Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Alterações fisiológicas na cana-de-açúcar causadas pela colonização por *Leifsonia xyli subsp. xyli*

Fernando Henrique Silva Garcia

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2019

Fernando Henrique Silva Garcia
Engenheiro Agrônomo

Alterações fisiológicas na cana-de-açúcar causadas pela colonização por *Leifsonia xyli subsp. Xyli*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO ALFREDO KLUGE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2019

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

Garcia, Fernando Henrique Silva

Alterações fisiológicas na cana-de-açúcar causadas pela colonização por *Leifsonia xyli subsp. xyli* / Fernando Henrique Silva Garcia. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

107 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Raquitismo das soqueiras 2. Metabolismo de carbono 3. Nutrição de plantas 4. Interação planta-patógeno I. Título

Dedico ao meu Deus em nome do seu filho amado Jesus Cristo que me concedeu forças para concluir essa tese e aos meus pais pelo apoio e educação fundamental para ter alcançado essa formação.

AGRADECIMENTOS

Aproveito a oportunidade para fazer estes agradecimentos a todos envolvidos na minha jornada no doutorado, sem os quais esta tese de forma alguma haveria sido elaborada.

A Deus em nome do seu filho amado Cristo Jesus, que me fortaleceu em todos os momentos durante a realização do doutorado. Abrindo portas e fechando portas. Fazendo de todas as circunstâncias favoráveis e desfavoráveis, se tornassem bênçãos na minha jornada, porque pude ver que todas as coisas cooperaram para o meu próprio bem.

Aos meus pais Eneida Garcia e Lucas Garcia, fonte de minha inspiração e exemplo que me apoiaram ao longo de toda essa jornada acadêmica. Aos meus irmãos, Hudson e Layse por todo incentivo dado.

Ao meu orientador Dr. Ricardo Alfredo Kluge pelo apoio dado para realização desta tese. Ao co-orientador Dr. Luís Eduardo Aranha por haver me acolhido em seu laboratório como um “filho bastardo”, concedendo a grande oportunidade e privilégio de poder trabalhar em seu laboratório para estudar este enigma, a bactéria *Leifsonia xyli subsp. xyli*.

Ao Dr. Lázaro Perez coordenador do Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, por ter me ajudado com exortações e conselhos, fazendo-me amadurecer ao longo deste doutorado. Além do Dr. Daniel Scherer de Moura pela oportunidade de haver trabalhado em seu laboratório, onde pude aprender com seus ensinamentos.

Aos Professores Dr. Paulo Mazzafera, Dr. Ricardo Antunes Azeves, Dr. José Lavres, Dr. Rafael Vasconcelos, Dr. Ângelo Jacomino, Sergio Florentino Pascholati, Dr Marcílio de Almeida, Dr. Paulo Castro, Dra. Lílian de Amorin e Dr. Alisdair Fernie por haverem concedido seus laboratórios e equipamentos para as análises desta tese.

Aos meus amigos Alex Velasquez, Samuel de Paula, Gabriel, Jacson Ferreira, Dra. Marina de Lima Nogueira e Angélica Argotte que muito me auxiliaram na condução desta pesquisa, em especial Iriz Costa Felippe e Dr. Adilson Pereira Domingues Júnior.

A Dra. Mariana Cicarelli Cia, Raphael Severo e Dra. Marie Laborde pelos ensinamentos e pela paciência em esclarecer minhas dúvidas referente as atividades no laboratório.

Os aliviadores de carga dos doutorandos e mestrandos, os técnicos de laboratório e funcionários da ESALQ, que não medem esforços para facilitar as atividades de pesquisa. Procurarei citar cada nome aqui, peço perdão caso não tenha citado a todos. Os técnicos Pedro Conceição Arthuso, Gilmar Batista Grigolon, Antonio Agostinho Gozzo, Antonio Francisco de Campos Amaral, Marcos José Trevisan, Arthur Roberto Silva, Nivanda Maria de Moura Ruiz, Edson Ademir de Moraes, Maria Heloisa Duarte de Moraes, Renato Barbosa Salaroli, Silvia de Afonseca Lourenço, Edson Ademir de Moraes, Clayton Coratito, Aparecido Donizete Serrano; em especial Cleusa Pereira Cabral, Salete Aparecida Gaziola e as bibliotecárias Eliana Maria Garcia e Thais Cristiane Campos de Moraes.

Aos pastores Natanael Camargo e Ruth Camargo pelo aconselhamento, correção, exortação e exemplo de vida, ajudando-me a fortalecer minha fé ao longo destes quatro anos.

Aos irmãos da igreja Assembleia de Deus Bereana, pelo acolhimento como membro de sua família. Aos irmãos do grupo de oração Aliança Bíblica Universitária do Brasil (ABU-ESALQ), pela amizade e apoio ao longo deste doutorado.

Aos companheiros e amigos do futebol, pela amizade, respeito e pelos momentos descontraídos que passamos.

Aos meus amigos e companheiros de república Danilo Lyra, Filipi Inácio, Caio Barbosa, Camilo e Pedro pela convivência e amizade.

Às agências de fomento CAPES e CNPQ pela concessão da bolsa para realização do doutorado.
Reforço que todo este trabalho é fruto da cooperação de todas estas pessoas, sem as quais não haveria concretizado este trabalho.

Porque quem é Deus senão o Senhor? E quem é rochedo senão o nosso Deus? Deus é o que me cinge de força e aperfeiçoa o meu caminho. Faz os meus pés como os das cervas, e põe-me nas minhas alturas. Ensina as minhas mãos para a guerra, de sorte que os meus braços quebraram um arco de cobre. Também me deste o escudo da tua salvação; a tua mão direita me susteve, e a tua mansidão me engrandeceu. Alargaste os meus passos debaixo de mim, de maneira que os meus artelhos não vacilaram.

Salmos 18:31-36

SUMÁRIO

RESUMO 10
ABSTRACT 11
1. COLONIZAÇÃO DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* AUMENTA DEMANDA HÍDRICA NA CANA-DE-AÇÚCAR. 13
RESUMO 13
ABSTRACT 13
1.1. INTRODUÇÃO 14
1.2. MATERIAL E MÉTODOS 16
1.2.1. CONDIÇÃO DE CRESCIMENTO 16
1.2.2. QUANTIFICAÇÃO DA BACTÉRIA 17
1.2.3. CARACTERÍSTICAS DO SOLO E MANEJO DE IRRIGAÇÃO 17
1.2.4. ESTADO HÍDRICO DA PLANTA 18
1.2.5. TROCAS GASOSAS E TEOR DE CLOROFILA 18
1.2.6. QUANTIFICAÇÃO AMINOÁCIDOS E PROLINA 18
1.2.7. DETERMINAÇÃO DE MDA E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2).. 19
1.3. RESULTADOS 20
1.3.1. QUANTIFICAÇÃO DO TÍTULO BACTERIANO 20
1.3.2. DISPONIBILIDADE DE ÁGUA NOS VASOS 20
1.3.3. TEOR RELATIVO DE ÁGUA E CONTEÚDO DE CLOROFILA. 20
1.3.4. TROCAS GASOSAS 21
1.3.5. COMPOSTOS OSMOPROTETORES 22
1.3.6. FORMAÇÃO H_2O_2 E MDA 23
1.4. DISCUSSÃO 24
1.4.1. *Leifsonia xyli subsp. xyli* PODE AUMENTAR O ESTADO DE ESTRESSE HÍDRICO NA PLANTA? 26
REFERÊNCIAS 26
2. RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS AFETA O PARTICIONAMENTO DE CARBONO EM CANA-DE-AÇÚCAR POR INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE ÓRGÃOS DRENOS 39
RESUMO 39

ABSTRACT 39
2.1. INTRODUÇÃO 40
2.2. METODOLOGIA 41
2.2.1. CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO 41
2.2.2. CRESCIMENTO DA PLANTA E PRODUÇÃO DE BIOMASSA 42
2.2.3. ÁREA FOLIAR, PIGMENTOS E DENSIDADE ESTOMÁTICA 42
2.2.4. TROCAS GASOSAS 42
2.2.5. QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES 43
2.2.6. ATIVIDADE DE INVERTASE 43
2.2.7. ANÁLISE ANATÔMICA 43
2.2.8. QUANTIFICAÇÃO ETILENO 44
2.2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA 44
2.3. RESULTADOS 44
2.4. DISCUSSÃO 46
2.4.1. RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS AFETA PARTIONAMENTO DE CARBONO NA CANA-DE-AÇÚCAR 48
2.5. CONCLUSÕES 50
REFERÊNCIAS 50
3. CRESCIMENTO DO TÍTULO BACTERIANO DE *Leifsnonia xyli subsp. xyli* NA CANA-DE-AÇÚCAR AUMENTA A ABSORÇÃO DE S E REDUZ A ABSORÇÃO DE MOLIBDÊNIO. 67
RESUMO 66
ABSTRACT 66
3.1. INTRODUÇÃO 67
3.2. MATERIAL E MÉTODOS 69
3.2.1. EXPERIMENTO I 69
3.2.2. EXPERIMENTO II 70
3.2.3. EXPERIMENTO III 70
3.2.3.1. ANÁLISE AGRONÔMICA 71
3.2.3.2. TROCAS GASOSAS E ÍNDICE DE CLOROFILA 72
3.2.3.3. DETERMINAÇÃO MDA E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2) 72
3.2.3.4. DETERMINAÇÃO MACRONUTRIENTES E MICRONUTRIENTES 72

3.2.3.5. QUANTIFICAÇÃO DOS FENÓLICOS 73
3.2.3.6. METABOLÔMICA 73
3.2.3.7. QUANTIFICAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA E GLUTATIONA OXIDADA 74
3.2.3.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA 74
3.2.3.9. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS 74
3.3. RESULTADOS 75
3.3.1. EXPERIMENTO I 75
3.3.2. EXPERIMENTO II 76
3.3.3. EXPERIMENTO III 77
3.4. DISCUSSÃO 78
3.4.1. ALTERAÇÕES METABÓLICAS DA PLANTA EM FUNÇÃO DO CRESCIMENTO DO TÍTULO BACTERIANO 81
3.4.2. AUMENTO CRESCIMENTO BACTERIANO ALTERA O METABOLISMO PRIMÁRIO NA FOLHA E NO COLMO 81
3.4.3. PUTRESCINA, PODE SER UM SINAL METABÓLITO PARA AUMENTO DO TÍTULO BACTERIANO NA CANA-DE-AÇÚCAR? 84
3.5. CONCLUSÃO 84
REFERÊNCIAS 85
4. CONCLUSÕES GERAIS 107

RESUMO

Alterações fisiológicas na cana-de-açúcar causadas pela colonização por *Leifsonia xyli subsp. xyli*

A doença do Raquitismo das Soqueiras (RS) é uma doença na cana-de-açúcar cujo agente causal é uma bactéria patogênica denominada *Leifsonia xyli subsp. xyli*. O patógeno se estabelece e coloniza os feixes vasculares do xilema podendo ser também encontrado nas células da bainha e do mesofilo da folha ao longo do desenvolvimento da doença na planta. Com ausência de sintomas específicos, o principal dano ocorre na produtividade, onde as plantas doentes apresentam menor formação e crescimento dos colmos. O impacto da doença no campo está diretamente associado com o crescimento do título bacteriano, que desencadeia alterações fisiológicas na planta. Contudo, a doença ainda é um enigma, faltando esclarecimentos sobre como a doença afeta a produtividade na cana-de-açúcar ou como a doença induz o estado de déficit hídrico ou se os sintomas da doença estão associados a um desbalanço nutricional na planta. Nesta tese, nós buscamos responder essas hipóteses, procurando entender melhor a doença a partir do estudo da fisiologia da planta. Ao longo dos capítulos estudados, nós verificamos no capítulo 1, que a colonização da bactéria não leva as plantas ao estado de déficit hídrico hídrica. No capítulo 2 nós evidenciamos que RS afeta a produtividade da cana-de açúcar por alterar seu desenvolvimento e o particionamento de carbono na planta. A cana-de-açúcar com alto título de *Lxx* exibiu acúmulou mais açúcar no colmo principal em detrimento da menor formação de orgãos drenos, devido a menor formação de perfilhos. No capítulo 3, nós mostramos que os sintomas da RS também estão associados a um desbalanço nutricional na planta. As plantas com RS apresentaram um aumento na absorção de enxofre (S), magnésio e cálcio. O aumento da absorção de S, foi acompanhando com a menor absorção de molibdênio pela raiz. Desta forma, sintomas de RS podem estar associados ao aumento na absorção de S levar a deficiência molibdênio ao longo do desenvolvimento da planta. Portanto, a partir desta investigação, foi descoberto que RS aumenta a demanda hídrica na planta. Além disso, que o crescimento do título bacteriano na cana-de-açúcar altera o particionamento de carbono e o estado nutricional da planta.

Palavras-chave: Raquitismo das soqueiras, Metabolismo de carbono, Nutrição de plantas, Interação planta-patógeno

ABSTRACT

Physiological changes in sugar cane caused by colonization *Leifsonia xyli subsp. xyli*

Ratoon stunting disease (RS) is a sugarcane disease whose causative agent is a pathogenic bacterium called *Leifsonia xyli subsp. xyli* The pathogen establishes and colonizes xylem vascular bundles and can also be found in leaf sheath and mesophyll cells throughout the disease development in the plant. The disease not have specific symptoms, the main damage occurs in yield, where diseased plants have less tillers formation and growth. The impact of the disease on the field is directly associated with the growth of bacterial titers, which triggers physiological changes in the plant. However, the disease is still an enigma, lacking clarification as to how the disease affects sugarcane productivity or the disease induces water deficit or whether the symptoms of the disease are associated with nutritional imbalance in the plant. In this thesis, we seek to answer these hypotheses, seeking to better understand the disease from the study of plant physiology. Throughout the chapters studied, we found in chapter 1 that the colonization of the bacteria does not lead the plants to the state of water deficit. In chapter 2 we show that RS affects sugarcane productivity by altering its development and carbon partitioning in the plant. The sugarcane with high *Lxx* titers exhibited accumulated more sugar in the main stalk in function of the lower formation sinks due to the lower formation of tillers. In Chapter 3, we show that RS symptoms are also associated with a nutritional imbalance in the plant. Plants with RS showed an increase in sulfur (S), magnesium and calcium absorption. Increased absorption of S was accompanied by lower absorption of molybdenum from the root. Thus, symptoms of RS may be associated with increased absorption of S leading to molybdenum deficiency throughout plant development. Therefore, from this investigation, it was found that RS increases the water demand in the plant. In addition, the growth of bacterial titer in sugarcane alters the carbon partitioning and nutritional status of the plant.

Keywords: Ratoon stunting disease, Carbon metabolism, Plant nutrition, Plant-pathogen interaction

1. COLONIZAÇÃO DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* AUMENTA DEMANDA HÍDRICA NA CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

Leifsonia xyli subsp. xyli (*Lxx*) é uma bactéria patogênica que causa o raquitismo das soqueiras (RS). A bactéria coloniza os feixes vasculares do xilema, as células do mesofilo e da bainha da folha. Os sintomas da doença são redução perfilhamento, comprimento dos colmos e comprimento dos entrenós, sintoma semelhante a cana-de-açúcar quando submetida ao déficit hídrico. Desta forma hipótese deste estudo consistiu em verificar se as plantas colonizadas com *Lxx* são mais sensíveis quando submetidas a uma menor lâmina de irrigação. O experimento foi feito com dois genótipos de cana-de-açúcar SP 803280 e CB49260 inoculado e não inoculados (Mock) com *Lxx* submetidas a duas condições hídricas: irrigação (100% irrigação) e déficit hídrico (50% irrigação), avaliando a resposta da planta a partir de dados fisiológicos. Observou-se que a colonização da bactéria na planta elevou a demanda hídrica, verificada pela redução da água disponível no vaso (CAD) entre os genótipos de cana-de-açúcar. No entanto, as plantas inoculadas com *Lxx* não alteraram o teor relativo de água (TRA) na folha em função dos tratamentos hídrico impostos. Os genótipos de cana-de-açúcar sob déficit hídrico diminuíram os parâmetros de fotossíntese, teor relativo de água e aumentaram a produção de aminoácidos e prolina na folha. Nós observamos que as plantas do genótipo SP 803280 inoculado com *Lxx*, foram mais susceptíveis ao déficit hídrico, verificado pelo aumento na produção de malonoaldeído (MDA). Este estudo mostrou que a doença aumentou a demanda hídrica na cana-de-açúcar, porém não alterou o estado hídrico de ambos os genótipos de cana-de-açúcar. Este estudo é mais uma evidência que os sintomas de RS não estão associados à doença ocasionar déficit hídrico na planta.

Palavras-chave: Ratoon Stunting Disease, Estresse hídrico, Irrigação, Estresse múltiplo, Aminoácidos, *Sacharrum ssp.*

Abstract

Leifsonia xyli subsp. xyli (Lxx) is a pathogenic bacterium that causes Ratoon stunting disease (RS). The bacterium colonizes the xylem vascular bundles, the mesophyll and sheath cells leaf. Symptoms of the disease are reduced tillering, stem length and internode length, a symptom similar to sugarcane when subjected to water deficit. Thus hypothesis of this study consisted in verifying if the plants colonized with *Lxx* are more sensitive when submitted to a smaller irrigation depth. The experiment was carried out with two SP 803280 and CB49260 sugarcane genotypes inoculated and not inoculated (Mock) with *Lxx* submitted to two water conditions: irrigation (100% irrigation) and water deficit (50% irrigation), evaluating the response. of the plant from physiological data. The colonization of the bacteria in the plant increased the water demand, verified by the reduction of the available water in the pot (CAD) among the sugarcane genotypes. However, plants inoculated with *Lxx* did not change the relative water content (TRA) in the leaf as a function of the water treatments imposed. Sugarcane genotypes under water deficit decreased photosynthesis parameters, relative water content and increased leaf amino acid and proline production. We observed that plants of genotype SP 803280 inoculated with *Lxx* were more susceptible to water deficit, verified by the increase in malonoaldehyde (MDA) production. This study showed that the disease increased water demand in sugarcane, but did not change the water status of both sugarcane genotypes.

This study is further evidence that symptoms of RS are not associated with disease causing water deficit in the plant.

Keywords: Ratoon Stunting Disease, Water stress, Irrigation, Multiple stress, Amino acids, *Sacharrum ssp.*

1.1 INTRODUÇÃO

Diversos países no mundo estão adotando políticas de redução na emissão dos gases de efeito estufa, objetivando minimizar o aquecimento global e variação do clima no planeta. Após o acordo de Paris, o Brasil se comprometeu a reduzir a emissão de gases do efeito estufa em 43% até 2030 (NDC BRASIL, 2015). A utilização de energia limpa é uma das estratégias adotadas pelo Brasil para reduzir a emissão destes poluentes, feito a partir do aumento da participação do biocombustível na sua matriz energética. A cana-de-açúcar é a principal cultura utilizada para produção de etanol como biocombustível e seu uso nos veículos automotores promoveu uma economia de 27,5 toneladas de CO_2 (MACEDO, 2007).

O Brasil é o principal produtor de cana-de-açúcar no mundo, sendo o Estado de São Paulo o maior produtor com 52% da área de plantio (CONAB, 2018). A cana-de-açúcar colhida no campo é destinada à indústria para produção de etanol e açúcar. A produção de etanol é destinada ao abastecimento no mercado interno para uso como biocombustível, enquanto o açúcar é comercializado no mercado interno e externo. A expansão no plantio da cana-de-açúcar causou a preocupação dos órgãos ambientais, devido sua expansão poder ser realizada em áreas florestais ou em substituição aos cultivos agrícola, para produção de biocombustível (ALTIERI; BRAVO, 2007). Contudo, a expansão da cana-de-açúcar não ocorreu em áreas florestais e tampouco em substituição a culturas produtoras de alimentos, mas em solos degradados que antes estavam ocupados pela pastagem (Bordonal et al. 2018). Apesar do aumento na área de plantio, foi registrado uma redução de 3,7% na a produção anual de cana-de-açúcar (CONAB, 2018).

Em condições de campo, a cana-de-açúcar está exposta a vários fatores adversos que podem limitar sua produção, como a incidência de doenças. Raquitismo das soqueiras (RS) é uma doença causada pela bactéria *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx) que pode reduzir a produtividade da cana-de-açúcar em até 26%, resultando em prejuízo econômico que podem alcançar em até US $ 1.000 t ha^{-1} ano^{-1} (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004; URASHIMA et al., 2017). A doença altera o desenvolvimento da planta, havendo um menor crescimento e formação dos colmos (BAILEY; BECHET, 1995, 1997). No campo, a doença é disseminada

durante a colheita e pela utilização de material infectado como plantio no campo. O único método de controle utilizado nos cultivos é o tratamento térmico dos toletes, feito pela imersão dos toletes em água quente (50-52°C) por 30 minutos (BENDA et al. 1977; CARVALHO et al., 2016). Todavia, o tratamento térmico não elimina o patógeno no material de plantio, servindo apenas para reduzir o título bacteriano nos toletes em até 50% (QUECINE et al., 2016). A presença da bactéria nos genótipos de cana-de-açúcar no mundo (URASHIMA et al., 2017), pode ser devido essa bactéria ser um organismo endofítico na cana-de-açúcar, que estabeleceu-se nos genótipos comerciais a partir da disseminação de material de plantio resultante da hibridização interespecífica entre *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum* (YOUNG, 2016).

Leifsonia xyli subsp. xyli é uma bactéria gram-positiva e fastidiosa, que coloniza o lúmen dos feixes vasculares do xilema da planta, podendo se espalhar para o mesofilo e bainha na folha (EVTUSHENKO et al., 2000; QUECINE et al., 2016; WEAVER; TEAKLE; HAYWARD, 1977). O genoma da bactéria se caracteriza por conter poucos genes de patogenicidade, além de ausência de enzimas de biossíntese de aminoácidos, de modo que sua sobrevivência é dependente da aquisição destes compostos orgânicos pela planta (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). A severidade da doença está diretamente associada com o título bacteriano (Davis et al., 1988), e o sintomas da doença se manifestam quando as plantas alcançam um alto título bacteriano, que induzem alterações fisiológicas na planta, modificando seu desenvolvimento (DAVIS; DEAN; HARRISON, 1988; MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

Os sintomas da doença estão associados a um desbalanço hormonal (Zhang et al., 2016). Plantas com RS apresentaram um aumento na biossíntese de ácido abscísico (ABA) e redução na biossíntese auxina e giberelina no colmo quando comparadas as plantas sadias. O aumento na concentração de ABA provavelmente reflete o aumento na expressão do seu gene de biossíntese (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2018). Não está claro se o aumento do nível de ABA no colmo é causado pela bactéria agir diretamente na planta através da secreção de compostos tóxicos ou indiretamente por induzir o déficit hídrico. Pois, a colonização da bactéria os feixes vasculares do xilema, pode induzir a planta a sintetizar compostos de defesa que obstruem os vasos do xilema, para evitar a mobilidade da bactéria na planta (TEAKLE; APPLETON; STEINDL, 1978; WEAVER; TEAKLE; HAYWARD, 1977). Em suporte a esta hipótese, os sintomas de RS se tornam mais evidentes quando as plantas estão submetidas a condições de déficit hídrico (Steindly e Hugles, 1953). No entanto, não há evidências que a colonização de *Lxx* reduza o estado hídrico na planta. Assim, o objetivo deste estudo foi

verificar se a colonização da bactéria torna os genótipos de cana-de-açúcar mais susceptíveis ao déficit hídrico. Observou-se que as plantas inoculadas com *Lxx* aumentaram a demanda hídrica da planta, intensificando o déficit hídrico a partir do aumento na formação de MDA nas plantas. Contudo a colonização de *Lxx* na planta não reduziu estado hídrico da planta independente do tratamento hídrico.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 CONDIÇÃO DE CRESCIMENTO

O estudo foi conduzido com genótipos de cana-de-açúcar CB 49260 e SP 803280 em casa de vegetação com controle de temperatura. Os genótipos de cana-de-açúcar foram retirados de matrizes cultivadas em casa de vegetação, onde os colmos foram cortados e plantados em mini-toletes com uma gema em recipientes de 0,5 L com substrato (Basaplant). Quarenta e seis dias após o plantio, as plantas foram transferidas para vasos de 22 L (algura 29 cm e diâmetro 34 cm) . Os vasos foram preenchidos com Neossolo vermelho distroférrico e adubados com 50 g de calcário dolomítico (4,5 t ha^{-1}) e 16,5 g NPK do fertilizante 10-10-10 (60-150-100 kg ha^{-1}). Cinco dias após o transplante, as plantas foram inoculadas com meio contendo cepa da bactéria *Lxx* CTCB07 a partir do corte do ápice do colmo e as plantas não inoculadas (Mock) com meio salino sem a bactéria (MONTEIRO-VITORELLO et al. 2004). Após a inoculação da planta, foram removidos os perfilhos em cada genótipo, deixando apenas o colmo principal inoculado com a bactéria onde procedeu-se as avaliações fisiológicas. Cada genótipo foi avaliado separadamente a partir da imposição do déficit hídrico totalizando 4 tratamentos para cada genótipo. O experimento foi conduzido por delineamento inteiramente casualizadob no esquema fatorial 1 x 2 x 2 genótipo x déficit hídrico x plantas inoculadas com bactéria, , sendo analisados os genótipos separadamente em função do tratamento hídrico e da colonização da bactéria. Os tratamentos consistiram em dois genótipos inoculados (CBLI e SPLI) e Mock mantidas sob duas condições hídricas: irrigado (100% Capacidade de Campo) e déficit hídrico (50% capacidade de Campo). Desta forma os tratamentos com genótipo CB 49260 foram divididos: CB 49260 Mock irrigado (CBI), CB 49260 inoculado com *Lxx* irrigado (CBLI), CB 49260 Mock submetido ao déficit hídrico (CBDH) e CB 49260 inoculado com *Lxx* submetido ao déficit hídrico (CBLDH). Já os tratamentos do genótipo SP803280 consistiram: SP 803280 Mock irrigado (SPI), CB SP803280 inoculado com *Lxx* irrigado (SPLI), SP 803280 Mock submetido ao déficit hídrico (SPDH) e SP 803280 inoculado com *Lxx* submetido ao déficit

hídrico (SPLDH). A imposição dos tratamentos hídricos ocorreram 105 dias após a inoculação da bactéria, sendo as avaliações fisiológicas realizadas em três tempos 113, 121 e 128. Em cada avaliação fisiológica foram realizadas com três repetições para cada tratamento.

1.2.2 QUANTIFICAÇÃO DA BACTÉRIA

A quantificação do título bacteriano nas plantas de cana-de-açúcar foi realizada 150 dias após a inoculação da bactéria extraindo a seiva do xilema nos entrenós iniciais do colmo. A quantificação foi realizada por qPCR (CIA et al., 2018; QUECINE et al., 2016).

1.2.3 CARACTERÍSTICAS DO SOLO E MANEJO DE IRRIGAÇÃO

Os níveis de irrigação foram definidos como 100% (tratamento sem déficit hídrico) e 50% da capacidade de campo (tratamento com moderado déficit hídrico) calculado a partir da capacidade máxima de retenção de água no solo (θ com base na umidade do solo de -4,85 kPa). O déficit hídrico moderado foi obtido regando as plantas com 50% da capacidade de campo em relação ao controle (CBI e SPI). A aplicação da lâmina de irrigação baseou-se nos valores médios de tensão de água no solo obtidos por tensiômetros instalados para cada genótipo de cana-de-açúcar. Estes tensiômetros foram instalados a 0-0,1 m de profundidade (100% da ETc). Os tensiômetros foram equipados com um transdutor eletrônico de pressão acoplado a um registrador de dados. Isso permitiu o monitoramento em tempo real da pressão da água no solo. O cálculo da lâmina de irrigação foi realizado a cada 2 dias com base na equação da curva de retenção de umidade do solo ajustada neste experimento. Após as leituras de tensão, os valores coletados foram transformados no potencial matricial do solo (Ψm) (equação 1) e, em seguida foi feita a estimativa de umidade de acordo com modelo proposto por (VAN GENUCHTEN, 1980) (equação 2)

$$\psi_m = L_t - h_c \qquad \text{(eq. 1)}$$

(Ψm) - potencial matricial do solo (kPa); Leitura do tensiômetro ou tensão da água no solo (kPa); hc- pressão equivalente à altura da coluna de água no tensiômetro (kPa);

(eq. 2)

$$\theta = \theta_r + \frac{(\theta_s - \theta_r)}{[1+(\alpha|\Psi_m|)^n]^m}$$

θ (Ψm) - umidade volumétrica em função do potencial matricial, em m^3 m^{-3}; θr - umidade volumétrica residual do solo, em m^3 m^{-3}; θs - umidade volumétrica do solo saturado, em m^3 m^{-3}; m e n - parâmetros de regressão da equação, adimensional; α - parâmetro com dimensão igual ao inverso da tensão, em kPa^{-1}; e Ψm - potencial matricial, em kPa.

1.2.4 ESTADO HÍDRICO DA PLANTA

O estado hídrico da planta foi mensurado através do teor relativo de água (TRA) na folha +2. As folhas foram coletadas às 5:00 da manhã e colocadas em caixa de gelo para evitar a desidratação. As amostras frescas foram pesadas em balança de precisão para determinação da massa fresca e em seguida as amostras foliares foram colocadas em água destilada sob temperatura de 4ºC no escuro, que após 24 horas foram pesadas para determinação da massa túrgida. A massa seca foi obtida pela secagem em estufa a 37ºC durante três dias. O teor relativo de água na folha foi determinado segundo a equação:

TRA% = (massa fresca - massa seca) / (massa túrgida – massa seca).

1.2.5 TROCAS GASOSAS E TEOR DE CLOROFILA

As trocas gasosas foram medidas na folha +1 usando um analisador de gás infravermelho (IRGA-6400, LI-COR, Lincoln NE, EUA). As plantas foram avaliadas entre 8:30 e 12:00h utilizando 400 µmol mol^{-1} CO_2 com intensidade de luz 1000 µmol m^{-2} s^{-1}, temperatura de bloco 30°C, para os seguintes parâmetros fisiológicos: condutância estomática (*gs*), assimilação de CO_2 (*A*); taxa de transpiração (*E*), concentração interna de CO_2 na folha (*Ci*). O índice de clorofila foi determinado na mesma folha utilizando o medidor Soil Plant Analysis Development (SPAD-502, Minolta, Japão).

1.2.6 QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS E PROLINA

A quantificação de aminoácidos e prolina foram realizadas na folha +1 coletadas entre 10:00 e 11:30 horas. A extração dos aminoácidos foi feita com solvente metanol/ clorofórmio/água (12: 5: 3 v/v). As amostras foram incubadas à temperatura de 4ºC ao longo de todo período noturno conforme descrito (BIELESKI; TURNER, 1966). O homogeneizado foi então centrifugado a 10000 g 4ºC por 20 min e os sobrenadantes foram transferidos para outro *eppendorf*, adicionando 250 µL de clorofórmio e 375 µL de água pura. As amostras foram novamente centrifugadas a 10000 g 4ºC por 20 min e o sobrenadante coletado foi incubado a 38ºC por uma hora. Por fim, foram colocadas 100 uL de amostras em tubos de ensaio com 0,2 mL de nihindrina, 1 mL de cianeto de potássio 0,0001M (KCN) e 0,5 mL de citrato incubado a 95ºC por 20 minutos. Após a incubação adicionou-se 1,3 mL de etanol 60%, sendo em seguida as amostras analisadas em espectrofotômetro de 490 nm. A quantificação de aminoácidos foi determinada por curva padrão (0-400 µmol de Leucina). A quantificação de prolina foi feita de acordo (BATES; R.P.; I.D., 1973). Os procedimentos da análise de prolina foram realizadas conforme descrito por (CIA et al., 2012).

1.2.7 DETERMINAÇÃO DE MDA E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2)

A determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio foi realizada conforme descrito por (ALEXIEVA et al., 2001). Foi macerado 0,2 g tecido foliar (folha +1) com 2 mL de 0,1% (v/v) ácido tricloroacético (TCA), contendo aproximadamente 20% de Polivinilpolipirrolidona (PVPP). Após homogeneização, o extrato foi transferido para *eppendorf* (2 mL) e centrifugado a 13000 *g* por 10 minutos a 4 ºC. Foi adicionado uma alíquota de 0,2 mL do sobrenadante, 0,2 mL de tampão de fosfato de potássio (100 mM, pH 7,5) e 0,8 mL de 1M KI (w/v) em um *eppendorf* para cada amostra em duplicatas. Em seguida foi deixado em incubação por 1 h no escuro e em temperatura ambiente. Após o período de incubação procedeu-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 390 nm.

A avaliação da peroxidação lipídica foi conduzida segundo (HEATH; PACKER, 1968), utilizando 0,2 g (200 mg) de material vegetal fresco (parte aérea ou raiz) macerado em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA - 0,1%), contendo aproximadamente 20% de PVPP. Após homogeneização, o material foi transferido todo para *eppendorf* e centrifugado a 13000 *g* (≡ 10.000 RPM) por 10 minutos a 4ºC. Em seguida, foi adicionado 1 mL de TCA (20%, contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico) em 0,250 mL (250 uL) do sobrenadante , sendo incubado a 95 ºC por 30 minutos. Em seguida cada amostra foi resfriada em gelo e deixadas no escuro por 15 minutos em temperatura ambiente. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 532 e 600

nm. Sabendo que ε= 155 mM^{-1} cm^{-1}, as determinações das concentrações de MDA foram realizadas através da fórmula: ABS (532-600)/ε155= **X** (em mM/L); X/1000 = X em mM/mL.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 QUANTIFICAÇÃO DO TÍTULO BACTERIANO

Nos tratamentos Mock não foram detectadas *Lxx* nas plantas nas duas condições hídricas impostas entre ambos genótipos (CBI, CBDH e SPI e SPDH) (Figura 1). Já nos tratamentos inoculados com a bactéria, foram detectadas a presença da bactéria nas plantas. As plantas CB 49260 inoculada com *Lxx* não exibiram diferença no título bacteriano em função do tratamento hídrico, já as plantas RB 803280 apresentaram menor título bacteriano quando submetidas ao déficit hídrico (SPLDH) ($p<0,05$).

1.3.2 DISPONIBILIDADE DE ÁGUA NOS VASOS

A capacidade de água disponível (CAD) nos vasos decresceu nas plantas inoculada com *Lxx* e em função do déficit hídrico ($p<0,05$). As plantas CB49260 inoculadas com bactéria (CBLI) obtiveram uma maior absorção de água em relação ao Mock quando submetidas a irrigação, verificado pela menor capacidade de água disponível nos vasos. Não foram observadas diferenças na CAD nos tratamentos sob déficit hídrico (FIGURA 2). Contudo, o genótipo RB 803280 inoculada com *Lxx* submetido déficit hídrico (SPLDH) exibiu menor CAD que o Mock apenas no primeiro tempo de avaliação (SPDH).

