



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

DETECÇÃO DE *Leifsonia xyli* subsp *xyli* EM MUDAS-PRÉ-BROTADAS DE
CANA-DE-AÇÚCAR

DANIELLE DE OLIVEIRA
PROF. DR. ALFREDO SEIITI URASHIMA

ARARAS

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

**DETECÇÃO DE *Leifsonia xyli* subsp *xyli* EM MUDAS-PRÉ-BROTADAS DE
CANA-DE-AÇÚCAR**

DANIELLE DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. ALFREDO SEITI URASHIMA

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produção
Vegetal e Bioprocessos Associados
como requisito parcial à obtenção do
título de MESTRE EM PRODUÇÃO
VEGETAL E BIOPROCESSOS
ASSOCIADOS

Araras

2017

OLIVEIRA, DANIELLE

DETECÇÃO DE *Leifsonia xyli* subsp *xyli* EM
MUDAS-PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR / DANIELLE
OLIVEIRA. -- 2017.
52 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus
Araras, Araras

Orientador: ALFREDO SEIITI URASHIMA

Banca examinadora: Roberto Giacomini Chapola, Luís Otávio Saggion

Beriam

Bibliografia

1. raquitismo-das-soqueiras. 2. diagnóstico. 3. disseminação. I.
Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Danielle de Oliveira, realizada em 29/06/2017:



Prof. Dr. Alfredo Seiti Urashima
UFSCar



Prof. Dr. Luis Otávio Saggion Beriam
IBC-SP



Prof. Dr. Roberto Giacomini Chapola
FAI

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro obrigado é para Deus, que está sempre ao meu lado, me fazendo mais forte a cada dia.

A toda minha família, em especial a minha mãe Geralda, meu padrasto Gilcimar, e as minhas irmãs Joyce, Tamiris e Laura, que são a base de quem sou e de onde meus valores vieram. São todos eles que me dão um incalculável suporte e que me ajudam a enfrentar até os mais difíceis momentos da minha vida.

Agradeço também ao meu querido parceiro Jean, que tem estado ao meu lado por quase metade da minha vida, me apoiando e me fortalecendo nesta caminhada que escolhemos ir juntos.

A meu caro orientador professor Alfredo, que abriu as portas para mim, desde quando comecei como aluna especial, quem acreditou em mim e devotou seu tempo e conhecimento a mim. Com essa oportunidade puder aprender muito, apresentar em congressos nacionais e internacionais e crescer imensamente como pessoa.

Agradeço também as técnicas do laboratório LAGEM, Nathália e Monique e aos estagiários, que muitas vezes me ajudaram, seja com alguma atividade ou com conhecimentos.

Aos meus amigos de mestrado, por essa jornada que desfrutamos juntos, aprendendo e nos divertindo também. Em especial a minha companheira Tatiane, quem tornou mais fácil minha imersão na fitopatologia e que hoje é uma verdadeira amiga que levo comigo.

A todos os professores e funcionários do PPGPVBA, em especial à coordenadora Sandra, que com todo seu conhecimento e dedicação, vêm construindo um incrível programa de pós numa das mais renomadas universidades do país.

Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A cada professor da minha banca de qualificação e de defesa, que doaram seu tempo para melhorar meu trabalho.

Obrigada a todos, esse trabalho não seria possível sem cada um de vocês.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	03
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	04
3.1 Cana-de-açúcar.....	04
3.2 Raquitismo das soqueiras.....	06
3.3 Importância econômica.....	07
3.4 Detecção de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	08
3.5 Avanços Moleculares sobre <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	09
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
4.1 Seleção de genótipos com diferentes concentrações de Lxx.....	11
4.1.1 <i>Extração de seiva de cana-de-açúcar</i>	11
4.1.2 <i>Diagnose sorológica</i>	12
4.2 Diagnose molecular.....	14
4.2.1 Extração de DNA total de tecido.....	14
4.2.2 <i>Primers</i> específicos e condições de amplificação	14
4.2.3 Parâmetros de seleção de <i>primers</i>	16
4.2.3.1 Sensibilidade.....	16
4.2.3.1.1 Lxx em diferentes concentrações.....	16
4.2.3.1.2 DNA N4 em diluição seriada.....	17
4.2.3.1.3 Análise de dados de sensibilidade.....	18
4.2.3.2 Especificidade e acurácia dos conjuntos de <i>primers</i>	18
4.3 Validação dos conjuntos de <i>primers</i> selecionados.....	20
4.3.1 Extração de DNA total de tecido de MPB.....	20
4.3.2 Detecção de Lxx em MPB de 45 e 60 dias.....	21
4.3.3 Análise de dados de detecção de Lxx em MPB.....	21

5	RESULTADOS	22
5.1	Seleção de genótipos com diferentes concentrações de Lxx.....	22
5.2	Sensibilidade dos conjuntos de <i>primers</i> usando diferentes concentrações de Lxx.....	23
5.3	Sensibilidade dos conjuntos de <i>primers</i> usando diluição seriada de DNA N4.....	26
5.4	Especificidade e acurácia dos conjuntos de <i>primers</i>	26
5.5	Detecção de Lxx em MPB de 45 e 60 dias.....	29
6	DISCUSSÃO	31
7	CONCLUSÕES	36
8	LITERATURA CITADA	37

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Redução na produtividade de cana-de-açúcar em consequência da presença do Raquitismo das Soqueiras.....	08
Tabela 2. Lista de DNA totais extraídos de tecido de cana-de-açúcar utilizados para teste de sensibilidade dos <i>primers</i> específicos para <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (Lxx).....	17
Tabela 3. Lista de DNA utilizados no teste de especificidade e acurácia dos <i>primers</i> específicos para <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (Lxx).....	19
Tabela 4. Lista de DNA total extraído de mudas-pré-brotadas (MPB) com 45 e 60 dias após plantio utilizado no teste de detecção de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	21
Tabela 5. Eficiência da detecção molecular de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> baseado em sensibilidade.....	25
Tabela 6. Eficiência da detecção molecular de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> baseada em especificidade e acurácia.....	28
Tabela 7. Validação da detecção molecular em mudas-pré-brotadas (MPB) com raquitismo-das-soqueiras.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Extração de seiva de cana-de-açúcar utilizando ponteira adaptada e corte oblíquo na ponta da cana.....	12
Figura 2. Aparato com membrana utilizado no teste sorológico Dot Blot	13
Figura 3. Região de coleta de tecido de muda-pré-brotada para extração de DNA total.....	20
Figura 4. Análise diagnóstica de raquitismo-das-soqueiras por técnica sorológica <i>Dot Blot Immunoassay</i>	23
Figura 5. Gráfico de sensibilidade da detecção molecular de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (Lxx) em diluição seriada de DNA N4 (10^6 UFC/mL).....	26
Figura 6. Mudanças-pré-brotadas de duas diferentes idades originadas de cana-de-açúcar com <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	29
Figura 7. Detecção molecular de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (Lxx) em DNA total extraído de mudas-pré-brotadas originadas de canas positivas para Lxx nas concentrações entre 10^9 e 10^6 UFC/mL.....	30

DETECÇÃO DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* EM MUDAS-PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Autor: DANIELLE DE OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. ALFREDO SEITI URASHIMA

RESUMO

A primeira grande mudança nos últimos anos do setor sucroenergético brasileiro ocorreu quando a colheita mecânica substituiu os cortes manuais de canas queimadas. A segunda transformação começou com a mecanização de materiais de plantio e isso está sendo possível pelo uso da nova metodologia: mudas pré-brotada (MPB). Para garantir o sucesso desta inovação é fundamental o uso de MPB sadias, especialmente contra a doença raquitismo-das-soqueiras, causada pela bactéria fastidiosa *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). Esta doença é considerada a mais importante do setor e os únicos meios de transmissão para novas áreas é pelo uso de materiais propagativos contaminados. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um teste de diagnóstico de rotina para a detecção precoce de Lxx em MPB. No primeiro ensaio, quatro pares de primers já publicados, Cxx ITSF # 5/Cxx ITSr # 5, Cxx1/ Cxx2 , C2F/C2R , LX23SF/LX23SR , foram desafiados sob as condições recomendadas pelos autores, bem como, as nossas próprias modificações. Para isso foram utilizadas cana-de-açúcar adulta com Lxx em várias concentrações. No segundo ensaio, dois dos melhores primers/condições foram testadas contra MPB de 45 e 60 dias de idade derivadas de materiais contaminados com Lxx. Nosso resultado mostrou que o par de primers CXX ITSF # 5/Cxx ITSr # 5 sob nossas modificações foi o mais acurado, uma vez Lxx foi detectada em todos os 52 MPB de 45 dias originadas de materiais propagativos contaminados com 10^9 até 10^6 UFC / mL de Lxx.

DETECTION OF *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* IN PRESROUTED SEEDCANE**Author: DANIELLE DE OLIVEIRA****Adviser: Prof. Dr. ALFREDO SEITI URASHIMA****ABSTRACT**

The first great change in recent years of the Brazilian sugarcane industry occurred when mechanical harvest replaced the manual cuttings of burned canes. The second transformation has started with mechanization of planting materials thanks to new methodologies such as pre-sprouted cane (MPB in Portuguese). To ensure the success of this innovation, however, is paramount the use of clean seed cane, especially against ratoon stunting disease, caused by the fastidious bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). This disease is considered the most important and the only means of transmission to new area is the use of contaminated propagative materials. Therefore, the purpose of this work was to develop a routine diagnostic test for early detection of Lxx in MPB seedlings. In the first assay, four previously published pair of primers, Cxx ITSf#5/Cxx ITSr#5, Cxx1/Cxx2, C2F/C2R, LX23SF/LX23SR, was challenged under the conditions described, as well as, our own modifications against adult diseased sugarcane with various concentrations of Lxx. In the second assay, two of the best primers/conditions were tested against MPB seedlings of 45 and 60 days of age derived from Lxx-contaminated materials. Our result showed primers Cxx ITSf#5/Cxx ITSr#5 run under our modifications was the recommended since Lxx was detected in all 52 MPB seedlings of 45 days resulted from propagative materials contaminated with 10^9 up to 10^6 UFC/mL.

1 INTRODUÇÃO

Através da cana-de-açúcar podem-se obter vários produtos, dentre eles o açúcar que é consumido mundialmente, o etanol, que é um combustível sustentável, sendo que o etanol produzido de cana tem maior rendimento quando comparado com o etanol de milho e também energia elétrica, que é uma ótima opção sustentável, principalmente comparada com as termoelétricas (BRASKEM, 2015).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar com a safra 2016/17 estimada em mais de 690 milhões de toneladas (CONAB, 2016). A produção de cana tem crescido a cada ano, sendo que na safra de 2015/16 houve um aumento de 3,1% e na safra de 2016/2017 de 3,8%. Entretanto a produtividade não cresce na mesma proporção, tendo crescido apenas 2,4% em 2015 e sofrendo decréscimo de 1% em 2016 (CONAB, 2015; CONAB, 2016), ou seja, o aumento de produção está ocorrendo mais pelo aumento de área do que por aumento de produtividade.

