

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**DETECÇÃO COM TÉCNICAS MOLECULARES DE *Leifsonia xyli* subsp.
xyli E *Xanthomonas albilineans* EM CANA-DE-AÇÚCAR.**

VANESSA DUARTE DIAS

Orientador:
Prof. PhD. Marcos Gomes da Cunha

Junho - 2016

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES
E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

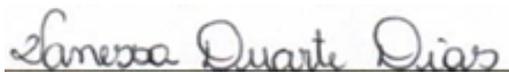
Nome completo do autor: Vanessa Duarte Dias

Título do trabalho: DETECÇÃO COM TÉCNICAS MOLECULARES DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* E *Xanthomonas albilineans* EM CANA-DE-AÇÚCAR.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 06/ 02 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

VANESSA DUARTE DIAS

DETECÇÃO COM TÉCNICAS MOLECULARES DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* E *Xanthomonas albilineans* EM CANA-DE-AÇÚCAR.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração: Fitossanidade.

Orientador:

Prof. PhD. Marcos Gomes da Cunha

Co-orientador:

Prof. Dr. Érico de Campos Dianese

Goiânia, GO – Brasil
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

GPT/BC/UFG

D541o Dias, Vanessa Duarte.
DETECÇÃO COM TÉCNICAS MOLECULARES DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* E *Xanthomonas albilineans* EM CANA-DE-AÇÚCAR [manuscrito] / Vanessa Duarte Dias. - 2016.

xv, f. 107: il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Ph.D. Marcos Gomes da Cunha;
Coorientador: Prof. Dr. Érico de Campos Dianese.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2016.

Bibliografia.

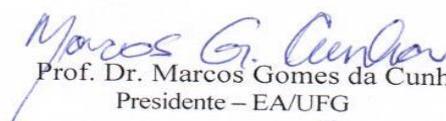
1. Cana-de-açúcar – Folhas – Doenças. 2. Raquitismo.
2. Escaldadura. 4. Plantas – Doenças. I. Título.

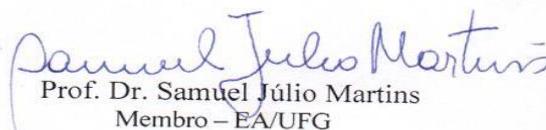
CDU:.....



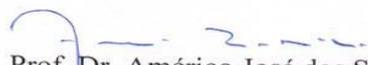
ATA DE DEFESA DE TESE

Aos trinta dias do mês de junho do ano de dois mil e dezesseis (30.06.2016), às 09h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Prof. Dr. Marcos Gomes da Cunha - Orientador/Presidente, Prof. Dr. Érico de Campos Dianese, Prof. Dr. Américo José dos Santos Reis, Dr. Renato Carrer Filho, Prof. Dr. Nadson de Carvalho Pontes e Prof. Dr. Samuel Júlio Martins, para, em sessão pública realizada no auditório do PPGA da EA/UFV, procederem à avaliação da defesa de Tese intitulada: "**Detecção com técnicas moleculares de *Leifsonia xyli subsp. xyli* e *Xanthomonas albilineans* em cana-de-açúcar**", de autoria de **Vanessa Duarte Dias**, discente do curso de **Doutorado**, na área de Concentração em **Fitossanidade**, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação dos membros da Banca e deu início às atividades relativas à defesa da Tese. Passou a palavra a doutoranda que em quarenta minutos apresentou o seu trabalho. Após a apresentação a candidata foi arguida sucessivamente pelos membros da banca. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. De acordo com a Resolução nº 1051, de 09.09.2011 do CEPEC - Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura, que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Agronomia, a Banca Examinadora considerou **APROVADA** a Tese, com as correções recomendadas, estando integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **DOCTORA** em Agronomia, na área de concentração em **FITOSSANIDADE**, pela Universidade Federal de Goiás. A doutoranda deverá efetuar as modificações sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar a versão definitiva da tese à Secretaria do PPGA, no prazo máximo de trinta dias após a data da Defesa. A conclusão do Curso e a emissão do Diploma dar-se-ão após o cumprimento do Artigo 69, § 1º e § 2º, da Resolução CEPEC nº 1051, de 09.09.2011. A Banca Examinadora recomendou a publicação de artigo(s) científico(s), oriundo(s) dessa tese, em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de efetuadas as modificações sugeridas. No caso da discente titulada não providenciar a publicação de seu trabalho final em forma de artigo(s) científico(s) no prazo de seis meses, após a data da defesa, serão aplicados os dispositivos do Artigo 70, § 1º e § 2º, da mesma Resolução. Para finalizar, o Presidente agradeceu os membros examinadores, congratulou-se com a doutoranda e encerrou a sessão às 13h35min. E para constar, eu Welinton Barbosa Mota, secretário do PPGA, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora, em quatro vias de igual teor.