1.3.3 TEOR RELATIVO DE ÁGUA E CONTEÚDO DE CLOROFILA.

O teor relativo de água (TRA) foi inferior ($p<0,05$) nas plantas submetidas ao déficit hídrico, não havendo diferença em função da colonização da bactéria nos genótipos de cana-de-açúcar (Figura 2). O teor de clorofila foliar foi inferior nas plantas CB 49260 e SP803280 submetidas ao déficit hídrico ($p<0,05$). As plantas (CBDH) decresceram em 14% o teor de clorofila foliar em comparação às plantas submetidas à irrigação. Sob condições de déficit hídrico, as plantas inoculadas com a bactéria (CBLDH) apresentaram uma redução de 27% no teor de clorofila quando comparadas com o Mock. Esta análise mostrou que a presença da

bactéria nos genótipos de cana-de-açúcar não reduziram o estado hídrico e a degradação de clorofila foliar nas duas condições hídricas impostas em ambos os genótipos analisados.

1.3.4 TROCAS GASOSAS

As trocas gasosas nas plantas CB 49260 apresentam redução nas plantas submetidas ao déficit hídrico e pela inoculação com a bactéria (Figura 3). Na primeira avaliação, as plantas inoculadas com a bactéria submetidas a irrigação decresceram 43% *A* em relação ao Mock. No entanto, sob déficit hídrico as plantas inoculadas não diferiram do Mock. Na segunda e terceira avaliação, as plantas CB 49260 sob déficit hídrico apresentaram reduções de 44 e 75% em relação ao Mock, respectivamente. Plantas CB 49260 inoculadas com *Lxx* sob déficit hídrico diminuíram 71% e 85% *A* em relação às plantas sem Mock irrigado (Figura 4). Plantas inoculadas com *Lxx* exibiram menor condutância estomática (*gs*) no primeiro tempo de avaliação, sendo inferior nas plantas irrigadas (<0,05). As plantas inoculadas com *Lxx* submetidas ao déficit hídrico não apresentaram diferença ao Mock na mesma condição. Na segunda avaliação *gs* foi inferior apenas em função da imposição do déficit hídrico. No terceiro tempo, não foram observadas diferenças entre os tratamentos. O carbono interno (*Ci*) apresentou diferença no tratamentos hídrico nas plantas inoculadas com a bactéria a partir da terceira avaliação (p<0,05). As plantas CB 49260 inoculadas com *Lxx* irrigadas apresentaram menor *Ci* que as plantas inoculadas com *Lxx* sob deficiência hídrica. A taxa de transpiração (*E*) mostrou diferença nos tratamentos apenas na primeira e na segunda avaliação. Na primeira avaliação, a presença *Lxx* reduziu em 53% *E* nas plantas CB 49260 submetidas a irrigação quando comparadas ao Mock. Já as plantas Mock submetidas ao déficit hídrico reduziram a *E* em 65% em relação ao Mock irrigado (p<0,05). Na segunda avaliação, *E* diferiu apenas em função do tratamento hídrico. Em geral, plantas sob déficit hídrico apresentaram menor *E* que plantas sob irrigação.

Os resultados dos parâmetros de troca gasosa no genótipo da cana-de-açúcar SP 803280 mostraram diferença apenas na função do tratamento hídrico (p<0,05) em todos os tempos avaliados (Figura 4). Não houveram alterações nas trocas gasosas nas plantas inoculadas com *Lxx*. Observamos redução de de 46, 70 e 79% no valor de *A* no Mock sob déficit hídrico (SPDH) em relação ao Mock irrigado (SPI). Plantas inoculadas com *Lxx* sob déficit hídrico (SPLDH) apresentaram redução 37, 68 e 88% *A* em relação às plantas inoculadas com *Lxx* irrigadas (SPLI) Os resultados *gs* mostraram o mesmo padrão observado em *A*. O genótipo da cana-de-açúcar SP 803280 reduziu *gs* sob condição de déficit hídrico (<0,05). A presença

Lxx na planta SP 803280 não alterou o valor de *gs* em função da imposição do tratamento hídrico. Sob condições de déficit hídrico *gs* reduziu em 44, 66 e 61% na primeira, segunda e terceira avaliação quando comparados ao controle. O *Ci*, apresentou alteração nas plantas apenas na primeira avaliação em função do déficit hídrico. Em geral, as plantas SP 803280 irrigadas apresentaram maior *Ci* em relação as plantas sob deficiência hídrica. A presença *Lxx* não alterou o *Ci* entre os tratamentos. A alteração *E* foi menor nas plantas submetidas ao déficit hídrico ($p<0,05$). Não foram observadas alterações na *E* pela colonização de *Lxx* nas plantas. As plantas Mock submetidas ao déficit hídrico tiveram redução de 50, 58 e 84% ao Mock sob déficit hídrico (SPDH) quando comparadas ao controle (SPI). Plantas com *Lxx* sob déficit hídrico apresentaram redução de 47, 59 e 58% *E* nas plantas que foram inoculas com *Lxx* sob déficit hídrico (SPLDH).

1.3.5 COMPOSTOS OSMOPROTETORES

Os teores de aminoácidos solúveis e prolina foram alterados na folha em ambos os genótipos de cana-de-açúcar em função da colonização de *Lxx* e das condições de déficit hídrico ($p<0,05$). (FIGURA 4). Nas plantas CB 49260, não foi verificado diferença na quantidade de aminoácidos na folha a partir da primeira avaliação. Contudo na segunda e terceira avaliação, as plantas Mock sob déficit hídrico aumentaram 71 e 75% de aminoácidos quando comparadas ao Mock irrigado. Os mesmos resultados foram observados nas plantas inoculadas com *Lxx*, onde as plantas submetidas ao déficit hídrico aumentaram a quantidade de aminoácidos na folha.

As plantas Mock SP803280 submetidas ao déficit hídrico aumentaram 51, 105 e 199% quantidade de aminoácidos quando comparada ao Mock irrigado. O mesmo resultado também foram observadas nas plantas inoculadas com *Lxx*, havendo um aumento de 70, 111 e 90% de aminoácidos. No entanto, a inoculação de *Lxx* na planta aumentou a síntese de aminoácidos em 56% e 17% nas plantas sob déficit hídrico em relação ao Mock sob a mesma condição.

O acúmulo de prolina na folha foi superior nas plantas CB 49260 sob déficit hídrico. A primeira e terceira avaliação obtiveram os mesmos resultados, onde a acumulação de prolina na folha foi superior nas plantas submetidas ao déficit hídrico ($<0,05$). Nós não observamos alteração no conteúdo de prolina em função da presença da bactéria na planta. Em geral, as plantas Mock sob déficit hídrico apresentaram aumento de 7 e 25% no teor de prolina em relação ao Mock irrigado. As plantas inoculadas com *Lxx* sob déficit hídrico (CBLDH) também apresentaram aumento em 26 e 64% no conteúdo de prolina em relação às plantas CB 49260

inoculado com *Lxx* irrigado (CBLI). Na segunda avaliação, foi verificado que as plantas inoculadas com *Lxx* sob déficit hídrico elevaram o conteúdo de prolina na folha, havendo um aumentou em 36%.

Na segunda e terceira avaliação as plantas SP803280 apresentaram maior acúmulo de prolina na folha nos dois tempos avaliados (FIGURA 4) quando submetidas ao déficit hídrico. A colonização da bactéria na planta elevou o acúmulo de prolina na planta quando submetida ao déficit hídrico. No segundo tempo, as plantas inoculadas com *Lxx* submetidas ao déficit hídrico mostraram um aumento no acúmulo de prolina. Na terceira avaliação, o Mock irrigado (SPLI) com *Lxx* possuíram maior teor de prolina do que o Mock irrigado (SPI).

1.3.6 FORMAÇÃO H_2O_2 E MDA

Para avaliar o estresse nas plantas causado pelo tratamentos, foi analisado a produção de MDA e H_2O_2. Apenas na primeira avaliação, o genótipo CB 49260 exibiu alteração no teor de MDA ($p<0,05$). As plantas Mock sob déficit hídrico aumentaram a formação MDA quando comparadas as plantas Mock irrigadas (Figura7). As plantas irrigadas, não apresentaram diferença na produção de MDA em função da inoculação com *Lxx*. As plantas inoculadas com *Lxx* submetidas ao déficit hídrico obtiveram menor produção de MDA em relação ao Mock sob déficit hídrico.

No genótipo SP 803280 a diferença na produção de MDA foi superior nas plantas submetidas ao déficit hídrico quando comparada as plantas irrigadas. As plantas irrigadas e inoculadas com *Lxx* (SPLI) reduziram a formação MDA quando comparadas as Mock irrigado (SPI). Na segunda avaliação, observamos maior produção de MDA nas plantas inoculadas com *Lxx* sob déficit hídrico (SPLDH), exibindo um aumento em 59% a formação de MDA quando comparando com ao Mock sob déficit hídrico. Na terceira avaliação, as plantas inoculadas com *Lxx* submetidas ao déficit hídricos aumentaram a produção de MDA em relação as planta inoculadas com *Lxx* submetidas a irrigação.

A formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos genótipos de cana-de-açúcar diferiu apenas em um tempo de avaliação em ambos os genótipos em função do déficit hídrico. No segundo tempo de avaliação, o Mock CB 49260 sob déficit hídrico apresentam menor produção de H_2O_2 em relação ao Mock irrigado. No primeiro tempo de avaliação, as plantas Mock SP 803280 sob déficit hídrico demonstraram menor produção de H_2O_2 em relação ao Mock irrigado.

1.4 DISCUSSÃO

O RS é uma doença que reduz a produtividade da cana-de-açúcar. O impacto da doença na produtividade é maior quando as plantas estão submetidas à condição de déficit hídrico (Steindly e Hugles, 1953). Inclusive, os sintomas da doença estão associados a uma provável ocorrência de estresse hídrico na planta. Os sintomas da RS são causados pelo entupimento dos vasos do xilema (TEAKLE; APPLETON; STEINDL, 1978). Algumas bactérias patogênicas colonizam os vasos de xilema causando murcha na planta. A ocorrência de murcha na planta pode ser um dano indireto da bactéria devido a síntese de compostos defesa da planta, que induz o acúmulo de tilose que obstruem o vaso do xilema para evitar a distribuição de bactérias para outros tecidos da planta (MCELRONE; SHERALD; FORSETH, 2003; RAHMAN; ABDULLAH; VANHAECKE, 1999; YADETA et al., 2013). Nosso estudo mostrou que a colonização de *Lxx* na planta aumentou a demanda hídrica em ambos os genótipos, sendo observado apenas no tratamento irrigado no genótipo CB 49260 e sob condição de déficit hídrico no genótipo SP803280. No entanto, não verificamos alteração na taxa de transpiração e TRA na folha devido à colonização da bactérias em ambos genótipos. Nós observado redução no TRA em função da imposição do déficit hídrico. Apesar disso, a colonização *Leifsonia xyli subsp. xyli* na planta não alterou o estado hídrico das plantas nos dois genótipos em ambos os tramentos hídricos, comprovando que a colonização da bactéria não alterou o estado hídrico na planta.

A colonização de *Lxx* nas plantas reduziu a fotossíntese no genótipo CB 49260 em condições normais de irrigação, não sendo observado o mesmo resultado no genótipo SP 803280. A redução da fotossíntese nas plantas CB 49260 em condições de irrigação, foi causada pela colonização da bactéria reduzir a condutância estomática na planta, que consequentemente decresce a assimilação de CO_2 (Zhang et al., 2016). A redução da condutância estomática é causada pela bactéria alterar os níveis hormonais da planta (Zhang et al. 2016, Zhang et al. 2016). A colonização de *Lxx* na cana-de-açúcar aumenta o nível de ABA e diminui as concentrações de auxina e giberelina nos vasos do xilema (Zhang et al. 2016). O ABA é o principal hormônio de resposta ao déficit hídrico, responsável por induzir o fechamento estomático nas plantas. Contudo, o fechamento estomático não está associado a bactéria causar déficit hídrico na planta, porque não observamos redução no TRA nos dois genótipos de cana-de-açúcar inoculados com a bactéria. Estudo recente mostrou que o aumento do título bacteriano na planta eleva expressão de *NCED* (CIA et al., 2018). Desta forma, os sintomas da doença estão correlacionados com o aumento do título bacteriano aumentar a expressão do gene

de biossíntese de ABA (Cia et al., 2018; Davis et al., 1988). Este resultado demonstra, que o aumento do nível de ABA não está relacionado pela colonização da bactéria induzir um estado de déficit hídrico na planta. Provavelmente, a diferença encontrada entre os genótipos na fotossíntese, pode ser devida a planta SP 803280 haver um menor crescimento bacteriano. Sob condições de déficit hídrico, não foi verificado diferença na taxa fototossintética entre os genótipos em função da colonização de *Lxx* nas plantas. Esses resultados mostram que a colonização da bactéria associado ao déficit hídrico não potencializou o déficit hídrico na planta.

As concentrações dos aminoácidos e prolina foram alteradas em função do tratamento hídrico e da colonização de *Lxx* na planta. O acúmulo de aminoácidos na folha em ambos os genótipos foi superior nas plantas colonzadas pela bactéria e submetidas ao déficit hídrico. Os genótipos não apresentaram alterações no conteúdo de aminoácidos nas plantas irrigadas. O aumento na síntese de aminoácidos na planta é favorável ao desenvolvimento da bactéria na planta, uma vez que a *Lxx* é dependente da aquisição dos aminoácidos metionina e cisteína, por não conter seus genes de biossíntese (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004) Interessante, os genótipos sob déficit hídrico não apresentaram aumento do título bacteriano, mas redução no genótipo SP 803280. Este resultado mostram que a bactéria não é oportunista para aumentar seu crescimento em função da vulnerabilidade do hospedeiro frente ao déficit hídrico. Pelo contrário, a alteração metabólica na cana-de-açúcar sob déficit hídrico pode limitar algum composto metabólito essencial para o crescimento da bactéria.

O acúmulo de aminoácidos como a prolina é uma resposta fisiológica à adaptação das plantas à condição de déficit hídrico. Os aminoácidos podem atuar como compostos osmoprotetores para evitar a desidratação das células reduzindo potencial osmótico ao manter o turgor celular (RAI, 2002). Em nosso estudo, os genótipos de cana-de-açúcar sob déficit hídrico aumentaram conteúdo de aminoácidos e prolina. Contudo, a colonização de *Lxx* em ambos genótipos de cana-de-açúcar elevaram o acúmulo de aminoácidos e prolina nas plantas submetidas ao déficit hídrico. Neste estudo, nós verificamos evidências fisiológicas de que a colonização *Lxx* no genótipo SP 803280 incrementou o estado de estresse através do aumento na produção de MDA. Todavia, não foi observado o mesmo resultado do genótipo CB49260. Provavelmente, a diferença na resposta encontrada entre os genótipos, pode ser causada devido a maior tolerância CB 49260 sob déficit hídrico em relação a RB803280, devido ao maior concentração de aminoácidos e prolina nas plantas sob déficit hídrico.

1.4.1 *Leifsonia xyli subsp. xyli* PODE AUMENTAR O ESTADO DE ESTRESSE HÍDRICO NA PLANTA?

Os estudos anteriores descreveram que a ocorrência de RS na cana-de-açúcar está associada à condição de déficit hídrico (STEINDLY E HUGLES, 1953). No campo, os sintomas da doença são mais evidentes no déficit hídrico, criando a hipótese de que colonização de *Lxx* poderia levar a cana-de-açúcar à um estado de déficit hídrico (TEAKLE; APPLETON; STEINDL, 1978). No entanto estudo recente foi mostrado que a colonização da bactéria não promoveu obstrução nos vasos do xilema e aumento na concentração de ABA no colmo (Zhang et al., 2016). Este estudo mostrou que as plantas colonizadas pro *Lxx* submetidas a irrigação e ao déficit hídrico não apresentarma diferença no seu estado hídrico em relação as plantas não inoculadas com a bactéria. No entanto, ambos os genótipo inoculados com *Lxx* apresentaram aumento demanda hídrica. Ainda faltam informações, se a doença pode afetar o crescimento do sistema radicular. Esta característica morfológica é importante para entender melhor a relação dos sintomas da doença com o déficit hídrico, pois afeta diretamente a absorção de água pela planta. Portanto, este estudo mostrou os resultados das plantas inoculadas no colmo principal sem perfilhos submetidas ao déficit hídrico. Ainda faltam esclarecimentos, de como o crescimento do título bacteriano pode impactar as plantas submetidas ao déficit hídrico. Portanto este estudo mostrou que a colonização de *Lxx* aumentou a demanda de água sem causar um decréscimo no estado hídrico na cana-de-açúcar. Desta forma, estes resultados demonstram uma evidência que a colonização de *Lxx* na cana-de-açúcar não afeta o estado hídrico na planta, podendo então os sintomas de RS observados no campo não estarem associados ao déficit hídrico.

REFERÊNCIAS

ALEXIEVA, V. et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337–1344, 2001.

ALHENDAWI, R. A.; KIRKBY, E. A.; PILBEAM, D. J. Evidence that sulfur deficiency enhances molybdenum transport in xylem sap of tomato plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 28, n. 8, p. 1347–1353, 2005.

ALTIERI, M.; BRAVO, E. The ecological and social tragedy of crop-based biofuel production in the Americas. **Food First/Institute for Food & Development Policy**, v. 2006, n. Pimentel 2003, p. 1–5, 2007.

BAILEY, R. A. THE EFFECT OF HOT WATER TREATMENTS, RATOON STUNTING

DISEASE AND MOISTURE STRESS ON THE INCIDENCE OF SMUT IN SUGARCANE. 1977.

BAILEY, R. A.; BECHET, G. R. The effect of ratoon stunting disease on the yield of some south african sugarcane varieties under irrigated and rainfed conditions. **Proceedings of The South Africar Sugar Technologists Assocation**, n. June, p. 74–78, 1995.

BAILEY, R. A.; BECHET, G. R. Further evidence of the effects of ratoon stunting disease on production under irrigated and rainfed conditions. **Proceedings of The South Africar Sugar Technologists Assocation**, v. 71, n. September 1995, p. 97–101, 1997.

BAILLIE, C. K. et al. Apoplastic peroxidases enable an additional sulphite detoxification strategy and act as first line of defence upon exposure to sulphur containing gas. **Environmental and Experimental Botany**, v. 157, n. August 2018, p. 140–150, 2019.

BATES, L. S.; R.P., W.; I.D., T. Rapid determination of free proline for w a t e r - s t r e s s studies. **Plant and Soil**, v. 207, p. 205–207, 1973.

BENDA, G. T. A.; RICAUD, C. The use of heat treatment for sugarcane disease control. **Plant Pathology**, p. 483–496, 1977.

BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and Estimation of Amino Acids in Crude Plant Extracts by Thin-Layer Electrophoresis and Chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 293, p. 278–293, 1966.

BLOEM, E. et al. Facts and fiction about sulfur metabolism in relation to plant-pathogen interactions. **Plant Biology**, v. 9, n. 5, p. 596–607, 2007.

BLOEM, E.; HANEKLAUS, S.; SCHNUG, E. Significance of sulfur compounds in the protection of plants against pests and diseases. **Journal of Plant Nutrition**, v. 28, n. August 2014, p. 763–784, 2005.

BLOEM, E.; HANEKLAUS, S.; SCHNUG, E. Milestones in plant sulfur research on sulfur-induced-resistance (SIR) in Europe. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. January, p. 1–12, 2015.

CALDANA, C. et al. Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in Arabidopsis thaliana. **Plant Journal**, v. 73, n. 6, p. 897–909, 2013.

CARVALHO, G. et al. Development of a qPCR for Leifsonia xyli subsp . xyli and quanti fi cation of the effects of heat treatment of sugarcane cuttings on Lxx. **Crop Protection**, v. 80, p. 51–55, 2016.

CHEN, L. et al. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. **Nature**, v. 468, n. 7323, p. 527–532, 2010.

CIA, M. C. et al. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, v. 161, n. 3, p. 313–324, 2012.

CIA, M. C. et al. Novel Insights Into the Early Stages of Ratoon Stunting Disease of Sugarcane Inferred from Transcript and Protein Analysis. **Phytopathology**, v. 108, n. 12, p. 1455–1466, 2018.

CONAB. Monitoramento agrícola- Cana-de-açúcar. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 5, p. 1–86, 2018.

DAVIS, M. J. et al. Ratoon Stunting Disease of Sugarcane : Isolation of the Causal Bacterium. 1980.

DAVIS, M. J.; DEAN, J. L.; HARRISON, N. A. Quantitative Varability of Clavibacter xyli subsp. xyli population in sugarcane cultivars differing in resistance to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, v. 78, n°4, p. 462–468, 1988.

DE LA FUENTE, L. et al. The Bacterial Pathogen Xylella fastidiosa Affects the Leaf Ionome of Plant Hosts during Infection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–9, 2013.

ELSAYED, A. I.; RAFUDEEN, M. S.; GOLLDACK, D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: Protection against abiotic stress. **Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2014.

EVTUSHENKO, L. I. et al. 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 Da. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 2000, p. 371–380, 2000.

FATIMA, U.; SENTHIL-KUMAR, M. Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. September, p. 1–12, 2015.

FERREIRA, D. F. SISVAR : A COMPUTER STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM Sisvar : um sistema computacional de análise estatística. p. 1039–1042, 2011.

FU, X. et al. Physiological response and sulfur metabolism of the V. dahliae-infected tomato plants in tomato/potato onion companion cropping. **Scientific Reports**, v. 6, n. 59, p. 36445, 2016.

GAGLIARDI, P. R.; CAMARGO, L. E. A. Resist??ncia de variedades comerciais de cana-de-a????car ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. **Ciencia Rural**, v. 39, n. 4, p. 1222–1225, 2009.

GLAGLIARDI, R.; CAMARGO, L. E. A. Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do. **Online**, p. 1–4, 2000.

GLASSOP, D. et al. Changes in the sugarcane metabolome with stem development. Are they related to sucrose accumulation? **Plant and Cell Physiology**, v. 48, n. 4, p. 573–584, 2007.

HÄNSCH, R. et al. Significance of plant sulfite oxidase. **Plant Biology**, v. 9, n. 5, p. 589–595, 2007.

HANSTEIN, S. et al. Changes in cytosolic Mg 2+ levels can regulate the activity of the plasma membrane H + -ATPase in maize. **Biochemical Journal**, v. 435, n. 1, p. 93–101, 2011.

HEATH, R.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated Chloroplasts of Fatty Acid Peroxidation chlorophyll. **Archives of biochemistry and biophisics**, v. 126, n. 45, p. 189–198, 1968.

HUNG, W. L.; WANG, Y. A Targeted Mass Spectrometry-Based Metabolomics Approach toward the Understanding of Host Responses to Huanglongbing Disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 40, p. 10651–10661, 2018.

JACOBY, R. P.; KOPRIVA, S. Metabolic niches in the rhizosphere microbiome: New tools and approaches to analyse metabolic mechanisms of plant-microbe nutrient exchange. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 4, p. 1087–1094, 2019.

JAMES, B. G. L. THE EFFECT OF RATOON STUNTING DISEASE ON THE EXPRESSION OF SMUT SYMPTOMS. **Proceedings of The South Africar Sugar**

Technologists Assocation, n. June, p. 2–5, 1976.

KANNAN, S.; RAMANI, S. Studies on Molybdenum Absorption and Transport in Bean and Rice. **Plant Physiology**, v. 62, n. 2, p. 179–181, 1978.

KOFALVI, S. A.; NASSUTH, A. **Influence of wheat streak mosaic virus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat**47, 35-377, , 1995.

KOPRIVOVA, A.; KOPRIVA, S. Hormonal control of sulfate uptake and assimilation. **Plant Molecular Biology**, v. 91, n. 6, p. 617–627, 2016.

KUSHALAPPA, A. C.; GUNNAIAH, R. Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 9, p. 522–531, 2013.

LIMA, K. et al. Temporal dynamic responses of roots in contrasting tomato genotypes to cadmium tolerance. p. 245–258, 2018.

LISEC, J. et al. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 387–396, 2006.

LOWE-POWER, T. M. et al. Metabolomics of tomato xylem sap during bacterial wilt reveals Ralstonia solanacearum produces abundant putrescine, a metabolite that accelerates wilt disease. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 1330–1349, 2018.

MACEDO, I. C. Sugar Cane's Energy: Twelve studies on Brazilian sugar cane agribusiness and its sustainability. **Unica**, n. October, p. 1–230, 2007.

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

MISZALSKI, Z.; ZIEGLER, H. Superoxide Dismutase and Sulfite Oxidation. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 47, n. 5–6, p. 360–364, 1992.

MONTEIRO-VITORELLO, C. B. et al. The Genome Sequence of the Gram-Positive Sugarcane Pathogen Leifsonia xyli subsp . xyli. v. 17, n. 8, p. 827–836, 2004.

NAUMANN, M. et al. Sulfite reductase co-suppression in tobacco reveals detoxification mechanisms and downstream responses comparable to sulfate starvation. **Frontiers in Plant Science**, v. 871, n. October, p. 1–18, 2018.

NDC BRASIL, R. F. DO B. Contribuição Nacionalmente Determinada Para Consecução Do Objetivo Da Convenção-Quadro Das Nações Unidas Sobre Mudança Do Clima. **Unfccc**, v. 9, p. 6, 2015.

OAKLEY, A. J. Glutathione transferases: New functions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 15, n. 6, p. 716–723, 2005.

OMENA-GARCIA, R. P. et al. Identification of metabolite traits from the current metabolomic approaches. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 31, n. 1, p. 1–19, 2019.

PRODHAN, M. A. et al. Tight control of sulfur assimilation: an adaptive mechanism for a plant from a severely phosphorus-impoverished habitat. **New Phytologist**, v. 215, n. 3, p. 1068–1079, 2017.

QUECINE, M. C. et al. A stable Leifsonia xyli subsp . xyli GFP-tagged strain reveals a new colonization niche in sugarcane tissues. p. 154–162, 2016.

RAHMAN, M. A.; ABDULLAH, H.; VANHAECKE, M. Histopathology of susceptible and resistant Capsicum annuum cultivars infected with Ralstonia solanacearum. **Journal of Phytopathology**, v. 147, n. 3, p. 129–140, 1999.

RAI, V. K. **Role of amino acids in plant responses to stressesBiologia Plantarum**, 2002.

SÁNCHEZ-ELORDI, E. et al. Polyamines levels increase in smut teliospores after contact with sugarcane glycoproteins as a plant defensive mechanism. **Journal of Plant Research**, v. 132, n. 3, p. 405–417, 2019.

SCHAKER, P. D. C. et al. Metabolome dynamics of smutted sugarcane reveals mechanisms involved in disease progression and whip emission. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. May, p. 1–17, 2017.

TEAKLE, D. S.; APPLETON, J. M.; STEINDL, D. R. L. An anatomical basis for resistance of sugar cane to ratoon stunting disease. **Physiological Plant Pathology**, v. 12, n. 1, p. 83–91, 1978.

URASHIMA, A. S. et al. Prevalence and Severity of Ratoon Stunt in Commercial Brazilian Sugarcane Fields. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 815–821, 2017.

VAN DE MORTEL, J. E. et al. Metabolic and Transcriptomic Changes Induced in Arabidopsis by the Rhizobacterium Pseudomonas fluorescens SS101 . **Plant Physiology**, v. 160, n. 4, p. 2173–2188, 2012.

VAN GENUCHTEN, M. T. **van_Genuchten1980.pdfSoil. Sci. Soc. Am.**, 1980.

VILAS, J. M. et al. Modulation of plant and bacterial polyamine metabolism during the compatible interaction between tomato and Pseudomonas syringae. **Journal of Plant Physiology**, v. 231, n. September, p. 281–290, 2018.

WEAVER, L.; TEAKLE, D. S.; HAYWARD, A. C. Ultrastructural studies on the bacterium associated with the ratoon stunting disease of sugarcane. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 28, n. 5, p. 843–852, 1977.

WILLIAMS, J. S. et al. Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. **Plant physiology**, v. 128, n. 1, p. 150–159, 2002.

WONG, J. W. H. et al. The Influence of Contrasting Microbial Lifestyles on the Pre-symbiotic Metabolite Responses of Eucalyptus grandis Roots. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, n. February, 2019.

YADETA, K. A. et al. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. v. 4, n. April, p. 1–12, 2013.

YARMOLINSKY, D. et al. Sulfite reductase protects plants against sulfite toxicity. **Plant Physiology**, v. 161, n. 2, p. 725–743, 2013.

YOUNG, A. J. Possible origin of ratoon stunting disease following interspecific hybridization of Saccharum species. 2016.

YOUNG, A. J. et al. Molecular Detection of Diverse Leifsonia Strains Associated With Sugarcane. **Plant disease**, v. 101, n. 8, p. 1422–1431, 2017.

ZEIER, J. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, n. 12, p. 2085–2103, 2013.

ZHANG, X. et al. Morphological and physiological responses of sugarcane to Leifsonia xyli subsp. xyli infection. **Plant Disease**, v. 100, n. December, p. 1–8, 2016a.

ZHANG, X. et al. Influence of Inoculation of Leifsonia xyli subsp . xyli on Photosynthetic Parameters and Activities of Defense Enzymes in Sugarcane. **Sugar Tech**, 2016b.

FIGURAS

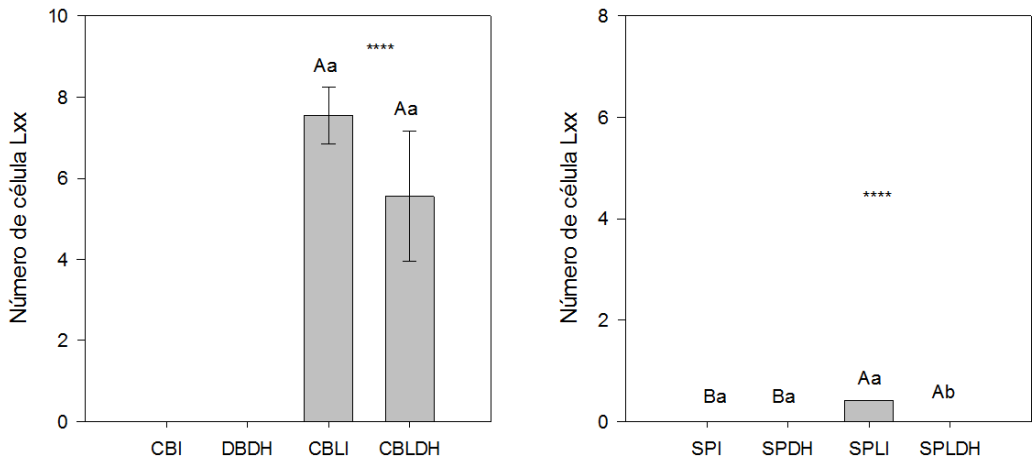


Figura 1. Quantificação de bactérias (n=4) no colmo (número de células Lxx / 100 ng de DNA vegetal) entre os genótipos de cana-de-açúcar CB 49260 e SP 803280 em função dos tratamentos: CB49260 Mock sob irrigação (CBI), CB49260 Mock sob déficit hídrico (CBDH), CB49260 inoculado com *Lxx* sob irrigação (CBLI), CB49260 inoculado com *Lxx* sob déficit hídrico (CBLDH), SP 803280 Mock sob irrigação (SPI), SP803280 sob deficit hídrico (SPDH), SP803280 inoculado com *Lxx* sob irrigação (SPLI), SP803280 inoculado com *Lxx* sob déficit hídrico (SPLDH) As letras maiúsculas indicam diferenças entre a colonização *Lxx* e letras minúsculas entre os tratamentos hídricos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

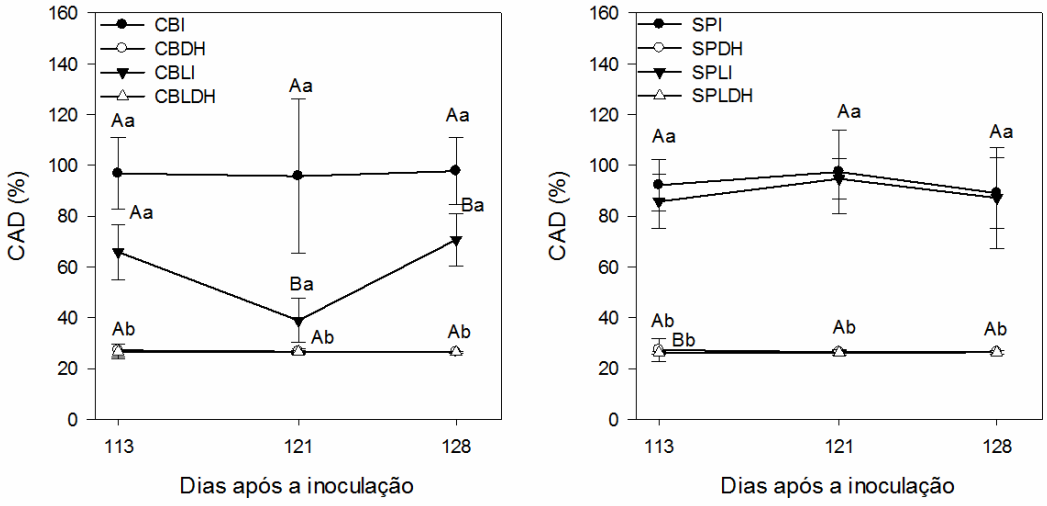


Figura 2. Capacidade de campo (n = 4) dos vasos dos genótipos de cana-de-açúcar CB 49260 e SP 803280 em função dos tratamentos: CB49260 Mock sob irrigação (CBI), CB49260 Mock em déficit hídrico (CBDH), CB49260 inoculado com *Lxx* sob irrigação (CBLI), CB49260 inoculado com *Lxx* sob déficit hídrico (CBLDH); SP 803280 Mock sob irrigação (SPI), SP803280 Mock, SP803280 sob déficit hídrico (SPDH), SP803280 inoculado com *Lxx* sob irrigação (SPLI), SP803280 inoculado com *Lxx* sob déficit hídrico (SPLDH). Letras maiúsculas indicam diferenças (n = 4) entre a colonização *Lxx* e letras minúsculas entre os tratamentos hídricos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