Uma das causas de declínio de produtividade da cana é o raquitismo-da-soqueira (RDS), que tem como agente causal a bactéria fastidiosa *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) que é uma das principais doenças da cultura. Em um estudo nos Estados Unidos, o RDS causou uma quebra de produtividade que variou de 9 a 33% em sete das oito variedades testadas (GRISHAM, 1991). Em outro experimento na Austrália a quebra variou de 12 a 37% (YOUNG e BRUMBLEY, 2004). De acordo com Viswanathan (2004) na Índia o declínio na produtividade foi de até 50%. No Brasil, em um experimento conduzido por Chagas e Matsuoka (1988) o dano foi de

21% e em outro experimento de 2009 variou de 1,6 a 27,5% (GAGLIARDI e CAMARGO, 2009).

Como a bactéria não possui vetor natural, a única forma de disseminação para novas áreas se dá por mudas infectadas e a transmissão para as plantas saudáveis ocorre através de facões e implementos agrícolas (HOY et al, 1999). No Brasil, na busca de adequar as leis ambientais, diminuir custos e aumentar a qualidade, a produção de cana vem sendo mecanizada. Essa transformação do setor se iniciou na colheita, atualmente, está em processo de mecanização a fase do plantio, em que pode ser usado as mudas-pré-brotadas (MPB) que traz grandes vantagens como mudas de alta qualidade e maior uniformidade do canavial, além de minimizar a disseminação de pragas de solo e reduzir até 90% da quantidade de mudas que vão para o campo (LANDELL et al, 2012).

Para garantir o sucesso desta inovação e que seu emprego ocorra em todo o Brasil, é necessário que as MPB não sejam disseminadoras de patógenos. Comstock (1996) em sua pesquisa comprovou que quanto maior o inóculo inicial de Lxx, maior a incidência de RDS. Sendo assim, o sucesso no controle da Lxx está na efetividade da exclusão deste patógeno, pois uma vez instalada, a doença causa declínio da produtividade, podendo chegar ao ponto de ser inviável a manutenção do canavial, tendo como consequência a realização da reforma precoce (MAGAREY et al, 2002).

Como a Lxx é de natureza fastidiosa, o RDS não apresenta sintomas característicos, o que torna necessário o uso da diagnose laboratorial (ROSA e CAMARGO, 2006). Atualmente a detecção da Lxx para exame de rotina tem sido feita por sorologia, que tem como material de análise a seiva da cana-de-açúcar, entretanto, como as MPB vão para o campo com 60 dias (LANDELL et al, 2012), não é possível coletar seiva nesta fase.

Por isso o setor necessita de um método mais refinado e acessível, que possibilite a detecção de Lxx antes das mudas irem para o campo. Uma alternativa é o uso da técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase), que é conhecida pela sua eficácia e sensibilidade. Atualmente temos diferentes *primers* específicos para Lxx, entretanto não há um protocolo para diagnose precoce da bactéria em MPB. Sendo assim, nosso objetivo foi desenvolver um teste diagnóstico para detecção de Lxx em MPB de cana-de-açúcar, antes das mesmas irem para o campo.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de um teste diagnóstico para detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em mudas-pré-brotadas de cana-de-açúcar.

Objetivos específicos:

- Selecionar genótipos com diferentes concentrações de Lxx;
- Testar quatro pares de *primers* em diversas condições de amplificação para detecção de Lxx em diferentes títulos da bactéria e selecionar o mais acurado.
- Validar a eficácia do melhor par de *primer* em mudas-pré-brotadas de 45 e 60 dias com diferentes concentrações da bactéria Lxx.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar pertencente à família Poaceae, tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum*, é uma planta semeverene, cultivada principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Acredita-se que a cana-de-açúcar foi domesticada pelo homem em Papua Nova Guiné (BRANDES, 1956). Também é conhecida por apresentar um dos mais complexos genomas entre as plantas cultivadas (INGELBRECHT et al, 1999).

Através da cana-de-açúcar é possível produzir vários produtos, como açúcar que é um dos mais importantes e antigos produtos derivados da cana; o etanol, que é um combustível sustentável para meios de transporte; bioenergia, que se tornou importante por ser uma alternativa em épocas de estiagem. Também é possível produzir plástico e vários outros produtos (BRASKEM, 2015).

A cultura foi introduzida no Brasil no início do século XVI e atualmente o país é o maior produtor mundial com uma área cultivada de mais de 9 milhões de hectares e produção estimada para safra de 2016/2017 de 690 milhões de toneladas (CONAB, 2016). Em 2012, o Brasil já atingia a marca de 31% da produção mundial de cana-de-açúcar (PROTOCOLO AGROAMBIENTAL, 2014). Além disso, o país é também o maior produtor de açúcar, com uma produção de 37 milhões de toneladas (USDA, 2016).

A cana-de-açúcar está presente nas cinco regiões do Brasil. No entanto, a região sudeste sozinha, possui 63% da área total de cana. O estado de São Paulo é o principal produtor, com 52,3% da área total do Brasil, isto se resume em quase 5 milhões de hectares e mais de 381 milhões de toneladas produzidas (CONAB, 2016).

Desde a introdução da cana no Brasil, o setor tem passado por momentos marcantes. Entre 2003 e 2009 o Brasil passou pela revolução flex, em que foi lançado carro flex e o primeiro avião movido a etanol, foi realizado o primeiro leilão de bioenergia e foi também quando se iniciou o uso de etanol nas corridas da Fórmula Indy. Outro grande marco desta época ocorreu em 2007, com a adesão das usinas paulistas ao Protocolo Agroambiental, onde o setor assumiu o compromisso de antecipar de 2021 para 2014 o fim da queimada na colheita em áreas planas e de 2031 para 2017 em áreas inclinadas. Com isso, a colheita mecanizada foi consolidada (ÚNICA, 2012).

Com a introdução da mecanização houve várias melhorias e avanços, como na parte ambiental, que deixou-se de emitir quase 1 tonelada de CO₂ eq por hectare (CAPAZ et al, 2013). Além disso, o risco de erosão diminuiu, pois é possível deixar no solo a palhada restante após a colheita, formando assim, uma camada de proteção que posteriormente será fonte de matéria orgânica (CANELLAS et al, 2010).

Com a mecanização da colheita, também houve diminuição de 32,74% no preço por tonelada colhida. A colheita mecanizada apresentou um custo de U\$3,06 por tonelada contra U\$4,14 da colheita manual. Já em relação à capacidade operacional, em uma mesma área, uma máquina trabalhando 15h/dia realizou a colheita em um total de 12 dias enquanto que a colheita manual foi realizada por uma média de 849,41 pessoas durante 7 dias, com rendimento de 9,31t/pessoa (RODRIGUES e SAAB, 2007).

Após a mecanização da colheita, o setor sucroenergético começou a mecanizar o plantio, o que vem muitas vezes associado ao uso de mudas pré-brotadas (MPB). Essa tecnologia de formação de mudas de cana foi apresentada em 2012, pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). As MPB apresentam mais vigor, sanidade e uniformidade de plantio, além de redução da quantidade de mudas que vão para o campo quando comparado com o plantio manual e com o plantio mecanizado convencional usando cana inteira (LANDELL et al, 2012).

3.2 RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS

O raquitismo das soqueiras (RDS), causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) é uma das principais doenças da cultura da cana-de-açúcar (DAVIS e BAILEY, 2000). Seu primeiro relato ocorreu em 1945, em uma área conhecida como Walkerton-Rosella na Austrália durante uma primavera seca, em que os canaviais da variedade Q28 apresentaram fraco desenvolvimento na soqueira (STEINDL e HUGHES, 1953). No Brasil, o RDS foi descrito pela primeira vez em 1956 no Rio de Janeiro (VEIGA, 1956).

Por ser difícil de isolar e cultivar *in vitro*, acreditou-se por muitos anos que a doença fosse causada por vírus. Em 1973, usando microscopia de contraste de fase foi possível observar bactérias em seiva do xilema retirada de canas contaminadas (DAVIS et al, 1980). Somente em um trabalho de Davis et al (1984) a bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* foi descrita como agente causal do RDS. No entanto, foi proposta a reclassificação da bactéria para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (EVTUSHENKO et al, 2000).

A bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é fastidiosa, gram-positiva, do grupo corineformes, sem flagelo, aeróbica obrigatória, pertencente a ordem Actinomycetales. As células são pleomórficas, baciliformes de 0,25-0,5 µm por 1-4 µm, com forma reta ou ligeiramente curva e de difícil cultivo *in vitro*. As colônias crescidas em meios de cultura sólido apresentam aspecto circular não pigmentado, com diâmetro entre 0,1 e 0,3 mm (DAVIS et al, 1984).

O RDS não apresenta sintomas característicos; o que pode ser observado com o passar das safras em variedades suscetíveis é o crescimento retardado das touceiras, com colmos atrofiados, queda de produção ao longo das safras, coloração laranja-avermelhada dos feixes vasculares e em casos extremos pode evoluir para morte da touceira (RICAUD, 1974). No entanto, algumas doenças, insetos, fatores ambientais e danos mecânicos podem resultar em sintomas internos e externos similares (GILLASPIE e TEAKLE, 1989). Os sintomas e sua intensidade são determinados por genótipo da variedade, ciclo da planta, condições climáticas, tratamentos culturais e estresses causados pelo uso de herbicidas e ocorrência de outras doenças (STEINDL, 1961).

O principal veículo de transmissão da Lxx para novas plantas dentro do talhão são as ferramentas de corte da cana-de-açúcar como podões, colheitadeiras, etc (GRISHAM, 1991). A bactéria tem alta capacidade de colonizar novos colmos, como mostra o trabalho de Hoy et al (1999) em que a disseminação por colheita mecanizada foi de 3,9 até 7,3 metros. Teakle et al (1978) mostrou em seu estudo que a Lxx coloniza apenas vasos de xilema mas Quecine et al (2016) mostra em seu trabalho que a colonização da Lxx não está limitada ao xilema, mas também clorênquima e células da bainha do feixe vascular. A disseminação para novos campos ocorre rapidamente por meio de plantio de mudas vindas de canaviais contaminados (HOY et al, 1999).

Devido a forma de disseminação para novas áreas, o controle da doença tem sido baseado no método de exclusão, ou seja, o uso de material sadio para plantio (MAGAREY et al, 2002). Em busca da sanidade das mudas, as matrizes são produzidas utilizando técnicas para controle da Lxx, como uso de cultura de meristema (ENDRESS, 1994) e o tratamento térmico dos toletes (FERNANDES JR et al, 2010). No entanto, essas técnicas possuem pontos negativos como variação somaclonal no caso de cultura de tecido e escape no controle, além de falhas na brotação quando utilizado tratamento térmico (CIDADE et al, 2006; CARVALHO et al, 2016). Por essas razões, as MPB tem ganhado espaço.

3.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A cana-de-açúcar, por ser uma importante matéria prima, está presente em diversos continentes e os relatos de RDS mostram que a doença está presente em quase todos os países produtores de cana. Desde a descoberta do RDS, foram realizados vários estudos sobre o impacto da doença. Esses estudos têm evidenciado grandes danos à produtividade (Tabela 1). Sendo assim, o RDS é considerado uma das mais importantes doenças da cana-de-açúcar.

Tabela 1 Redução na produtividade de cana-de-açúcar em consequência da presença do Raquitismo das Soqueiras.