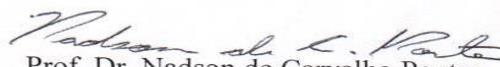

Prof. Dr. Marcos Gomes da Cunha
Presidente - EA/UFV


Prof. Dr. Samuel Júlio Martins
Membro - EA/UFV


Prof. Dr. Érico de Campos Dianese
Membro - EA/UFV


Prof. Dr. Américo José dos Santos Reis
Membro - EA/UFV


Dr. Renato Carrer Filho
Membro - EA/UFV


Prof. Dr. Nadson de Carvalho Pontes
Membro - IF/Goiás/Morrinhos

À minha família, meu esposo Rodrigo e a minha filha Sophia Laura,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela força e determinação para enfrentar as dificuldades e por tudo que consegui realizar nesta trajetória do doutorado;

A Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós - graduação em Agronomia, pela oportunidade de aprimoramento profissional.

Ao professor Marcos Gomes da Cunha pela orientação e confiança;

Ao professor Érico de Campos Dianese pela Co-orientação e apoio;

Ao professor Phillipe Challes Rott por ter me acolhido em seu laboratório durante o período sanduíche na Universidade da Flórida.

A toda a equipe do Núcleo de Pesquisa em Fitopatologia da Universidade Federal de Goiás, principalmente à Renata Maria de Oliveira, pelos conselhos e incentivo durante a realização deste trabalho;

Ao CNPQ e PSDE pela concessão da Bolsa de estudos no Brasil e Estados Unidos;

A todos que contribuíram para a realização deste projeto.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	8
GENERAL ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 CANA-DE-AÇÚCAR- CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	12
2.2 A CANA-DE-AÇUCAR NO BRASIL.....	13
2.3 ESCALDADURA DAS FOLHAS- <i>Xanthomonas albilineans</i>	16
2.3.1 Histórico da escaldadura das folhas.....	16
2.3.2 A bactéria <i>Xanthomonas albilineans</i>.....	16
2.3.3 Variabilidade genética em <i>Xanthomonas albilineans</i>	18
2.3.4 Importância Economica da Escaldadura das Folhas em cana-de-açúcar.....	20
2.3.5 Sintomatologia.....	21
2.3.6 Disseminação.....	21
2.3.7 Controle.....	22
2.3.8 Detecção e diagnose.....	23
2.3.9 Descobertas recentes.....	25
2.4 RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS- <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	25
2.4.1 Histórico e etiologia do Raquitismo das soqueiras.....	25
2.4.2 Importância economica do Raquitismo das soqueiras em cana-de-açúcar.....	27
2.4.3 Sintomatologia.....	28
2.4.4 Sobrevivência e disseminação.....	29
2.4.5 Controle.....	30
2.4.6 Detecção e diagnose.....	31
3 REFERENCIAS.....	33
4 DETECÇÃO DE <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> EM CANA-DE-AÇÚCAR ADVINDAS DE TOLETES TRATADOS TERMICAMENTE EM ASSOCIAÇÃO COM ANTIBIÓTICO.....	43
4.1 INTRODUÇÃO.....	45
4.2 MATERIAL E METODOS.....	46
4.2.1 Tratamento térmico com adição de antibiótico em toletes de uma e três gemas.....	47
4.2.1.1 Extração do fluído vascular da cana-de-açúcar.....	48
4.2.1.2 Extração de DNA das amostras.....	48
4.2.1.3 Integridade, quantificação e pureza do DNA extraído.....	49
4.2.2 PCR convencional.....	49
4.2.3 NESTED-PCR.....	51
4.2.4 Sensitividade da detecção de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> em DNA total do fluído fibrovascular de cana-de-açúcar.....	52
4.2.5 Sequenciamento dos padrões amplificados por NESTED-PCR.....	52
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.3.1 Toletes de uma gema tratados termicamente.....	53
4.3.2 Toletes com três gemas.....	55
4.4 CONCLUSÕES.....	61

