes regiões.

A diversidade genética dos isolados, demonstrada através da aplicação de rep-PCR, e a variabilidade em agressividade, constatada no teste de patogenicidade, parece não estarem relacionadas, com base nos resultados obtidos no presente estudo. A diversidade genética permitiu o grupamento dos isolados e mostrou que estes grupamentos estavam mais relacionados com uma ou outra região, a partir da qual os isolados foram amostrados; o mesmo não ocorreu em relação à característica de

agressividade. No entanto, observou-se que um dos dois isolados pertencentes ao Grupo 3 de rep-PCR, utilizado como T8 no teste de patogenicidade, também forma um grupo único quando se considera o fator agressividade. Esta informação se constitui num dado interessante, o qual poderá ser explorado em pesquisas futuras que se ocupem deste tipo de assunto. A relação entre diversidade genética de isolados e agressividade também foi estudada por Davis et al. (1997), os quais relataram que em testes de patogenicidade, conduzidos com 15 isolados de *X. albilineans*, não foi demonstrada diferença em agressividade entre isolados, apesar dos mesmos terem sido colocados em grupos diferentes quanto à diversidade genética, avaliada por análise de RFLP.

### 3 CONCLUSÕES

- Os isolados de *X. albilineans* mostraram diversidade genética, havendo uma tendência desta característica estar relacionada com a região geográfica de origem dos isolados

- Os isolados de *X. albilineans* apresentaram variabilidade patogênica, evidenciada através da agressividade

- A diversidade genética dos isolados, aparentemente, não mostrou relação com a variabilidade patogênica

- A espécie *X. albilineans* foi identificada em todas as amostras de plantas de cana-de-açúcar que apresentaram sintomas típicos de escaudadura.



## REFERÊNCIAS

AKIBA, F. **Isolamento, inoculação e sobrevivência de *Xanthomonas albilineans* e avaliação de resistência à escaldadura das folhas em cana-de-açúcar.** 1978. 97p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 1978.

ALSUBEL, F.N. (Ed.). **Short protocols in molecular biology.** 2nd ed. New York: John Wiley, p. 28, 1992.

ALVAREZ, A.M.; SCHENCK, S.; BENEDICT, A.A. Differentiation of *Xanthomonas albilineans* strains with monoclonal antibody reaction patterns and DNA fingerprints. **Plant Pathology**, Oxford, UK, v.46, n.2, p. 358 – 366, 1996.

BIRCH, R.G. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 2, n. 1, p. 1 – 11, 2001.

CANA-DE-AÇÚCAR: *Saccharum híbridas*. Disponível em: <http://www.agrobyte.com.br/cana.htm>. Acesso em 25.jul.2002.

CASAGRANDE, M.V.; SANGUINO, A.; FERREZINI, E. In: **VII Seminário de tecnologia agrônômica**, p. 183-190. 1997. Piracicaba. Evolução, prejuízos e métodos de controle de quatro importantes doenças da cana-de-açúcar. Piracicaba: CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR, 1997.

DAVIS, M.J.; ROTT, P.; WARMUTH, C.J.; CHATENET, M.; BAUDIN, P. Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 3, p. 316 – 324, 1997.

DAVIS, M.J.; ROTT, P.; ASTUA-MONGE, G. Nested, multiplex PCR for detection of both *Clavibacter xyli* and *Xanthomonas albilineans* in sugarcane. **ICPP Paper**, n. 3.3.4, 1998. Disponível em: [//D:win95/3 3/4.html](#). Acesso em 31. jan. 2000.

DAVIS, M.J.; ROTT, P.; DEAN, J.L. Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease**, St. Paul, v.78, n.1, p. 78 – 82, 1994.

DE BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium melilori* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 58v. p. 2180-2187, 1992.

IREY, M.S.; COMSTOCK, J.C. Use of enzyme-linked immunosorbent assay to detect the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, in sugarcane. **Journal American Society Sugarcane Technology**. V.11, p.48-52, 1991.

JAUFEEERALLY – FAKIM, Y.; AUTREY, J.C.; DOOKUN, A.; TOTH, I.K.; DANIELS, M. Genetic identification of the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, in Mauritius using a new set of specific primers. **Sugar Cane International**, Colney, UK, p. 7 – 13, 2000.