País	Dano à produtividade	
	(%)	Fonte
África do Sul	1-41	Bailey e Bachet (1997)
Austrália	12-37	Young e Brumbley (2004)
Brasil	21	Chagas e Matsuoka (1988)
Brasil	0-32	Anonymous (1992/1993)
Brasil	1-27	Gagliardi e Camargo (2009)
Estados Unidos	2-24	Koike (1982)
Estados Unidos	8-23	Dean (1983)
Estados Unidos	5	Dean e Davis (1990)
Estados Unidos	14-27	Grisham (1991)
Índia	50	Viswanathan (2004)

3.4 DETECÇÃO DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

A bactéria Lxx é de difícil detecção por sua característica fastidiosa e por não apresentar sintomas característicos, com isso torna-se necessário o uso de técnicas laboratoriais para diagnóstico da doença (ROSA e CAMARGO, 2006). Desde a descoberta do RDS, os cientistas vêm desenvolvendo e aperfeiçoando técnicas para diagnose. Atualmente, podemos dividir as técnicas de diagnóstico em três grandes grupos: clássico, sorológico e molecular.

O método clássico apresenta grande importância histórica, pois foram as primeiras técnicas desenvolvidas para a detecção da Lxx. Dentre as técnicas clássicas temos diagnóstico por microscopia de contraste e cultura do patógeno (RAO et al, 2004). Esses métodos baseiam-se em observação das características morfológicas da Lxx. Entretanto, essas técnicas apresentam grandes dificuldades, sendo a principal delas relacionada com a limitação do número de amostras processadas e no caso de cultura de patógeno, possui ainda dificuldade de isolamento e demanda de tempo para crescimento da cultura de Lxx.

Com o desenvolvimento das técnicas sorológicas, alguns pontos foram melhorados como o aumento do número de amostras processadas e o tempo de diagnóstico. Dentre as técnicas sorológicas temos *Dot-Blot* (DB-EIA) e TB-EIA – *Tissue Blot Immunoassay*, ambos do tipo Elisa – *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (RAO et al, 2004). A característica em comum entre elas é a utilização de anticorpo específico para Lxx. A diferença é o material utilizado, sendo seiva para

dot-blot e um pedaço do tolete cortado transversalmente para *Tissue blot*. Apesar de serem métodos utilizados em larga escala pelos produtores, as técnicas sorológicas apresentam uma grande limitação, pois só é possível fazer a coleta dos materiais de análise aproximadamente sete meses após o plantio ou colheita (GRISHAM et al, 2007).

Com o avanço das técnicas, surgiram as diagnoses moleculares, que apresentam duas importantes metodologias de detecção para Lxx: PCR- *Polymerase Chain Reaction* e qPCR- *Quantitative Polymerase Chain Reaction*. Ambas as metodologias são baseadas no uso de marcadores moleculares específicos para a Lxx. O material utilizado para análise é o DNA da bactéria, que pode ser extraído de seiva, tecido vegetal, meio de cultura, entre outros. A grande diferença entre elas é tipo de resposta obtida, pois para PCR o diagnóstico é qualitativo, já para qPCR o resultado é quantitativo (NASCIMENTO et al, 2010).

Todas as metodologias de detecção de Lxx apresentam vantagens e desvantagens e a escolha de uma delas depende da viabilidade, aplicabilidade, praticidade e recursos financeiros disponíveis.

3.5 AVANÇOS MOLECULARES SOBRE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Por ser de característica fastidiosa, a detecção laboratorial da Lxx é essencial e a técnica de PCR, por sua acurácia, é uma importante ferramenta. No entanto, para o uso da técnica é necessário utilizar *primers* específicos. Um dos mais utilizados *primers* para Lxx é o Cxx1 (5' – CCG AAG TGA GCA GAT TGA CC) e Cxx2 (5' – ACC CTG TGT TGT TTT CAA CG), que foram desenhados utilizando o produto da PCR gerado pelos *primers* L1/G1, que é parte da região ITS (*intergenic transcribed space*) do DNA 16-23S ribossomal (PAN et al 1998).

Também disponível na literatura, o par de *primer* CxxITSf#5 (5' – TCA ACG CAG AGA TTG TCC A) e CxxITSr#5 (5' – GTA CGG GCG GTA CCT TTT C), foi desenhado utilizando parte da região ITS do DNA 16-23S ribossomal (FEGAN et al 1998). Já o *primer* LX23SF (5' – ACC TCC TTT CTA AGG AGC) e LX23SR (5' – TGA ATT GAT CGG CTC ACC), foi desenhado utilizando a região 23S ribossomal do genoma da bactéria (GAGLIARDI e CAMARGO 2003).

Diferente dos *primers* que foram desenhados utilizando a região 23S do genoma da Lxx, os *primers* C2F (5' – CGA GTT TGG GTT TCT GCC TGC) e C2R

(5' – AGG TGG CAG CGA CAA CGG TGC), utilizaram uma sequência de 800 pares de bases, resultante do produto da PCR do *primer* pSKC2-800. Essa região foi hibridizada apenas com o fragmento de DNA de Lxx quando utilizada a sonda de hibridação Southern (TAYLOR et al 2003).

Um grande marco na luta contra o RDS ocorreu em 2004, com a publicação do sequenciamento do genoma da Lxx, que foi realizado por uma parceria internacional de um grupo de pesquisadores (MONTEIRO-VITORELLO et al 2004). Foi utilizado o isolado brasileiro nomeado CTCB07, que apresentou um único cromossomo circular com mais de 2 milhões de pares de bases, sendo que 68% foram ligações CG. Neste isolado, foram identificados 2326 genes codificadores de proteínas e 307 pseudogenes (MONTEIRO-VITORELLO et al 2004).

À partir do primeiro sequenciamento do genoma da Lxx, juntamente com o estudo de sua diversidade genética da Lxx, foi possível entender mais a bactéria (YOUNG et al 2006). Também houve uma maior facilidade de desenho de novos *primers* específicos para a detecção da bactéria, inclusive pela técnica de PCR tempo real (CARVALHO et al 2016). Recentemente, foi publicada a técnica nanoPCR (*Nanoparticle-assisted Polymerase Chain Reaction*) para detecção da Lxx, avançando ainda mais na luta contra a bactéria (DANTAS et al 2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DE GENÓTIPOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LXX

Um total de 192 colmos das variedades RB966928, RB92579, RB855156 e CB49-260 com idade acima de 12 meses, previamente inoculadas com Lxx, pertencentes ao campo experimental do LAGEM (Laboratório de Genética Molecular) foram coletadas no campus da UFSCar-Araras; em seguida foi extraída a seiva e por fim realizado o teste sorológico para determinar os níveis de Lxx em cada material.

4.1.1 EXTRAÇÃO DE SEIVA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Os colmos utilizados para extração da seiva foram coletados com auxílio de facão descontaminado com amônia quaternária a 10%. De cada colmo coletado foram amostrados aproximadamente 15 cm da região basal. Para a extração da seiva foi utilizado compressor de ar com uma ponteira adaptada acoplada à amostra coletada da região basal com corte oblíquo na ponta (Figura 1) feito com auxílio de guilhotina. Foi extraído um total de 500 µL de seiva por amostra e adicionadas duas gotas de amonex (1:10) como conservante.

Figura 1- Extração de seiva de cana-de-açúcar utilizando ponteira adaptada e corte oblíquo na ponta da cana.



4.1.2 DIAGNOSE SOROLÓGICA

Para identificar a presença de Lxx nos genótipos, foi utilizada a técnica sorológica indireta *Dot Blot*, em que um volume de 100 μ L de seiva de cada amostra foi fixada em membrana de nitrocelulose hidratada com água deionizada que estava em um aparato próprio (Figura 2) para determinação dos poços, sendo os quatros primeiros poços do lado esquerdo do aparato reservados para os controles nas seguintes concentrações de Lxx 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 UFC/mL e no quinto poço foi pipetada água deionizada autoclavada como controle negativo. Em seguida as membranas foram secas a 80° C em estufa por uma hora.

Figura 2 – Aparato com membrana utilizado no teste sorológico *Dot Blot*.



As membranas secas foram bloqueadas utilizando a mistura de leite em pó desnatado e solução PBST (900 mL de água deionizada autoclavada + 100 mL de PBS 10x + 1 mL de Turn + 0,1 g de azida) na proporção de 1:20 em agitador Orbitron Rotator I modelo 260200 por 30 min. Em seguida foi realizada a tríplice lavagem das membranas com 20 mL de PBST deixados em agitador por 10 min. Para incubação com antissoro, foi utilizada a mistura de 4 μ L de antissoro e 20 mL de PBST em agitação por uma hora em temperatura ambiente, após, foi realizada a tríplice lavagem com 20 mL de PBST com auxílio de agitador por 10 min. Depois, as membranas ficaram por uma hora em agitação com 5 μ L de IgG e 20 mL de PBS 1x (marca Sigma) e ao final, novamente realizou-se a tríplice lavagem com PBST.

O processo foi finalizado no escuro, mantendo-se a membrana em agitação por uma hora em solução reveladora com 0,02 g de corante Fast blue + 100 mL de cloreto de magnésio a 1 molar + 20 mL de solução revelação (24 g de TRIZMA base + 1000 mL de água deionizada autoclavada) para cada membrana. Para facilitar a leitura, foi realizada a limpeza de impurezas que vem junto com o caldo com 20 mL de hipoclorito com auxílio de algodão (não limpa os controles) e a leitura foi realizada após a secagem completa das membranas em temperatura ambiente, utilizando-se como parâmetro os controles aplicados na membrana. Após a revelação do *Dot Blot*, foi possível identificar as seivas com presença de Lxx e o sua respectiva concentração.

4.2 DIAGNOSE MOLECULAR

4.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Os DNA totais de cana-de-açúcar com Lxx, *Xylella fastidiosa* e cana-de-açúcar sem Lxx (pelo *Dot Blot*) juntamente com o DNA de *Sporisorium scitamineum*, *Phytophthora parasítica*, *Pyricularia grisea*, *Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas campestris* e *Puccinia kuehnii* foram extraídos baseando-se no protocolo de Murray e Thompson (1980) com tampão CTAB. As amostras foram colocadas em microtubos de 2 mL até atingir 1 mL. Foram adicionados 1.400 µL de tampão (0.7M NaCl, 1% 292 CTAB, 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA e 1% 2-mercaptoetanol) e mantidos em banho maria por 4 horas a 65°C. Após esse período foi centrifugado (*Centrifuge 5415 D*) a 8.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Depois foram retirados 800 µL da suspensão e transferidos para microtubo de 1,5 mL e adicionado volume igual de clorofórmio/etanol (24:1), homogeneizou-se por 2 minutos e centrifugou-se por 5 minutos por 12.800 rpm em temperatura ambiente. Retiraram-se 600 µL do sobrenadante e adicionaram-se 420 µL de isopropanol. As amostras foram mantidas no freezer por 1 hora. Depois foram centrifugados (*Centrifuge Jouan BR4i*) a 12.800 rpm por 20 minutos a 4°C e foi dispensada a solução para visualização do pellet. Adicionou-se 1 mL de álcool 70% e centrifugou-se a 12.800 rpm por 10 minutos a 4°C. O álcool foi dispensado e o microtubo foi colocado no concentrador por 3 minutos para secagem completa do álcool. O DNA foi dissolvido em 50 µL de água deionizada autoclavada e deixado *over night* no escuro para dissolver o pellet.