4.5	REFERÊNCIAS.....	62
5	DIAGNOSE DE ESCALDADURA DAS FOLHAS EM CANA-DE-AÇÚCAR POR PCR BASEADA NO MÍNIMO RESIDUAL BACTERIANO EM FASE DE LATENCIA DA DOENÇA.....	64
5.1	INTRODUÇÃO.....	66
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	69
5.2.1	Aquisição das plantas e preparação das amostras.....	69
5.2.2	Extração do fluido vascular da cana-de-açúcar.....	70
5.2.3	Extração de DNA das amostras.....	70
5.2.4	Aplicação da metodologia para diferentes variedades de cana-de-açúcar.....	71
5.2.5	Reações de PCR convencional.....	72
5.2.6	Nested-PCR.....	73
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
5.4	CONCLUSÕES.....	79
5.5	REFERENCIAS.....	80
6	COMPARISON OF LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP), POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR), AND SELECTIVE ISOLATION ASSAYS FOR DETECTION OF <i>Xanthomonas albilineans</i> FROM SUGARCANE.....	83
6.1	INTRODUCTION.....	84
6.2	MATERIAL AND METHODS.....	86
6.2.1	Plant material and sample preparation.....	86
6.2.2	Isolation of <i>Xanthomonas albilineans</i> on selective medium and determination of pathogen population densities.....	86
6.2.3	DNA extraction from sugarcane stalk samples.....	87
6.2.4	Relationship between disease symptoms, population size of <i>Xanthomonas albilineans</i> and detection limit of the pathogen.....	87
6.2.5	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primer design.....	88
6.2.6	LAMP assays.....	88
6.2.7	Polymerase chain reaction (PCR) assays.....	88
6.2.8	Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) assay.....	89
6.2.9	Sensitivity of detection of <i>Xanthomonas albilineans</i> from pure cultures.....	89
6.3	RESULTS.....	90
6.3.1	Optimization of the LAMP assay.....	90
6.3.2	Detection limit of <i>Xanthomonas albilineans</i> in deionized water suspensions using LAMP and PCR assays.....	90
6.3.3	Detection of <i>Xanthomonas albilineans</i> in sugarcane stalks with and without leaf scald symptoms.....	91
6.3.4	Relationship between disease symptoms, population size of <i>Xanthomonas albilineans</i> and detection limit of the pathogen.....	91
6.3.5	Identification of genetic variants of <i>Xanthomonas albilineans</i> by LAMP and PCR assays.....	92
6.4	DISCUSSION.....	93
6.5	ACKNOWLEDGEMENTS.....	96
6.6	LITERATURE CITED.....	95

RESUMO GERAL

DIAS, V. D. Detecção com técnicas moleculares de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e *Xanthomonas albilineans* em cana-de-açúcar. 2016. 107 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Fitossanidade) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016¹.