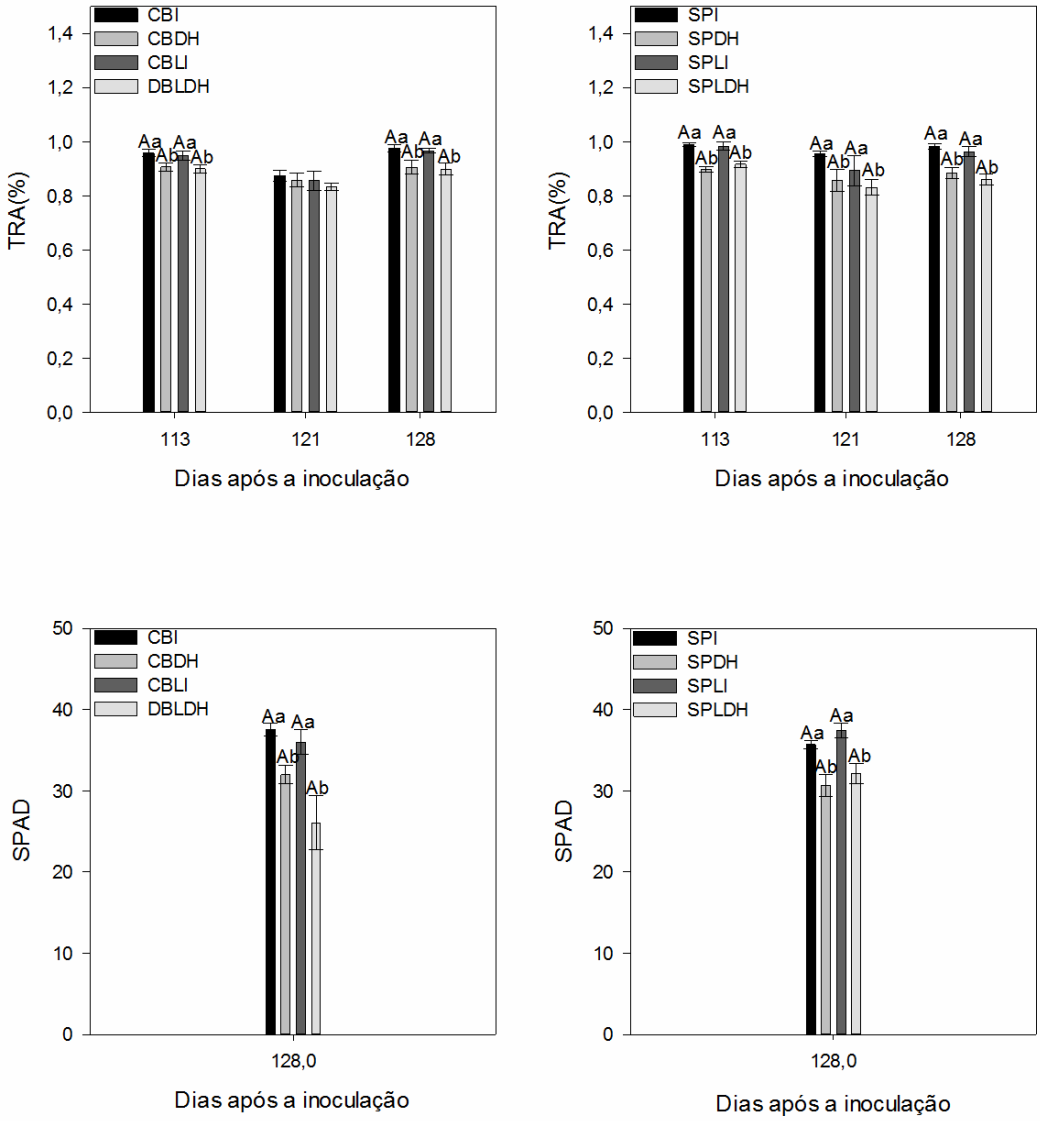


Figura 3. Teor relativo de água (TRA) e Índice de Clorofila (SPAD) (n = 4) nos genótipos de cana-de-açúcar CB 49260 e SP 803280 em função dos tratamentos: CB49260 Mock irrigado (CBI), CB49260 Mock sob déficit hídrico (CBDH) CB49260 inoculado com *Lxx* sob irrigação (CBLI), CB49260 inoculado com *Lxx* sob déficit hídrico (CBLDH); SP803280 Mock sob irrigação (SPI), SP803280 Mock sob déficit hídrico (SPDH), SP803280 inoculado com *Lxx* sob irrigação (SPLI), SP803280 inoculado com *Lxx* sob déficit hídrico (SPLDH). Letras maiúsculas indicam diferenças entre a colonização de *Lxx* e letras minúsculas entre os tratamentos hídricos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

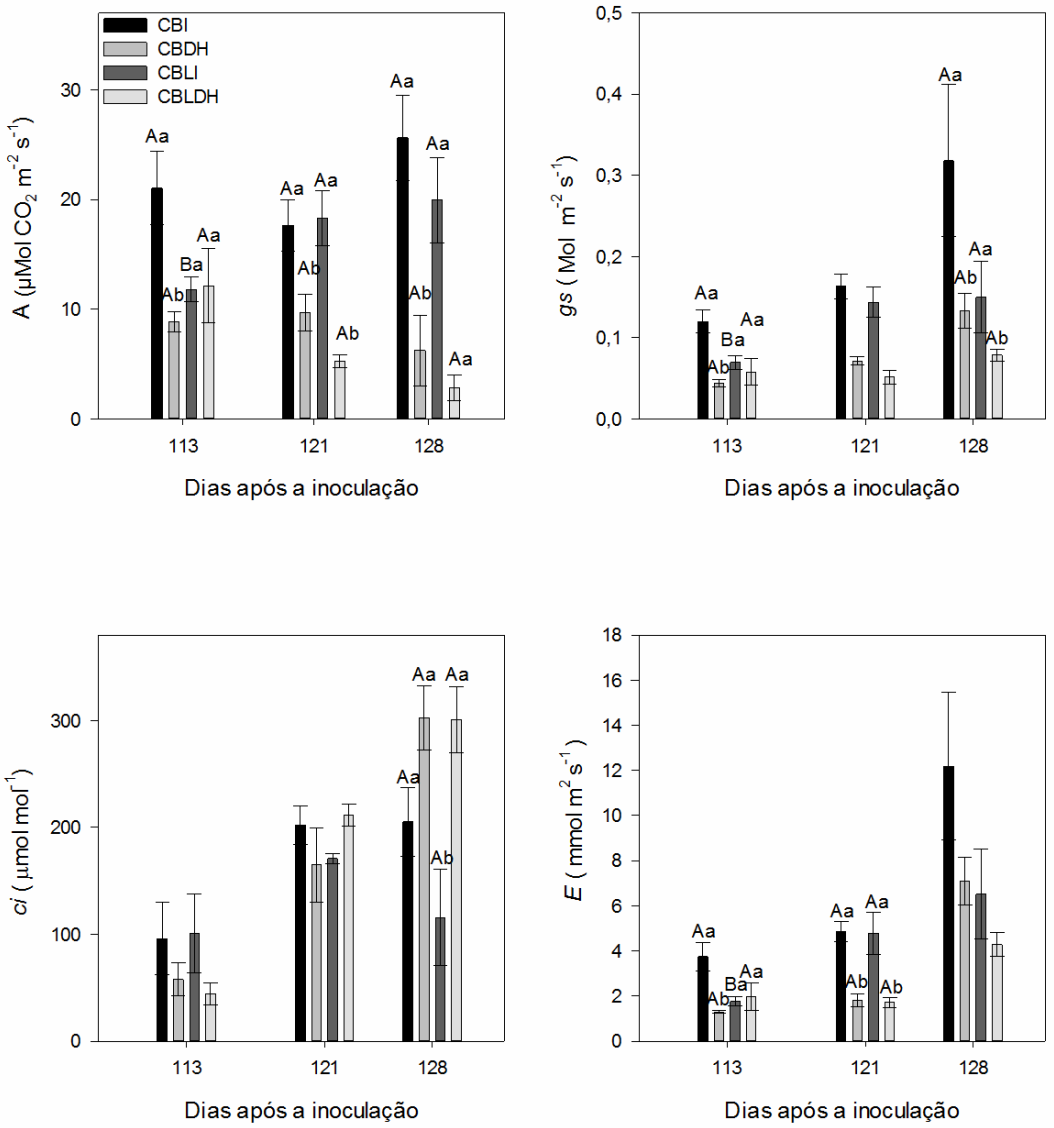


Figura 4. Assimilação de CO_2 (*A*) condutância estomática (*gs*), concentração interna de CO_2 foliar (*Ci*) e transpiração (*E*) (n = 4) no genótipo CB 49260 em função dos tratamentos: CB49260 Mock sob irrigação (CBI), CB49260 Mock sob déficit hídrico (CBDH), CB49260 inoculado com *Lxx* sob irrigação (CBLI), CB49260 inoculado com *Lxx* sob déficit hídrico (CBLDH). Letras maiúsculas indicam diferenças na colonização de *Lxx* e letras minúsculas entre os tratamentos com hídrico, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

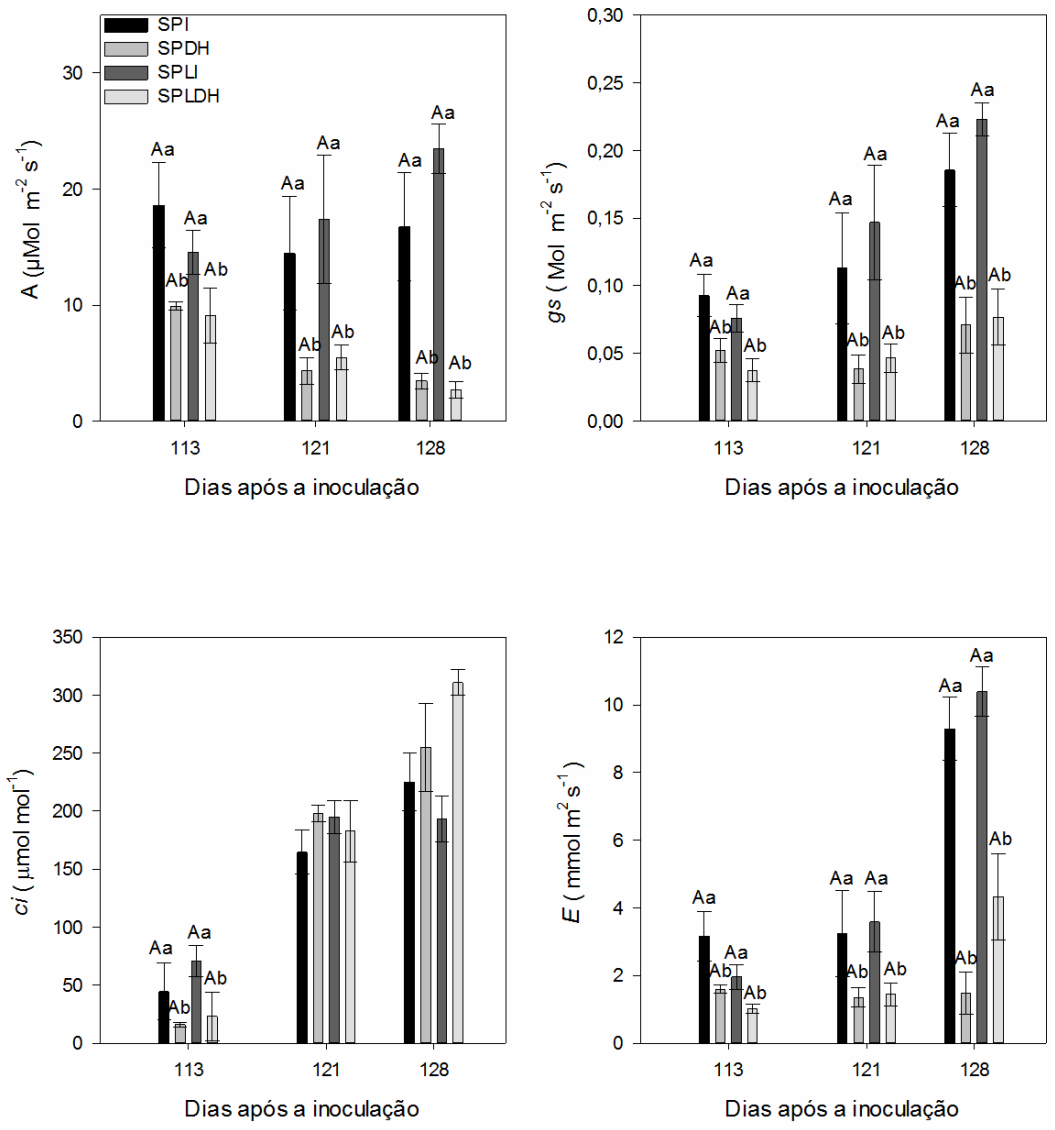


Figura 5. Assimilação de CO_2 (*A*) condutância estomática (*gs*), concentração interna de CO_2 foliar (*Ci*) e transpiração (*E*) (n = 4) no genótipo SP803280 em função dos tratamentos: SP803280 mock sob irrigação (SPI), SP803280 mock sob déficit hídrico (SPDH), SP803280 inoculado com *Lxx* sob irrigação (SPLI), SP803280 inoculado com *Lxx* sob déficit hídrico (SPLDH). Letras maiúsculas indicam diferenças na colonização de *Lxx* e letras minúsculas entre os tratamentos hídricos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

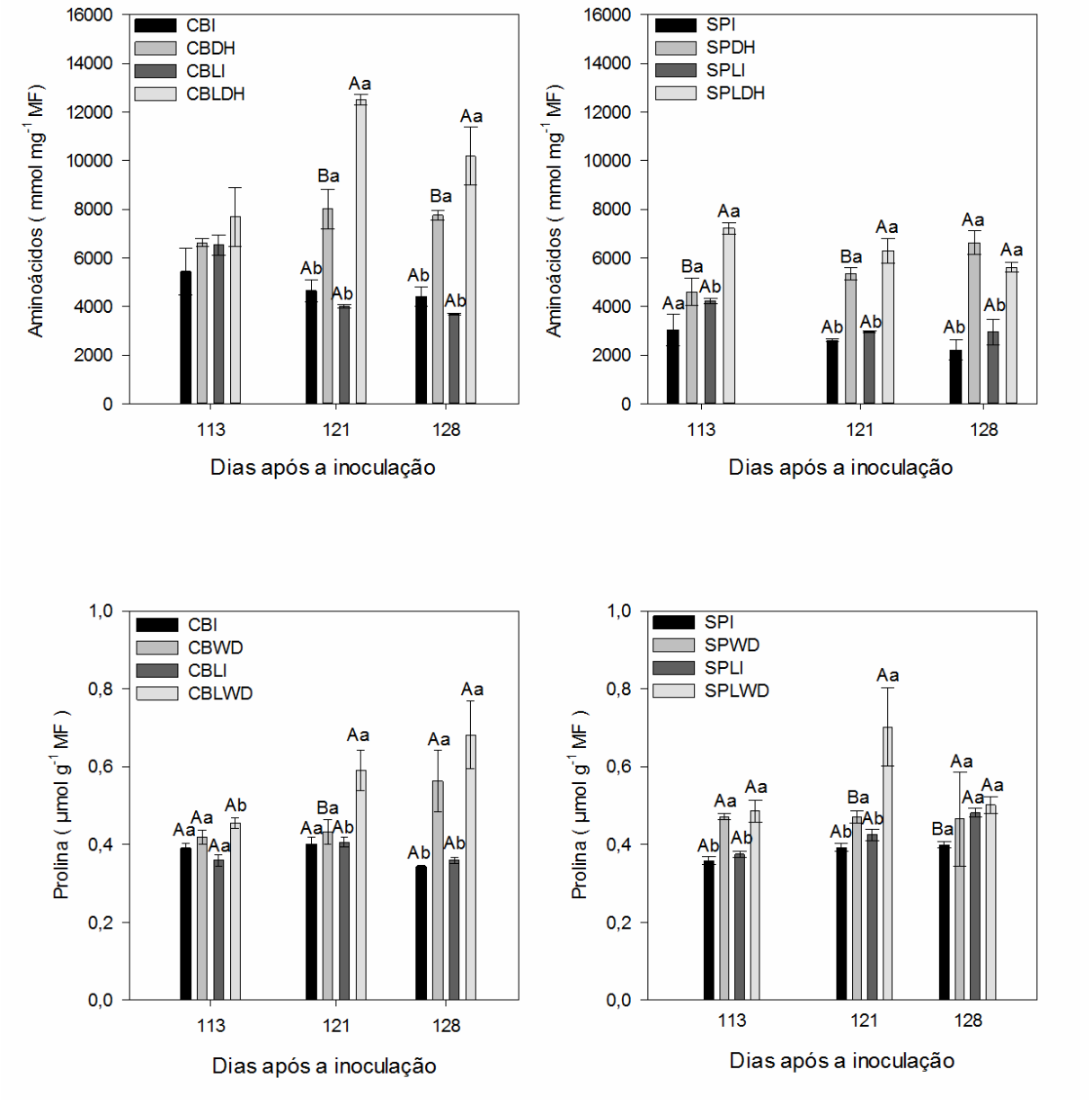


Figura 6. Concentração aminoácido total e prolina na folha (n = 4) nos genótipos de cana-de-açúcar CB 49260 e SP 803280 em função dos tratamentos: CB49260 Mock sob irrigação (CBI), CB49260 Mock sob déficit hídrico (CBDH), CB49260 inoculado com *Lxx* sob irrigação (CBLI), o CB49260 inoculado com *Lxx* sob déficit hídrico (CBLDH); SP803280 Mock sob irrigação (SPI), SP803280 Mock sob déficit hídrico (SPDH), SP803280 inoculado com *Lxx* sob irrigação (SPLI), SP803280 inoculado com *Lxx* sob déficit hídrico (SPLDH). Letras maiúsculas indicam diferenças na colonização de *Lxx* e letras minúsculas entre os tratamentos hídricos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

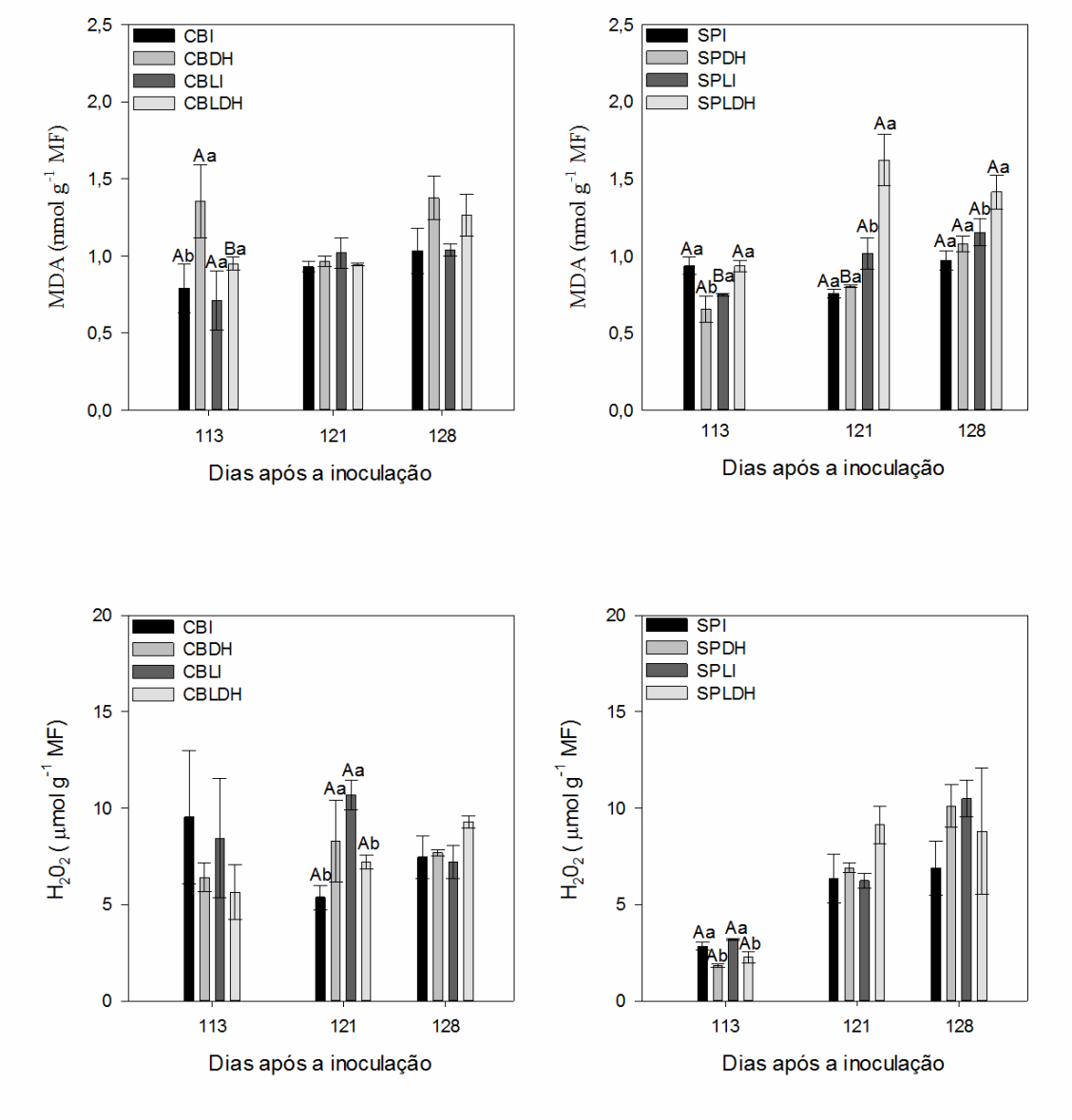


Figura 7. Malonoaldeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na folha (n = 4) nos genótipos de cana-de-açúcar CB 49260 e SP 803280 nos tratamentos: CB49260 sob irrigação (CBI), CB49260 sob déficit hídrico (CBDH), CB49260 inoculado com *Lxx* sob irrigação (CBLI), CB49260 inoculado com *Lxx* sob déficit hídrico (CBLDH); SP803280 sob irrigação (SPI), SP803280 sob déficit hídrico (SPDH), SP803280 inoculado com *Lxx* sob irrigação (SPLI), SP803280 inoculado com *Lxx* sob déficit hídrico (SPLDH). Letras maiúsculas indicam diferenças na colonização de *Lxx* e letras minúsculas entre os tratamentos hídricos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

2 RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS AFETA O PARTICIONAMENTO DE CARBONO POR INIBIR A FORMAÇÃO DE ÓRGÃOS DRENOS NA CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

O raquitismo das soqueiras (RS) é uma doença da cana-de-açúcar que causa sérios prejuízos econômicos aos produtores em diversos países a partir da redução da biomassa e do acúmulo de açúcares nos colmos. A redução da produtividade está associada à mudança no desenvolvimento da planta, observada pelo menor crescimento e perfilhamento. Desta forma, a hipótese do presente estudo foi averiguar se o decréscimo em produtividade de RS decorre da diferença no acúmulo de biomassa e acúcares não estruturais entre os órgãos da planta. Observamos que o aumento do título de *Leifsonia xyli subsp xyli* (*Lxx*) na planta reduziu a formação de perfilhos e aumentou o diâmetro do colmo principal quando comparadas com plantas com baixo título bacteriano (Controle). A produção total de biomassa não foi alterada em função do título bacteriano, entretanto, plantas com alto título bacteriano apresentaram maior acúmulo de biomassa no colmo principal, enquanto que plantas com baixo título bacteriano apresentaram maior acúmulo de biomassa nos perfilhos e raízes. O aumento da alocação de biomassa para colmo principal está associado com a redução na formação de órgãos drenos, resultando no acúmulo de sacarose e amido no colmo principal.

Palavras-chave: Perfilhamento, Fonte-dreno, Monocotiledônea, *Leifsonia xyli subsp. xyli*, Patógeno endofítico

Abstract

Ratoon Stunting Disease (RSD) is a sugarcane disease that causes serious economic damage to producers in several countries thourgh reduction of biomass and accumulation of sugars in the stalks. Reduction in productivity is associated with changes in plant development, observed by lower growth and tillering. Thus, the aim of the present study was to investigate whether the decrease in yield of RSD is due to the difference in biomass accumulation and nonstructural sugars between plant organs. We observed that the increase in *Leifsonia xyli subsp xyli* (*Lxx*) titers in the plant reduced the formation of tillers and increased the main stalk diameter when compared to plants with low bacterial titers (Control). Total biomass production was not altered as a function of bacterial titer, however, plants with high bacterial titers presented higher biomass accumulation in the main stalk, while plants with low bacterial titers presented higher biomass accumulation in tillers and roots. Increased allocation of biomass to main stalk is associated with the reduction in sinks organs formation, resulting in sucrose and starch accumulation in the main stalk.

Keywords: Tillering, sink-source, Monocotyledon, *Leifsonia xyli subsp. xyli*, Endophytic pathogen

2.1 INTRODUÇÃO

O raquitismo das Soqueiras (RS) é uma doença de ocorrência mundial da cana-de-açúcar que reduz a produtividade de biomassa e açúcar, causando sérios prejuízos econômicos que podem alcançar até US $ 1000 toneladas ano^{-1} ha^{-1} (Urashima & Silva, 2017). No Brasil, as perdas com a doença podem chegar até 26% da produtividade de biomassa (Gagliardi et al., 2009); já em outros países as perdas chegaram em 41% na China e 30% na Austrália (Bailey et al. 1997; Deng et al. 2004).

RS é uma doença causada pela bactéria patogênica *Leifsonia xyli subsp. xyli* (*Lxx*) que coloniza os vasos do xilema da planta, podendo também ser encontrada nas células do parênquima e da bainha da folha (Quecine et al., 2016; Zhang et al., 2016a; Weaver et al., 1977). *Lxx* é considerada uma bactéria endofítica por estar presente em todos os genótipos de cana-de-açúcar no mundo, não havendo variação no seu genoma (Young, 2016; Monteiro-vitorello et al., 2004; Li et al., 2013). O estabelecimento da bactéria nos genótipos comerciais de cana-de-açúcar provavelmente sucedeu pelo cruzamento interespecífico entre as espécies *Saccharum spontaneum e Saccharum officinarum* e a posterior utilização deste material em plantios comerciais ao redor do mundo (Young et al. 2016).

No campo, os sintomas da doença são caracterizados pela redução no crescimento dos colmos, menor formação de perfilhos, entrenós curtos e descoloração vascular (Young et al. 2016). Os sintomas da doença estão diretamente associados com o aumento do título bacteriano na cana-de-açúcar, sendo os genótipos classificados em suscetível ou resistente em função do crescimento da bactéria ao longo do desenvolvimento da planta (Li et al., 2013; Carvalho et al., 2016). Não há um sintoma específico para identificação da doença no campo; sendo que a confirmação é feita levando o material em laboratório para detecção por técnica moleculares (Grisham et al., 2009; Carvalho et al., 2016). Algumas estratégias de controle são adotadas para reduzir o título bacteriano, como imersão do material de plantio em água quente e utilização de genótipos resistentes. Porém, ainda se desconhece um método eficiente para erradicar a doença na planta (Li et al., 2016).

Estudos recentes começaram a desvendar a interação do patógeno com a cana-de-açúcar através das análises fisiológica, molecular e bioquímica na planta. O aumento do título bacteriano na cana-de-açúcar provoca decréscimos nos níveis de auxina e do ácido giberélico associado com o aumento de ácido abscísico (ABA) no colmo (Zhang et al., 2016a). O aumento do ABA no colmo está associado com o aumento da expressão do gene *NCED* na planta (Cia et al., 2018). Os sintomas da doença também estão associados com a inibição na expressão dos

genes do ciclo celular (Cia et al. 2018). Essas descobertas são importantes para entender a alteração no desenvolvimento da cana-de-açúcar causada a partir da colonização da bactéria.

RS afeta a produtividade na cana-de-açúcar por reduzir o perfilhamento e o crescimento dos colmos (Bailey et al. 2015; Quecine et al. 2016). O menor acúmulo de biomassa nas plantas com RS, está relacionada ao decréscimo da fotossíntese, causado pela menor atividade de Rubisco e na concentração de clorofila foliar (Zhang et al., 2016b). Contudo, ainda faltam estudos que relacionem alteração no desenvolvimento da planta no particionamento de biomassa. O objetivo deste estudo foi avaliar se a cana-de-açúcar com RS reduz a produtividade de biomassa em função da modificação do particionamento de carboidratos entre os órgãos na planta. Nós observamos diferença no desenvolvimento e no particionamento de biomassa e carbono nas plantas com maior título bacteriano. Plantas com maior título bacteriano acumularam mais rapidamente sacarose e amido no colmo principal devido a uma menor formação de órgãos dreno ao longo do estágio inicial de desenvolvimento da cana-de-açúcar.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O estudo foi conduzido com genótipo cana-de-açúcar CB 49260 classificado como suscetível a *Leifsonia xyli subsp. xyli* (*Lxx*) (Gagliardi et al., 2009). O experimento consistiu em avaliar o mesmo genótipo de cana-de-açúcar com alto e baixo título de *Lxx*. O material vegetal utilizado foi obtido de matrizes com sintomas e assintomáticas de RS no campo do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (LFN) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP). Posteriormente, o material vegetal foi cortado em mini-toletes de uma gema e plantado com substrato (Basaplant) em bandeja com 32 células. O experimento foi realizado em casa de vegetação com controle de temperatura e umidade relativa. Vinte e dois dias após o plantio, as plantas foram transplantadas para vasos de 6L com substrato (Basaplant). Cada vaso recebeu 7,5g de adubo 10-10-10 e 7,89g de sulfato de amônio. As plantas foram irrigadas diariamente. Sessenta dias após o plantio o título bacteriano foi quantificado usando a bainha foliar da planta (Young et al. 2017). O experimento foi conduzido até 127 dias após o plantio da cana-de-açúcar. Ao longo da colheita foram coletados folha, colmo e raiz material fresco para análise anatômica e também em nitrogênio líquido para mensuração do acúmulo de açúcares e atividade da invertase no colmo principal.

A quantificação de *Lxx* nas plantas foi analisada na bainha foliar (Young et al., 2017). As amostras foram maceradas e o DNA da bactéria foi extraído para ser quantificado por qPCR conforme (Carvalho et al. 2016, Quecine et al. 2016).

2.2.2 CRESCIMENTO DA PLANTA E PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Foram realizadas medições frequentes no crescimento e diâmetro do colmo principal até 90 dias após o plantio A produção de biomassa foi avaliada aos 127 dias após o plantio, deixando o material fresco a 60°C em estufa para determinar a matéria seca da biomassa total, do colmo principal, dos perfilhos e da parte aérea (MAP), bem como a matéria seca de raiz (MR) e relação parte aérea/raiz (MAP MR^{-1}).

2.2.3 ÁREA FOLIAR, PIGMENTOS E DENSIDADE ESTOMÁTICA

A área foliar foi determinada na primeira folha totalmente expandida (folha +1) por medidor de área foliar (Li-2000-LI-COR inc., Lincoln, NE, EUA) e em seguida foi seca em estufa a 60 °C para determinação da área foliar específica (área / matéria seca). O conteúdo de clorofila foliar foi quantificado a partir de 0,1 g de matéria seca utilizando clorofórmio, sendo a concentração de clorofila a, b e carotenoide determinada em espectrofotômetro (Wellburn, 1994). A densidade estomática foi avaliada pela contagem do número de estômatos/cm^2 usando uma câmera acoplada a microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2®) (Premiere® MA88-300).

2.2.4 TROCAS GASOSAS

As trocas gasosas foliares foram mensuradas na folha +1 usando um analisador de gás infravermelho (IRGA-6400). O horário de avaliação foi entre 8:30 e 12:00 am, utilizando 400 µmol mol^{-1} CO_2 com intensidade luminosa de 1500 µmol m^{-2} s^{-1}, câmara temperatura em bloco de 30 °C. Os parâmetros fisiológicos medidos foram: condutância estomática (*gs*), assimilação de CO_2 (A_N); taxa de transpiração (*E*), a eficiência do uso da água ($EUA = A_N/E$). Curva de luz e A_N/Ci foram mensurados através do modelo Von Caemmerer (2000), que foram calculados taxa fotossintética máxima (*Amax*), taxas máximas de Rubisco (*Vcmax*) e atividade da PEPcase (*Vpmax*).

2.2.5 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES

A extração dos açúcares nas raízes, colmo e folha foram realizadas pelo método (Bieleski e Turner, 1966). A folha +1, o terceiro entrenó do colmo principal e as raízes foram coletadas entre 10 e 12 horas. Os açúcares foram extraídos com 0,1 g de matéria seca em solução metanol/clorofórmio/água (MCW) na proporção 12: 5: 3 v/v, sendo incubados por aproximadamente 12 horas. Depois, as amostras foram centrifugadas a 10.000 *rpm* e os açúcares solúveis e a sacarose foram quantificados através no sobrenadante como descrito (Dubois et al., 1956; van Handel, 1968). Os açúcares redutores foram determinados pela diferença de açúcares solúveis totais e sacarose (Cunha et al., 2017). A concentração de amido no *pellet* foi quantificada de acordo com (Ribeiro et al. 2017; Dubois et al., 1956).

2.2.6 ATIVIDADE DE INVERTASE

A atividade da invertase foi mensurada no terceiro entre-nó do colmo principal. A extração foi realizada com amostras congeladas e homogeneizadas em 100 mM tampão acetato, pH + 5 (1: 3 de peso fresco / volume de tampão), contendo 7 mM EDTA e 100 uL de mecaptanol. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000g por 30 min, sendo o sobrenadante coletado para determinar o teor de proteína solúvel através de Bradford (1976). A determinação da atividade da invertase foi feita adicionando 20 µL do extrato da amostra, 100 mM de sacarose a 0,1 M, 80 mM de tampão de acetato, sendo incubado durante 30 min. A reação enzimática foi finalizada com a adição de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Em seguida as amostras foram incubadas a 95°C durante 30 minutos para determinação dos açúcares redutores. A atividade da enzima foi quantificada pela produção de açúcares redutores ao longo do período de incubação. Para aferir a atividade enzimática foi utilizado um branco para cada amostra, quantificando a concentração de açúcar redutores antes da reação enzimática. A determinação dos açúcares redutores foi realizada pelo método DNS (Miller, 1959) utilizando glicose para curva padrão (0- 900 µg / mL)

2.2.7 ANÁLISE ANATÔMICA

A análise anatômica foi realizada com folhas, colmo principal (terceiro entrenó) e raízes. As amostras foram fixadas com glutaraldeído e solução de formaldeído (Karnovsky

1965) e incubadas com solução alcólica nas concentrações (10, 20, 30, 40, 50,60, 70, 80, 90 e 100%) por 10 min. Em seguida foram feitos cortes nas amostras, sendo em seguida submetidas aos testes histoquímicos específicos para verificar a presença de polifenóis, proteínas e polissacarídeos realizado pela coloração periódica de ácido-Schiff e azul de naftol-preto (Fisher 1968). Nos cortes anatômicos os polissacarídeos da parede celular, o citoplasma e os amiloplastos foram identificados pela coloração rosa, enquanto os compostos fenólicos foram marcados com a cor laranja do ácido periódico de Schiff. As proteínas foram coradas de azul pelo naftol azul-preto. Todas as seções histológicas foram analisadas e fotografadas sob um microscópio de luz (Carl Zeiss-Jenemed2, Oberkochen, Alemanha) equipado com uma câmara Samsung (série SDC-313, Samsung Techwin Co., Ltd., cidade de Changwon, Coreia).