4.2.2 PRIMERS ESPECÍFICOS E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

Nos ensaios para testar os 4 pares de *primers* específicos para Lxx foram utilizadas sua condição de amplificação original (recomendação dos autores) e adaptações. Os *primers* utilizados foram:

- Cxx1 (5' – CCG AAG TGA GCA GAT TGA CC) e Cxx2 (5' – ACC CTG TGT TGT TTT CAA CG) (PAN et al 1998), utilizando da ciclagem a 95°C por 5 min, 40 ciclos de 95°C por 1s, 57°C por 1s, e 72°C por 30 s, e extensão final de 72°C por 5 min. O volume final de reação foi de 25-µL contendo 50 mM KCl, 2

mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.2 mM de cada dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 0.4 µM de cada *primer*, 0.625 unidade de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 438pb;

- CxxITSf#5 (5' – TCA ACG CAG AGA TTG TCC A) e CxxITSr#5 (5' – GTA CGG GCG GTA CCT TTT C) (FEGAN et al 1998), utilizando da ciclagem a 96°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 92°C por 15s, 57°C por 30s e 72°C por 30s, e extensão final de 72°C por 5 min. O volume final da reação foi 25-µL contendo tampão de amplificação (1X), 1,5 mM MgCl₂, 200 mM dNTP, 0.25 µM de cada *primer*, 0,5 unidade de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 305pb;
- C2F (5' – CGA GTT TGG GTT TCT GCC TGC) e C2R (5' – AGG TGG CAG CGA CAA CGG TGC) (TAYLOR et al 2003), utilizando da ciclagem a 96°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 15 s, 57°C por 30 s e 72°C por 30 s, e extensão final de 72°C por 10 min. O volume final da reação foi 25-µL contendo 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.24 mM de cada dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 0.25 µM de cada *primer*, 1 unidade de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 520pb;
- LX23SF (5' – ACC TCC TTT CTA AGG AGC) e LX23SR (5' – TGA ATT GAT CGG CTC ACC) (GAGLIARDI e CAMARGO 2003), utilizando da ciclagem a 94°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 s, 57°C por 1 min e 72°C por 1 min e 30 s, e extensão final de 72°C por 3 min. O volume final da reação foi 25-µL contendo 2 µL de DNA com tampão de amplificação (1X), 2 mM MgCl₂, 200 µM de cada dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 0.2 µM de cada *primer*, 1 unidade de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 500pb.

As condições de amplificação adaptadas utilizadas foram:

- Cxx1(5' – CCG AAG TGA GCA GAT TGA CC) e Cxx2 (5' – ACC CTG TGT TGT TTT CAA CG) (PAN et al 1998), utilizando da ciclagem a 96°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 15 s, 58°C por 30 s e 72°C por 30 s, e extensão final de 72°C por 10 min. O volume final da reação foi 25-µL contendo 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.24 mM de cada dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 0.25 µM de cada *primer*, 1 unidade de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 438pb;

- CxxITSf#5 (5' – TCA ACG CAG AGA TTG TCC A) e CxxITSr#5 (5' – GTA CGG GCG GTA CCT TTT C) (FEGAN et al 1998), utilizando da ciclagem a 96°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 15 s, 58°C por 30 s e 72°C por 30 s, e extensão final de 72°C por 10 min. O volume final da reação foi 25- μ L contendo 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.24 mM de cada dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 0.25 μ M de cada *primer*, 1 unidade de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 305pb;
- C2F (5' – CGA GTT TGG GTT TCT GCC TGC) e C2R (5' – AGG TGG CAG CGA CAA CGG TGC) (TAYLOR et al 2003), utilizando da ciclagem a 95°C por 5 min, 40 ciclos de 95°C por 1 s, 57°C por 1 s, e 72°C por 30 s, e extensão final de 72°C por 5 min. O volume final da reação foi 25- μ L contendo 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.2 mM de cada dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 0.4 μ M de cada *primer*, 0.625 unidade de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 520pb;
- LX23SF (5' – ACC TCC TTT CTA AGG AGC) e LX23SR (5' – TGA ATT GAT CGG CTC ACC) (GAGLIARDI e CAMARGO 2003), utilizando da ciclagem a 96°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 15 s, 58°C por 30 s e 72°C por 30 s, e extensão final de 72°C por 10 min. O volume final da reação foi 25- μ L contendo 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.24 mM de cada dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 0.25 μ M de cada *primer*, 1 unidade de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 500pb.

4.2.3 PARÂMETROS DE SELEÇÃO DE *PRIMERS*

A escolha do melhor conjunto de *primer* e condição de amplificação para detecção de Lxx foi baseada em três parâmetros, sensibilidade, especificidade e acurácia. Sensibilidade é a capacidade do *primer* de detectar indivíduos doentes dentro de uma população. Especificidade é a capacidade do *primer* de detectar indivíduos sadios dentro de uma população. Acurácia é a relação entre os resultados de sensibilidade e especificidade.

4.2.3.1 SENSIBILIDADE

4.2.3.1.1 LXX EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

O delineamento estatístico utilizado foi fatorial 4X2X4 com 3 repetições, sendo quatro pares de *primers*, duas condições de amplificação (original e adaptada) e quatro diferentes concentrações de Lxx (10^9 , 10^8 , 10^7 e 10^6 UFC/mL). Também foi utilizado um controle negativo com água deionizada e um controle positivo com DNA de cultura de Lxx obtida no Laboratório de Genética Molecular (LAGEM-UFSCar). Os DNA que foram utilizados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Lista de DNA totais extraídos de tecido de cana-de-açúcar utilizados para teste de sensibilidade dos *primers* específicos para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx).

Identificação	Hospedeiro	Patógeno	Localização	Resultado <i>Dot Blot</i>
N1rep1	Cana-de-açúcar	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	Araras, SP	N1
LxAr05	Cana-de-açúcar	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	Araras, SP	N2
LxAr05	Cana-de-açúcar	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	Araras, SP	N3
LxAr05	Cana-de-açúcar	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	Araras, SP	N4

N1= 10^9 UFC/mL; N2= 10^8 UFC/mL; N3= 10^7 UFC/mL; N4= 10^6 UFC/mL.

Os DNA foram submetidos à amplificação por PCR utilizando o termociclador Gene Amp PCR System 9700. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 2% com o sistema de eletroforese Life Technologies model 250, corado em brometo de etídeo e visualizados em Transilluminador L Pix Loccus.

4.2.3.1.2 DNA N4 EM DILUIÇÃO SERIADA

Na segunda etapa do teste de sensibilidade, foram utilizadas duas das combinações *primers*/condição de amplificação, que foram selecionadas na etapa 1 de sensibilidade por terem sido os melhores resultados. Também foram utilizadas nove diluições (1:2, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:40 e 1:50) dos DNA na concentração 10^6 UFC/mL (Tabela 2), que é a menor concentração de Lxx determinada pelo *Dot Blot*. Também foram utilizados um controle negativo com água deionizada e um controle positivo com DNA de cultura de Lxx obtido no LAGEM-UFSCar.

Os DNA foram submetidos à amplificação por PCR utilizando o termociclador Gene Amp PCR System 9700. Os produtos da PCR foram separados em gel de

agarose a 2% com o sistema de eletroforese Life Technologies model 250, corado em brometo de etídeo e visualizados em Transilluminador L Pix Loccus.

4.2.3.1.3 ANÁLISE DE DADOS DE SENSIBILIDADE

Para análise de sensibilidade foram utilizadas as fórmulas:

$$\begin{array}{lcl} \text{Razão FP} = \frac{\text{FP} \times 100}{\text{VP} + \text{FP}} & \text{Razão FN} = \frac{\text{FN} \times 100}{\text{VN} + \text{FN}} & \text{Sensibilidade relativa} = \frac{\text{VP} \times 100}{\text{VP} + \text{FN}} \\ & \text{SE (\%)} & \end{array}$$

Legenda:

VP: resultado verdadeiramente positivo

FN: Falso-negativo

VN: Resultado verdadeiramente negativo

FP: Falso-positivo

4.2.3.2 ESPECIFICIDADE E ACURÁCIA DOS CONJUNTOS DE *PRIMERS*

Nesta etapa, as duas das combinações de *primer* e condição de amplificação que foram mais sensíveis no ensaio de sensibilidade foram utilizadas. Foram utilizados 2 *primers*, DNA com Lxx na concentração 10⁹UFC/mL, 4 DNA totais de cana-de-açúcar sem Lxx (canas que passaram por tratamento térmico e foram negativas para Lxx pela metodologia *Dot Blot*) e DNA de outros patógenos sendo 2 DNA de *Xanthomonas albilineans*, 2 DNA de *Puccinia kuehnii*, 2 DNA de *Xylella fastidiosa*, 2 DNA de *Phytophthora parasitica*, 2 DNA de *Xanthomonas campestris*, 2 DNA de *Pyricularia grisea* obtidos no LAGEM-UFSCar e 2 DNA de *Sporisorium scitamineum* (Tabela 3).

Tabela 3 - Lista de DNA utilizados no teste de especificidade e acurácia dos *primers* específicos para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx).

Identificação amostra	Hospedeiro	Patógeno	Localização	Resultado Dot Blot
LxAr04	Cana-de-açúcar	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	Araras, SP	N1
ScPk01-78	Cana-de-açúcar	<i>Puccinia kuehnii</i>	Araras, SP	*
ScPk01-58	Cana-de-açúcar	<i>Puccinia kuehnii</i>	Araras, SP	*
ScSs01-01	Cana-de-açúcar	<i>Sporisorium scitamineum</i>	Araras, SP	*
ScSs01-01	Cana-de-açúcar	<i>Sporisorium scitamineum</i>	Araras, SP	*
SI 01	Cana-de-açúcar	SP	Araras, SP	-
SI 02	Cana-de-açúcar	SP	Araras, SP	-
SI 03	Cana-de-açúcar	SP	Araras, SP	-
SI 04	Cana-de-açúcar	SP	Araras, SP	-
ScXa01-02	Cana-de-açúcar	<i>Xanthomonas albilineans</i>	Araras, SP	*
CVPN02-01b	Cevada	<i>Pyricularia grisea</i>	Araras, SP	*
CVPN02-01b	Cevada	<i>Pyricularia grisea</i>	Araras, SP	*
CiPh10-01	Citros	<i>Phytophthora parasitica</i>	Araras, SP	*
CiPh06-01	Citros	<i>Phytophthora parasitica</i>	Araras, SP	*
CiCf01-01	Citros	<i>Xylella fastidiosa</i>	Araras, SP	*
CrXc0-02	Brócolis	<i>Xanthomonas campestris</i>	Araras, SP	*

N1= 10⁹ UFC/mL; (-) = Negativo; (*) = Não utilizada a técnica; SP= Sem patógeno.