O cultivo de cana-de-açúcar está em expansão no Brasil, devido principalmente ao crescente consumo de etanol por carros bicompostíveis. A área plantada está em crescimento, mas a produtividade nos últimos anos vem decrescendo, e fatores como incidência de doenças podem estar contribuindo para tal situação. Dentre as doenças, as bacterianas, como o raquitismo das soqueiras e a escaldadura das folhas, possuem grande importância para a cultura, pois podem reduzir a produtividade em até 30%. Nem sempre os sintomas são visualizados em campo, necessitando assim de técnicas avançadas de detecção ou controle. Para a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*), que causa o raquitismo das soqueiras em cana-de-açúcar a medida de controle mais utilizada além da resistência varietal é tratar termicamente os toletes que servirão de mudas. Assim o objetivo do primeiro trabalho foi realizar o tratamento térmico dos toletes com a adição de antibiótico casugamicina à dosagem de 300mL/100L de H₂O com o intuito de tentar reduzir o escape bacteriano dentre os tratamentos padrões, como também em outras combinações de tempo e temperatura propostos: T1= 52°C/30'; T2= 52°C/1hr; T3= 50°C/1hr; T4= 50°C/2hrs; T5= 52°C/30' + antibiótico; T6= 52°C/1hr + antibiótico; T7= 50°C/1hr + antibiótico; T8= 50°C/2hrs + antibiótico; T9= antibiótico e T10= testemunha. Além disso, dentre as técnicas para diagnose de tais doenças, as mais utilizadas por laboratórios são os testes sorológicos, que tem como vantagem detectar quantitativamente a presença das bactérias nos colmos mas, no entanto, possui a desvantagem de detectar somente quando a população bacteriana está relativamente alta. Já a técnica de PCR que é uma das técnicas consideradas mais sensíveis, não vem sendo utilizada na prática, pois esta alta sensibilidade não vem ocorrendo. Os protocolos não detectam as bacterioses no caso de infecção latente, onde o título bacteriano é relativamente baixo. Portanto, os demais trabalhos visaram aprimorar a detecção *Xanthomonas albilineans* desenvolvendo um protocolo LAMP, e comparando com outras técnicas de detecção como isolamento em meio semi-seletivo, PCR e Nested-PCR, tanto para amostras sintomáticas quanto para assintomáticas. Para estas últimas onde a população do patógeno de maneira geral é baixa, aprimoramos um protocolo Nested para detectar escaldadura das folhas em infecções latentes, comparando técnicas de extração do fluido vascular combinado a quatro diferentes protocolos de extração de DNA.

Palavras-chave: fitobactérias, infecções latentes, LAMP, Nested-PCR, *Saccharum sp.*

¹ Orientador: Prof. Dr. Marcos Gomes da Cunha. EA/UFG
Co-orientador: Prof. Dr. Érico de Campos Dianese. EA/UFG

GENERAL ABSTRACT

DIAS, V. D. **Detection with molecular techniques of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e *Xanthomonas albilineans* in sugarcane.** 2016. 109 f. Thesis (PhD in Agronomy: Phytopathology) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016¹.

The sugarcane production areas are increasing in Brazil due to increased ethanol consumption by flex fuel cars. The planted area is growing, but productivity has been declining in recent years, and factors such as incidence of diseases in the crop may be contributing to this situation. Among the diseases, bacteria such as scald of the leaves and ratoon stunting disease are of great importance to the crop because they can reduce productivity by up to 30%. In addition and the symptoms are not always displayed in the field, thus requiring advanced techniques to detect such bacterial diseases For *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, which causes rickets in the ratoon cane sugar control measure most commonly used besides varietal resistance is thermally treating the billets that will serve seedlings. Thus, the purpose of the first study was to perform the heat water treatment of billets with the addition of kasugamycin antibiotic dosage 300mL/100L H₂O in order to try to reduce bacterial escape from the standard treatments, as also in other time and temperature combinations proposed: T1 = 52°C/30'; T2 = 52°C/1hr; T3 = 50°C/1hr; T4 = 50°C/2hrs; T5 = 52°C/30' + antibiotic; T6 = 52°C/1hr + antibiotic; T7 = 50°C/1hr + antibiotic; T8 = 50°C/2hrs + antibiotic; T9 = antibiotic and T10 = control. Moreover, among techniques for diagnosis of such diseases, the most used by laboratories are the serological tests which have the advantage of quantitatively detecting the presence of bacteria on the stems but, however, has the disadvantage of detecting only when the bacterial population is relatively high. PCR technique that is one of the techniques considered most sensitive, has not been used in practice, as this high sensitivity has not been used, the protocols do not detect bacterial diseases in the case of latent infection, where bacterial title is relatively low. So the other work aimed at improving the *Xanthomonas albilineans* detection developing a LAMP protocol, and compared to other techniques of detection and isolation in semi-selective medium, PCR and nested PCR for both symptomatic samples and for asymptomatic and the latter where population in general pathogen is low, we improved Nested one protocol to detect the leaf scald in latent infections by comparing the vascular fluid extraction techniques combined with four different DNA extraction protocols.