LEOVILLE, F.; COLENO, A. Detection de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, agent de léchaudurede la canne a sucre dans des boutures contaminees. **Annuary Phytopathology**. V.8, p.233-236, 1976.

LOPES, S.A. **Xanthomonas albilineans detection, identification and infectivity titration in sugarcane**. Baton Rouge, 1996. 90p. Dissertation (PhD in Plant Health) Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Louisiana State University, Louisiana, 1996.

LOPES, S.A.; DAMANN, K.E.; GRELEN, L.B. Comparison of methods for identification of sugarcane pathogen *Xanthomonas albilineans*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 24, n. 2, p. 114 – 119, 1998.

LOPES, S.A.; DAMANN, K.E.; HOY, J.W.; GRISHAM, M.P. Infectivity titration for assessing resistance to leaf scald among sugarcane cultivars. **Plant disease**, St. Paul, v.85, n. 6, p. 592 – 596, 2001.

LOWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T.; BRUIJN, F.J. de. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* Pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 70, p. 2286 – 2295, 1994.

MARTIN, J.P.; ROBINSON, P.E. Leaf Scald. In: MARTIN, J.P.; ABBOTT, E.V.; HUGHES, C.G. **Sugar cane diseases of the world**. New York: John Wiley, 1961. v.1, cap.111, p.79-108.

MOHAMED, I.S.; ROTT, P.; DAVIS, M.J.; CHATENET, M. Differentiation of *Xanthomonas albilineans* strains based on multiplication of the pathogen in sugarcane varieties. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, 22., 1995. Cartagena. **Proceedings**. Cali:Tecnicaña, 1996. v.2, p. 486 – 492.

PAN, Y.B.; GRISHAM, M.P.; BURNER, D.M. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 2, p. 189 – 194, 1997.

PAN, Y.B.; GRISHAM, M.P.; BURNER, D.M.; LEGENDRE, B.L.; WEI, Q. Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 2, p. 218 - 222, 1999.

RAMALLO, J.; RAMALLO, N.E.V. de; PLOPER, L.D. Diagnóstico de enfermedades de la caña de azúcar: metodologías aplicadas por la EEADAC. **Avance Agroindustrial**, Tucumán, v. 21, n. 1, p. 8 – 12, 2000.

RODRIGUES NETO, J. **Diversidade de *Xanthomonas* patogênicas para plantas.** <http://www.bdt.fat.org.br/bactéria/subprojeto4>. (24 Apr. 2003).

ROTT, P.; DAVIS, M.J. Recent advances in research on variability of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, 22., 1995. Cartajena. **Proceedings**. Cali:Tecnicaña, 1996. v.2, p. 498 – 503.

ROTT, P.; MOHAMED, I.S.; KLETT, P.; SOUPA, D.; SAINT-ALBIN, A. de; FELDMANN, P.; LETOURMY, P. Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization on sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 12, p. 1202 – 1213, 1997.

SAUMTALLY, S.; MÉDAN, H.; AUTREY, L.J.C. Detection, transmission and control of leaf scald of sugarcane caused by *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. In:

INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, 22., 1995. Cartajena. Proceedings. Cali:Tecnicaña, 1996. v.2, p. 477 – 484.

SORDI, R.A **Escaldadura das folhas da cana-de-açúcar: crescimento *in vitro* do agente causal (*Xanthomonas albilineans*), diagnose por planta teste e cura por termoterapia *in vivo* e cultura de ápice meristemático.** 1986. 161 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1986.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F.; CARVALHO, P.C.T.; TOKESHI, H.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.N.; SALGADO, C.L.; KRUGNER, T.L.; CARDOSO, E.J.B.N. E BERGAMIN FILHO (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1980. v.2. cap. 12. p. 141-206.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.;LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research.** Oxford, UK, v.19, p.6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bactéria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology,** New York, v.5, p.25-40, 1994.

WANG, Z.K.; COMSTOCK, J.C.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N.W. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathology,** Oxford, UK, v.48, n.2, p. 245 – 252, 1999.