Os DNA foram submetidos à amplificação por PCR utilizando o termociclador Gene Amp PCR System 9700. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose à 2% com sistema de eletroforese Life Technologies model 250, corado em brometo de etídeo e visualizados em Transiluminador L Pix Loccus. E para análise de especificidade e acurácia foram utilizados as fórmulas:

$$\text{Razão FP} = \frac{\text{FP} \times 100}{\text{VP} + \text{FP}} \quad \text{Razão FN} = \frac{\text{FN} \times 100}{\text{VN} + \text{FN}} \quad \text{Sensibilidade relativa} = \frac{\text{VP} \times 100}{\text{VP} + \text{FN}}$$

$$\text{Especificidade relativa} = \frac{\text{VN} \times 100}{\text{VN} + \text{FP}} \quad \text{Acurácia relativa} = \frac{(\text{VP} + \text{VN}) \times 100}{\text{N}}$$

Legenda:

VP: resultado verdadeiramente positivo

FN: Falso-negativo

VN: Resultado verdadeiramente negativo

FP: Falso-positivo

N: VP+VN+FN+FP

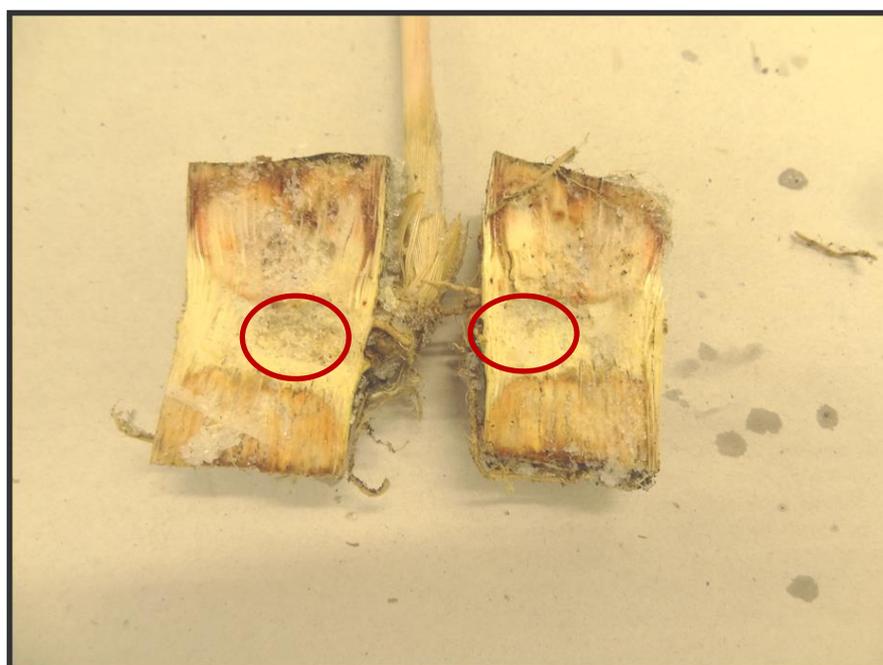
4.3 VALIDAÇÃO DOS CONJUNTOS DE *PRIMERS* SELECIONADOS

Para validação dos conjuntos de *primers* x condição de amplificação selecionados foram utilizadas MPB de cana-de-açúcar. Foram utilizadas as cultivares de canas-de-açúcar CB49-260, RB966928, RB92579 e RB855156 com quatro níveis de Lxx (10^9 UFC/mL, 10^8 UFC/mL, 10^7 UFC/mL e 10^6 UFC/mL), determinados por sorologia *Dot Blot*. Essas cultivares foram cortadas em gemas individuais, sendo 40 gemas para cada nível da bactéria, em seguida, plantadas em copos plásticos de 250 mL com substrato a base de casca de pinus e fibra de coco, mantidas em estufa e irrigadas apenas com água por um período de 45 e 60 dias.

4.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE TECIDO EM MPB

Para extração do DNA das MPB foi utilizado o tecido do internódio do colmo de origem da MPB, próximo a gema (Figura 3) que foi picado com lâminas e colocado em microtubos de 2 mL até atingir 1 mL. Os DNA de MPB com Lxx foram extraídos baseando-se no protocolo de Murray e Thompson (1980) com tampão CTAB.

Figura 3 - Região de coleta de tecido de muda-pré-brotada para extração de DNA total.



4.3.2 DETECÇÃO DE LXX EM MPB DE 45 E 60 DIAS

A detecção de Lxx em MPB foi realizada utilizando como parâmetro a sensibilidade de detecção. Nesta etapa, foram escolhidas duas combinações de *primers* + condição de amplificação que obtiveram os melhores resultados na seleção de *primers*. Foram utilizados DNA extraídos de MPB de duas idades, 45 e 60 dias, sendo 53 DNA extraídos de MPB de 45 dias e 43 DNA extraídos de MPB com 60 dias (Tabela 4).

Tabela 4 - Lista de DNA total extraído de mudas-pré-brotadas (MPB) com 45 e 60 dias após plantio utilizado no teste de detecção precoce de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

Número de amostras	Hospedeiro	Patógeno	Resultado Dot Blot
8	MPB com 45 dias	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	N1
14	MPB com 45 dias	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	N2
12	MPB com 45 dias	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	N3
18	MPB com 45 dias	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	N4
8	MPB com 60 dias	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	N1
8	MPB com 60 dias	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	N2
12	MPB com 60 dias	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	N3
14	MPB com 60 dias	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	N4

N1= 10⁹ UFC/mL; N2= 10⁸ UFC/mL; N3= 10⁷ UFC/mL; N4= 10⁶ UFC/mL.

Os DNA foram submetidos à amplificação por PCR utilizando o termociclador Gene Amp PCR System 9700. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 2% com sistema de eletroforese Life Technologies model 250, corado em brometo de etídeo e visualizados em Transiluminador L Pix Loccus.

4.3.3 ANÁLISE DE DADOS DE DETECÇÃO DE LXX EM MPB

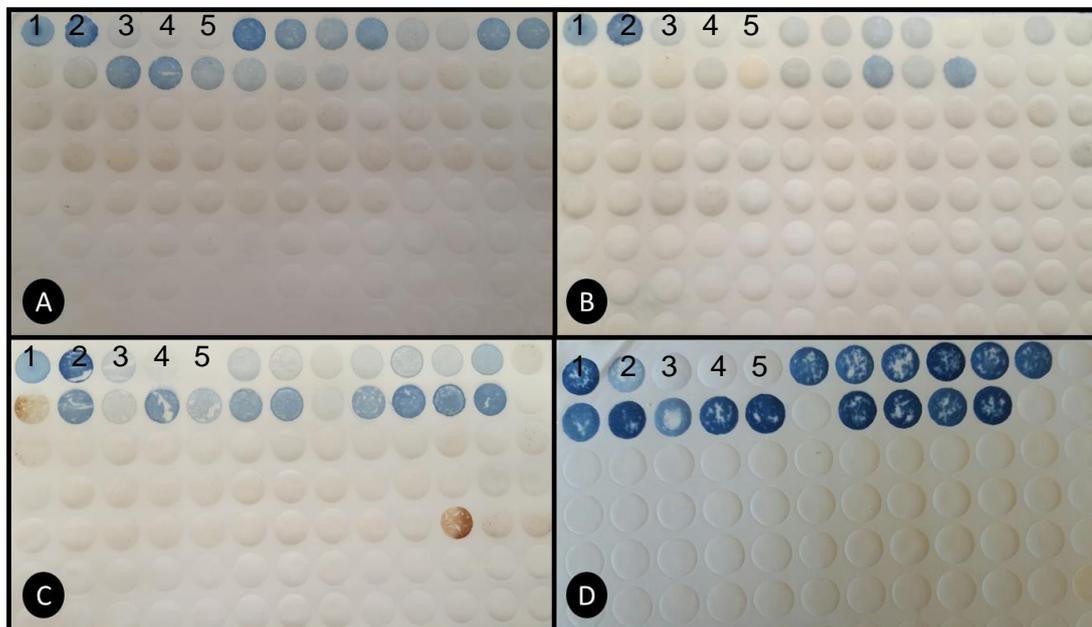
Para análise de sensibilidade de detecção de Lxx em MPB foram utilizadas as mesmas fórmulas descritas em análise de dados de sensibilidade (Item 4.2.3.1.3 – pág. 18).

5 RESULTADOS

5.1 SELEÇÃO DE GENÓTIPOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LXX

De um total de 192 amostras de seiva que foram retiradas de quatro variedades e que foram submetidas a *Dot Blot*, 61 amostras foram positivas. Na variedade RB966928 (Figura 4-A), foi possível detectar 15 amostras positivas, sendo 1 amostra N1, 10 amostras N2 e 4 amostras N3. Na variedade RB855156 (Figura 4-B) foi detectado um total de 13 amostras positivas, sendo 6 amostras N2, 5 amostras N3 e 2 amostras N4. Já para a variedade RB92579 (Figura 4-C) foram detectadas 18 amostras positivas, sendo 10 amostras N2, 6 amostras N3 e 2 amostras N4. E na variedade CB49-260 foram detectadas 15 amostras positivas, sendo 14 amostras na concentração N1 e 1 na N2.

Figura 4 - Análise diagnóstica de raquitismo-das-soqueiras por técnica sorológica *Dot Blot Immunoassay*.



A= RB966928, B= RB855156, C= RB92579, D= CB49-260. Controles: 1- N1 (10^9 CFU/mL); 2 - N2 (10^8 CFU/mL); 3 - N3 (10^7 CFU/mL); 4 - N4 (10^6 CFU/mL); 5 - Controle negativo. Outros poços: seiva de canas com diferentes títulos de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

5.2 SENSIBILIDADE DOS CONJUNTOS DE *PRIMERS* USANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LXX

O primeiro parâmetro de seleção de *primers* foi a sensibilidade (capacidade de detectar indivíduos doentes). De um total de 13 amostras (Tabela 2, pág. 17), 7 foram amplificadas com os *primers* Cxx1 e Cxx2 na condição original, sendo elas 3 amostras N1, 2 amostras N3, 1 amostra N4 e 1 controle positivo. Com isso obteve uma sensibilidade de 53,8%. De 13 amostras, 11 foram amplificadas pelos *primers* C2F e C2R, quando utilizada a condição original, sendo elas 3 amostras N1, 2 amostras N2, 3 amostras N3, 2 amostras N4 e 1 controle positivo, obtendo assim 84,6% de sensibilidade. Um total de 2, das 13 amostras testadas, foi amplificado quando se utilizaram os *primers* LX23SF e LX23SR na condição original, sendo 1 controle positivo e 1 amostra N1, tendo como resultado 15,4% de sensibilidade. Das 13 amostras testadas, nenhuma foi amplificada com os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5 na condição original (Tabela 5).

Todas as 13 amostras testadas foram amplificadas quando se utilizaram os *primers* Cxx1 e Cxx2 e o par CxxITSf#5 e CxxITSr#5, ambos na condição adaptada, amplificando assim 3 amostras N1, 3 amostras N2, 3 amostras N3, 3 amostras N4 e

1 controle positivo. Deste modo, ambos *primers* obtiveram 100% de sensibilidade. De um total de 13 amostras, 9 foram amplificadas com os *primers* LX23SF e LX23SR, sendo elas 3 amostras N1, 1 amostras N2, 2 amostras N3, 2 amostras N4 e 1 controle positivo, obtendo 69,2% de sensibilidade na condição de amplificação adaptada. Das 13 amostras testadas, nenhuma foi amplificada com os *primers* C2F e C2R na condição adaptada (Tabela 5).

1 **Tabela 5** - Eficiência da detecção molecular de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* baseado em sensibilidade.