2.2.8 QUANTIFICAÇÃO ETILENO

A quantificação de etileno foi determinada coletando as folhas as 8:00 na posição (-1) não estando totalmente expandidas e os entrenós do colmo sendo colocadas em potes (3L) que foram vedados sendo deixados no escuro por 4 horas (Gao et al. 2015). O etileno foi determinado injetando 1 mL do gás foi injetado na Cromatografia gasosa equipado com chama de detector ionizante, programada nas seguintes condições: Temperatura da coluna foi 50°C e fluxo 50mL/min.

2.2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) através do software SISVAR (Ferreira, 2011). As comparações entre as médias foram realizadas pelo teste de T ($p<0,05$).

2.3 RESULTADOS

A análise de qPCR confirmou diferença de título bacteriano entre as plantas ($p<0,05$) (FIGURA 2). Após 40 dias, as plantas com alto título de *Lxx* apresentaram menor formação de perfilhos e maior diâmetro no colmo principal e área foliar (Figura 3). Para verificar se as

diferenças no desenvolvimento da cana-de-açúcar ocorreu em função de alguma modificação estrutural entre os órgãos, nós fizemos análises de anatomia em raiz, colmo e folha. Não foram observadas diferenças na área foliar específica e no crescimento de comprimento do colmo entre os tratamentos (SUPLEMENTAR 1). Não foi exibido diferença no acúmulo de proteínas e fenólicos em função do título bacteriano entre os órgãos analisados (FIGURA 4E, F). A análise anatômica foliar também não evidenciou diferença visual no acúmulo de açúcares. Já no colmo, as plantas com alto título bacteriano apresentaram maior concentração de açúcares (FIGURA 4D) do que plantas com menor título bacteriano (FIGURA 4C). Interessante, é ver que o acúmulo de açúcares está associado ao rápido desenvolvimento do colmo principal, observado pelo maior número de células do parênquima. Contudo, plantas com baixo título bacteriano apresentam menor diferenciação no colmo principal, exibindo menor formação de células do parênquima e a presença da epiderme adaxial e abaxial. Nas raízes, as plantas com baixo título bacteriano (FIGURA 4A) apresentaram maior acúmulo de amido (FIGURA 4B). Em todos os órgãos analisados, não foram observadas alterações estruturais ou danos celulares em função do crescimento bacteriano na planta.

A assimilação de CO_2 (A_N) e condutância estomática (*gs*) foi superior nas plantas com maior título bacteriano (FIGURA 5). Não foram verificadas diferenças na taxa de transpiração (*E*), na eficiência no uso da água (*EUA*) e concentração de clorofila a e b, carotenóides em função da diferença no título bacteriano da planta (SUPLEMENTAR 1). Nós observamos que plantas com alto título bacteriano modificram seu desenvolvimento, exibindo uma menor formação de perfilhos e uma maior área foliar. A partir deste resultado nós decidimos investigar se o aumento na taxa fotossintética poderia ser causado por uma mudança morfológica, a partir do aumento no número de estômatos na folha. Nós não detectamos alteração no número de estômatos em função do crescimento bacteriano da planta (SUPLEMENTAR 2). Não havendo diferenças morfológicas, decidimos avaliar se a diferença na taxa fotossintética ocorreu a nível bioquímico. O aumento da fotossíntese nas plantas com maior título *Lxx* é resultado do aumento da atividade da PEPcase, pois não foram detectadas diferenças na atividade da Rubisco (Vc_{Max}) e na taxa fotossintética máxima (A_{max}). Além disso, foi observado aumento na taxa de respiração nas plantas com alto título bacteriano.

A partir das análises fotossintéticas e anatômica, nós decidimos analisar a quantificação de açúcares não-estruturais entre os órgãos. O acúmulo de amido na folha foi superior nas plantas com alto título bacteriano (FIGURA 7). Porém as concentrações de açúcares redutores e sacarose na folha não apresentaram diferença em função do crescimento bacteriano. Contudo, no colmo principal, as plantas com alto título bacteriano exibiram maior

acúmulo de sacarose e amido. A concentração de sacarose no colmo principal foi 40% maior nas plantas com alto título bacteriano, que também exibiram uma maior relação sacarose/hexose. Ao contrário do resultado encontrado nas folhas, nas raízes a concentração de amido foi superior nas plantas com baixo título bacteriano. Na raiz não foram observadas diferenças nas concentrações de açúcar redutores e sacarose. As plantas com maior título de *Lxx* exibiram menor atividade de invertase em relação as plantas com baixo título de *Lxx* ($p<0,05$).

A produção de biomassa total não diferiu em razão do título bacteriano nas plantas ao longo dos quatro meses de experimento, porém foi observado diferença no particionamento de biomassa entre os órgãos. As plantas com alto título bacteriano aumentaram em 70% o acúmulo de biomassa no colmo principal em relação as plantas com menor título *Lxx* (FIGURA 10). Além disso, verificou-se menor acúmulo de matéria seca nos perfilhos e raízes (FIGURA 1, 10 e SUPLEMENTAR 3) e maior relação parte aérea/raiz nas plantas com menor título bacteriano. No entanto, o acúmulo biomassa na parte aérea total não diferiu entre os tratamentos.

2.4 DISCUSSÃO

A redução na produtividade na cana-de-açúcar com RS, está associada com as mudanças no desenvolvimento da cana-de-açúcar, a partir da redução do crescimento dos colmos e da formação de perfilhos (Bailey & Bechet, 1997, 1995b; Gagliardi et al., 2009). Nosso estudo demonstrou que o aumento do título de *Lxx* causou mudanças no desenvolvimento da cana-de-açúcar. Os sintomas observados pelas plantas com maior título de *Lxx* foram: crescimento compacto verificado com redução da distância entre os fitômeros. No desenvolvimento da folha, as plantas com alto título de *Lxx* exibiram um desenvolvimento mais lento com formação tardia da lígula e da bainha (FIGURA 1G, H). Além disso, aumento do título bacteriano na planta desencadeou uma menor formação dos perfilhos e um aumento no diâmetro no colmo principal (FIGURA 1). Interessante, é a menor formação de perfilhos está associada ao rápido desenvolvimento do entrenó no colmo principal (FIGURA 1C, D e E). O rápido desenvolvimento do entrenó ligado ao aumento no diâmetro do colmo principal é resultado da rápida diferenciação celular para formação do colmo, verificado pelo aumento no número de células parenquimáticas. Os sintomas da doença podem estar associados pelo crescimento do título bacteriano induzir a expressão de genes *core sensing* liberando proteínas efetoras que modulam o desenvolvimento da planta (Cia et al. 2018; Monteiro-Vitorello et al., 2004; Davis et al., 1988).

As diferenças no desenvolvimento nas plantas com maior título bacteriano está associada com um desbalanço hormonal na planta. As plantas com RS apresentam uma menor síntese auxina e ácido giberélico e um aumento na concentração de ácido abcísico no colmo (Zhang et al. 2016). Tais alterações hormonais também estão associadas com o aumento na expressão do gene de biossíntese de ABA e etileno, que são os hormônios que inibem o crescimento das plantas (Cia et al. 2018). No entanto, o aumento do título de *Lxx* reduziu a síntese de etileno na folha e no colmo das plantas. O etileno é um hormônio que está envolvido nas respostas aos estresses abióticos e bióticos, controlando a resposta de defesa e crescimento na cana-de-açúcar (Cunha et al., 2017; Gao et al., 2015). No desenvolvimento da cana-de-açúcar, o etileno induz o perfilhamento e reduz a área foliar e o crescimento dos entrenós do colmo (Chong et al., 2010; Mishra et al., 2014). A inibição no crescimento causado pelo etileno decorre pelo hormônio inibir a divisão, expansão e diferenciação celular (Dubois et al., 2018). Estudos mostraram que a diminuição na concentração de etileno pode estimular o aumento na área foliar (Lee & Reid, 1997; Fiorani et al., 2019). Portanto, a redução no perfilhamento e o aumento da área foliar observado nas plantas com maior título bacteriano estão associados também com à redução na síntese de etileno.

A fotossíntese e a taxa respiratória aumentaram na cana-de-açúcar nas plantas com maior título bacteriano. O aumento da fotossíntese não foi resultado de um aumento no número de estômatos ou por alguma mudança estrutural nos tecidos da folha, mas pelo aumento da atividade da PEPcase, que favoreceu para aumentar a fixação de carbono pela planta. O aumento da atividade da PEPcase ocorreu pela a]] maior difusão de CO_2 no espaço apoplástico das células do mesofilo proporcionada pela maior condutância estomática nas plantas com alo título bacteriano. Além disso, nossos resultados mostraram que o crescimento bacteriano não causou danos estruturais na planta, não sendo observado diferença estrutural nos tecidos dos órgãos. Não foi observado redução no teor de clorofila foliar nas plantas com maior título bacteriano, 4 meses após o plantio. Assim, a degradação da clorofila foliar verificada por Zhang et al. (2016), com onze meses após inoculação de *Lxx*, pode ser causada por alguma alteração fisiológica na planta desencadeada pelo crescimento bacteriano ao longo do desenvolvimento da cana-de-açúcar (Zhang et al., 2016b). Por outro lado, a respiração foi superior nas plantas com maior título de *Lxx*, mostrando uma maior demanda energética com o aumento no título bacteriano.

O acúmulo de açúcar na cana-de-açúcar diferiu entre os órgãos em função do título bacteriano. Na folha, o crescimento do título bacteriano na planta resultou no maior acúmulo de amido na folha em relação às plantas com baixo título de *Lxx*. O maior acúmulo de amido

nas plantas com alto título de *Lxx*, é consequência da maior fotossíntese verificada nestas plantas. Pois, o amido é sintetizado no cloroplasto a partir o excesso de açúcares produzidos pela fotossíntese, que são compostos temporários de reserva durante o dia, sendo metabolizados no período noturno pelas plantas (Macneill et al., 2017; Thalmann & Santelia, 2017). Parte da síntese de carboidratos nas folhas é transportado para colmo e raízes da cana-de-açúcar (Wang et al., 2013). Desta forma, o crescimento bacteriano na planta altera a alocação de carbono entre os órgãos na cana-de-açúcar, havendo maior acúmulo de sacarose e amido no colmo principal. O aumento da concentração de sacarose no colmo principal está associado à redução da atividade da invertase da parede celular e com o aumento na formação das células do parênquima do colmo. O colmo é o principal órgão dreno de açúcares, onde os açúcares são armazenados nas células parenquimáticas na cana-de-açúcar. A invertase da parede celular é uma enzima que atua na redistribuição de açúcares entre os órgãos drenos, a partir da clivagem da sacarose em frutose e glicose (Koch, 2004). Portanto, o aumento do acúmulo de sacarose e amido é causado pelo menor fornecimento de açúcares para os órgãos dreno e pelo rápido processo de diferenciação no colmo das plantas.

2.4.1 RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS AFETA PARTIONAMENTO DE CARBONO NA CANA-DE-AÇÚCAR

No campo, a RS reduz a produtividade da cana-de-açúcar por induzir mudanças no desenvolvimento das plantas, afetando a partição de carbono entre os órgãos. A alteração no desenvolvimento da cana-de-açúcar como a redução do perfilhamento e diâmetro do colmo está associado ao *crosstalk* entre ABA e etileno. Em Arabidopsis, o ABA controla o desenvolvimento atuando como regulador negativo do crescimento da gema axilar (Yao et al. 2015; Holalu 2018). Os mutantes em biossíntese de ABA, *aba 2-1* e *nced* em arabidopsis, aumentaram a ramificação em relação ao selvagem (Yao et al. 2015; Holalu et al.2018). ABA inibe o desenvolvimento da gema axilar, inibindo a expressão dos genes do ciclo celular e da síntese de auxina na planta (Yao et al. 2015). Os mesmos resultados são observados na cana-de-açúcar, onde as plantas com aumento do título de *Lxx*, reduz o perfilhamento, aumenta concentração de ABA no colmo e inibe a expressão dos genes do ciclo celular (Zhang et al. 2016; Cia et al. 2018). O nível crescente de ABA está associado ao controle de perfilhos, pelo hormônio inibir o crescimento das gemas (Ortiz-Morea et al., 2013); além de também atuar no controle dos perfilhos da planta, por induzir o processo senescência (Vasantha et al., 2012).

Assim, a redução dos perfilhos em plantas com RS é causada pelo aumento do nível ABA e redução no nível de etileno no colmo principal.

Essas mudanças de desenvolvimento nas plantas doentes, afetam o particionamento de carbono por reduzir a formação dos órgãos drenos. Em nosso estudo, a cana-de-açúcar com alto título de *Lxx* , aumentou a alocação de biomassa para o colmo principal e produziu menos biomassa para formação perfilhos e raízes. O aumento da produção de biomassa no colmo principal nas plantas com maior título de *Lxx* foi acompanhado com um aumento no acúmulo de carboidratos não estruturais. O acúmulo de sacarose e amido no colmo principal ocorreu pelo aumento no carregamento de açúcares do floema para ser transportado e armazenado no colmo, devido ao menor alocação de energia para formação de perfilhos (FIGURA 11). Plantas com alto título de *Lxx* aumentam a expressão de *SWEET14*, que é um transportador de açúcar para o carregamento do floema (Cia et al. 2018, Chen et al. 2012). O *SWEET14* é homólogo do *SWEET11* em Arabidopsis, cuja função é transportar açúcares para o floema, principalmente na forma de sacarose (Chen et al., 2012). Por outro lado, os perfilhos da cana-de-açúcar são órgãos drenos que recebem e o transporte dos açúcares pelo floema, sendo metabolizados para síntese dos componentes estruturais da célula para crescimento dos perfilhos. O crescimento bacteriano de *Lxx* na cana-de-açúcar reduziu a atividade da invertase da parede celular, que é essencial para o descarregamento dos açúcares no floema para os órgãos drenos (Kock, 2004). A inibição do perfilhamento na cana-de-açúcar é causada pela menor hidrólise de sacarose para os perfilho, havendo uma menor disponibilidade de hexoses para o metabolismo das gemas. A redução na disponibilidade de carboidratos para as gemas está associada ao rápido desenvolvimento basal dos entrenós, que é um forte dreno de carboidratos. O rápido desenvolvimento dos entrenós é evidenciado pelo aumento na formação das células parenquimáticas, que é o tecido responsável pelo armazenamento de sacarose no colmo (FIGURA 12). O crescimento bacteriano na planta induz processo de diferenciação nas células do parênquima no colmo a partir da redução da atividade da invertase e ao acúmulo de sacarose e amido (Borisjuk et al., 2003, 2002). Os mesmos resultados também são observados no mutante *tin* em trigo, onde a ausência do gene inibidor de perfilhos (*TIN*) apresentou redução no perfilhamento, rápido desenvolvimento dos entrenós e acúmulo de açúcar no caule na fase reprodutiva (Kebrom et al., 2012; Kebrom, 2017).

Portanto, as alterações fisiológicas desencadeadas pelo crescimento bacteriano na planta pode promover ums maturação precoce nos entrenós do colmo principal. Contudo, é provável que o açúcar seja acumulado mais lentamente nos perfilhos, uma vez que pouco é disponibilizado para sua formação e crescimento, podendo inclusive resultar em um acúmulo

de açúcar tardio de açúcares no perfilho em relação ao colmo principal. Há evidências em alguns genótipos que a RS elevaram o acúmulo de sacarose nos colmos (Bailey & Bechet, 1997, 1995a). Todavia, a maioria dos genótipos de cana-de-açúcar estudados exibiram menor acúmulo de sacarose nos colmos. Talvez, o menor desempenho das plantas com alto *Lxx* seja causado pela avaliação haver sido realizada nos perfilhos, onde o desenvolvimento e acúmulo de açúcar pode ser mais lento que o colmo principal.

2.5 CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que o impacto do crescimento do título de *Lxx* no particionamento de açúcares e biomassa na cana-de-açúcar. O crescimento bacteriano na planta causou mudança no desenvolvimento da cana-de-açúcar a partir da redução da síntese de etileno na folha e colmo, havendo uma redução no perfilhamento, aumento na área foliar e no diâmetro do colmo principal. A menor formação de perfilhos pode estar associada à menor descarga de floema, afetada pela menor atividade de invertase da parede celular. O acúmulo de açúcar no colmo principal ocorre pelo rápido desenvolvimento dos entrenós e do menor perfilhamento na cana-de-açúcar com alto título bacteriano.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código Financeiro 001 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa PROCESSO 169260 / 2017-8. Também gostaríamos de agradecer a Pedro Conceição Arthuso, Marcos José Trevisan, Arthur Roberto Silva, Nivanda Maria de Moura Ruiz e Edson Ademir de Moraes pelo apoio na condução deste experimento.

REFERÊNCIAS

ALEXIEVA, V. et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337–1344, 2001.

ALHENDAWI, R. A.; KIRKBY, E. A.; PILBEAM, D. J. Evidence that sulfur deficiency enhances molybdenum transport in xylem sap of tomato plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 28, n. 8, p. 1347–1353, 2005.

ALTIERI, M.; BRAVO, E. The ecological and social tragedy of crop-based biofuel production

in the Americas. **Food First/Institute for Food & Development Policy**, v. 2006, n. Pimentel 2003, p. 1–5, 2007.

BAILEY, R. A. THE EFFECT OF HOT WATER TREATMENTS, RATOON STUNTING DISEASE AND MOISTURE STRESS ON THE INCIDENCE OF SMUT IN SUGARCANE. 1977.

BAILEY, R. A.; BECHET, G. R. The effect of ratoon stunting disease on the yield of some south african sugarcane varieties under irrigated and rainfed conditions. **Proceedings of The South Africar Sugar Technologists Assocation**, n. June, p. 74–78, 1995.

BAILEY, R. A.; BECHET, G. R. Further evidence of the effects of ratoon stunting disease on production under irrigated and rainfed conditions. **Proceedings of The South Africar Sugar Technologists Assocation**, v. 71, n. September 1995, p. 97–101, 1997.

BAILLIE, C. K. et al. Apoplastic peroxidases enable an additional sulphite detoxification strategy and act as first line of defence upon exposure to sulphur containing gas. **Environmental and Experimental Botany**, v. 157, n. August 2018, p. 140–150, 2019.

BATES, L. S.; R.P., W.; I.D., T. Rapid determination of free proline for w a t e r - s t r e s s studies. **Plant and Soil**, v. 207, p. 205–207, 1973.

BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and Estimation of Amino Acids in Crude Plant Extracts by Thin-Layer Electrophoresis and Chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 293, p. 278–293, 1966.

BLOEM, E. et al. Facts and fiction about sulfur metabolism in relation to plant-pathogen interactions. **Plant Biology**, v. 9, n. 5, p. 596–607, 2007.

BLOEM, E.; HANEKLAUS, S.; SCHNUG, E. Significance of sulfur compounds in the protection of plants against pests and diseases. **Journal of Plant Nutrition**, v. 28, n. August 2014, p. 763–784, 2005.

BLOEM, E.; HANEKLAUS, S.; SCHNUG, E. Milestones in plant sulfur research on sulfur-induced-resistance (SIR) in Europe. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. January, p. 1–12, 2015.

CALDANA, C. et al. Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in Arabidopsis thaliana. **Plant Journal**, v. 73, n. 6, p. 897–909, 2013.

CARVALHO, G. et al. Development of a qPCR for Leifsonia xyli subsp . xyli and quanti fi cation of the effects of heat treatment of sugarcane cuttings on Lxx. **Crop Protection**, v. 80, p. 51–55, 2016.

CHEN, L. et al. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. **Nature**, v. 468, n. 7323, p. 527–532, 2010.

CIA, M. C. et al. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, v. 161, n. 3, p. 313–324, 2012.

CIA, M. C. et al. Novel Insights Into the Early Stages of Ratoon Stunting Disease of Sugarcane Inferred from Transcript and Protein Analysis. **Phytopathology**, v. 108, n. 12, p. 1455–1466, 2018.

CONAB. Monitoramento agrícola- Cana-de-açúcar. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 5, p. 1–86, 2018.

DAVIS, M. J. et al. Ratoon Stunting Disease of Sugarcane : Isolation of the Causal Bacterium. 1980.

DAVIS, M. J.; DEAN, J. L.; HARRISON, N. A. Quantitative Varability of Clavibacter xyli

subsp. xyli population in sugarcane cultivars differing in resistance to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, v. 78, n°4, p. 462–468, 1988.

DE LA FUENTE, L. et al. The Bacterial Pathogen Xylella fastidiosa Affects the Leaf Ionome of Plant Hosts during Infection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–9, 2013.

ELSAYED, A. I.; RAFUDEEN, M. S.; GOLLDACK, D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: Protection against abiotic stress. **Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2014.

EVTUSHENKO, L. I. et al. 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 Da. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 2000, p. 371–380, 2000.

FATIMA, U.; SENTHIL-KUMAR, M. Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. September, p. 1–12, 2015.

FERREIRA, D. F. SISVAR : A COMPUTER STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM Sisvar : um sistema computacional de análise estatística. p. 1039–1042, 2011.

FU, X. et al. Physiological response and sulfur metabolism of the V. dahliae-infected tomato plants in tomato/potato onion companion cropping. **Scientific Reports**, v. 6, n. 59, p. 36445, 2016.

GAGLIARDI, P. R.; CAMARGO, L. E. A. Resist??ncia de variedades comerciais de cana-de-a????car ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. **Ciencia Rural**, v. 39, n. 4, p. 1222–1225, 2009.

GLAGLIARDI, R.; CAMARGO, L. E. A. Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do. **Online**, p. 1–4, 2000.

GLASSOP, D. et al. Changes in the sugarcane metabolome with stem development. Are they related to sucrose accumulation? **Plant and Cell Physiology**, v. 48, n. 4, p. 573–584, 2007.

HÄNSCH, R. et al. Significance of plant sulfite oxidase. **Plant Biology**, v. 9, n. 5, p. 589–595, 2007.

HANSTEIN, S. et al. Changes in cytosolic Mg 2+ levels can regulate the activity of the plasma membrane H + -ATPase in maize. **Biochemical Journal**, v. 435, n. 1, p. 93–101, 2011.

HEATH, R.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated Chloroplasts of Fatty Acid Peroxidation chlorophyll. **Archives of biochemistry and biophisics**, v. 126, n. 45, p. 189–198, 1968.

HUNG, W. L.; WANG, Y. A Targeted Mass Spectrometry-Based Metabolomics Approach toward the Understanding of Host Responses to Huanglongbing Disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 40, p. 10651–10661, 2018.

JACOBY, R. P.; KOPRIVA, S. Metabolic niches in the rhizosphere microbiome: New tools and approaches to analyse metabolic mechanisms of plant-microbe nutrient exchange. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 4, p. 1087–1094, 2019.

JAMES, B. G. L. THE EFFECT OF RATOON STUNTING DISEASE ON THE EXPRESSION OF SMUT SYMPTOMS. **Proceedings of The South Africar Sugar Technologists Assocation**, n. June, p. 2–5, 1976.

KANNAN, S.; RAMANI, S. Studies on Molybdenum Absorption and Transport in Bean and Rice. **Plant Physiology**, v. 62, n. 2, p. 179–181, 1978.

KOFALVI, S. A.; NASSUTH, A. **Influence of wheat streak mosaic virus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat**47, 35-377, , 1995.

KOPRIVOVA, A.; KOPRIVA, S. Hormonal control of sulfate uptake and assimilation. **Plant Molecular Biology**, v. 91, n. 6, p. 617–627, 2016.

KUSHALAPPA, A. C.; GUNNAIAH, R. Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 9, p. 522–531, 2013.

LIMA, K. et al. Temporal dynamic responses of roots in contrasting tomato genotypes to cadmium tolerance. p. 245–258, 2018.

LISEC, J. et al. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 387–396, 2006.

LOWE-POWER, T. M. et al. Metabolomics of tomato xylem sap during bacterial wilt reveals Ralstonia solanacearum produces abundant putrescine, a metabolite that accelerates wilt disease. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 1330–1349, 2018.

MACEDO, I. C. Sugar Cane's Energy: Twelve studies on Brazilian sugar cane agribusiness and its sustainability. **Unica**, n. October, p. 1–230, 2007.

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

MISZALSKI, Z.; ZIEGLER, H. Superoxide Dismutase and Sulfite Oxidation. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 47, n. 5–6, p. 360–364, 1992.

MONTEIRO-VITORELLO, C. B. et al. The Genome Sequence of the Gram-Positive Sugarcane Pathogen Leifsonia xyli subsp . xyli. v. 17, n. 8, p. 827–836, 2004.

NAUMANN, M. et al. Sulfite reductase co-suppression in tobacco reveals detoxification mechanisms and downstream responses comparable to sulfate starvation. **Frontiers in Plant Science**, v. 871, n. October, p. 1–18, 2018.

NDC BRASIL, R. F. DO B. Contribuição Nacionalmente Determinada Para Consecução Do Objetivo Da Convenção-Quadro Das Nações Unidas Sobre Mudança Do Clima. **Unfccc**, v. 9, p. 6, 2015.

OAKLEY, A. J. Glutathione transferases: New functions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 15, n. 6, p. 716–723, 2005.

OMENA-GARCIA, R. P. et al. Identification of metabolite traits from the current metabolomic approaches. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 31, n. 1, p. 1–19, 2019.

PRODHAN, M. A. et al. Tight control of sulfur assimilation: an adaptive mechanism for a plant from a severely phosphorus-impoverished habitat. **New Phytologist**, v. 215, n. 3, p. 1068–1079, 2017.

QUECINE, M. C. et al. A stable Leifsonia xyli subsp . xyli GFP-tagged strain reveals a new colonization niche in sugarcane tissues. p. 154–162, 2016.

RAHMAN, M. A.; ABDULLAH, H.; VANHAECKE, M. Histopathology of susceptible and

resistant Capsicum annuum cultivars infected with Ralstonia solanacearum. **Journal of Phytopathology**, v. 147, n. 3, p. 129–140, 1999.

RAI, V. K. **Role of amino acids in plant responses to stressesBiologia Plantarum**, 2002.

SÁNCHEZ-ELORDI, E. et al. Polyamines levels increase in smut teliospores after contact with sugarcane glycoproteins as a plant defensive mechanism. **Journal of Plant Research**, v. 132, n. 3, p. 405–417, 2019.

SCHAKER, P. D. C. et al. Metabolome dynamics of smutted sugarcane reveals mechanisms involved in disease progression and whip emission. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. May, p. 1–17, 2017.

TEAKLE, D. S.; APPLETON, J. M.; STEINDL, D. R. L. An anatomical basis for resistance of sugar cane to ratoon stunting disease. **Physiological Plant Pathology**, v. 12, n. 1, p. 83–91, 1978.

URASHIMA, A. S. et al. Prevalence and Severity of Ratoon Stunt in Commercial Brazilian Sugarcane Fields. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 815–821, 2017.

VAN DE MORTEL, J. E. et al. Metabolic and Transcriptomic Changes Induced in Arabidopsis by the Rhizobacterium Pseudomonas fluorescens SS101 . **Plant Physiology**, v. 160, n. 4, p. 2173–2188, 2012.

VAN GENUCHTEN, M. T. **van_Genuchten1980.pdfSoil. Sci. Soc. Am.**, 1980.

VILAS, J. M. et al. Modulation of plant and bacterial polyamine metabolism during the compatible interaction between tomato and Pseudomonas syringae. **Journal of Plant Physiology**, v. 231, n. September, p. 281–290, 2018.

WEAVER, L.; TEAKLE, D. S.; HAYWARD, A. C. Ultrastructural studies on the bacterium associated with the ratoon stunting disease of sugarcane. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 28, n. 5, p. 843–852, 1977.

WILLIAMS, J. S. et al. Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. **Plant physiology**, v. 128, n. 1, p. 150–159, 2002.

WONG, J. W. H. et al. The Influence of Contrasting Microbial Lifestyles on the Pre-symbiotic Metabolite Responses of Eucalyptus grandis Roots. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, n. February, 2019.

YADETA, K. A. et al. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. v. 4, n. April, p. 1–12, 2013.

YARMOLINSKY, D. et al. Sulfite reductase protects plants against sulfite toxicity. **Plant Physiology**, v. 161, n. 2, p. 725–743, 2013.

YOUNG, A. J. Possible origin of ratoon stunting disease following interspecific hybridization of Saccharum species. 2016.

YOUNG, A. J. et al. Molecular Detection of Diverse Leifsonia Strains Associated With Sugarcane. **Plant disease**, v. 101, n. 8, p. 1422–1431, 2017.

ZEIER, J. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, n. 12, p. 2085–2103, 2013.

ZHANG, X. et al. Morphological and physiological responses of sugarcane to Leifsonia xyli subsp. xyli infection. **Plant Disease**, v. 100, n. December, p. 1–8, 2016a.

ZHANG, X. et al. Influence of Inoculation of Leifsonia xyli subsp . xyli on Photosynthetic Parameters and Activities of Defense Enzymes in Sugarcane. **Sugar Tech**, 2016b.

FIGURAS

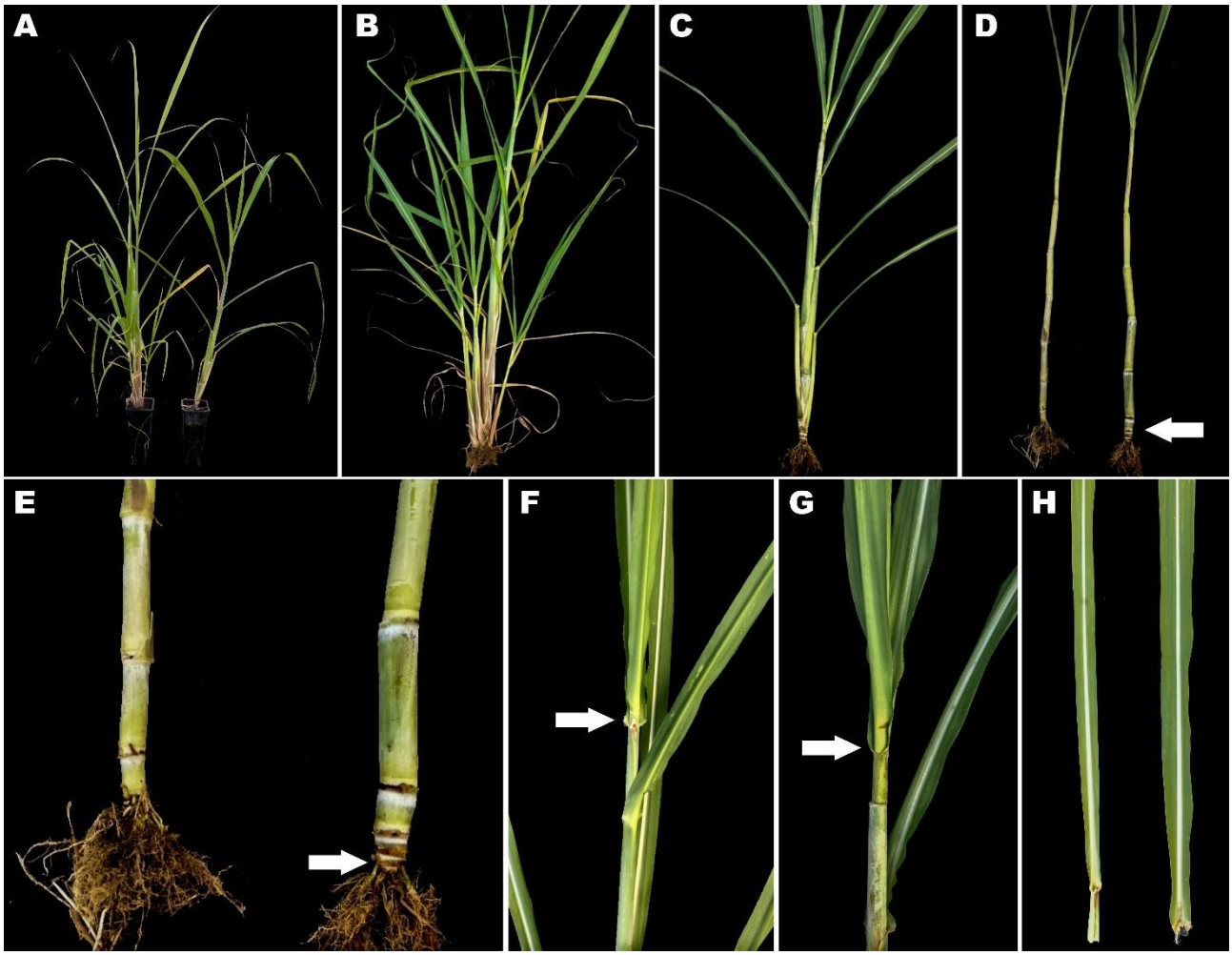


Figura 1. A) Cana-de-açúcar com baixo título de *Lxx* e cana-de-açúcar e com alto título de *Lxx* em vasos. B) Plantas com baixo título de *Lxx* exibindo perfilhamento. C) Plantas com alto título de *Lxx* sem perfilhamento, D) e E) Colmo principal das plantas com baixo título de *Lxx* e alto título de *Lxx*. Setas indicanm rápido desenvolvimento dos entrenós. F) Plantas com baixo título de *Lxx* com presença da lígula na folha +1. G) Plantas com alto título de *Lxx* com ausência da lígula na Folha +1. Setas indicanm desenvolvimento folha +1 nas plantas com baixo título de *Lxx* (F) e alto título de *Lxx*. H) Folha +1 das plantas com baixo título de *Lxx* (à esquerda) e alto título de *Lxx* (à direita).

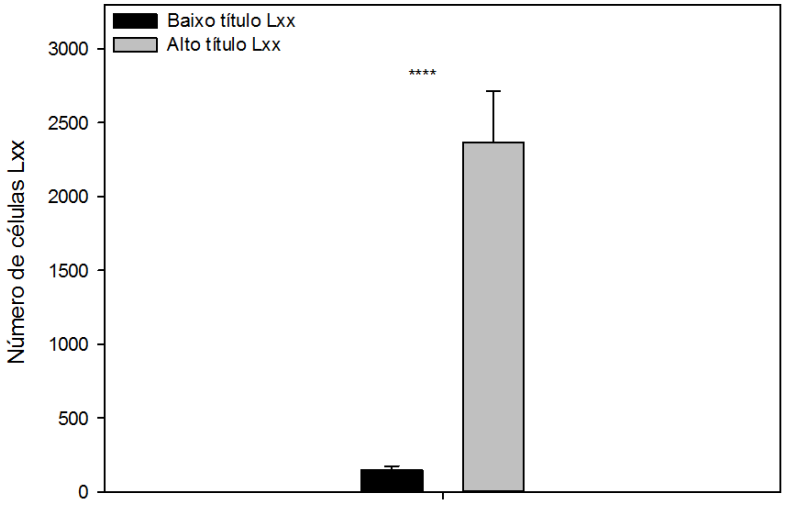


Figura 2. Quantificação do número de bactérias na planta (número de células *Lxx* / 100ng de DNA vegetal) realizadas por meio de qPCR entre tratamentos de cana-de-açúcar (n=4). A diferença entre as médias dos tratamentos foram obtidas pelo teste t ($p<0,05$).