Key words: latent infections, LAMP and Nested-PCR, *Saccharum sp*, phyto bacteria.

¹ Adviser: Prof. Dr. Marcos Gomes da Cunha. EA/UFG
Co-adviser: Prof. Dr. Érico de Campos Dianese. EA/UFG

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas do mundo, cultivada em mais de 100 países, e representa uma importante fonte de mão de obra no meio rural nesses países (www.novacana.com/cana-de-acucar/). A cana-de-açúcar é um exemplo de cultura renovável e versátil, que pode ser utilizada como fonte de energia limpa e matéria-prima de produtos. A modernização das 430 usinas em operação no país, com a adoção de novas tecnologias desde o plantio até a produção de açúcar, etanol e bioeletricidade, fortaleceram o setor, reconhecido mundialmente por seu pioneirismo e sua eficiência produtiva (UNICA, 2016). Desde que chegou ao país no início do século XVI, junto com as primeiras caravelas, a cana-de-açúcar se tornou um dos mais importantes cultivos desenvolvidos no Brasil. Atualmente, o país ocupa o primeiro lugar no “ranking” de produção de açúcar e é o maior exportador de etanol do planeta (UNICA, 2016).

A recente busca por combustíveis renováveis que substituam o petróleo e não sejam tão agressivos ao meio ambiente faz da cana-de-açúcar um produto de importância global na procura por um desenvolvimento mais sustentável (www.novacana.com/cana-de-acucar/). A demanda por bicompostíveis exige a expansão da produção da matéria-prima, e, tal expansão, leva a uma multiplicação inadequada da cana-planta que, por muitas vezes, é colhida em talhões comerciais e utilizada nos novos plantios, sem nenhuma inspeção ou tratamento. Com este tipo de manejo, aumentam-se também os problemas fitossanitários. Segundo Gatti (2008), doenças da cana-de-açúcar são muito graves porque causam a degenerescência das variedades em cultivo, obrigando a sua substituição periódica. Dentre as 120 doenças que tem sido descritas (Rott *et al.*, 2000), duas delas são consideradas doenças de maior importância para a cana-de-açúcar no âmbito mundial: Raquitismo da soqueira (RSD-Ratoon Stunting Disease), causada pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) e

Escaldadura das folhas (LS - Leaf Scald), causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans* (*X. albilineans*).

A distribuição mundial destas doenças, a ausência de sintomas aparente e suas consequências no campo levaram a necessidade de desenvolver eficientes metodologias de detecção, sem as quais dificulta-se o controle. Na atualidade, as técnicas moleculares são as mais rápidas e mais sensíveis e tem sido usadas com sucesso em diferentes patossistemas (Wang, et al. 1999). Dentre as técnicas moleculares, a mais popular para detecção de patógenos é a PCR (polymerase chain reaction) que para a bactéria *X. albilineans*, iniciadores e protocolos foram previamente desenvolvidos por Davis, et al. (1994); Pan, et al. (1997); Wang, et al. (1999); e para *Lxx* foram desenvolvidos protocolos por: Fegan et al. (1998); Pan et al. (1998); Grisham et al. (2007). Entretanto, os estudos em questão são trabalhosos que limitam o número de análises e não muito robustos para garantir índices satisfatórios de detecção em plantas onde o nível populacional bacteriano é baixo, ou seja, abaixo do limite mínimo de detecção da técnica. Por isso, além de tentarmos aprimorar a técnica de detecção por PCR para *Lxx* e *X. albilineans*, um protocolo LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) foi também desenvolvido para detectar *X. albilineans* em cana-de-açúcar e comparado com outras técnicas de detecção tradicional e moleculares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CANA-DE-AÇÚCAR – CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

A cana-de-açúcar foi descrita por Linneu em 1753, no livro *Specie Plantarum*, como *Saccharum officinarum* e *Saccharum spicatum*, e, posteriormente sofreu inúmeras alterações (Cesnik & Miocque, 2004). A cana pertence à família da Poaceae, tribo *Andropogoneae* e gênero *Saccharum*. A classificação botânica das espécies de cana-de-açúcar mais aceita contempla: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule* (Barbosa, 2000). *Saccharum spontaneum* e *Saccharum robustum* são selvagens enquanto as outras quatro espécies são domesticadas.