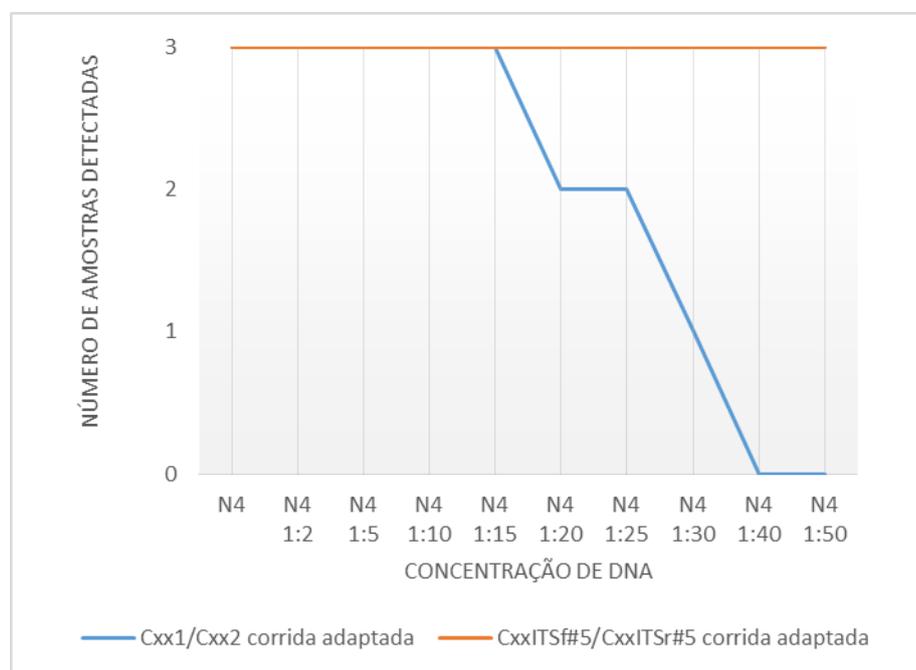
Primer	Condição de amplificação do DNA	VP	VN	FN	N	Razão FN	Sensibilidade relativa
						FNx100/VN+FN	SE (%)
						VPx100/VP+FN	
Cxx1 e Cxx2	Pan et al (1998)	7	1	6	14	85,7	53,8
CxxITSf#5 e CxxITSr#5	Fegan et al (1998)	0	1	13	14	92,9	0,0
C2F e C2R	Taylor et al (2003)	11	1	2	14	66,7	84,6
LX23SF e LX23SR	Gagliardi e Camargo (2003)	2	1	11	14	91,7	15,4
Cxx1 e Cxx2	Adaptada 1	13	1	0	14	0,0	100,0
CxxITSf#5 e CxxITSr#5	Adaptada 1	13	1	0	14	0,0	100,0
C2F e C2R	Adaptada 2	0	1	13	14	92,9	0,0
LX23SF e LX23SR	Adaptada 1	9	1	4	14	80,0	69,2

3 Sensibilidade = Verdadeiro Positivo X 100 / (Verdadeiro Positivo + Falso Negativo); Adaptada 1= Condição de amplificação recomendado por Taylor et al
4 (2003) com aumento de 1º C no anelamento; Adaptada 2= Condição de amplificação recomendada por Pan et al (1998).

5.3 SENSIBILIDADE DOS CONJUNTOS DE *PRIMERS* USANDO DILUIÇÃO SERIADA DE DNA N4

Os dois *primers* que obtiveram 100% de sensibilidade utilizando diferentes níveis de Lxx, foram desafiados com DNA N4 (10^6 UFC/mL) em diluição seriada. Todas as 30 amostras testadas foram amplificadas pelos *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5 na condição adaptada, sendo a mais diluída (1:50) com aproximadamente 2×10^4 UFC/mL, apresentando assim 100% de sensibilidade. Das 30 amostras testadas, 20 foram amplificadas pelo par de *primers* Cxx1 e Cxx2 em condição adaptada, sendo elas 3 amostras N4, 3 amostras da diluição 1:2, 3 amostras da diluição 1:5, 3 amostras da diluição 1:10, 3 amostras da diluição 1:15, 2 amostras da diluição 1:20, 2 amostras da diluição 1:25 e 1 amostra da diluição 1:30 (Figura 5).

Figura 5 - Gráfico da sensibilidade da detecção molecular de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) em diluição seriada de DNA N4 (10^6 UFC/mL).



N4= DNA total de cana-de-açúcar com Lxx na concentração de 10^6 UFC/mL; Corrida adaptada= condição de amplificação recomendada por Taylor et al (2003) com aumento de 1° C no anelamento.

5.4 ESPECIFICIDADE E ACURÁCIA DOS *PRIMERS*

Para a seleção de *primers* também foram utilizados os parâmetros especificidade (capacidade do *primer* de identificar as amostras sadias) e acurácia (porcentagem de acerto entre especificidade e sensibilidade). De um total de 28 amostras (Tabela 3, pág 19), sendo 10 amostras positivas para Lxx, com concentração de bactéria 10^9 UFC/mL e 18 amostras negativas para Lxx, sendo elas dois DNA de *S. scitamineum*, dois DNA de *X. albilineans*, dois DNA de *P. kuehnii*, dois DNA de *X. fastidiosa*, dois DNA de *P. parasitica*, dois DNA de *X. campestris*, dois DNA de *P. grisea* e quatro DNA totais de cana-de-açúcar sem Lxx, os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5 em condição adaptada e os *primers* Cxx1 e Cxx2 em condição adaptada, obtiveram 100% de especificidade e acurácia (Tabela 6).

1 **Tabela 6** - Eficiência da detecção molecular de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* baseada em especificidade e acurácia.

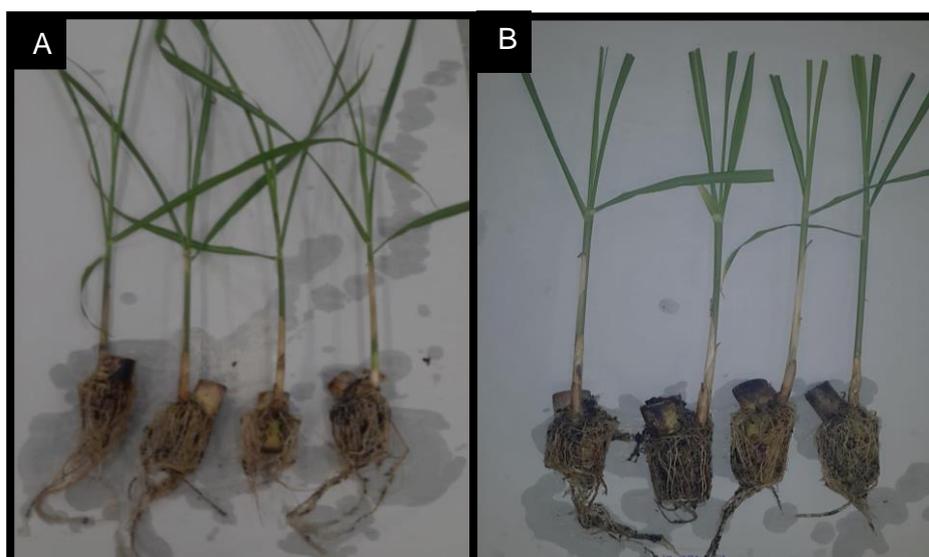
<i>Primer</i>	Condição de amplificação do DNA	VP	VN	FN	FP	N	Sensibilidade relativa	Especificidade relativa	Acurácia relativa
							SE (%)	SP (%)	AC (%)
							$\frac{VP \times 100}{VP + FN}$	$\frac{VN \times 100}{VN + FP}$	$\frac{(VP + VN) \times 100}{N}$
Cxx1 e Cxx2	Adaptada 1	10	18	0	0	28	100	100	100
CxxITSf#5 e CxxITSr#5	Adaptada 1	10	18	0	0	28	100	100	100

- 2 Sensibilidade = Verdadeiro Positivo X 100 / (Verdadeiro Positivo + Falso Negativo); Especificidade = Verdadeiro Negativo X 100 / (Verdadeiro Negativo +
 3 Falso Positivo); Acurácia = (Verdadeiro Positivo + Verdadeiro Negativo) X 100 / Total número de amostras; Adaptada 1= Condição de amplificação
 4 recomendada por Taylor et al (2003) com aumento de 1° C no anelamento;

5.5 DETECÇÃO DE LXX EM MPB DE 45 E 60 DIAS

Mudas-pré-brotadas oriundas de material com presença de Lxx em níveis entre N1 (10^9 UFC/mL) e N4 (10^6 UFC/mL) obtiveram desenvolvimento normal, apresentando de 3 a 4 folhas aos 45 dias e de 4 a 5 folhas aos 60 dias e não apresentando sintomas da presença da bactéria (Figura 6).

Figura 6 - Mudanças-pré-brotadas de duas diferentes idades originadas de cana-de-açúcar com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.



A= Muda-pré-brotada de 45 dias; B= Muda-pré-brotada de 60 dias

De um total de 52 MPB de 45 dias, originadas de canas positivas para Lxx, a bactéria foi detectada em 35 quando se utilizaram os *primers* Cxx1 e Cxx2, tendo como resultado final 67,3% de sensibilidade, enquanto que as 52 MPB de 45 dias foram positivas para a presença de Lxx, quando se utilizaram os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5 em condição adaptada, obtendo 100% de sensibilidade (Tabela 7).

Em MPB de 60 dias, originadas de canas positivas para Lxx, de um total de 42 amostras, em 30 foi detectada a bactéria quando se utilizou o conjunto de *primers* Cxx1 e Cxx2 em condição adaptada, e 33 foram positivas para a presença de Lxx com os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5 em condição adaptada, obtendo 71,4% e 78,6% de sensibilidade, respectivamente (Tabela 7).

Esse ensaio, portanto, permitiu concluir que uma detecção segura foi possível em MPB de 45 dias utilizando o *primer* CxxITSf#5 e CxxITSr#5 na condição adaptada.

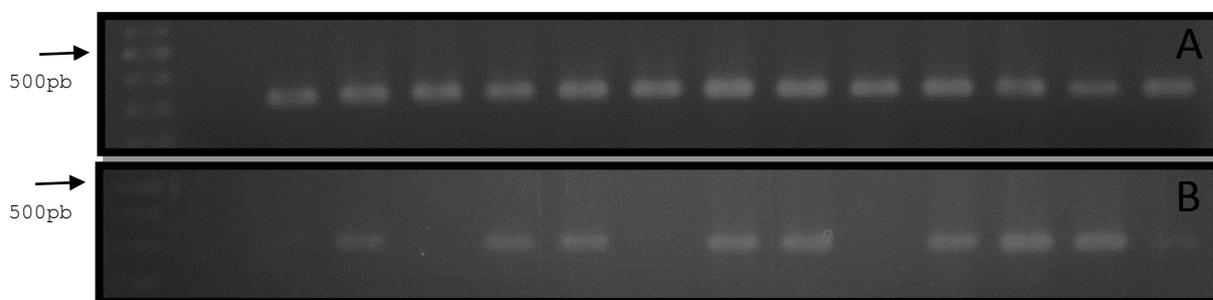
Tabela 7 - Validação da detecção molecular em mudas-pré-brotadas (MPB) com raquitismo-das-soqueiras

<i>Primer</i>	Condição de amplificação DNA	Idade MPB	VP	FP	N	Sensibilidade relativa
						SE (%)
						$\frac{VP \times 100}{VP + FN}$
Cxx1 e Cxx2	Adaptado	45 Dias	35	0	52	67,3
CxxITSf#5 e CxxITSr#5	Adaptado	45 Dias	52	0	52	100,0
Cxx1 e Cxx2	Adaptado	60 Dias	30	0	42	71,4
CxxITSf#5 e CxxITSr#5	Adaptado	60 Dias	33	0	42	78,6

Sensibilidade = Verdadeiro Positivo X 100 / (Verdadeiro Positivo + Falso Negativo). Amplificação adaptada= condição de amplificação recomendada por Taylor et al (2003) com aumento de 1° C no anelamento.