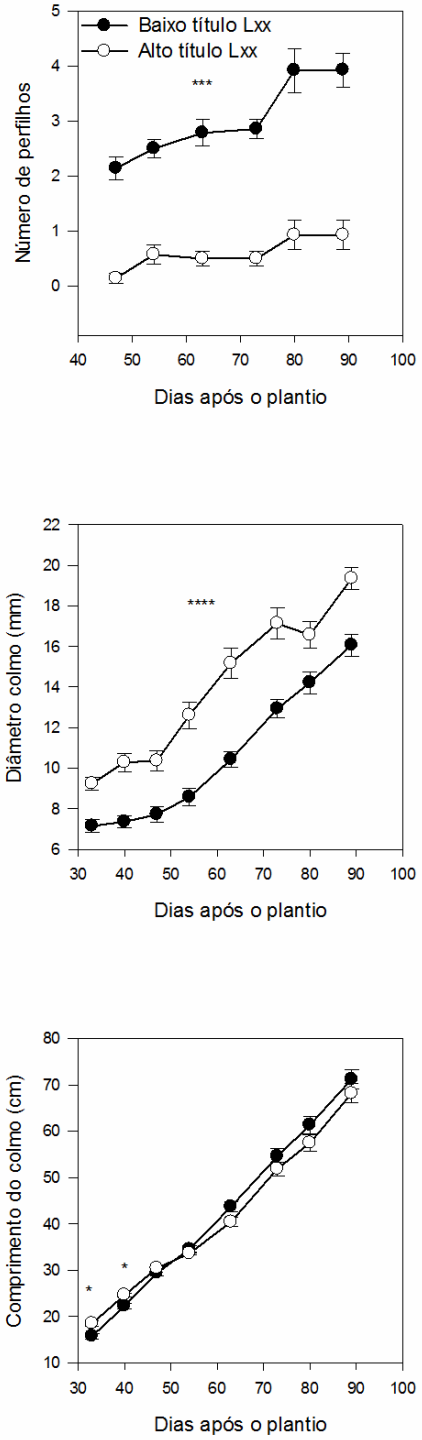


Figura 3. Perfilho, diâmetro do caule e crescimento caem nos tratamentos baixo título *Lxx* e alto título *Lxx* (n = 14). A diferença entre as médias dos tratamentos foram obtidas pelo teste t ($p<0,05$).

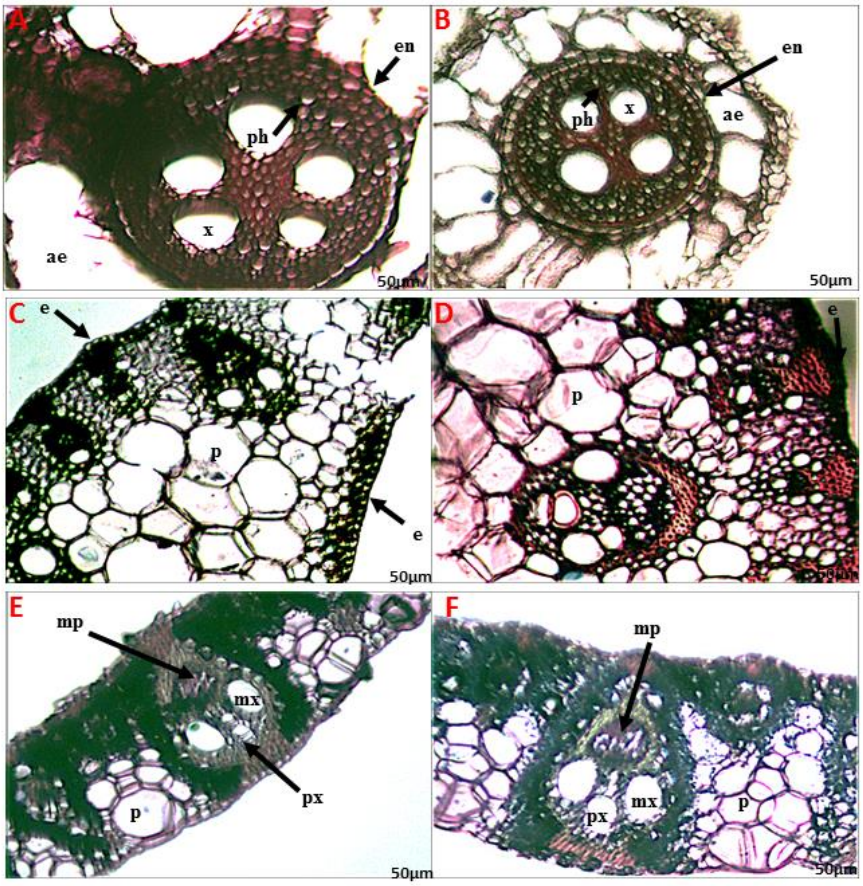


Figura 4. Análise anatômica nas raízes dos órgãos, colmo e folha (n = 4) nos tratamentos: baixo título de *Lxx* (A, C e E) e alto título de *Lxx* (B, D, F). As letras na figura representam: epiderme (e), xilema (x), floema (ph), endoderme (en), aerênquima (ae).

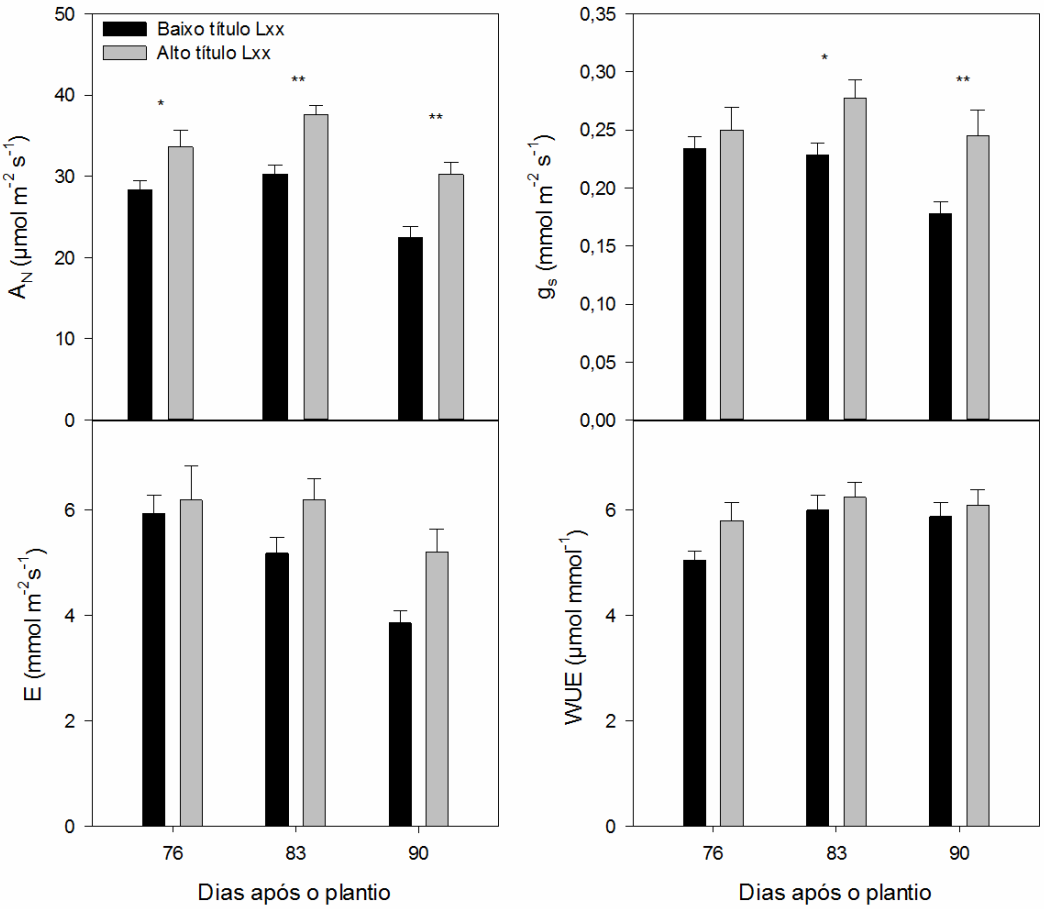


Figura 5. Análise de assimilação de CO_2 (A_N), condutância estomática (*gs*), taxa de transpiração (*E*) e eficiência de uso de água (*EUA*) nos tratamentos baixo título de *Lxx* baixo e alto título de *Lxx* (n = 11). A diferença entre as médias dos tratamentos foram obtidas pelo teste t ($p<0,05$).

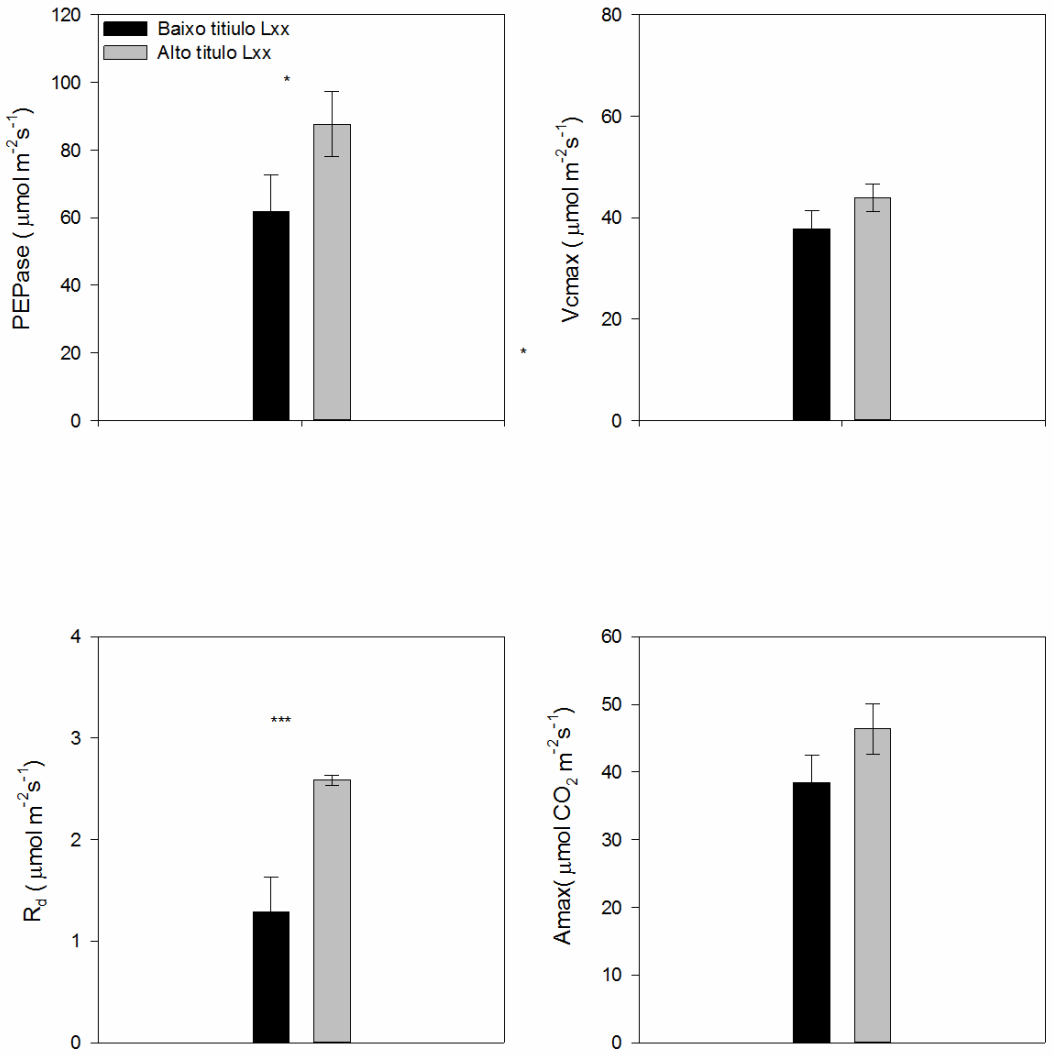


Figura 6. Atividade da Pepcase, Atividade da Rubisco, taxa fotossintética máxima (*Amax*) e respiração noturna (*Rd*) avaliado nas plantas dos tratamentos com baixo título de *Lxx* baixo e alto título de *Lxx* (n = 3) A diferença entre as médias dos tratamentos foram obtidas pelo teste t ($p<0,05$).

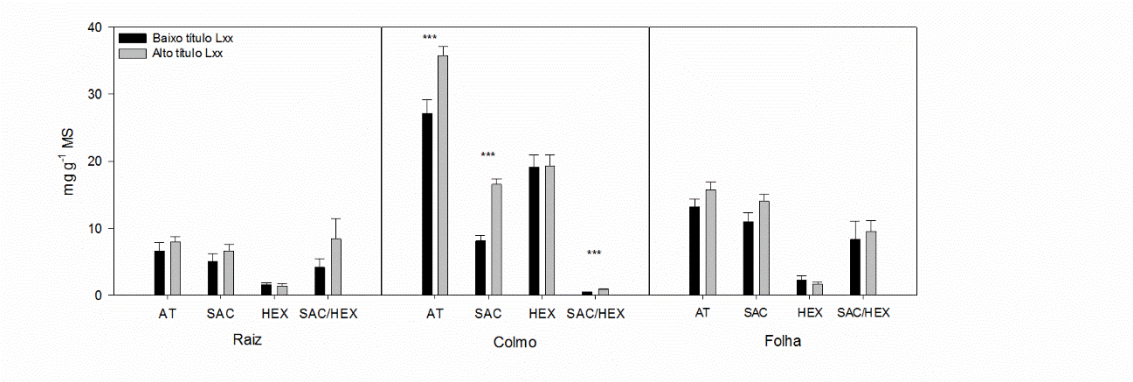


Figura 7. Teor de açúcar total, sacarose, hexose (açúcar redutor) e relação sacarose hexose^{-1} analisados na raiz, folha +1, colmo principal entre os tratamentos baixo título de *Lxx* baixo e alto título de *Lxx* (n = 6). A diferença entre as médias dos tratamentos foram obtidas pelo teste t (p<0,05).

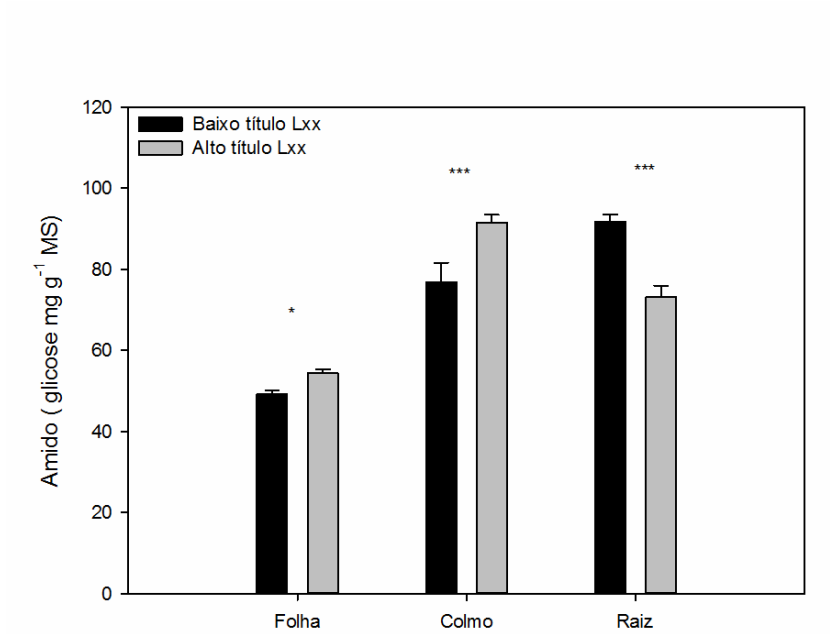


Figura 8. Concentração de amido nos órgãos: folha, colmo e raiz analisados nos tratamentos tratamentos baixo título de *Lxx* e alto título de *Lxx* (n = 6). A diferença entre as médias dos tratamentos foram obtidas pelo teste t (p<0,05).

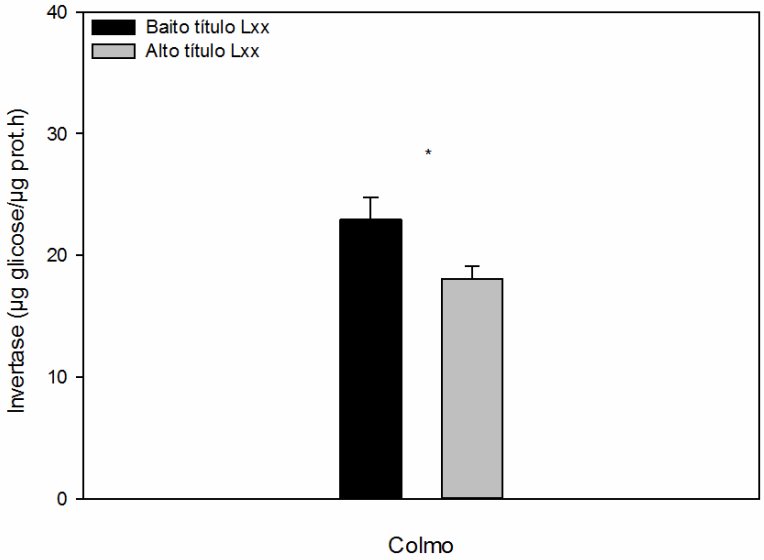


Figura 9. Atividade de invertase de parede celular no colmo analisado nos tratamentos tratamentos baixo título de *Lxx* e alto título de *Lxx* (n = 5). A diferença entre as médias dos tratamentos foram obtidas pelo teste t (p<0,05).

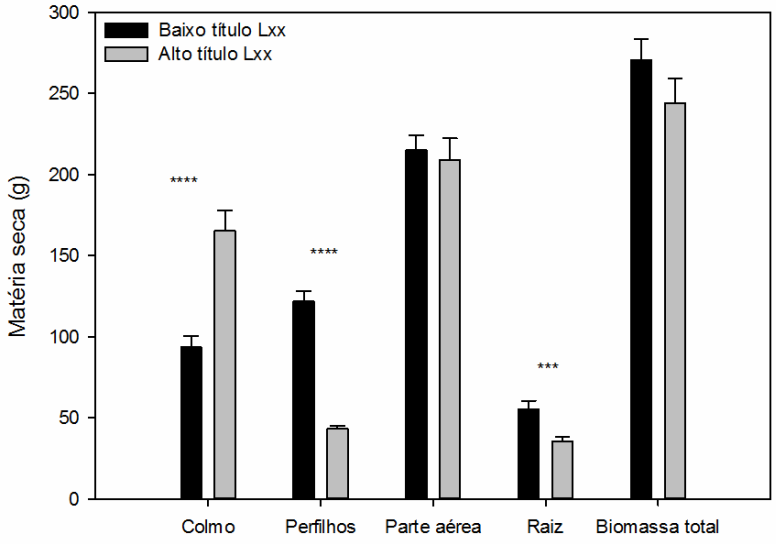


Figura 10. Acúmulo de massa seca entre os órgãos principal colmo, perfilhos, raiz, parte aérea e biomassa nos tratamentos baixo título de *Lxx* e alto título de *Lxx* (n = 11) A diferença entre as médias dos tratamentos foram obtidas pelo teste t (p<0,05).

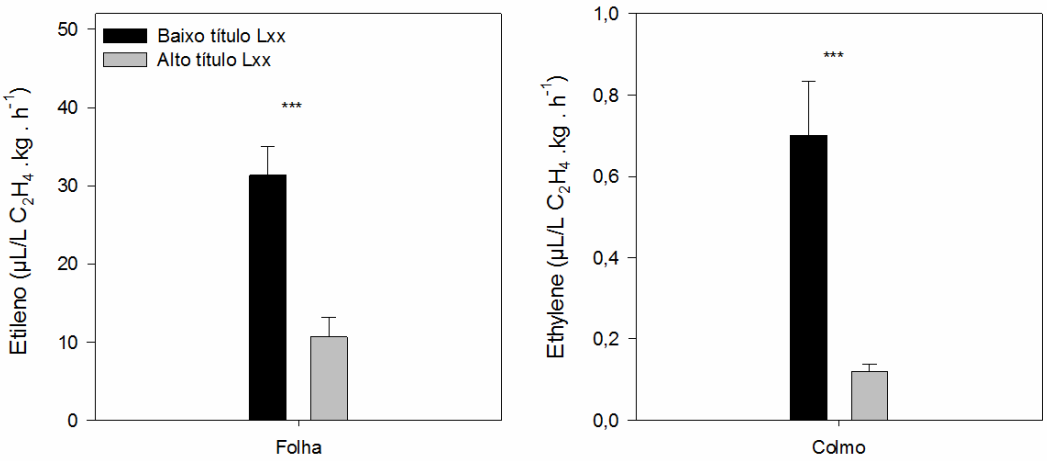


Figura 11. Concentração de Etileno na folha (n = 4) e no colmo principal (n = 8) nas plantas com baixo título de *Lxx* e alto título de *Lxx*. A diferença entre as médias dos tratamentos foram obtidas pelo teste t ($p<0,05$).

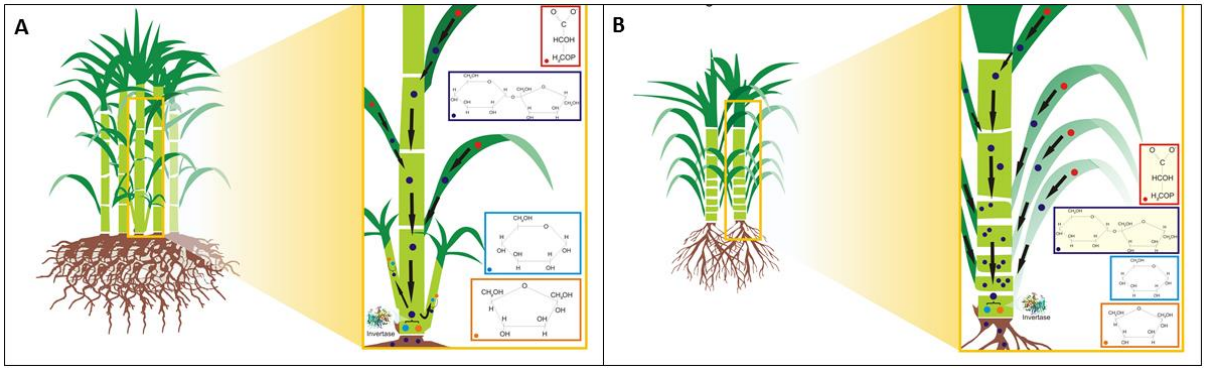
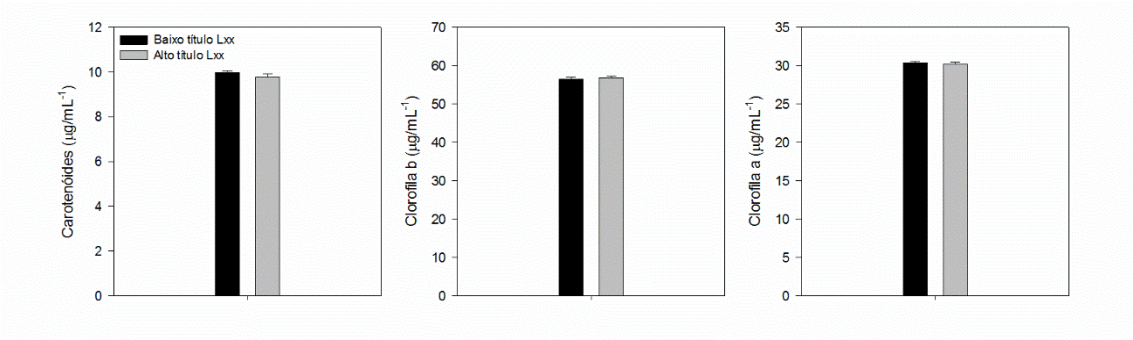
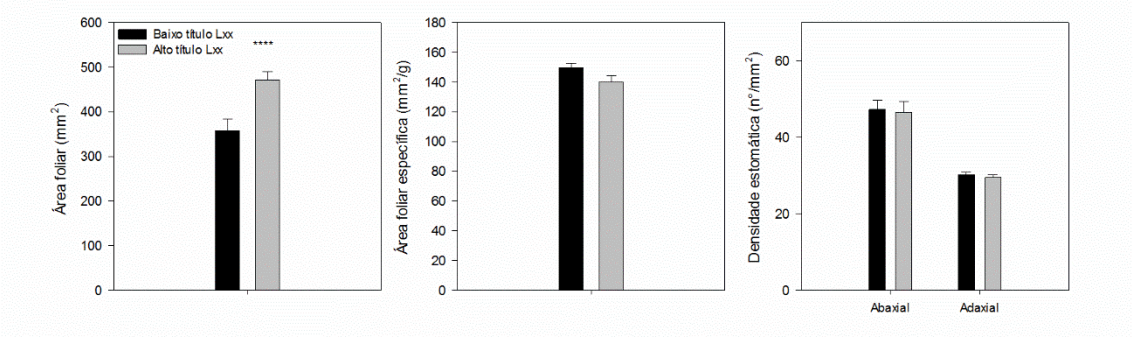


Figura 12. Modelo representando acúmulo de açúcares no colmo principal em plantas com alto e baixo título de *Lxx*: A) Açúcares produzidos pelas plantas com menor título bacteriano são transportados do colmo principal para órgãos drenos, onde invertase hidrolisa a sacarose em frutose e glicose, fornecendo carboidratos para desenvolvimento dos perfilhos. B) A produção de açúcares nas plantas com maior título bacteriano são transportados e armazenados no colmo principal na forma de sacarose e amido, resultante da menor atividade da Invertase que inibe a formação dos perfilhos pelo menor fornecimentos de carboidratos.

SUPLEMENTAR

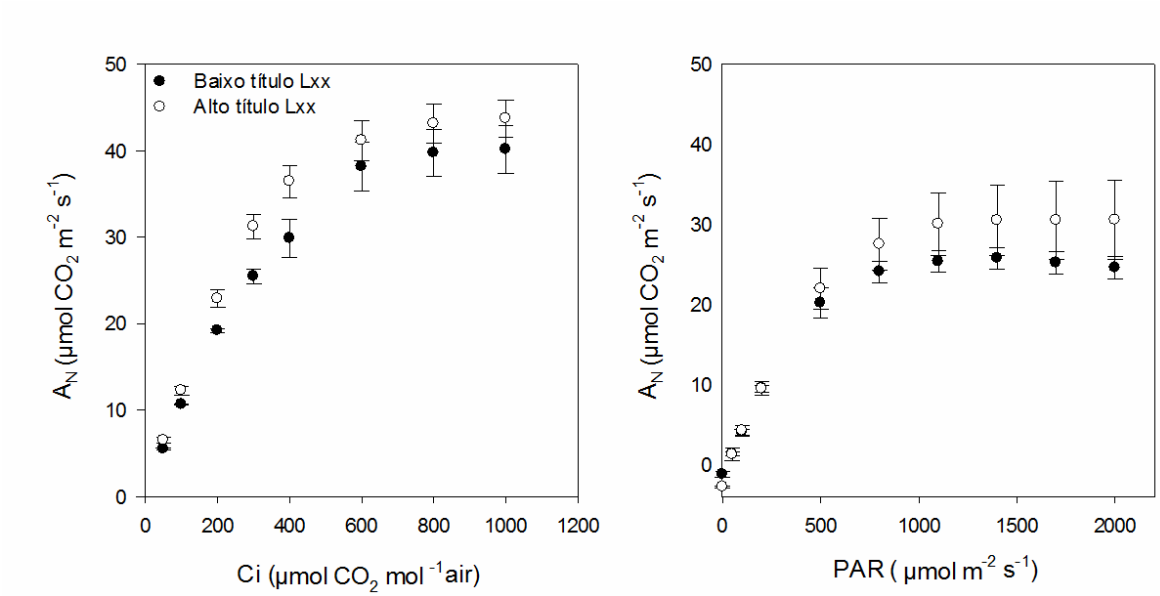


SUPLEMENTAR 1. Concentração de carotenóides, clorofila b e clorofila a analisados na folha +1 nos tratamentos com baixo título de *Lxx* e alto título de *Lxx* (n = 11). A diferença entre as médias dos tratamentos foram obtidas pelo teste t ($p<0,05$).



SUPLEMENTAR 2. Análise Área foliar (mm^2) Área foliar específica (mm^2 g^{-1}) e densidade estomática (estômatos mm^{-2}) nos tratamentos baixo título de *Lxx* e alto título de *Lxx* (n = 11). A diferença entre as médias dos tratamentos foram obtidas pelo teste t ($p<0,05$).

SUPLEMENTAR 3. Imagem das raízes da cana-de-açúcar em função de título bacterianos. A imagem mostrou as raízes das plantas com baixo título *Lxx* (à esquerda) e alto título *Lxx* (à direita).



SUPLEMENTAR 4 . Curva A-Ci e Curva de luz nas plantas com baixo título de *Lxx* e alto título de *Lxx*.

3 CRESCIMENTO DO TÍTULO BACTERIANO DE *LEIFSNONIA XYLI SUBSP. XYLI* NA CANA-DE-AÇÚCAR AUMENTA A ABSORÇÃO DE S E REDUZ A ABSORÇÃO DE MOLIBDÊNIO

Resumo

Raquitismo das Soqueiras (RS) é uma doença que reduz a produtividade da cana-de-açúcar por causar alterações fisiológicas que afetam o seu crescimento e desenvolvimento. Contudo, ainda não há evidências se os sintomas da doença estão associados a uma alteração do estado nutricional da planta. Desta forma, a hipótese deste estudo consistiu em que o crescimento bacteriano *Leifsonia xyli subsp. xyli* (*Lxx*) altera o estado nutricional na cana-de-açúcar. Foram realizados três experimentos com cana-de-açúcar do genótipo CB 49260 com alto e baixo título de *Lxx*. Experimento I em câmara de crescimento, Experimento II em casa de vegetação e experimento III em solução nutritiva com duas concentrações de enxofre (S) 100 e 50%. Nós observamos nos três experimentos que as plantas com alto título bacteriano apresentaram aumento na concentração de S foliar em relação as plantas com baixo título bacteriano. As plantas com alto título de *Lxx* apresentaram incremento nas concentrações de cálcio e magnésio na folha. O experimento em solução nutritiva mostrou que o aumento na absorção de S a partir do crescimento bacteriano na planta, decresceu acúmulo de molibdênio na raiz. Portanto, esse estudo demonstra que os sintomas de RS estão associados com aumento da assimilação de S na planta que afeta a absorção de molibdênio na planta, podendo resultar em sintomas deficiência de molibdênio ao longo do desenvolvimento da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Raquitismo das soqueiras, Metabolômica, Nutrição de plantas, Endofítico

Abstract

Ratoon Stunting Disease (RSD) is a disease that reduces sugarcane productivity by causing physiological changes that affect its growth and development. However, there is no evidence yet if the disease symptoms are associated with a change in the nutritional status of the plant. Thus, the hypothesis of this study was that bacterial growth *Leifsonia xyli subsp. xyli* (*Lxx*) alters the nutritional status of sugarcane. Three experiments were carried out with sugarcane genotype CB 49260 with high and low *Lxx* titers. Experiment I in growth chamber, Experiment II in greenhouse and Experiment III in nutrient solution with two concentrations of sulfur (S) 100 and 50%. We observed in the three experiments that plants with high bacterial titers showed increase in leaf S concentration compared to plants with low bacterial titers. The plants with high *Lxx* titers showed increase in leaf calcium and magnesium concentrations. The experiment in nutrient solution showed that the increase in S uptake from plant bacterial growth decreased root molybdenum accumulation. Therefore, this study demonstrates that RS symptoms are associated with increased uptake of S in the plant which affects the absorption of molybdenum in the plant, which may result in symptoms of molybdenum deficiency throughout the development of sugarcane.
Keywords: Ratoon Stunting Disease, Metabolomics, Plant nutrition, Endophytic.

3.1 INTRODUÇÃO

Raquitismo das soqueiras é uma das principais doenças na cana-de-açúcar que causam perdas consideráveis na produtividade no campo. Estima-se que as perdas na cana-de-açúcar podem chegar em até 26% da produtividade, levando a prejuízos que chegam em US$ 1000 ha^{-1} ano^{-1} (GLAGLIARDI; CAMARGO, 2000; URASHIMA et al., 2017). A doença é causada por uma bactéria fastidiosa, gram-positiva denominada *Leifsonia xyli subsp. xyli* (*Lxx*) que coloniza os vasos do xilema, células do mesofilo e da bainha (DAVIS et al., 1980; QUECINE et al., 2016). Os sintomas da doença na planta são redução no crescimento e perfilhamento da planta, entrenós curtos e vermelhidão no feixe vascular do colmo. A doença apresenta maior severidade com o crescimento do título bacteriano na planta (Davis et al, 1988).

Estudos recentes começaram a desvendar os sintomas de RS na cana-de-açúcar, ao descrever algumas alterações fisiológicas produzidas pela doença na planta (CIA et al., 2018; ZHANG et al., 2016a, 2016b). Foi verificado que as plantas doentes possuem um desbalanço hormonal, a partir do aumento dos níveis de ácido abscísico (ABA) e reduções de auxina e giberelina no colmo (ZHANG et al., 2016a). A alteração do nível de ABA no colmo ainda é desconhecida, podendo ser ocasionadas diretamente pela bactéria sintetizar um análogo do ácido abscísico (Monteiro-Vitorello et al. 2004). Ou indiretamente, devido a um eventual déficit hídrico na planta causado pela obstrução dos vasos do xilema pelo acúmulo de tiloses, sendo uma resposta de defesa da planta em resposta ao crescimento bacteriano (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004; TEAKLE; APPLETON; STEINDL, 1978). A taxa fotossintética e a condutância estomática decresceu 6 meses após a inoculação da bactéria na planta (ZHANG et al. 2016).