A reação de PCR realizada em MPB de 45 dias com os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5, na condição de amplificação adaptada, resultaram na amplificação de fragmentos de fácil identificação, não deixando dúvidas na visualização dos mesmos e também não apresentou falsos negativos independentemente da concentração da bactéria (Figura 7A). O mesmo não foi observado em MPB de 60 dias, que obtiveram falsos negativos como resultado (Figura 7B).

Figura 7 – Detecção molecular de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) em DNA total extraído de mudas-pré-brotadas originadas de canas positivas para Lxx nas concentrações entre 10⁹ e 10⁶ UFC/mL



A= Gel de agarose com resultado da detecção molecular em MPB de 45 dias usando os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5, na condição de amplificação adaptada, com tamanho de fragmento de 305bp. B= Gel de agarose com resultado da detecção molecular em MPB de 60 dias usando os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5, na condição de amplificação adaptada, com tamanho de fragmento de 305bp.

6 DISCUSSÃO

Atualmente, existem três tipos de produtores de cana-de-açúcar em relação ao RDS: aqueles que não fazem qualquer controle da doença, aqueles que apenas fazem a diagnose laboratorial em seu matrizeiro e aqueles que fazem a diagnose laboratorial no matrizeiro juntamente com o controle do RDS pelo tratamento térmico. E nos casos em que fazem diagnose laboratorial, esse tem sido realizado pela técnica sorológica, por apresentar menor preço e maior praticidade em relação aos outros métodos de detecção.

Um estudo de Urashima e Marchetti (2013) mostrou que em 2009 foi detectada a presença de Lxx em 23,6% das amostras recebidas dos produtores para diagnóstico de rotina de RDS pelo método sorológico *Dot Blot*. Esse número foi ainda maior em 2010 e 2011, com um total de 27,1% e 25,8% respectivamente. Os números são alarmantes se assumirmos que a principal finalidade do diagnóstico de rotina do RDS é selecionar material para formar viveiros de multiplicação e não para fazer o controle de toda a produção.

Outro fato a se considerar, é que mesmo as amostras negativas pelo diagnóstico sorológico podem estar com a presença da bactéria, pois o teste *Dot blot* detecta Lxx acima de 10^6 UFC/mL (Figura 4). Com isso, os produtores que fazem apenas diagnóstico sorológico, podem estar usando materiais infectados para montar seu matrizeiro, tendo como consequência produção de mudas com a bactéria.

Os produtores que fazem o diagnóstico sorológico e o tratamento térmico de 52°C por 30 minutos, também correm o risco de uma fonte de Lxx em seu matrizeiro.

Uma vez que Fernandes Jr et al (2010) comprovaram que esse pode apresentar escapes. Com isso, também terá como consequência produção de mudas com a bactéria.

E para aqueles que não fazem nenhum controle da Lxx, se torna ainda mais preocupante, pois os níveis de RDS em sua produção provavelmente estão ainda maiores do que os outros dois grupos de produtores, o que acarretará em matrizeiros com níveis altos de Lxx e conseqüentemente, plantio de mudas infectadas.

Dentre os sistemas de produção de mudas, se destaca as MPB, que têm sido produzidas utilizando as recomendações do IAC, e uma das vantagens apresentadas é a sanidade das MPB (LANDELL et al, 2012). No entanto, com as possíveis falhas na identificação e no controle da Lxx, até o presente estudo não havia como garantir a sanidade das mudas uma vez que as MPB com Lxx, não apresentam sintomas nesta fase (Figura 6), o que já era esperado, uma vez que os sintomas aparecem com a colheita (RICAUD, 1974)

Para outras doenças em outras culturas, como por exemplo, em citros, já existem testes diagnósticos e legislação que determina a obrigatoriedade de realizar teste de sanidade em uma amostra das mudas que são comercializadas. E RDS, por ser de característica fastidiosa, sem inseto vetor, seu controle é realizado pelo método de exclusão, com isso, torna-se indispensável o uso de mudas sadias (HOY et al, 1999). No entanto, para a adoção de um método de detecção de RDS em MPB é necessário garantir sua efetividade.

Uma técnica que tem se mostrado efetiva na detecção de doenças é a PCR pois é baseada unicamente na detecção da sequência de DNA do patógeno, com isso, o aparecimento de um fragmento de tamanho conhecido amplificado pela PCR, indica que o patógeno está presente na amostra (YOUNG et al, 2014).

Para o uso da técnica de PCR, é necessária a escolha de um *primer* específico para Lxx. Atualmente existem diversos *primers* disponíveis na literatura, dentre eles, estão Cxx1 e Cxx2 (PAN et al, 1998), CxxITSf#5 e CxxITSr#5 (FEGAN et al, 1998), C2F e C2R (TAYLOR et al, 2003) e LX23SF e LX23SR (GAGLIARDI e CAMARGO, 2003). E para determinar um protocolo de detecção de Lxx em MPB, é necessário e essencial trabalhar com o *primer* mais eficaz e, com isso, fez-se necessária a seleção, sendo este um dos objetivos atingidos deste trabalho.

Os *primers* escolhidos para este estudo foram desenhados utilizando diferentes locus entre as regiões 16S e 23S e também região codificadora de proteína hipotética. Com isso, a sensibilidade da detecção de Lxx foi influenciada pela diferença dos *primers*, uma vez que na condição original, apresentaram grande diferença de sensibilidade entre si (Tabela 5). A sensibilidade é o parâmetro mais importante na seleção dos *primers*, pois é indispensável que a técnica identifique todos os indivíduos doentes, para que o RDS não seja instalado em novos campos.

Outros fatores que comprometeram, parcial ou totalmente a sensibilidade dos *primers*, foram os reagentes da PCR, quando não estavam em quantidade adequada e ajustada (Tabela 5), podendo se tornar até mesmo menos eficaz que a técnica sorológica (Tabela 5 e Figura 4). Entretanto, quando os reagentes da reação da PCR foram modificados, a sensibilidade do *primer* foi aumentada em relação a sua condição de amplificação original, o que foi observado com os *primers* Cxx1 e Cxx2, CxxITSf#5 e CxxITSr#5 e LX23SF e LX23SR na condição adaptada (Tabela 5).

Os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5 (FEGAN et al, 1998) e Cxx1 e Cxx2 (Pan et al 1998) na condição adaptada, obtiveram os maiores níveis de sensibilidade, sendo quase 18,2% superiores aos *primers* C2F e C2R (TAYLOR et al, 2005) na condição original, sendo esse último, o que obteve a sensibilidade mais alta dentre os *primers* na condição original (Tabela 5).

Os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5, na condição adaptada se mostraram mais sensível que os *primers* Cxx1 e Cxx2 em condição adaptada quando utilizado em DNA N4 (10^6 UFC/mL) em diluição seriada (Figura 5) e também obteve uma sensibilidade de aproximadamente 100 vezes mais que o *Dot Blot*, podendo essa diferença ser ainda maior, uma vez que não foram testados DNA com menos de 2×10^4 UFC/mL (Figura 4 e Figura 5).

Alguns trabalhos corroboram com os resultados deste presente estudo, demonstrando que quando a temperatura de anelamento, quantidade de cloreto de magnésio, dNTP e Taq polimerase foram modificadas, houve aumento ou diminuição da sensibilidade, especificidade e rendimento dos produtos da PCR. Ou seja, conforme foram ajustados os reagentes da PCR, eles obtiveram melhores resultados com os *primers*. E principalmente, a escolha do locus para o desenho do *primer* foi essencial (HENEGARIU et al, 1997).

O cloreto de magnésio é um componente crítico da reação de PCR, uma vez que a Taq polimerase é dependente do magnésio. Além disso os iniciadores de DNA e dNTP se ligam ao magnésio, com isso, a concentração de Mg depende da concentração de dNTP e DNA molde. O MgCl₂, Taq polimerase e dNTP em condições inadequadas reduzem a quantidade do produto da PCR. Com isso, as modificações para melhorar o desempenho da PCR têm que ser dirigidas aos fatores que afetam a taxa de anelamento e extensão (MARKOULATOS et al, 2002).

As modificações significantes que foram realizadas nas condições de amplificação dos *primers* foram aumento entre 1 e 1,5 µL de cloreto de magnésio, 0,4 µL de dNTP e aproximadamente 0,1 µL de Taq polimerase. Também foi elevada a temperatura de anelamento em 1°C em relação a condição de amplificação original para os *primers* Cxx1 e Cxx2, CxxITSf#5 e CxxITSr#5 e os *primers* LX23SF e LX23SR. Foram elevados 2 °C na temperatura de desnaturação do DNA durante os ciclos da reação para os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5

Como os dados deste estudo e de outros autores comprovaram a influência da condição de amplificação na eficácia do *primer*, foi necessário realizar o teste de especificidade com os melhores conjuntos de *primers*, uma vez que eles tiveram suas condições de amplificação adaptadas. Assim, os resultados mostraram que não foi afetada a especificidade e foi melhorada a acurácia dos conjuntos de *primers* com condição de amplificação adaptada (Tabela 6).

Após a seleção dos conjuntos de *primers*, foi examinada a viabilidade de detecção de Lxx em MPB de 45 e 60 dias. A idade limite de 60 dias foi selecionada, pois essa é a recomendada para o plantio no campo (LANDELL et al, 2012). Também foram utilizadas mudas de 45 dias, pois permitem que os resultados da sanidade das MPB saiam antes do plantio a campo. Como MPB são constituídas basicamente por uma gema e seu respectivo nó (LANDELL et al, 2012), foi utilizado o tecido do último para a extração do DNA, uma vez que nesta região há uma maior concentração de feixes vasculares por área (DINARDO-MIRANDA et al, 2008).

Foi possível detectar Lxx em MPB de 45 e 60 dias (Tabela 7). No entanto, os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5 na condição de amplificação adaptada se mostraram mais efetivos na identificação de Lxx do que os *primers* Cxx1 e Cxx2 em condição adaptada, uma vez que ele detectaram 100% das MPB de 45 dias oriundas de materiais com Lxx. Com os resultados apresentados na identificação de Lxx em MPB, é possível assumir que a detecção em mudas com menos de 45 dias

também será possível e, provavelmente, sem afetar a sensibilidade (Figura 7A e 7B).

Com os resultados deste estudo, foi possível concluir que os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5 em condições de amplificação adaptada foram mais sensíveis, específicos e acurados para detecção de Lxx, com uma taxa de 100% para todos esses parâmetros e também foi possível detectar Lxx em mudas-pré-brotadas de 45 dias com 100% de sensibilidade. Portanto, com os resultados deste estudo, foi possível obter um protocolo para detecção precoce de Lxx em MPB e com isso garantir a sanidade das mudas, o que até o momento não era possível.

O setor necessita que esse novo protocolo seja rapidamente adotado para impedir a disseminação de Lxx através das MPB, uma vez que seu emprego tem aumentado no setor sucroalcooleiro, e conseqüentemente, disseminar o RDS por toda a produção, uma vez que a mecanização da colheita está sendo utilizada em praticamente 100% das áreas.

7 CONCLUSÕES

Os dados do presente trabalho permitem concluir que:

- Foi possível detectar Lxx em mudas-pré-brotadas de 45 dias.
- O *primer* CxxITSf#5 e CxxITSr#5 em condições de amplificação adaptada foi o mais sensível, específico e acurado para detecção de Lxx.

8 LITERATURA CITADA

ANONYMOUS. Variety tolerance to ratoon stunting disease. **Centro de Tecnologia Copersucar Annual Report**, p. 20-21, 1992/93.