Contudo, ainda faltam esclarecimentos sobre o impacto da doença em relação ao estado nutricional da planta. Alguns patógenos alteram o estado nutricional da planta, trazendo danos fisiológicos que levam a suscetibilidade do hospedeiro (FATIMA et al. 2015). O S é um dos nutrientes que são alterados em função da colonização de patógeno vasculares, sendo que seu aumento da sua assimilação pela planta pode estar relacionado a uma resposta de defesa (WILLIANS, 2002). Na planta o S é um elemento essencial para desenvolvimento da planta, participando de compostos inseridos no metabolismo primário e secundário (BLOEM; HANEKLAUS; SCHNUG, 2005, 2015; FU et al., 2016; OAKLEY, 2005; WILLIAMS et al., 2002). O S é constituinte de moléculas orgânicas que desempenham diversas funções fisiológicas, como no metabolismo de aminoácidos, proteínas, hormônios, secundário e no sistema antioxidante (HÄNSCH, et al. 2005). Ele está presente nos aminoácidos cisteína e metionina, nas coenzimas Acetil-Coa, tiamina e biotina, nos peptídeos hormonais sistemina e sulfokina (BLOEM et al., 2007; KOPRIVOVA; KOPRIVA, 2016), inclusive alguns compostos

sulfurados atuam como resposta de defesa como glicosinolatos e fitoalexinas. A limitação de S nas plantas provoca vários danos metabólicos, tornando as plantas mais suscetíveis aos estresses biótico e abiótico. O metabolismo de S nas plantas vem sendo amplamente estudado, buscando compreender os genes envolvidos na assimilação de S e na síntese de compostos de defesa (Willians et al. 2002). Alguns trabalhos mostraram que o aumento da assimilação de S tornam a planta mais resistente contra patógenos vasculares (Bloem et al. 2005; Williams et al. 2002).

Os avanços das técnicas moleculares a partir das ômicas tem contribuído para compreender melhor as respostas das plantas aos fatores ambientais. A metabolômica vem sendo amplamente empregada como uma das ferramentas que auxiliam na compreensão da interação planta-patógeno (JACOBY; KOPRIVA, 2019; OMENA-GARCIA et al., 2019). Para cada interação planta-microrganismo, a planta responde com um perfil metabólico, havendo diferenças de metabólitos entre os microrganismos endofíticos, mutualistas e patogênicos, inclusive entre raças da mesma espécie (WONG et al., 2019). Os resultados da metabolômica, determinam a assinatura fenotípica da planta, podendo auxiliar no reconhecimento de metabólitos que levam a suscetibilidade ou resistência da planta ao patógeno (KUSHALAPPA; GUNNAIAH, 2013). Algum estudo tem mostrado a presença de alguns metabólitos estão relacionados com a resistência aos microrganismos patogênicos (VAN DE MORTEL et al., 2012). Pesquisas recentes mostraram que plantas podem sintetizar metabólitos que favorecem o crescimento do patógeno, aumentando a severidade da doença na planta (LOWE-POWER et al., 2018; VILAS et al., 2018). Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar se alterações fisiológicas na cana-de-açúcar com RS, analisando a alteração metabólica e o estado nutricional da planta.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 EXPERIMENTO I

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento (Convirion Winnipeg, Canadá) com plantas de cana-de-açúcar do genótipo CB 49260 considerado suscetível ao raquitismo das soqueiras (GAGLIARDI E CAMARGO, 2009). Os tratamentos consistiram na utilização de plantas com alto título de *Lxx* e baixo título de *Lxx* para avaliar o estado nutricional da cana-de-açúcar em função do crescimento do título bacteriano. O material vegetal foi obtido de toletes de primeira soca infectados com *Lxx* e toletes de matrizes com baixo título bacteriano, que foram retirados e cortados em mini-toletes com uma gema, plantado em bandejas de 32 células

preenchidas com substrato (Basaplant). Quarente dias após o plantio, as plantas foram transferidas para vasos com solo Neossolo vermelho distroférrico e levadas para câmara de crescimento permanecendo 120 dias nas condições 30°C e fotoperíodo de 12 horas (600 µMol m^{-2} s^{-1} de PAR). Ao longo do experimento foram eliminados os perfilhos, deixando apenas o colmo principal onde foram realizadas medições fisiológicas e após 120 dias foi feito a quantificação de biomassa entre os tratamentos.

3.2.2 EXPERIMENTO II

Para verificar se a diferença no estado nutricional do experimento anterior não foi causada pelo ambiente na câmara de crescimento e sim pelo crescimento do título bacteriano na planta. Foi realizado um segundo experimento em casa de vegetação utilizando toletes de cana-de-açúcar com alto título de *Lxx* e baixo título de *Lxx* . O material vegetal foi obtido de matrizes do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (LFN) da Escola Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ-USP), coletando material CB 49260 com sintomas de RS e ausência sintomas de RS no campo. Posteriormente, o material vegetal foi cortado em mini-toletes e plantado em recipientes de 32 células com substrato (Basaplant). O experimento foi realizado em casa de vegetação com controle de temperatura 30 ° C e umidade relativa de 70%. Após 22 dias de plantio, as plantas foram transplantadas para vasos de 6L com substrato (Basaplant). Cada vaso foi adubado com 7,5g de 10-10-10 (NPK) e 7,89g de sulfato de amônio. As plantas foram irrigadas diariamente. Sessenta dias após o plantio, o título bacteriano foi quantificado usando bainha foliar da planta (Young et al. 2017). O experimento foi conduzido até os 131 dias onde as plantas foram colhidas para determinação da produção de biomassa.

3.2.3 EXPERIMENTO III

Os tratamentos consistiram em utilizar o genótipo de cana-de-açúcar CB 49260 com alto título de *Lxx* e baixo título de *Lxx* submetidos à duas concentrações de S na solução nutritiva (100% e 50% S da solução Hoagland) (Figura 1). O experimento foi conduzido no delineamento fatorial 2 a 2 (patógeno x S) com 4 repetições em casa de vegetação do Centro de Energia Nuclear de Agricultura (CENA). As plantas foram produzidas a partir de mini-toletes retirado de matrizes do departamento de Fitopatologia e Nematologia (LFN-ESALQ), que contém matrizes com alto e baixo título *Lxx*. As plantas foram plantadas com mini-toletes em

bandejas com 32 células. Um mês após o plantio as mudas de cana-de-açúcar foram transplantadas para vasos (5L) contendo solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnold, 1956). As plantas ficaram 15 dias com 25% da força de Solução Hoagland para aclimatação das plantas em solução nutritiva. Após o período de aclimatação, as plantas foram submetidas 100% da solução de Hoagland. Os tratamentos com 50% e 100% de S foram impostos, dede a solução de aclimatação na planta. As plantas cresceram em solução nutritiva durante 2 meses de crescimento.

Figura: Croqui mostrando os tratamentos do experimento realizado em função da diferença no título bacteriano na cana-de-açúcar e na concentração de S na solução de Hoagland. Os tratamentos iniciam a partir da esquerda com: Plantas com baixo título bacteriano com 50%S na solução de Hoagland (↓Lxx↓S); plantas com baixo título bacteriano com 100%S na solução de Hoagland(↓Lxx↑S); plantas com alto título bacteriano com 50%S solução de Hoagland (↑Lxx↓S).; plantas com alto título bacteriano com 100%S da solução de Hoagland (↑Lxx↑S).

3.2.3.1 ANÁLISE AGRONÔMICA

A produção de biomassa foi obtida no final dos experimentos, sendo experimento I (120 dias após o plantio), Experimento 2 (131 dias após o plantio) e Experimento III (60 dias após a imposição da solução nutritiva). No experimento III antes da colheita foi aferido crescimento como o diâmetro e o comprimento do colmo. Nos três experimentos o material foi separado em colmo principal, perfilhos, e raiz deixando em estufa a 60°C durante três dias, para obtenção da matéria seca. Em seguida o material foi pesado, onde determinou-se biomassa do colmo principal, dos perfilhos, raiz e a biomassa total da planta

3.2.3.2 TROCAS GASOSAS E ÍNDICE DE CLOROFILA

A determinação da taxa de assimilação de CO_2 (*A*), transpiração (*E*) e condutância estomática (*gs)* e carbono interno (*Ci*) foram realizadas nas folhas +1 utilizando um analisador de gases a infravermelho (IRGA) Li-6400 (Licor Inc., Nebraska, USA). A análise com IRGA procedeu-se com saturação luminosa (1500 µmol fóton m^{-2} s^{-1}), a 25 ºC, 400 µmol mol^{-1} de CO_2 no período das 8:30 às 11:00h. O índice de clorofila foi determinado na folha +1 utilizando o medidor Soil Plant Analysis Development (SPAD-502, Minolta, Japão).

3.2.3.3 DETERMINAÇÃO MDA E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2)

A determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio foi realizada conforme descrito (ALEXIEVA et al., 2001). Foi macerado 0,2 g tecido foliar com 2 mL de ácido tricloroacético 0,1% (TCA) (v/v), contendo polivinilpirrolidona (PVPP). Após homogeneização, o extrato foi transferido para um *eppendorf* (2 mL) e centrifugado a 13000 *g* por 10 minutos a 4ºC. Foi adicionado uma alíquota de 0,2 mL do sobrenadante, 0,2 mL de tampão de fosfato de potássio (100 mM, pH 7,5) e 0,8 mL de 1M KI (*p*/v) em um *eppendoof* para cada amostra em triplicatas. As amostras foram incubadas por 1 h no escuro e em temperatura ambiente. Após o período de incubação procedeu-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 390 nm.

A avaliação da peroxidação lipídica foi conduzida segundo (HEATH; PACKER, 1968), utilizando 0,2 g (200 mg) de material vegetal fresco (parte aérea e colmo) macerado em 2 mL de TCA 0,1%, contendo PVPP. Após a homogeneização do conteúdo foi transferido para *eppendorf* e centrifugado a 13000 *g* (≡ 10.000 RPM) por 10 minutos a 4ºC. Em seguida, foi adicionado 1 mL de TCA (20%, contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico) em 0,250 mL (250 uL) do sobrenadante, sendo incubado a 95 ºC por 30 minutos. Em seguida cada amostra foi resfriada em gelo e em seguida as amostras foram deixadas no escuro por 15 minutos em temperatura ambiente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 532 e 600 nm. Sabendo que ε= 155 mM^{-1} cm^{-1}, as determinações das concentrações de MDA foram realizadas através da equação: ABS (532-600) /ε155= **X** (em mM/L); X/1000 = X em mM/mL.

3.2.3.4 DETERMINAÇÃO DE MACRONUTRIENTES E MICRONUTRIENTES

Quantificação dos macronutrientes e micronutrientes na folha, colmo e raiz foram realizadas utilizando 0,5g de matéria seca (MS), colocados em tubos de ensaios com a adição de ácido nitroperclórico (1/2 v/v), deixando incubado durante toda a noite. Em seguida as amostras foram submetidas em blocos de aquecimento, onde a temperatura foi aumentada lentamente no bloco até alcançar 220°C. Após a digestão as amostras foram ressuspendidas em 50mL de água destilada em tubo falcon. Foi coletado 5 mL de cada amostra para ser analisadas em Plasma de Acoplamento Indutivo (ICP-OES, da Thermo Scientific, modelo iCAP 6200) para quantificação dos macronutrientes e micronutrientes.

3.2.3.5 QUANTIFICAÇÃO DOS FENÓLICOS

A quantificação de fenólicos na planta foi feita em folha e colmo adicionando 4 mL de metanol 50% em 0,8g material fresco (conservado a -80 °C) macerado em nitrogênio líquidos, deixando incubado por 90 minutos a 80°C. Em seguida o material foi deixado 30 minutos em temperatura ambiente, sendo centrifugado 20000g por 15 minutos. Foi coletado o sobrenadante das amostras, onde a determinação dos fenóis livres foi feita com a reação Folin-Ciocalteau de acordo (KOFALVI; NASSUTH, 1995).

3.2.3.6 METABOLÔMICA

As amostras de folha foram coletadas as 5:00 am e colmo entre as 9 e 11:00 am sendo armazenadas e maceradas em nitrogênio líquido. Quatro réplicas biológicas de cada tratamento foram utilizadas para as análises, onde os metabólitos dos órgãos foram extraídos e analisadas de acordo com o protocolo descrito por (CALDANA et al., 2013). 50 mg de material vegetal congelado foi colocado em *eppendorff* com 700 ml de metanol, sendo incubado por 1h sob agitação a 70°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g, onde o sobrenadante foi retirado. Foi adicionado clorofórmio (300 ml) e água (300 ml) ao sobrenadante para separação das fases polar e apolar, sendo em seguida retirado 1 ml da fase polar e secado. Foi adicionado Ribotol como padrão interno e a derivação e análise dos metabólitos nas amostras foram realizadas conforme descrito (LISEC et al., 2006).

3.2.3.7 QUANTIFICAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA E GLUTATIONA OXIDADA

Quantificação da glutationa reduzida e oxidada foi obtida por espectrofotometria (LIMA et al., 2018). 0,8 g de tecido fresco foi homogenizado com 5% de ácido sulfosalicílico (1mL), sendo centrifugado a 10000g a 4°C durante 20 minutos. 200 uL do sobrenadante foi transferido em eppendoff, sendo adicionado 1,8 mL uma solução tampão de 100 mM fosfato de potássio e 0,5mM EDTA (pH7) e 100 uL de 3mM do reagente de Ellman (DTNB). As amostras foram deixadas no escuro, após 5 minutos as amostras foram analisadas em espectrofotômetro com 412 nm. Após a leitura em espectrofotômetro, foi adicionada na amostra 100 uL de 0,4 mM deNADPH e 2 µL GR (205 U mg^{-1}) e mantidas no escuro, sendo feito a leitura 412nm, 20 minutos após a adição dos reagentes. A quantificação da glutationa foi determinada por curva padrão de GSH (0-1 mM).

3.2.3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram organizados em delineamentos inteiramente casualizado, sendo os dados coletados submetidos a análise de variância (ANOVA) a partir do programa SISVAR (FERREIRA, 2011). As diferenças entre as médias foram realizadas por meio do teste de t ($p<0,05$)

3.2.3.9 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Os resultados obtidos da análise de metabolômica foi submetido análise de Componentes Principais, objetivando compreender melhor a distribuição dos metabólitos em função do órgão e do crescimento do título bacteriano (n=4). A análise foi realizada estabelecendo os efeitos fixos de parâmetros, segundo o seguinte modelo:

$$y = \mu + Pb + Qc + Sd + \varepsilon$$

Em que y é o vetor de variáveis metabólicas, µ é a constante da média geral, b é o vetor do efeito do título bacteriano na planta, c é o vetor do efeito do órgão, d é o vetor de interação entre título bacteriano e órgão e ε é o vetor do efeito de erro com ε ~ N (0, σ_ε ^ 2). As letras maiúsculas representaram as matrizes de incidência para os respectivos efeitos. Os resultados

da metabolômica foram submetidos a ANOVA (modelo linear geral univariado), sendo o teste de média de cada metabólito feito por Teste de t ($p < 0,05$). A avaliação dos resíduos pela ANOVA, mostrou não haver a necessidade de transformar os dados. A análise do PCA foi realizada usando o software R através do pacote factoextra (KASSAMBA et al. 2017). Para evitar multicolinearidade foram eliminadas as variáveis com correlações superior 0,90. As correlações de Pearson entre as alterações metabólicas na planta foram estimadas usando todas as repetições, e a significância foi avaliada através do teste t de Student (FERREIRA, 2011).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 EXPERIMENTO I

Para confirmar a presença da bactéria nas plantas foi realizada a análise de q-PCR, onde foi confirmado haver diferença do título bacteriano entre as plantas, havendo plantas com alto título de *Lxx* e baixo título de *Lxx* (FIGURA 1). Em seguida fora realizadas medições de trocas gasosas nas plantas. Na primeira avaliação não foi observado diferença na assimilação de CO_2 (*A*) ($p<0,05$), porém nas outras duas avaliações as plantas com alto título *Lxx* exibiram maior *A*. As plantas com alto título de *Lxx* apresentaram menor *Ci* ($p< 0,05$) na primeira e segunda avaliação e menor *gs* ($p<0,05$) na primeira e terceira avaliação. As plantas com alto título *Lxx* exibiram clorose nas folhas mais novas das plantas (FIGURA 3), tendo um menor teor de clorofila em comparação a planta com baixo título *Lxx* (FIGURA 2).

A manifestação de clorose na folha mais nova pode ser causada por alguma alteração do estado nutricional da planta causada pelo aumento do título bacteriano na planta. Para verificar essa hipótese, nós coletamos a folha +1 das plantas para fazer uma análise de macro e micronutrientes. Nós observamos aumento na concentração de S, Ca e Mg nas plantas com alto título de *Lxx*. Nós não verificamos diferenças em N, P, K, B, Mn, Zn. Nesta análise não foi feito análise de Molibdênio. A partir destes resultados nós decidimos quantificar aminoácidos na folha, onde foi verificado que as plantas com alto Lxx apresentaram menor acúmulo de aminoácidos.

A produção de biomassa raiz e parte aérea, altura do colmo e relação parte aérea e raiz foram mensurados no experimento (FIGURA 6), onde foi observado que as plantas com alto título bacteriano exibiram menor acúmulo de biomassa total, raiz, parte aérea e uma menor relação parte aérea/raiz ($p<0,05$).

3.3.2 EXPERIMENTO II

A partir dos resultados encontrados no experimento I , foi realizado um experimento em casa de vegetação para confirmar se a alteração do estado nutricional na planta seria proporcionando pelo crescimento do título bacteriano. Foi quantificado o título bacteriano nas plantas, mostrando que há diferença de título bacteriano entre as plantas (FIGURA 7)

Neste experimento, as plantas com alto título *Lxx* apresentaram maior concentração de S, magnésio e potássio. Desta forma, os resultados confirmaram que a variação do estado nutricional na planta é causada pelo crescimento do título bacteriano (FIGURA8). Para avaliar o funcionamento da planta em função da alteração nutricional, foi analisado o acúmulo de aminoácidos, glutationa, peróxido de hidrogênio, malonoaldeído e fenólicos na folha e no colmo (FIGURA 9). Nós observamos que as plantas com alto título de *Lxx* apresentaram menor acúmulo de aminoácidos na folha e no colmo. A produção de peróxido de hidrogênio e fenólicos foram reduzidos na folha ($p<0,005$), e aumentaram no colmo nas plantas com alto título bacteriano ($p<0,0005$). A produção de malonoaldeído foi superior nos dois órgãos avaliados nas plantas com alto título bacteriano ($p<0,05$).

A partir dos resultados obtidos, nós decidimos investigar as principais alterações metabólicas causadas pelo aumento do título bacteriano na folha e no colmo feito pela análise de metabolômica (FIGURA 10). O aumento do título bacteriano reduziu a concentração dos aminoácidos fenilalanina, metionina, homoserina, ácido glutâmico, beta-alanina e ácido aspártico na folha ($p<0,05$). Contudo houve um maior acúmulo de carboidratos na folha, havendo maior acúmulo de rafinose, sacarose, ácido fosfórico, anidro-beta-D-glicose ($p<0,05$). Contudo as plantas com baixo título de *Lxx* apresentaram valores superiores de trealose e ácido nicotínico. No colmo, as plantas com alto título de *Lxx* obtiveram um menor conteúdo de valina, treonina, fenilalanina, ornitina, ácido malônico leucina, ácido glutâmico e ácido fumárico; e aumento do conteúdo de glicerol, eritritol, asparagina, ácido hidroxinâmico, maltose e anidro-B-glicose.

Na análise de Componentes Principais (PCA) explicou 65,1%, da variação dos metabólitos em função do órgão e do crescimento do título bacteriano onde a PC1 e PC2 representaram 45% e 20,1%. (FIGURA 11) A análise PCA demonstrou o acúmulo de metabólitos entre os órgãos em função do crescimento bacteriano na planta. A PCA demonstrou a concentração de homoserina, metionina, trealose e metionina acumularam nas folhas das plantas com baixo título de *Lxx*. Sacarose, eritritol, rafinose e putrescina acumularam nas folhas das plantas com alto título bacteriano. No colmo, as plantas com baixo título bacteriano

apresentaram maior acúmulo de ácido malônico, ornitina, valina e isoleucina. Já as plantas com alto título bacteriano apresentaram maior acúmulo de GABA, ácido glutâmico, ácido aspártico, ácido hidroxinamida e glicina.

O acúmulo de biomassa 131 dias após o plantio diferiu entre os tratamentos em função do título bacteriano. As plantas com alto título *Lxx* apresentaram maior produção de biomassa total e na parte aérea, sendo esse acúmulo ocorrido no colmo principal da planta. Além disso, as plantas com alto título de *Lxx* exibiram maior relação parte aérea/raiz. Já as plantas com baixo título de *Lxx*, apresentaram maior acúmulo de biomassa de perfilhos, inclusive, sendo a biomassa de perfilho que mais contribuiu para acúmulo de biomassa na parte aérea.

3.3.3 EXPERIMENTO III

No experimento III foi estudado o efeito da concentração de S nas plantas com alto e baixo título bacteriano (FIGURA 13), nós confirmamos novamente que as plantas com alto título *Lxx* apresentaram superior concentração de S e magnésio (FIGURA 14). Neste estudo foi avaliado a concentração dos nutrientes na folha, colmo e raiz. Nós observamos que a concentração de S foi superior na folha e no colmo para as plantas com alto título de *Lxx*. Já o acúmulo de S na raiz foi superior para as plantas submetidas com solução nutritiva com maior concentração de S (100%S). A concentração de cálcio na planta variou entre os tratamentos apenas na folha, onde as plantas com alto título *Lxx* com 50%S na solução nutritiva apresentaram concentrações superiores de cálcio em relação as plantas com baixo título *Lxx*. A concentração de magnésio na folha e no colmo foi superior nas plantas com alto título de *Lxx*. Já a concentração de magnésio na raiz foi maior nas plantas submetidas 100% S. A concentração de fósforo na folha foi inferior apenas nas plantas com baixo título de *Lxx* submetidas 50% S em relação às plantas com baixo título *Lxx* submetidas 100% S. No colmo as plantas com alto título *Lxx* apresentaram maior concentração de fósforo.. O potássio não exibiu diferença entre os tratamentos nos três órgãos avaliados.

Já na concentração dos micronutrientes nos diferentes órgãos (FIGURA 15), observou-se menor concentração de molibdênio na raiz das plantas com alto título de *Lxx*. Não foram verificadas diferenças na concentração Mo na folha e no colmo. A concentração de manganês (Mn) na folha foi maior nas plantas com baixo título de *Lxx*. No colmo a concentração de Mn foi superior nas plantas com alto título de *Lxx* e na raiz foi superior nas plantas com solução nutritiva com maior concentração de S (100% S). A concentração de zinco (Zn) na raiz diferiu em função da concentração de S, onde as plantas submetidas maior concentração de S exibiram

maior acúmulo de Zn. Nós não verificamos diferença na concentração de Fe e Cu nos órgãos avaliados.

Nas análises fisiológicas não foram observadas diferenças na taxa fotossintética entre as plantas e na concentração de clorofila foliar (FIGURA 16 e 17). Nas plantas foram observadas diferença no crescimento da planta, onde as plantas com alto título de *Lxx* apresentaram um menor crescimento, porém um maior diâmetro do colmo ($p<0,001$). Entretanto a diferença no crescimento não resultou em diferença na produção de biomassa total e biomassa na raiz em função do título bacteriano ou pela concentração de S na solução nutritiva (FIGURA 19).

3.4 DISCUSSÃO

A ocorrência de doença em plantas pode ser causada pela colonização do patógeno danificar as estruturas celulares ou pela indução de alterações fisiológicas, que comprometem diretamente o desenvolvimento da planta. *Leifsonia xyli subsp. xyli* é uma bactéria patogênica que causa a doença Raquitismo das soqueiras na cana-de-açúcar, por afetar o crescimento e o perfilhamento da planta, levando consequentemente a redução na produção de biomassa (BAILEY; BECHET, 1997; GAGLIARDI; CAMARGO, 2009). No campo não existe um sintoma específico para detecção da doença, sendo muitas vezes os sintomas confundido ao déficit hídrico e deficiência nutricional (YOUNG, 2016). Contudo, algumas doenças são originadas por distúrbios nutricionais na planta a partir da infecção de microrganismo patogênico, que alteram a assimilação dos nutrientes pela planta (DE LA FUENTE et al., 2013; FATIMA; SENTHIL-KUMAR, 2015). Neste estudo, nós demonstramos que a cana-de-açúcar com sintomas de RS está associada à um desbalanço nutricional. As plantas com alto título *Lxx* exibiram um aumento da concentração de magnésio e S na folha e no colmo.

A elevação dos níveis de S encontrados na folha e no colmo da cana-de-açúcar, demonstraram que há um aumento da demanda na planta por S a partir do crescimento bacteriano. O aumento da absorção de S está associado a necessidade da planta sintetizar compostos orgânicos sulfurados para atender a demanda do seu metabolismo a partir da colonização da bactéria. Porque a *Lxx* não possui enzimas para síntese dos aminoácidos cisteína e metionina, devendo ser obtido a partir do metabolismo vegetal (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Desta forma, o crescimento do título bacteriano ao longo do desenvolvimento da cana-de-açúcar requer um aumento na biossíntese de cisteína e metionina. Neste estudo nós observamos que o crescimento bacteriano na planta reduziu o acúmulo de aminoácidos livre e

glutationa. Além disso, os dados de metabolômica mostraram que há um menor acúmulo de metionina na folha e homoserina nas plantas com o aumento do título bacteriano. Glutationa, cisteína e metionina são compostos orgânicos cuja estrutura orgânica contém um átomo de S. A redução na síntese de metionina está relacionada com a menor disponibilidade de homoserina nas plantas com alto título bacteriano. Pois a homoserina é um precursor para síntese de metionina, treonina e isoleucina. Desta forma menor concentração homoserina reduz a síntese de metionina e isoleucina nas plantas com alto título bacteriano. O crescimento do título bacteriano ao longo do tempo na cana-de-açúcar pode elevar a absorção e o transporte de S para evitar sintomas de deficiência.

Entretanto, o aumento contínuo na absorção e transporte de S ao longo desenvolvimento da cana-de-açúcar pode ter um efeito antagônico na absorção de outros nutrientes (KANNAN; RAMANI, 1978). Nós verificamos aumento na assimilação de S e redução na assimilação de molibdênio nas plantas com alto título de *Lxx*. O aumento na absorção de sulfato afeta a absorção de Mo nas plantas, pois o sulfato é um ânion que apresenta as mesmas características físico-química do molibdênio, sendo ambos antagônicos quanto absorção e transporte pela planta (RAMADAN, 2005; KANNAN; RAMANI, 1978). Alguns estudos mostraram que o aumento na absorção e transporte de S reduziram a absorção e o transporte de Molibdênio pela planta (RAMADAN, 2005; KANNAN; RAMANI, 1978); e que plantas deficientes em S apresentaram elevação nos níveis de Molibdênio nos órgãos da planta (RAMADAN, 2005; PRODHAN et al., 2017).

É provável que a redução no crescimento na cana-de-açúcar ocorra devido ao crescimento do título bacteriano causar a elevação na absorção de S na planta levando consequentemente a uma deficiência de molibdênio. As plantas deficientes em molibdênio apresentam os mesmos sintomas descritos pela doença, como redução no crescimento da planta e entre-nós curtos (Mccray et al. 2016). Pois o molibdênio é componente de várias enzimas na planta como Nitrato redutase, Sulfito oxidase e Xantina desidrogenase (Mendel, 2007, 2011). A deficiência de molibdênio leva a inibição da atividade do sulfito oxidase, que é uma enzima que evita a toxidez de S foliar (HÄNSCH et al., 2007). O aumento na concentração de S nas plantas com alto título bacteriano não elevou o acúmulo de metionina e glutationa. Ao contrário, observou-se uma redução no acúmulo de glutationa e metionina, sendo possível que o S esteja em altas concentrações na forma de sulfito.

A Sulfito oxidase é uma enzima ubíqua no reino vegetal, que catalisa o sulfito para produção de sulfato (BAILLIE et al., 2019; NAUMANN et al., 2018; YARMOLINSKY et al., 2013). A inatividade da enzima leva ao acúmulo de sulfito, que é um composto reativo que

ataca diversas biomoléculas, podendo levar inativação de proteínas ou causar danos na membrana celular. Contudo, o excesso de sulfito pode ser catalisado a partir do acúmulo de peroxidases no apoplasto, que oxidam o sulfito através de peróxido de hidrogênio e compostos fenólicos (BAILLIE et al., 2019; MISZALSKI; ZIEGLER, 1992). O crescimento bacteriano na cana de açúcar elevou o acúmulo e a atividade peroxidases na folha (CIA et al., 2018; ZHANG et al., 2016b), que pode ser uma resposta ao aumento de sulfito na folha, a fim de evitar a toxidez na célula. Nós observamos que o crescimento bacteriano causou danos das estruturas celulares da planta a partir do aumento na produção de MDA na folha. Portanto a redução no acúmulo de fenólicos e peróxido de hidrogênio na folha está relacionado com as alterações fisiológicas na planta produzida pela colonização da bactéria, a partir do aumento na concentração de S na folha, ao invés de uma resposta de defesa da planta. Assim, os sintomas visuais observados nas folhas como deformação e dobramento irregular na folha, (Figura) nas plantas nas plantas com maior título bacteriano, pode ser causado por uma provável toxidez foliar por S, que eleva consequentemente o acúmulo de MDA e a degradação de clorofila na folha (Mccray et al. 2016). A resistência dos genótipos de cana de açúcar a colonização da bactéria pode ser devido ao acúmulo de fenólicos servem como substrato a peroxidase para combater o excesso de sulfito, evitando os sintomas de toxidez de sulfito na planta (CASTRO, 2018; LABORDE, 2019).

Já a concentração de magnésio também aumentou nas plantas com o crescimento do título bacteriano nos três experimentos avaliados. Magnésio é um nutriente que participa como cofator da atividade de diversas enzimas, como Pepcarboxilase, Ribulose 1,5 bisfosfato Oxigenase e Carboxilase, DNA polimerase e H+ ATPase (Cakmak et al. 2008, Fahmat et al. 2016). O aumento dos níveis de magnésio nas plantas com alto título bacteriano, contribui para aumentar o acúmulo de carboidratos na folha e no colmo principal. O magnésio é um cofator das enzimas envolvidas no particionamento de carbono, principalmente no carregamento de açúcares no floema. O aumento dos níveis de magnésio aumenta a atividade de H^+-ATPase, responsáveis pelo carregamento de açúcares no floema (HANSTEIN et al., 2011). Planta com alto título bacteriano elevou a concentração de sacarose e rafinose na folha, enquanto no colmo houve um aumento no acúmulo de maltose, isomaltose e anidro-β-glicose. Estes resultados corroboram com o Capítulo 2 desta tese, onde foi observado um aumento no acúmulo de açúcar na folha e no colmo em função nas plantas com alto título bacteriano. Também comprovam que o acúmulo de biomassa observado nas plantas com alto título *Lxx* é proporcionado por um rápido acúmulo de carboidratos no colmo principal.

3.4.1 ALTERAÇÕES METABÓLICAS DA PLANTA EM FUNÇÃO DO CRESCIMENTO DO TÍTULO BACTERIANO

O avanço da genética molecular a partir do surgimento das ômicas, permitiram maior esclarecimento da modulação no desenvolvimento da planta em resposta aos fatores ambientais, através da associação das informações genéticas e fisiológicas da planta, sendo uma assinatura fenotípica. A metabolômica tem sido uma das ferramentas utilizada para entender melhor a interação planta-patógeno, mais especificamente as alterações fisiológicas resultantes da colonização do patógeno na planta (SÁNCHEZ-ELORDI et al., 2019; VILAS et al., 2018). Em estudo desenvolvido por Castro (2019), foi avaliado a metabolômica da folha e da seiva do xilema dos genótipos CB 49260 (Suscetível) e SP 803280 (Resistente) com 30 e 120 dias após a inoculação com a bactéria. Neste estudo foi mostrado que o genótipo CB 49260 inoculado com *Lxx* exibiu maior concentração de cisteína, lisina, ácido ferúlico, Cis-Aconitato, ácido malônico, shikimato, ácido tartárico, ácido quínico do que as plantas que não foram inoculadas com a bactéria. Contudo, nós observamos que o crescimento bacteriano proporcionou a redução dos aminoácidos livres e elevou o acúmulo de açúcares na folha e no colmo. O crescimento bacteriano na planta reduziu a disponibilidade dos aminoácidos fenilalanina, metionina, homoserina, ácido glutâmico, beta-alanina e ácido aspártico na folha. No colmo, as plantas com alto título de *Lxx* obtiveram um menor conteúdo de valina, treonina, fenilalanina, ornitina, ácido malônico leucina, ácido glutâmico e ácido fumárico; e aumento do conteúdo de glicerol, ácido malônico, eritritol, asparagina, ácido hidroxinâmico, maltose e anidro-β-glicose. Vale enfatizar que o estudo de Castro foi feito com plantas assintomáticas, enquanto que este estudo foi feito com plantas com sintomas da doença desde estágios iniciais de desenvolvimento na plantas. Os sintomas são evidenciados a partir do crescimento bacteriano, resultando em mudanças na expressão gênica, proteômica e na fisiologia ao longo do desenvolvimento da planta (CIA et al., 2018; DAVIS; DEAN; HARRISON, 1988; ZHANG et al., 2016a, 2016b). Desta forma, o estudo de Castro se assemelharia as alterações metabólicas estágio inicial de infecção da bactéria na planta, enquanto que este estudo demonstra as modificações metabólicas na planta quando se manifestam os sintomas da doença no campo. É notável que a presença da bactéria na planta provoca aumento da demanda de S, pois a plantas apresentaram aumento na demanda de cisteína 120 dias após a inoculação (CASTRO, 2018).

3.4.2 AUMENTO CRESCIMENTO BACTERIANO ALTERA O METABOLISMO PRIMÁRIO NA FOLHA E NO COLMO

O aumento do título bacteriano elevou os níveis de açúcares na folha e no colmo. Na folha o crescimento bacteriano causou o acúmulo de sacarose, rafinose e anidro-β-glicose e redução de trealose. A elevação da síntese de sacarose na folha, pode ser resultado do acúmulo de sacarose sintase e sacarose fosfatase (CIA et al. 2018). A sacarose é o principal metabólito destinado para o transporte dos órgãos drenos na planta, sendo também o principal metabólito armazenado no colmo na cana-de-açúcar. A redução na concentração de trealose, pode estar associado ao particionamento de carbono e transporte para os órgãos drenos. Porque o aumento no acúmulo de sacarose resulta no menor conteúdo de trealose na planta (MILLER et al. 1999). Além disso, o crescimento bacteriano na planta provoca um aumento na expressão de genes envolvidos com biossíntese de trealose como trealose sintase, trealose fosfatase (CIA et al. 2018). Provavelmente o menor conteúdo de trealose, seja devido ao menor catabolismo de trealose-6P. O aumento do nível de sacarose resulta na síntese trealose-6P, servindo como sinalizador do estado energético na planta (LUNN et al. 2014; MULLER et al. 1999). Contudo, a redução de trealose na folha também pode estar associada pela bactéria utilizar como composto energético para seu crescimento na planta. O acúmulo de rafinose na folha pode ser em resposta ao aumento na colonização da bactéria na folha. Schaker et al. (2017) mostraram elevação dos níveis de rafinose após a infecção de *Sporisiorium scitamineum* na cana-de-açúcar. Rafinose é um metabólito que atua em resposta ao estresse oxidativo e déficit hídrico, atuando na limpeza das espécies reativas de oxigênio ou na redução do potencial os osmóticos para condição de déficit hídrico (GOLLDACH et al. 2014). O aumento na concentração de rafinose na folha, pode favorecer a adaptação de *Lxx* ao meio apoplastico da planta contra o estresse oxidativo (SCHAKER et al., 2017).

O crescimento bacteriano na planta, resultou no menor acúmulo de aminoácidos livres na folha. Foi observada uma redução na síntese de fenilalanina, metionina, homoserina, ácido glutâmico, β-alanina e ácido aspártico na folha. A redução na biossíntese de metionina, fenilalanina pode estar associada ao menor acúmulo das proteínas Metionina sintase 1, 2 e 3, quanto fenilanina sintase (CIA et al., 2018). Além disso a redução no conteúdo da metionina decorre da menor concentração da homoserina, que é precursor para síntese de metionina; ou pelo aumento na biossíntese de espermidina na folha (CIA et al., 2018). Em outros estudos, os patógenos causam danos direto na planta, resultando na elevações no conteúdo de aminoácidos livres na folha (HUNG; WANG, 2018; LOWE-POWER et al., 2018). A redução da disponibilidade dos aminoácidos livres no apoplasto foliar, pode tornar as plantas mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença na cana-de-açúcar. Alguns aminoácidos como leucina, isoleucina, prolina, treonina, metionina são precursores de metabólitos para ativação

das respostas de defesa da planta (ZEIER, 2013). Contudo, *Lxx* é uma bactéria endofítica na cana-de-açúcar, que diferente das bactérias patogênicas como *Ralsonia solanum*, *Pseudomonas syringae*, *Xantomonas albilienans* e *Xylella fastidiosa*, não causando danos estruturais na planta. O impacto da doença, decorre do aumento do título bacteriano, que atuam como drenos na aquisição dos metabólitos pela planta. Desta forma, é o crescimento bacteriano que gera redução da disponibilidade de aminoácidos, uma vez que a maior parte dos genes contidos no seu genoma está envolvido no transporte e no metabolismo de aminoácidos (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). O aumento na demanda de metabólitos a partir do crescimento bacteriano, pode levar a bactéria liberar efetores para modular o desenvolvimento da cana-de-açúcar, impedindo a formação de novos drenos para garantir a aquisição dos metabólitos nos órgãos colonizados.

No colmo nós verificamos maior acúmulo de maltose e anidro-β-glicose. Interessante verificar que o aumento do título bacteriano reduz o conteúdo de aminoácidos livres entre os dois órgãos, mas elevou o acúmulo de açúcares na planta. O resultado apresentado na metabolômica corrobora com os resultados descritos no capítulo 2, que demonstraram o acúmulo precoce de açúcares como resultado da menor formação de drenos e uma rápida diferenciação de células parenquimática no colmo das plantas com maior título bacteriano. Apesar de não haver diferença no acúmulo de sacarose, as plantas com maior título bacteriano exibiram maior concentração de maltose e anidro-β-glicose. O carregamento de açúcares no floema na cana-de-açúcar é feito via apoplástico através dos transportadores SWEETs. Desta forma, o acúmulo de açúcares no colmo nas plantas com maior título bacteriano está relacionado com maior síntese de sacarose na folha, assim como no aumento da expressão gênica do transportador de açúcar SWEET 14 (CIA et al., 2018). As bactérias patogênicas podem liberar efetores que modulam a expressão dos genes transportadores de açúcares para carregamento do floema (CHEN et al., 2010). O aumento da expressão destes genes é uma estratégia adotadas pela *Lxx* para aumentar a disponibilidade de açúcares no apoplasto; uma vez que a bactéria também está estabelecida no apoplasto das células do mesofilo e da bainha (QUECINE et al., 2016). A redução no acúmulo de aminoácidos pode ser resultado do amadurecimento mais rápido dos entre-nós da cana-de-açúcar (GLASSOP et al., 2007). Glassop et al. (2009) demonstraram que colmos imaturos apresentaram menor concentração de sacarose, exibindo maior concentração de ácidos orgânicos e aminoácidos como isoleucina, ácido glutâmico e treonina enquanto que entre-nós. Entretanto colmos maduros tiveram maior concentração de sacarose, maltose, trealose e rafinose. O crescimento bacteriano elevou o

conteúdo de maltose e anidro-β-glicose, demonstrando, conforme mostrado no Experimento II, que o crescimento bacteriano promove o acúmulo precoce de açúcares no colmo principal.

3.4.3 PUTRESCINA, PODE SER UM SINAL METABÓLITO PARA AUMENTO DO TÍTULO BACTERIANO NA CANA-DE-AÇÚCAR?

As poliaminas são compostos que são sintetizados pelas plantas em resposta ao estresse abiótico e na interação da planta com microrganismos (WANG et al. 2019). Nós verificamos que o aumento do título bacteriano na cana-de-açúcar resultou no acúmulo de putrescina na folha (FIGURA 13). Estudos mostram que a putrescina é fundamental para desenvolvimento das estruturas morfológicas do fungo e no aumento da virulência de bactérias nas plantas (VILAS et al. 2019; SANCHEZ-ELORDI et al. 2018); como também está associado como resposta de defesa contra microrganismos patogênicos (WANG et al. 2019). A putrescina é um metabólico essencial para severidade da doença como a murcha bacteriana em tomate causada *Ralstonia solanacearum* (LOWE-POWER et al. 2018). Já em *Pseudomonas syringae*, a ausência de putrescina inibe o crescimento da bactéria na planta, enquanto que o acúmulo de putrescina no apoplasto favorece a colonização na folha (Vilas et al. 2018). Conforme observado em patógenos bacterianos, a putrescina pode ser um metabólico sinal relacionado com o aumento do título bacteriano *Lxx* na cana-de-açúcar, sendo um metabólito que favorece a colonização nos tecidos foliares (WANG et al. 2019, Vilas et al. 2018). Além disso, *Lxx* não contém enzimas para codificação de espermina, que é uma das poliaminas essenciais para adaptação dos microrganismos ao hospedeiro (CIA et al. 2018). A putrescina é uma poliamina que serve como precursor para síntese de espermina e espermidina. Por outro lado, o acúmulo de putrescina pode ser utilizado pela planta para síntese de espermina e espermidina, sendo adquirido pela bactéria na planta. É provável que esse aumento da putrescina seja causado pelo crescimento do título bacteriano, que pode justificar a resistência das plantas à infecção por *Sporisorium scitamineum* na cana-de-açúcar (BAILEY, 1977; JAMES, 1976). Pois o aumento de conteúdo de putrescina nas plantas, atua como inibidor da germinação nos esporos do fungo (SÁNCHEZ-ELORDI et al., 2019).

3.5 CONCLUSÃO

Não havia evidência que os sintomas de RS estavam associados ao desbalanço nutricional na planta. Neste estudo nós mostramos que o aumento do título bacteriano causou elevação da concentração de S no colmo e na folha. O aumento na absorção de S causou menor acúmulo de molibdênio na raiz. Desta forma, é provável que o aumento da absorção de S nas plantas com crescimento bacteriano reduza a absorção e o transporte de molibdênio, havendo sintomas de deficiência deste micronutriente.

REFERÊNCIAS

ALEXIEVA, V. et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337–1344, 2001.

ALHENDAWI, R. A.; KIRKBY, E. A.; PILBEAM, D. J. Evidence that sulfur deficiency enhances molybdenum transport in xylem sap of tomato plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 28, n. 8, p. 1347–1353, 2005.

ALTIERI, M.; BRAVO, E. The ecological and social tragedy of crop-based biofuel production in the Americas. **Food First/Institute for Food & Development Policy**, v. 2006, n. Pimentel 2003, p. 1–5, 2007.

BAILEY, R. A. THE EFFECT OF HOT WATER TREATMENTS, RATOON STUNTING DISEASE AND MOISTURE STRESS ON THE INCIDENCE OF SMUT IN SUGARCANE. 1977.

BAILEY, R. A.; BECHET, G. R. The effect of ratoon stunting disease on the yield of some south african sugarcane varieties under irrigated and rainfed conditions. **Proceedings of The South Africar Sugar Technologists Assocation**, n. June, p. 74–78, 1995.

BAILEY, R. A.; BECHET, G. R. Further evidence of the effects of ratoon stunting disease on production under irrigated and rainfed conditions. **Proceedings of The South Africar Sugar Technologists Assocation**, v. 71, n. September 1995, p. 97–101, 1997.

BAILLIE, C. K. et al. Apoplastic peroxidases enable an additional sulphite detoxification strategy and act as first line of defence upon exposure to sulphur containing gas. **Environmental and Experimental Botany**, v. 157, n. August 2018, p. 140–150, 2019.

BATES, L. S.; R.P., W.; I.D., T. Rapid determination of free proline for w a t e r - s t r e s s studies. **Plant and Soil**, v. 207, p. 205–207, 1973.

BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and Estimation of Amino Acids in Crude Plant Extracts by Thin-Layer Electrophoresis and Chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 293, p. 278–293, 1966.

BLOEM, E. et al. Facts and fiction about sulfur metabolism in relation to plant-pathogen interactions. **Plant Biology**, v. 9, n. 5, p. 596–607, 2007.

BLOEM, E.; HANEKLAUS, S.; SCHNUG, E. Significance of sulfur compounds in the protection of plants against pests and diseases. **Journal of Plant Nutrition**, v. 28, n. August 2014, p. 763–784, 2005.

BLOEM, E.; HANEKLAUS, S.; SCHNUG, E. Milestones in plant sulfur research on sulfur-

induced-resistance (SIR) in Europe. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. January, p. 1–12, 2015.

CALDANA, C. et al. Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in Arabidopsis thaliana. **Plant Journal**, v. 73, n. 6, p. 897–909, 2013.

CARVALHO, G. et al. Development of a qPCR for Leifsonia xyli subsp . xyli and quanti fi cation of the effects of heat treatment of sugarcane cuttings on Lxx. **Crop Protection**, v. 80, p. 51–55, 2016.

CHEN, L. et al. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. **Nature**, v. 468, n. 7323, p. 527–532, 2010.

CIA, M. C. et al. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, v. 161, n. 3, p. 313–324, 2012.

CIA, M. C. et al. Novel Insights Into the Early Stages of Ratoon Stunting Disease of Sugarcane Inferred from Transcript and Protein Analysis. **Phytopathology**, v. 108, n. 12, p. 1455–1466, 2018.

CONAB. Monitoramento agrícola- Cana-de-açúcar. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 5, p. 1–86, 2018.

DAVIS, M. J. et al. Ratoon Stunting Disease of Sugarcane : Isolation of the Causal Bacterium. 1980.

DAVIS, M. J.; DEAN, J. L.; HARRISON, N. A. Quantitative Varability of Clavibacter xyli subsp. xyli population in sugarcane cultivars differing in resistance to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, v. 78, n°4, p. 462–468, 1988.

DE LA FUENTE, L. et al. The Bacterial Pathogen Xylella fastidiosa Affects the Leaf Ionome of Plant Hosts during Infection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–9, 2013.

ELSAYED, A. I.; RAFUDEEN, M. S.; GOLLDACK, D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: Protection against abiotic stress. **Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2014.

EVTUSHENKO, L. I. et al. 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 Da. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 2000, p. 371–380, 2000.

FATIMA, U.; SENTHIL-KUMAR, M. Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. September, p. 1–12, 2015.

FERREIRA, D. F. SISVAR : A COMPUTER STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM Sisvar : um sistema computacional de análise estatística. p. 1039–1042, 2011.

FU, X. et al. Physiological response and sulfur metabolism of the V. dahliae-infected tomato plants in tomato/potato onion companion cropping. **Scientific Reports**, v. 6, n. 59, p. 36445, 2016.

GAGLIARDI, P. R.; CAMARGO, L. E. A. Resist??ncia de variedades comerciais de cana-de-a????car ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. **Ciencia Rural**, v. 39, n. 4, p. 1222–1225, 2009.

GLAGLIARDI, R.; CAMARGO, L. E. A. Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do. **Online**, p. 1–4, 2000.

GLASSOP, D. et al. Changes in the sugarcane metabolome with stem development. Are they related to sucrose accumulation? **Plant and Cell Physiology**, v. 48, n. 4, p. 573–584, 2007.

HÄNSCH, R. et al. Significance of plant sulfite oxidase. **Plant Biology**, v. 9, n. 5, p. 589–595, 2007.

HANSTEIN, S. et al. Changes in cytosolic Mg 2+ levels can regulate the activity of the plasma membrane H + -ATPase in maize. **Biochemical Journal**, v. 435, n. 1, p. 93–101, 2011.

HEATH, R.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated Chloroplasts of Fatty Acid Peroxidation chlorophyll. **Archives of biochemistry and biophisics**, v. 126, n. 45, p. 189–198, 1968.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I**.** (1950), The water: culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, Berkeley.

HUNG, W. L.; WANG, Y. A Targeted Mass Spectrometry-Based Metabolomics Approach toward the Understanding of Host Responses to Huanglongbing Disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 40, p. 10651–10661, 2018.

JACOBY, R. P.; KOPRIVA, S. Metabolic niches in the rhizosphere microbiome: New tools and approaches to analyse metabolic mechanisms of plant-microbe nutrient exchange. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 4, p. 1087–1094, 2019.

JAMES, B. G. L. THE EFFECT OF RATOON STUNTING DISEASE ON THE EXPRESSION OF SMUT SYMPTOMS. **Proceedings of The South Africar Sugar Technologists Assocation**, n. June, p. 2–5, 1976.

KANNAN, S.; RAMANI, S. Studies on Molybdenum Absorption and Transport in Bean and Rice. **Plant Physiology**, v. 62, n. 2, p. 179–181, 1978.

KOFALVI, S. A.; NASSUTH, A. **Influence of wheat streak mosaic virus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat**47, 35-377, , 1995.

KOPRIVOVA, A.; KOPRIVA, S. Hormonal control of sulfate uptake and assimilation. **Plant Molecular Biology**, v. 91, n. 6, p. 617–627, 2016.

KUSHALAPPA, A. C.; GUNNAIAH, R. Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 9, p. 522–531, 2013.

LIMA, K. et al. Temporal dynamic responses of roots in contrasting tomato genotypes to cadmium tolerance. p. 245–258, 2018.

LISEC, J. et al. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 387–396, 2006.

LOWE-POWER, T. M. et al. Metabolomics of tomato xylem sap during bacterial wilt reveals Ralstonia solanacearum produces abundant putrescine, a metabolite that accelerates wilt disease. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 1330–1349, 2018.

MACEDO, I. C. Sugar Cane's Energy: Twelve studies on Brazilian sugar cane agribusiness and its sustainability. **Unica**, n. October, p. 1–230, 2007.

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

MISZALSKI, Z.; ZIEGLER, H. Superoxide Dismutase and Sulfite Oxidation. **Zeitschrift fur**

Naturforschung - Section C Journal of Biosciences, v. 47, n. 5–6, p. 360–364, 1992.

MONTEIRO-VITORELLO, C. B. et al. The Genome Sequence of the Gram-Positive Sugarcane Pathogen Leifsonia xyli subsp . xyli. v. 17, n. 8, p. 827–836, 2004.

NAUMANN, M. et al. Sulfite reductase co-suppression in tobacco reveals detoxification mechanisms and downstream responses comparable to sulfate starvation. **Frontiers in Plant Science**, v. 871, n. October, p. 1–18, 2018.

NDC BRASIL, R. F. DO B. Contribuição Nacionalmente Determinada Para Consecução Do Objetivo Da Convenção-Quadro Das Nações Unidas Sobre Mudança Do Clima. **Unfccc**, v. 9, p. 6, 2015.

OAKLEY, A. J. Glutathione transferases: New functions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 15, n. 6, p. 716–723, 2005.

OMENA-GARCIA, R. P. et al. Identification of metabolite traits from the current metabolomic approaches. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 31, n. 1, p. 1–19, 2019.

PRODHAN, M. A. et al. Tight control of sulfur assimilation: an adaptive mechanism for a plant from a severely phosphorus-impoverished habitat. **New Phytologist**, v. 215, n. 3, p. 1068–1079, 2017.

QUECINE, M. C. et al. A stable Leifsonia xyli subsp . xyli GFP-tagged strain reveals a new colonization niche in sugarcane tissues. p. 154–162, 2016.

PRODHAN, M. A. et al. Tight control of sulfur assimilation: an adaptive mechanism for a plant from a severely phosphorus-impoverished habitat. **New Phytologist**, v. 215, n. 3, p. 1068–1079, 2017.

RAHMAN, M. A.; ABDULLAH, H.; VANHAECKE, M. Histopathology of susceptible and resistant Capsicum annuum cultivars infected with Ralstonia solanacearum. **Journal of Phytopathology**, v. 147, n. 3, p. 129–140, 1999.

RAI, V. K. **Role of amino acids in plant responses to stressesBiologia Plantarum**, 2002.

SÁNCHEZ-ELORDI, E. et al. Polyamines levels increase in smut teliospores after contact with sugarcane glycoproteins as a plant defensive mechanism. **Journal of Plant Research**, v. 132, n. 3, p. 405–417, 2019.

SCHAKER, P. D. C. et al. Metabolome dynamics of smutted sugarcane reveals mechanisms involved in disease progression and whip emission. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. May, p. 1–17, 2017.

TEAKLE, D. S.; APPLETON, J. M.; STEINDL, D. R. L. An anatomical basis for resistance of sugar cane to ratoon stunting disease. **Physiological Plant Pathology**, v. 12, n. 1, p. 83–91, 1978.

URASHIMA, A. S. et al. Prevalence and Severity of Ratoon Stunt in Commercial Brazilian Sugarcane Fields. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 815–821, 2017.

VAN DE MORTEL, J. E. et al. Metabolic and Transcriptomic Changes Induced in Arabidopsis by the Rhizobacterium Pseudomonas fluorescens SS101 . **Plant Physiology**, v. 160, n. 4, p. 2173–2188, 2012.

VAN GENUCHTEN, M. T. **van_Genuchten1980.pdfSoil. Sci. Soc. Am.**, 1980.

VILAS, J. M. et al. Modulation of plant and bacterial polyamine metabolism during the compatible interaction between tomato and Pseudomonas syringae. **Journal of Plant Physiology**, v. 231, n. September, p. 281–290, 2018.

WEAVER, L.; TEAKLE, D. S.; HAYWARD, A. C. Ultrastructural studies on the bacterium associated with the ratoon stunting disease of sugarcane. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 28, n. 5, p. 843–852, 1977.

WILLIAMS, J. S. et al. Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. **Plant physiology**, v. 128, n. 1, p. 150–159, 2002.

WONG, J. W. H. et al. The Influence of Contrasting Microbial Lifestyles on the Pre-symbiotic Metabolite Responses of Eucalyptus grandis Roots. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, n. February, 2019.

YADETA, K. A. et al. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. v. 4, n. April, p. 1–12, 2013.

YARMOLINSKY, D. et al. Sulfite reductase protects plants against sulfite toxicity. **Plant Physiology**, v. 161, n. 2, p. 725–743, 2013.

YOUNG, A. J. Possible origin of ratoon stunting disease following interspecific hybridization of Saccharum species. 2016.

YOUNG, A. J. et al. Molecular Detection of Diverse Leifsonia Strains Associated With Sugarcane. **Plant disease**, v. 101, n. 8, p. 1422–1431, 2017.

ZEIER, J. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, n. 12, p. 2085–2103, 2013.

ZHANG, X. et al. Morphological and physiological responses of sugarcane to Leifsonia xyli subsp. xyli infection. **Plant Disease**, v. 100, n. December, p. 1–8, 2016a.

ZHANG, X. et al. Influence of Inoculation of Leifsonia xyli subsp . xyli on Photosynthetic Parameters and Activities of Defense Enzymes in Sugarcane. **Sugar Tech**, 2016b.

FIGURAS

EXPERIMENTO I

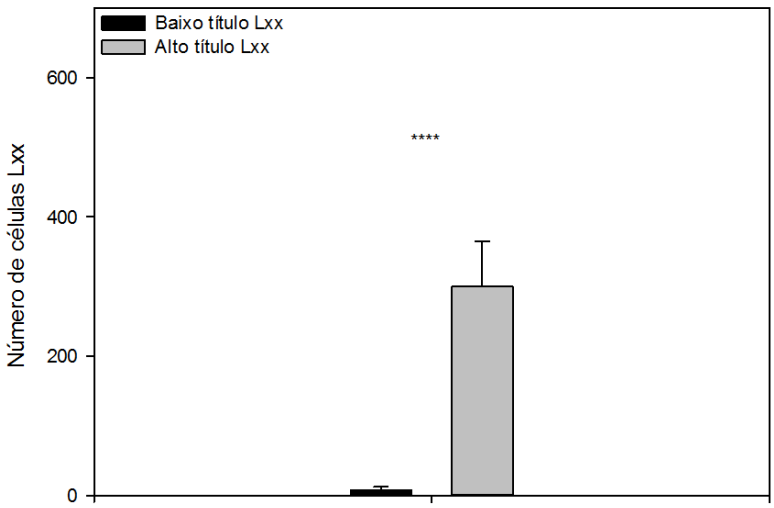


Figura 1. Quantificação do número de bactérias na folha (número de células Lxx / 100ng de DNA vegetal) realizadas por meio de qPCR entre tratamentos de cana-de-açúcar (n = 5). Diferença de média entre os tratamentos foram obtidas através teste t ($p<0,05$).

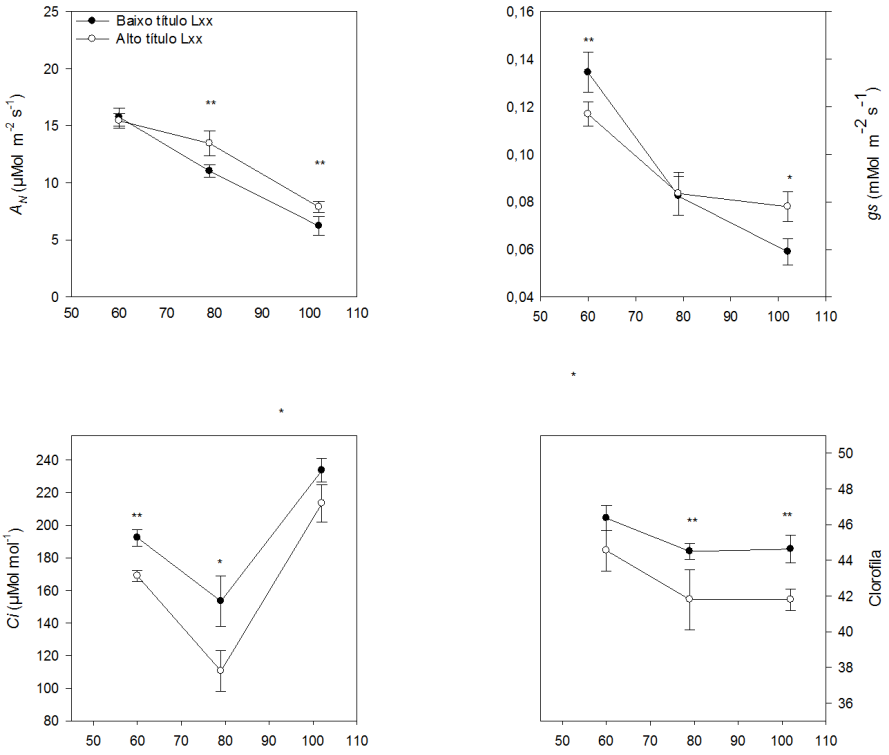


Figura 2. Análise da assimilação de CO_2 (A_N), condutância estomática (*gs*), carbono interno (*Ci*) e índicie de clorofila na folha (SPAD) nas plantas com alto título de *Lxx* e baixo título de *Lxx* . Diferença de média entre os tratamentos foram obtidas através teste t ($p<0,05$)

Figura 3. A) A esquerda folha das plantas com baixo título bacteriano e a direita folha com alto título bacteriano. B) Vasos com plantas com baixo título bacteriano (esquerda) e plantas com alto título bacteriano (direita).

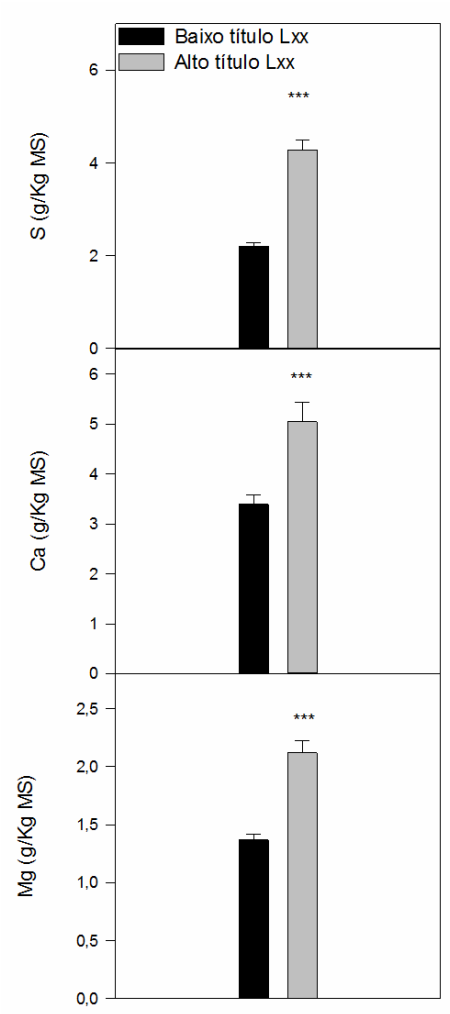


Figura 4. Concentrações de enxofre (S), cálcio (Ca) e Mangésio (Mg) na folha (g Kg^{-1} máteria seca) nas plantas com baixo e alto título *Lxx*. Diferença de média entre os tratamentos foram obtidas através teste t ($p<0,05$).

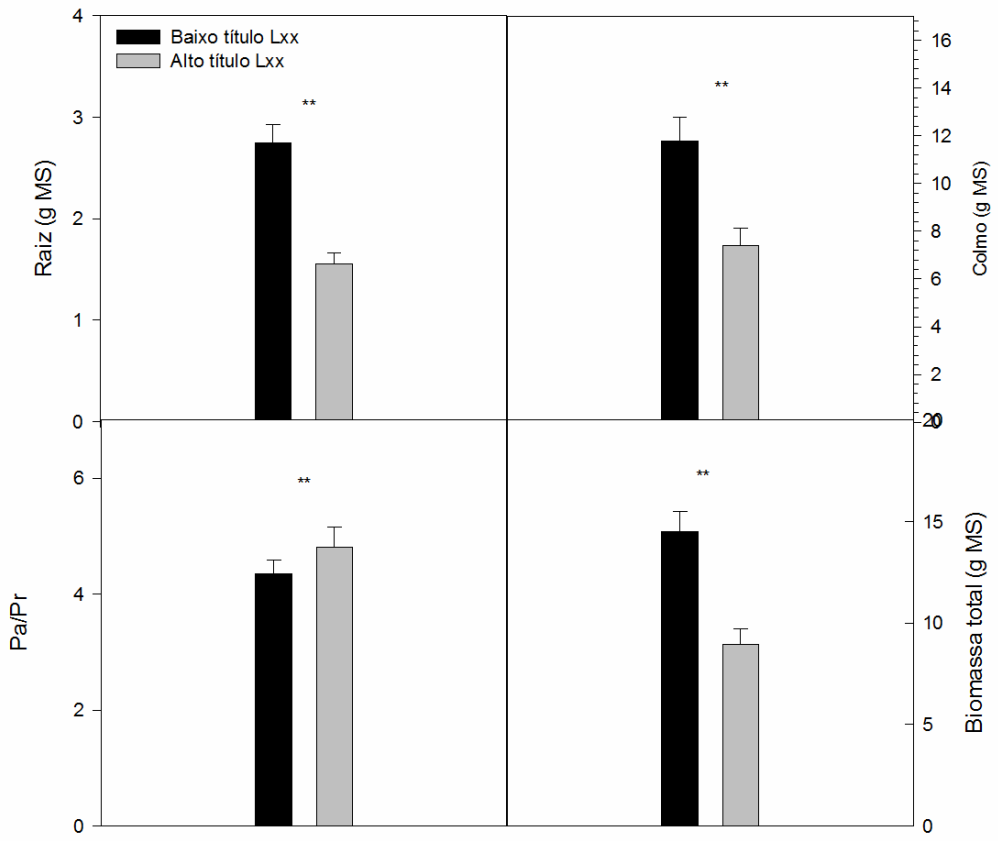


Figura 5. Produção de biomassa da raiz, colmo, biomassa total (g matéria seca) e relação parte aérea/raiz das plantas com alto e baixo título de *Lxx*. Diferença de média entre os tratamentos foram obtidas através teste t ($p<0,05$).

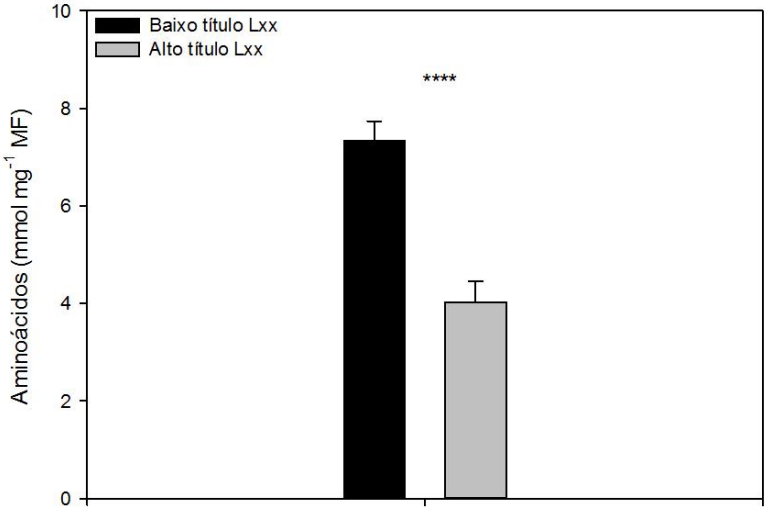


Figura 6. Concentração de aminoácidos livre na folha (mmol mg^{-1} matéria fresca) em plantas com baixo e alto título de *Lxx*. Diferença de média entre os tratamentos foram obtidas através teste t ($p < 0,05$).

EXPERIMENTO II

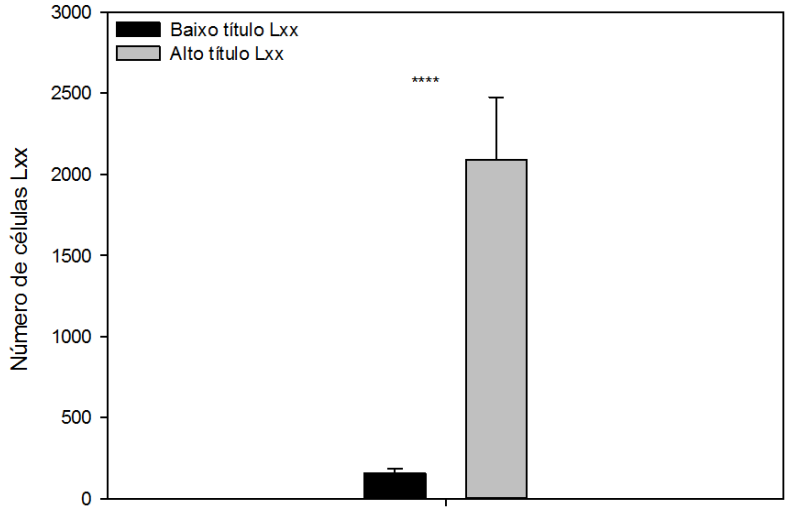


Figura 7. Quantificação do número de bactérias na folha (número de células *Lxx* / 100ng de DNA vegetal) realizadas por meio de qPCR entre tratamentos de cana-de-açúcar (n = 5). Diferença de média entre os tratamentos foram obtidas através teste t (p<0,05).

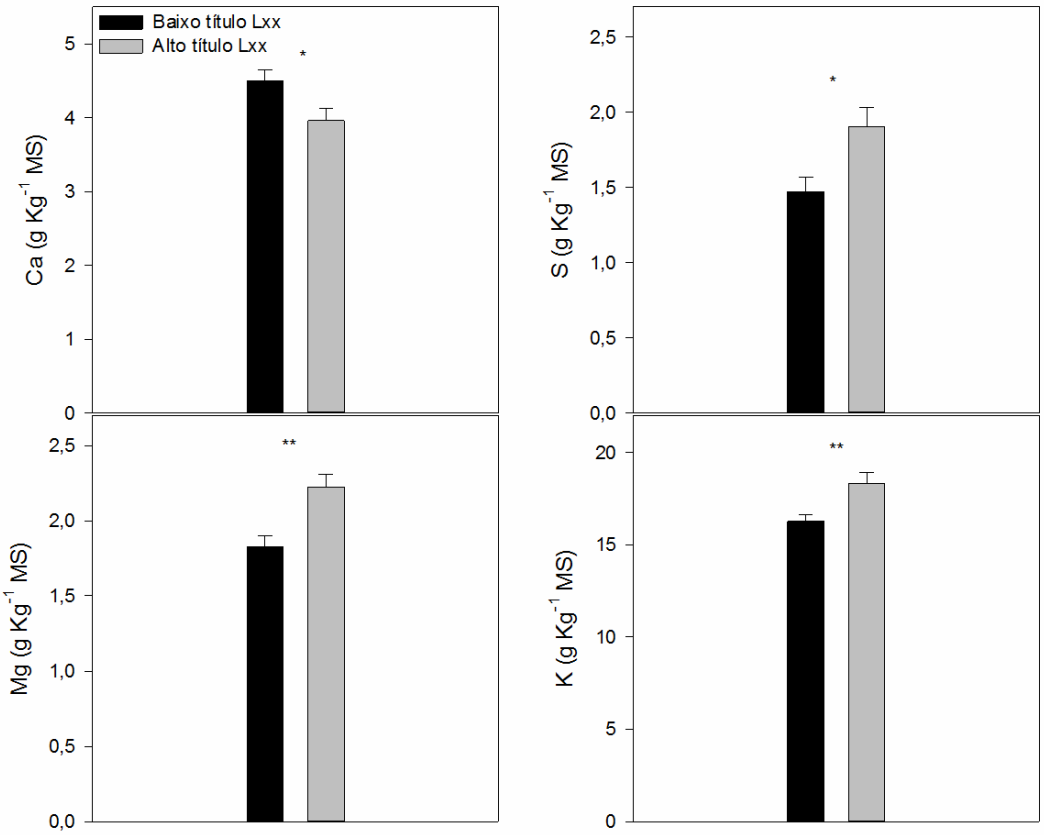


Figura 8. Concentração enxofre (S), cálcio (Ca) e Mangésio (Mg) na folha (g Kg^{-1} máteria seca) nas plantas com baixo e alto título de *Lxx*. Diferença de média entre os tratamentos foram obtidas através teste t (p<0,05).