BAILEY, R.A.; BECHET, G.R. Further evidence of the effect of ratoon stunting disease on production under irrigated and rain fed conditions. **Proc. S. Afr. Technol. Ass.**, vol. 23, p. 97-101, 1997.

BRASKEM. **O etanol**. Disponível em: <<http://www.braskem.com.br/site.aspx/Etanol>>. Acesso em: 07. ago. 2015.

BRANDES, E.W. Origin, dispersal and use in breeding of the Malanesian garden sugarcanes and their derivatives *Saccharum officinarum* L. **Proc Cong Int Soc Sug Technol**, vol.9, p.709-750, 1956.

CANELLAS, L.P.; BUSATO, J.G.; DOBBSS, L.B.; BALDOTTO, M.A.; RUMJANEK, V.M.; OLIVARES, F.L. Soil organic matter and nutrient pools under long-term non-burning management of sugar cane. **European Journal of Soil Science**, vol. 61, p. 375-383, 2010.

CAPAZ, R.S.; CARVALHO, V.S.B.; NOGUEIRA, L.A.H. Impacto f mechanization and previous burning reduction on GHG emissions of sugarcane harvesting operations in Brazil. **Applied Energy**, vol. 102, p. 220-228, 2013.

CARVALHO, G.; DA SILVA, T.G.E.R.; MUNHOZ, A.T.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; AZEVEDO, R.A.; MELOTTO, M.; CAMARGO, L.E.A. Development of a qPCR for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and quantification of the effects of heat treatment of sugarcane cuttings on Lxx. **Crop Protection**, vol.80, p. 51-55, 2016.

CHAGAS, P.R.R; MATSUOKA, S. Medidas de controle do raquitismo da soqueira. **Brasil Açucareiro**, vol. 106, p. 40-44, 1988.

CIDADE, D.A.P.; GARCIA, R.O.; DUARTE, A.C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E.. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 41, n. 3, p. 385-391, 2006.

COMSTOCK, J.C.; SHINE JR, J.M.; DAVIS, M.J.; DEAN, J.L. Relationship between resistance to *Clavibacter xyli* subsp. *Xyli* colonization in sugarcane and spread of Ratoon Stunting Disease in field. **Plant Disease**, vol. 80, n. 6, p. 704-708, 1996.

CONAB. **Safra brasileira**: cana-de-açúcar: safra 2015/2016: primeiro levantamento. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_13_09_39_02_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_15-16.pdf>. Acesso em: 05. ago. 2015.

CONAB: **Etanol verde**: Relatório safra 2015-2016. Disponível em:

http://www.ambiente.sp.gov.br/etanol-verde-relatorio-safra-2015_2016-2/. Acesso em: 17. jun. 2016.

CONAB. **Safra brasileira**: cana-de-açúcar: safra 2016/2017: primeiro levantamento. Disponível em:

http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_18_14_27_15_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_16.pdf. Acesso em: 23. jul. 2016.

DANTAS, P.V.P.; MELO, C.F.; HOULLOU, L.M.; MACHADO, G. Nanoparticle-assisted Polymerase Chain Reaction (NanoPCR): Optimization of PCR detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by the addition of nanoparticles. **Journal of Applied and Advanced Research**, vol.2, p.13-20, 2017.

DAVIS, M.J.; BAILEY, R.A. Ratoon stunting. In : ROTT, P.; BAILEY, R.A.; COMSTOCK, J.C.; CROFT, B.J.; SAUMTALLY, A.S. **A guide to sugarcane diseases. Centre de cooperation international en recherche agronomique pour le development (CIRAD) and International Society of Sugar Cane Technologists (ISSCT)**, p. 49-54, 2000.

DAVIS, M. J.; PURCEL, A. H.; THOMSON, S. V. Isolation media for the pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v. 30, p. 425-429, 1980.

DAVIS, M. J.; GILLASPIE JR. A. G.; VIDAVER, A. K. *Clavibacter* a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. sp. nov. subsp. nov and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov; pathogens that causa ratoon stunting disease of sugarcane and Bermuda grass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 107-117, 1984.

DEAN, J.L. Single-stool plots for estimating relative yield losses caused by ratoon stunting disease of sugarcane. **Plant Disease**, vol.67, p. 47-49, 1983.

DEAN, J.L.; DAVIS, M.J. Yield loss caused by ratoon stunting disease of sugarcane in Florida. **J. Am. Soc. Sugar Cane Technol**, vol.10, p. 66-72, 1990.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-Açúcar**, Campinas: Instituto Agrônômico, 2008.

ENDRESS, R. **Plant cell biotechnology**, Berlin: Springer-Verlag, 1994.

EVTUSHENKO, L.I., DOROFEEVA, L.V., SUBBOTIN, S.A., COLE, J. R., TIEDJE, J.M. *Leifsonia poae*. gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex

Leifson 1962) gen.nov., nom. rev. comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis, et al 1984) gen. nov. comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 5, p. 371-380, 2000.

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

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

GAGLIARDI, P.R.; CAMARGO, L. E. A. Análise estrutural e comparativa do genoma de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. 2003. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Agrônômica, Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2003.

GAGLIARDI, P.R.; CAMARGO, L.E.A. Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. **Ciênc Rural**, vol. 39, p. 1222–1226, 2009.

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

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

GRISHAM, M.P.; PAN, Y.B.; RICHARD, E.P. Jr. Early detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. **Plant Pathology**, vol. 47, p. 495-504, 2007.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N.A.; DLOUHY, S.R.; VANCE, G.H.; VOGT, P.H. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. **BioTechniques**, vol. 23, p. 504-511, 1997.

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

INGELBRECHT, I.L.; IRVINE, J.E.; MIRKOV, A.C. Posttranscriptional and silencing in transgenic sugarcane: Dissection of homology-dependent virus resistance in monocot that has a complex polyploidy genome. **Plant Physiol**, vol. 199, p. 1187-1197, 1999.

KOIKE, H. Yield effects of ratoon stunting and sugarcane mosaic diseases of some sugarcane varieties in Louisiana. **J. Amer. Soc. Sugar Cane Technol**, vol. 1, p. 47-51, 1982.

LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A.; DINARDO-MIRANDA, L. L.; SCARPARI, M. S.; GARCIA, J. C.; BIDOIA, M. A. P.; SILVA, D. N.; MENDONCA, J. R.; KANTHACK, R. A. D.; CAMPOS, M. F.; BRANCALIAO, S. R.; PETRI, R. H.; MIGUEL, P. E. M. **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB) oriundas de gemas individualizadas**. Campinas: IAC, 2012. (Documentos IAC, 109).

MAGAREY, R.C.; SUMA, S.; IRAWAN,; KUNIATA, L.S.; ALLSOPP, P.G. Diseases and pests encountered during a survey of *Saccharum* germplasm in the wild in Papua New Guinea. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, v.24, p. 219-227, 2002.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. **Journal of clinical Laboratory Analysis**, vol. 16, p. 47-51, 2002.

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

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, vol. 8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E.R.; PINHAL, M.A.S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Especial Oncologia**, vol. 67, p. 7-19, 2010.

PAN, Y.-B.; GRISHAM, M.P.; BURNER, D.M.A. Polymerase Chain Reaction Protocol for the Detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the Causal Bacterium of Sugarcane Ratoon Stunting Disease. **Plant Disease**, vol. 82, n.3, p. 285-290, 1998.

PROTOCOLO AGROAMBIENTAL DO SETOR SUCROENERGÉTICO PAULISTA: **Dados consolidados das safras 2007/08 a 2013/14**. Disponível em: <http://www.unica.com.br/protocolo-agroambiental/>. Acesso em: 23 jun. 2016.

QUECINE, M.C.; SILVA, T.M.; CARVALHO, G.; SAITO, S.; MONDIN, M.; TEIXEIRA-SILVA, N.S.; CAMARGO, L.E.A.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B. A stable *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* GFP-tagged strain reveals a new colonization niche in sugarcane tissues. **Plant Pathology**, vol. 65, p. 154-162, 2016.

RAO, G.P.; SAUMTALLY, A.S.; ROTT, P. **Sugarcane Pathology: Bacterial and Nematodes Diseases**. Enfield, Science Publishers, vol. 3, p. 3-12, 2004.

RICAUD, C. Ratoon stunting disease. Mauritius Sugar Industry Research Institute. Port Louis. **Annual Report**, p. 54, 1968.

RODRIGUES, E.B.; SAAB, O.J.G. Avaliação técnico-econômica da colheita manual e mecanizada da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) na região de Bandeirantes – Pr. **Semina: Ciências Agrárias**, vol. 28, n. 4, p. 581-588, 2007.

ROSA, D. D.; CAMARGO, L. E. A. **Uma abordagem genômica para o entendimento do crescimento fastidioso de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Agrônoma, Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2006.

STEINDL, D.R.L. Ratoon stunting disease. In: MARTIN, J.P.; ABBOTT, E.V.; HUGHES, C.G. **Sugar-Cane Diseases of the World**. vol. 1, p. 433-459, 1961.

STEINDL, D.R.L.; HUGHES, C.G. Ratoon stunting disease of sugarcane. **Cane Grower's Quarterly Bulletin**, vol. 16, p. 79-95, 1953.

TAYLOR, P.W.J.; PETRASOVITS, L.A.; VAN DER VELDE, R.; BIRCH, R.G.; CROFT, B.J.; FEGAN, M.; SMITH, G.R.; BRUMBLEY, S.M. Development of PCR-based markers for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in fibrovascular fluid of infected sugarcane plants. **Australasian Plant Pathology**, vol. 32, p. 367-375, 2003.

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

UNICA: **Indústria Brasileira de Cana-de-açúcar**: Uma trajetória de evolução. Disponível em: <http://www.unica.com.br/linhadotempo/index.html>. Acesso em: 15. Ago. 2016.

URASHIMA, A. S.; MARCHETTI, L. B. L. Incidence and Severity of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* Infection of Sugarcane in Sao Paulo State, Brazil. **Journal of Phytopathology**, vol. 161, p. 478-484, 2013.

USDA. **Table01: World sugar production, supply and distribution**. Disponível em: <<http://search.ers.usda.gov/search?affiliate=ers&query=sugar%20cane>>. Acesso em: 30. jul. 2015.

USDA. **Table01: World sugar production, supply and distribution**. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov/data-products/sugar-and-sweeteners-yearbook-tables.aspx> . Acesso em: 22 ago. 2016.

VEIGA, F.M. Notas sobre o raquitismo das socas em Campos. **Brasil Açucareiro**, vol. 47, p. 81-83, 1956.

VISWANATHAN, R. Serodiagnosis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* causing ratoon stunting disease in sugarcane. In: Rao, G.P.; Saumtally, A.S.; Rott, P. (eds) **Sugarcane Pathology: Bacterial and Nematodes Diseases**. Enfield, Science Publishers, p. 153–173, 2004.

YOUNG, A.; BRUMBLEY, S. Ratoon stunting disease of sugarcane: history, management and current research. In: Rao, G.P.; Saumtally, A.S.; Rott, P. (eds) **Sugarcane Pathology: Bacterial and Nematodes Diseases**. Enfield, Science Publishers, p. 97-124, 2004.

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

YOUNG, A.; NOCK, C.J.; MARTIN, A.; ENSBEY, M. Novel diagnostic method for ratoon stunting disease: Development and implications for RSD management. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, vol. 36, p. 237-243, 2014.