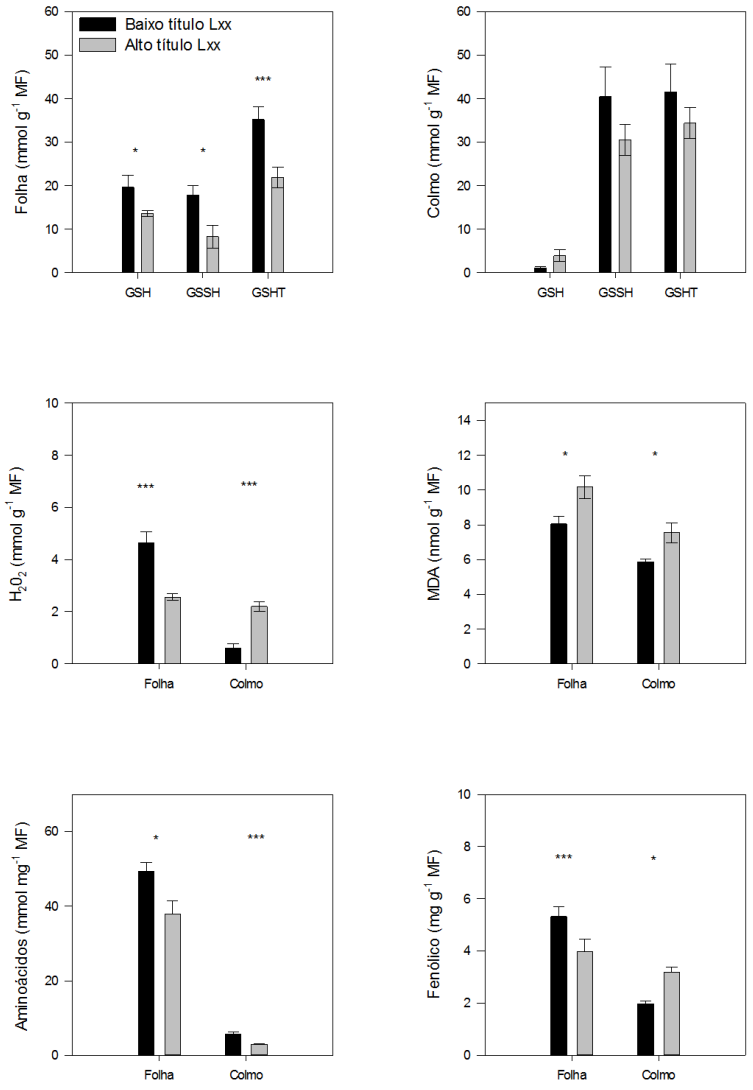


Figura 9. Concentração , glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSH), glutationa total (GT) na folha e no colmo, peróxido de hidrogênio, malonoaldeído, aminoácidos livres e fenólicos analisados na folha e no colmo em plantas com baixo e alto título de *Lxx*. Diferença de média entre os tratamentos foram obtidas através teste t ($p<0,05$).

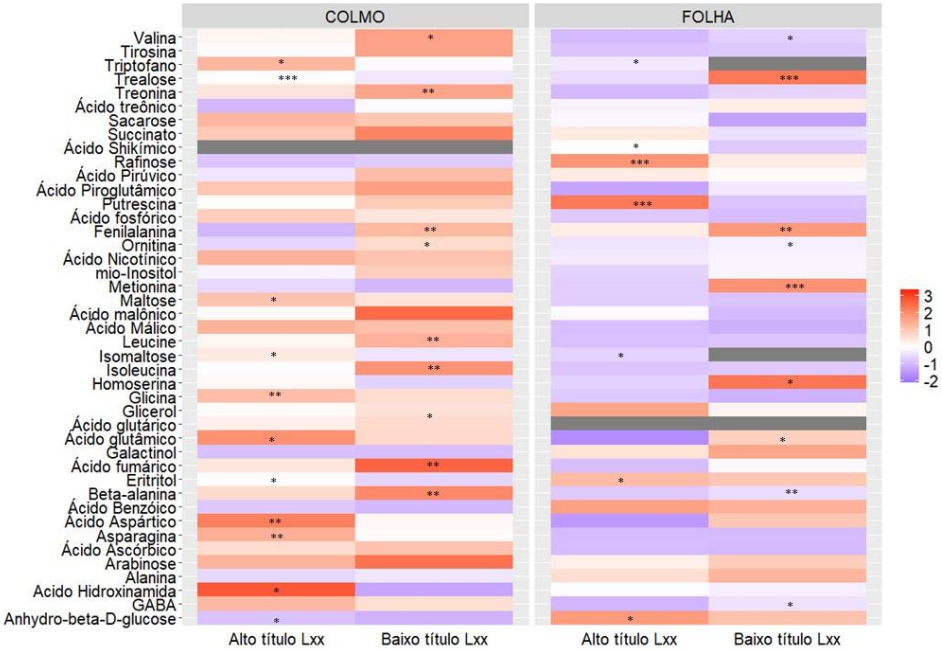


Figura 10. Análise de metabólitos na folha e no colmo de cana-de-açúcar com baixo título de *Lxx* e alto título de *Lxx*. Análise Heat Map foi utilizado para mostrar diferença na concentração dos metabólitos. Cor vermelha representa alta concentração de metabólitos e cor azul redução na concentração dos metabólitos na planta. Diferença de médias entre os tratamentos foram obtidas através do teste t ($p<0,05$).

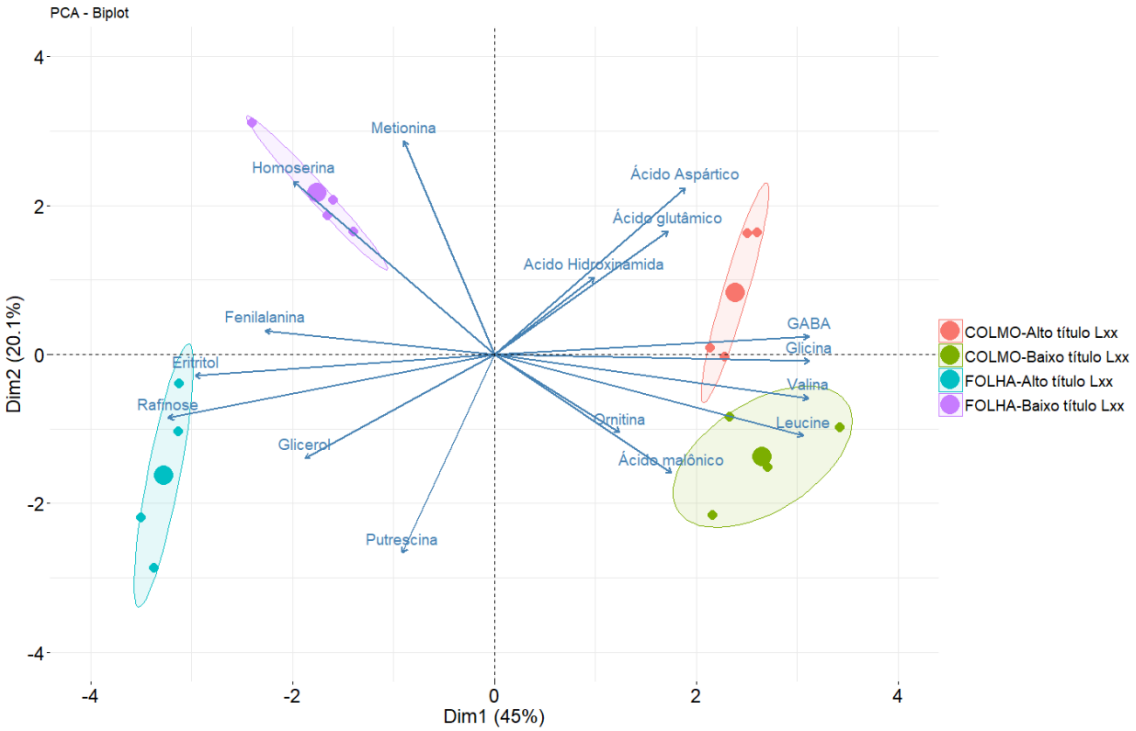


Figura 11. Análise de componentes principais em função da variação de matabólitos em folha e colmo em plantas com alto e baixo título de *Lxx* (n = 4). Os metabólitos na análise foram: homoserina, metionina, trealose, metionina, Sacarose, eritritol, rafinose, putrescina, ácido malônico, ornitina, valina e isoleucina, γ-aminobutírico (GABA), ácido glutâmico, ácido aspártico, ácido hidroxinamida e glicina.

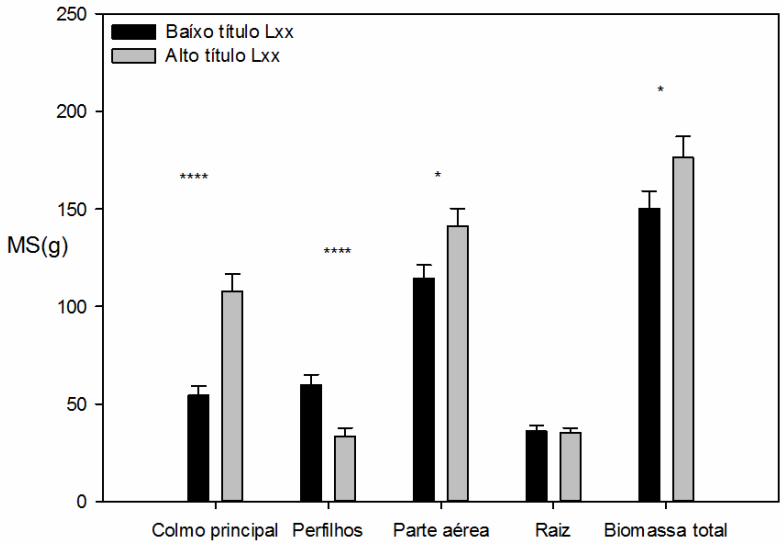


Figura 12. Produção de biomassa: colmo principal, perfilhos, raiz, colmo, total (g matéria seca) em plantas com alto e baixo título de *Lxx*. Diferença de médias entre os tratamentos foram obtidas através teste t ($p<0,05$).

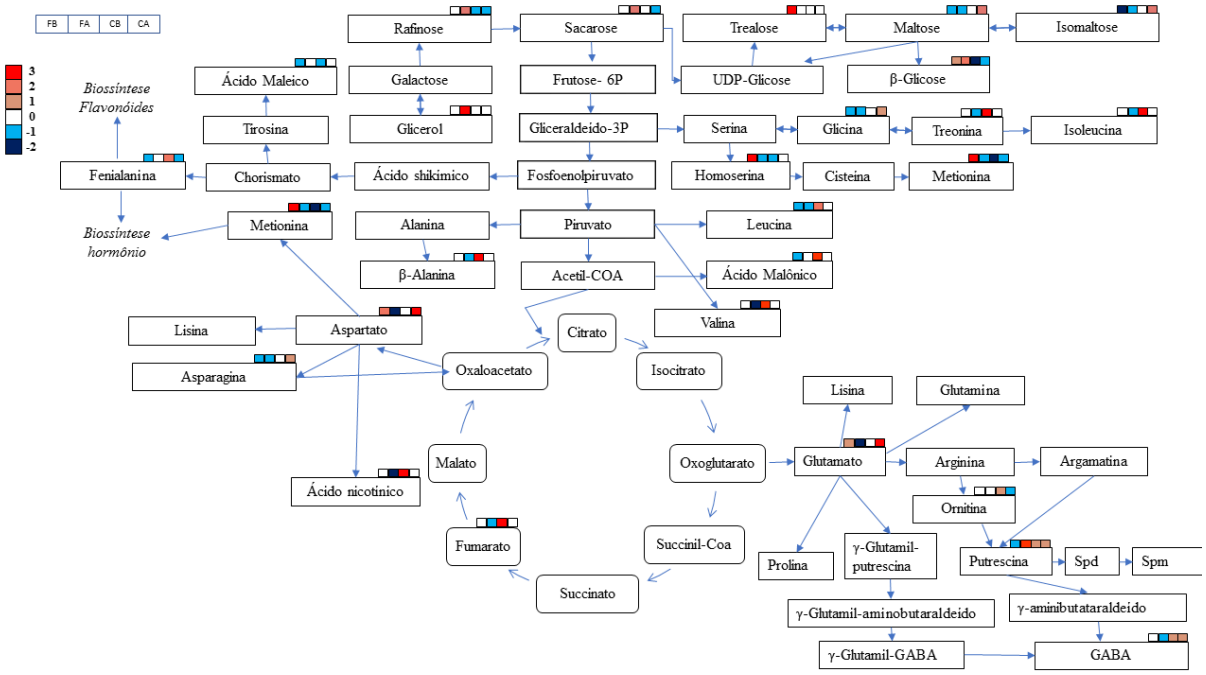


Figura 13. Alteração dos metabólitos das rotas da glicólises, Ciclo de Krebs e biossíntese de aminoácidos em função do crescimento bacteriano e dos órgãos: A análise dos metabólitos foi agrupada em folha: plantas com baixo título *Lxx* (FB) e alto título *Lxx* (FA); e colmo: plantas com baixo título de *Lxx* (CB) e alto título de *Lxx* (CA). A avaliação da intensidade por *Heatmap* foi feito apenas para os metabólitos que apresentaram diferença a partir da análise de variância ($p<0,05$).

EXPERIMENTO III

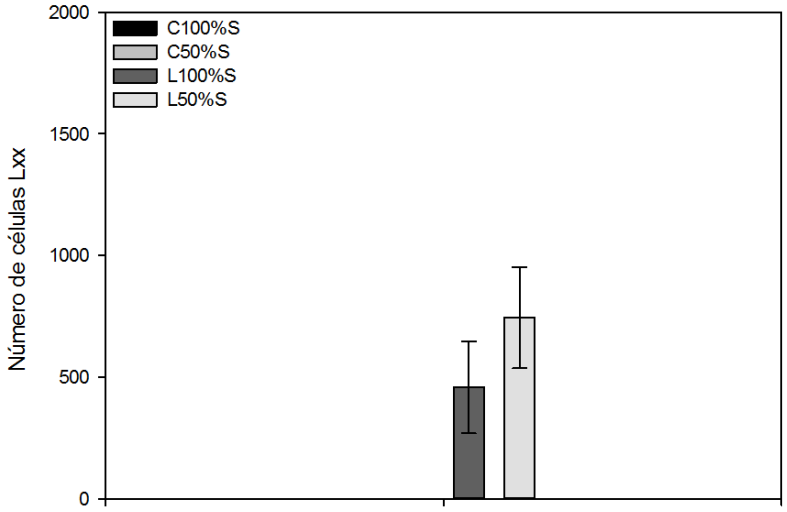


Figura 14. Quantificação do número de bactérias na folha (número de células *Lxx* / 100ng de DNA vegetal) realizadas por meio de qPCR entre tratamentos de cana-de-açúcar (n = 5): Plantas com baixo título de *Lxx* com 100% S na solução Hoagland (C100% S), Plantas com baixo título de *Lxx* com 50% S na solução Hoagland (C50% S), Plantas com alto título de *Lxx* com 100% S na solução Hoagland (L100% S), Plantas com alto título de *Lxx* com 50% S na solução Hoagland (L50% S) entre tratamentos de cana-de-açúcar (n = 5). Diferença de média entre os tratamentos (n = 4) foram obtidas através do teste tukey ($p<0,05$).

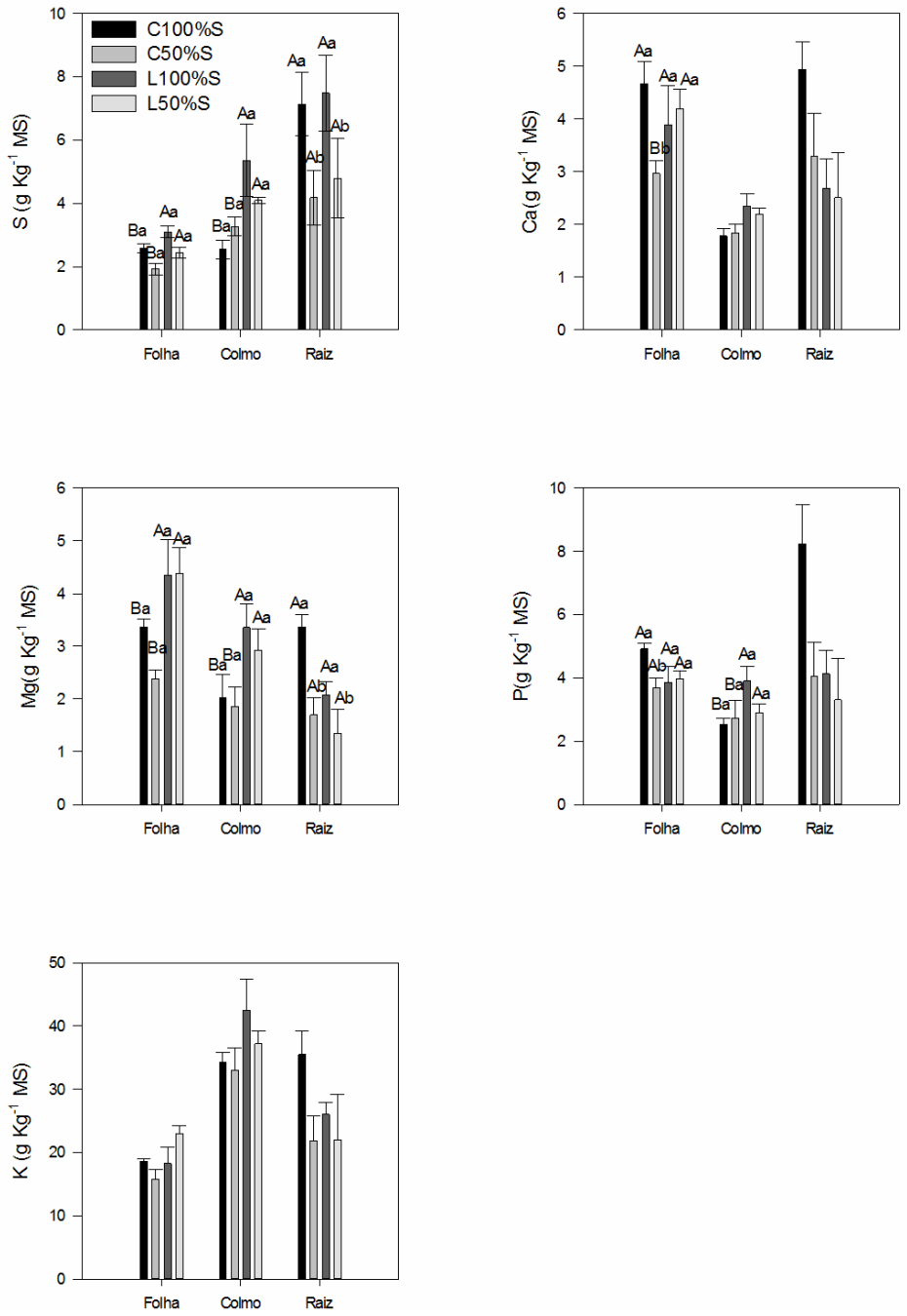


Figura 15. Concentração enxofre (S), cálcio (Ca) , Mangésio (Mg), fósforo (P) e cálcio (Ca) em folha, colmo plantas submetidas aos seguintes tratamentos: Plantas com baixo título de *Lxx* com 100% S na solução Hoagland (C100% S), Plantas com baixo título de *Lxx* com 50% S na solução Hoagland (C50% S), Plantas com alto título de *Lxx* com 100% S na solução Hoagland (L100% S), Plantas com alto título de *Lxx* com 50% S na solução Hoagland (L50% S) entre tratamentos de cana-de-açúcar (n = 5). Diferença de média entre os tratamentos (n = 4) foram obtidas através do teste tukey ($p<0,05$).

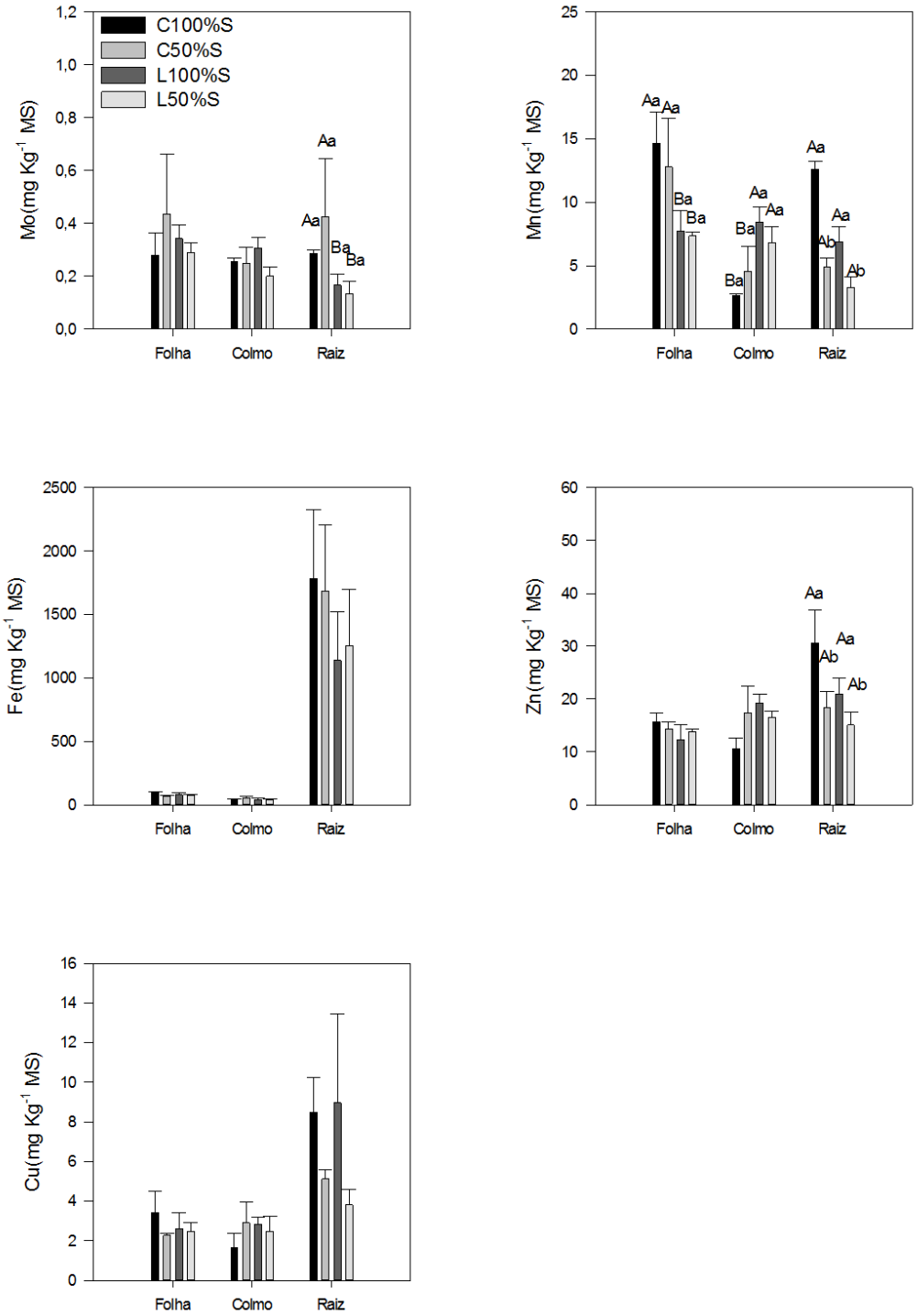


Figura 16. Concentração molibdênio (Mo), manganês (Mn), ferro (Fe), zinco (Zn) e cobre (Cu) em folha, colmo e raiz plantas submetidas aos seguintes tratamentos: Plantas com baixo título de *Lxx* com 100% S na solução Hoagland (C100% S), Plantas com baixo título de *Lxx* com 50% S na solução Hoagland (C50% S), Plantas com alto título de *Lxx* com 100% S na solução Hoagland (L100% S), Plantas com alto título de *Lxx* com 50% S na solução Hoagland (L50% S) entre tratamentos de cana-de-açúcar (n = 5). Diferença de média entre os tratamentos (n = 4) foram obtidas através do teste tukey ($p<0,05$).

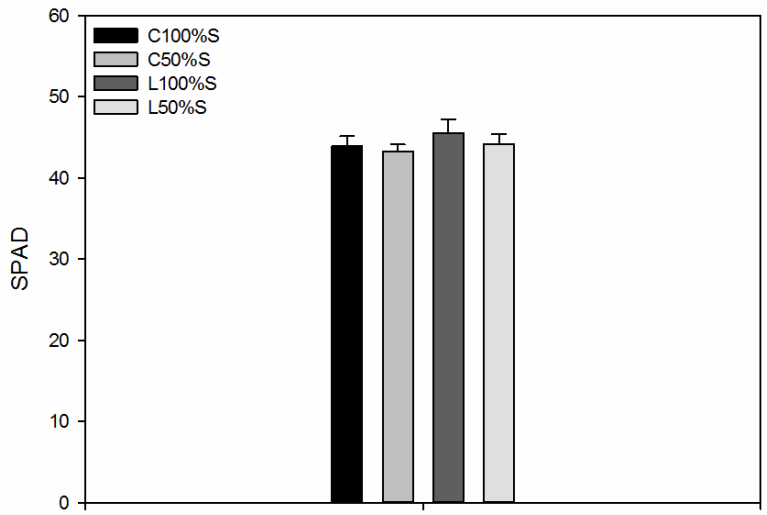


Figura 17. Índice de clorofila nas plantas submetidas aos tratamentos: Plantas com baixo título de *Lxx* com 100% S na solução Hoagland (C100% S), Plantas com baixo título de *Lxx* com 50% S na solução Hoagland (C50% S), Plantas com alto título de *Lxx* com 100% S na solução Hoagland (L100% S); Plantas com alto título de *Lxx* com 50% S na solução Hoagland (L50% S). Diferença de média entre os tratamentos (n = 4) foram obtidas através do teste tukey ($p<0,05$).

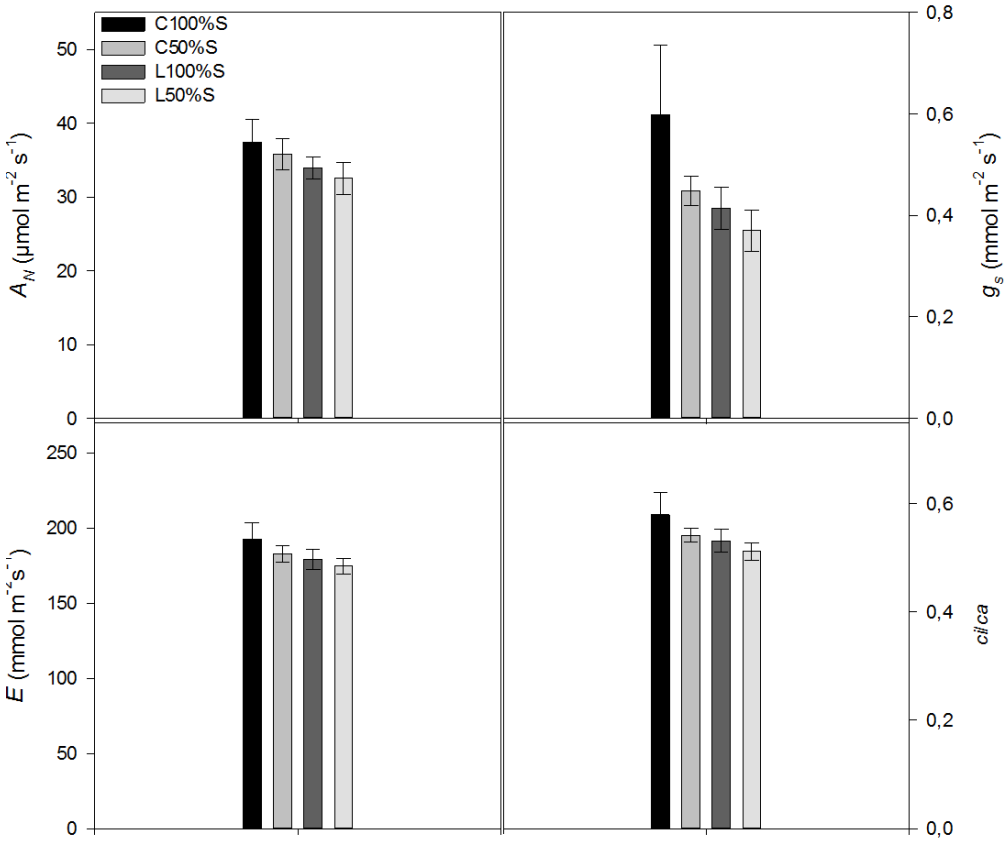


Figura 18. Assimilação de CO_2 (A_N), condutância estomática (*gs*), transpiração (*E*) e eficiência carboxilação (*ci/ca*) realizadas nas plantas submetidas aos seguintes tratamentos: Plantas com baixo título de *Lxx* com 100% S na solução Hoagland (C100% S), Plantas com baixo título de *Lxx* com 50% S na solução Hoagland (C50% S), Plantas com alto título de *Lxx* com 100% S na solução Hoagland (L100% S), Plantas com alto título de *Lxx* com 50% S na solução Hoagland (L50% S) entre tratamentos de cana-de-açúcar (n = 5). Diferença de média entre os tratamentos (n = 4) foram obtidas através do teste tukey ($p<0,05$).

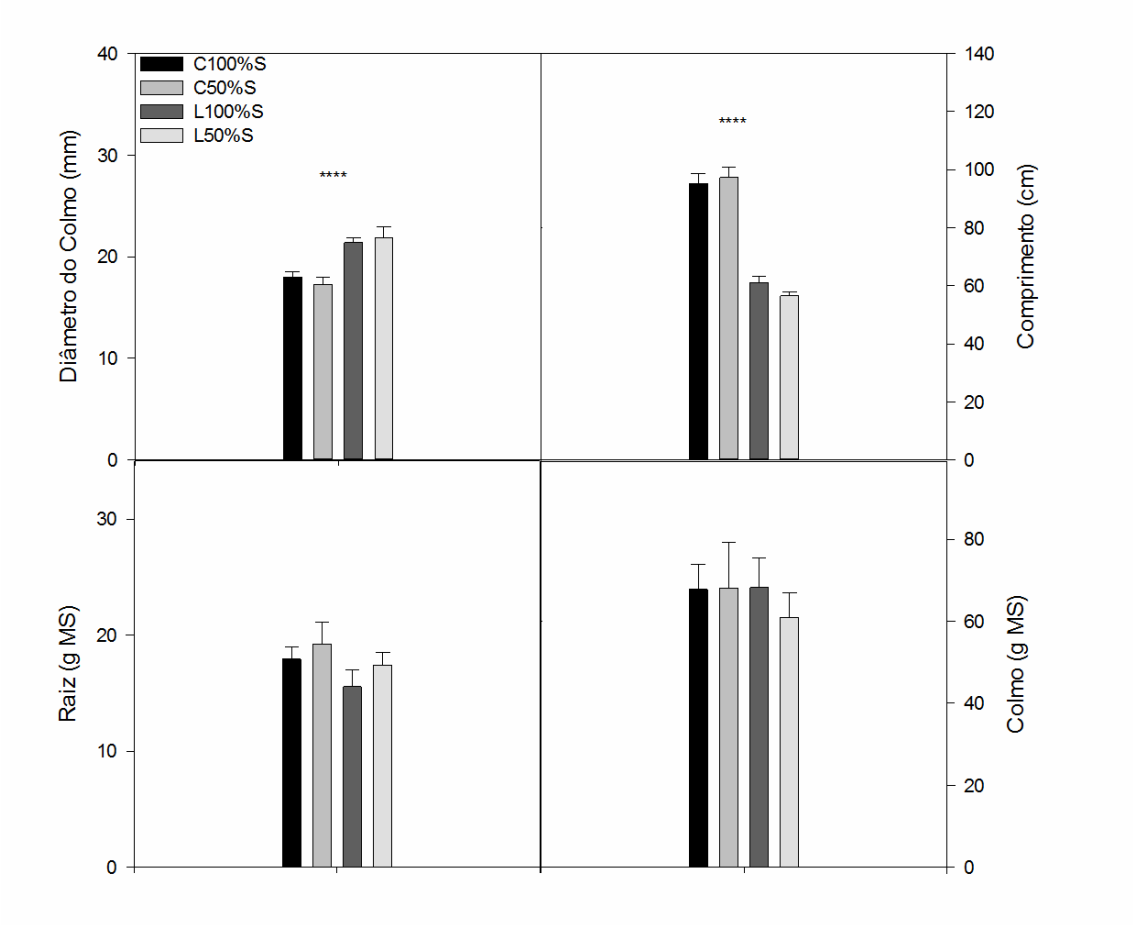


Figura 19. Diâmetro do colmo (cm), comprimento do colmo (cm), produção de biomassa colmo e raiz (g matéria seca) nas plantas submetidas aos seguintes tratamentos: Plantas com baixo título de *Lxx* com 100% S na solução Hoagland (C100% S), Plantas com baixo título de *Lxx* com 50% S na solução Hoagland (C50% S), Plantas com alto título de *Lxx* com 100% S na solução Hoagland (L100% S), Plantas com alto título de *Lxx* com 100% S na solução Hoagland (L50% S) entre tratamentos de cana-de-açúcar (n = 5). Diferença de média entre os tratamentos (n = 4) foram obtidas através do teste tukey ($p<0,05$).

4 CONCLUSÕES GERAIS

- Neste estudo foi mostrado que os sintomas do Raquitismo das Soqueiras não está associado ao déficit hídrico, pois a colonização da bactéria na planta não reduziu o teor relativo de água na planta;
- O crescimento do título bacteriano na planta altera o desenvolvimento da cana-de-açúcar, que afeta o particionamento de carbono havendo um acúmulo precoce de açúcares a partir da menor formação de perfilhos na planta (drenos);
- O sintoma de Raquitismo das Soqueiras está associado com aumento da demanda de S na planta, onde o crescimento bacteriano reduziu a absorção de molibdênio devido ao aumento de absorção de S, podendo levar a deficiência de molibdênio ao longo do desenvolvimento da cana-de-açúcar no campo.