A espécie selvagem *S. spontaneum* L. ($2n=40-128$) possui intenso perfilhamento, rizoma agressivo, colmos com até 8m de altura, duros e medulosos, com baixo teor de suco e sacarose. Melhoristas tem utilizado esta espécie para incorporar características como vigor, dureza e resistência à maioria das doenças (Soopramanien, 2000).

S. robustum Brandes & Jeswiet ex Grassl ($2n= 60-194$) é originária da Nova Guiné, possui porte ereto e pode atingir 10m de altura. O seu uso é limitado aos programas de melhoramento porque possui alta susceptibilidade a Escaldadura e ao vírus do mosaico (Soopramanien, 2000).

S. officinarum ($2n=80$) é conhecida como cana-nobre, pelo fato de possuir alto teor de sacarose e baixo em fibra. É exigente em clima e solo e suscetível as principais doenças da cana-de-açúcar. Essa espécie é poliplóide com centro de origem é a Nova Guiné (Ros, 2004). O termo nobre ou noble de *S. officinarum* foi criado por melhoristas holandeses, em 1920, para se referir a essa espécie, em razão do seu elevado teor de açúcar (Barbosa, 2000).

S. sinense ($2n=111$ a 120) é conhecida como cana chinesa ou japonesa, adapta-se bem em solos pobres e secos, tem colmos finos e compridos com internódios longos (Cesnik & Miocque, 2004), suscetível a maioria das doenças (Soopramanien, 2000).

S. barberi (2n=81 a 124) e *S. edule* (2n=74) possuem teor de sacarose médio e variedades precoces e alto teor de fibras, susceptível a maioria das doenças (Soopramanien, 2000).

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

2.2 A CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil no início do século XVI, por Martim Affonso de Souza que em 1532 trouxe a primeira muda de cana ao Brasil e iniciou seu cultivo na Capitania de São Vicente. Lá, ele próprio construiu o primeiro engenho de açúcar. Mas foi no Nordeste, principalmente nas Capitanias de Pernambuco e da Bahia, que os engenhos de açúcar se multiplicaram (Cesnik & Miocque, 2004).

Os três primeiros cultivos da cana no Brasil ficaram conhecidos como “ciclo da creola”, pois tinham sido introduzidos híbridos de *S. officinarum* com *S. barberi* (grupo mungo), denominados cana-crioula ou cana-da-terra. Posteriormente, a cana-crioula foi substituída pelas canas nobres devido a sua alta suscetibilidade ao vírus-do-mosaico (Barbosa, 2000).

As canas nobres, conhecidas como cana caiana, foram introduzidas no século XIX. Estas são mais ricas em sacarose e constituíram a base da indústria canavieira no Brasil até 1850, quando ocorreu a epidemia de gomose (*Xanthomonas vascularum*,) que causou enormes prejuízos. Após essa epidemia foram introduzidas variedades javanesas como a POJ32, POJ213 e a POJ2878. Nesta época, também foram introduzidas as variedades da Índia como a Co331, Co413, Co421, Co419 e outras. Entretanto, epidemias severas de carvão forçaram a introdução de novos genótipos (Matsuoka,

1999). Com o carvão, surgiram os programas de melhoramento no Brasil e, a partir de 1950, as variedades do Campo Experimental de Campos (Campos Brasil - CB) passaram a ser largamente plantadas.

A cultura da cana-de-açúcar prosperou substancialmente na região Nordeste, sendo o açúcar o principal produto do agronegócio brasileiro por mais de dois séculos. Na década de 1970, teve início a transformação do setor com o Programa Nacional do Álcool (Proálcool). O Proálcool foi instituído pelo Decreto nº 76.593 em 1975, com a finalidade de expandir a produção do álcool etílico anidro e viabilizar seu uso como matéria-prima para a indústria química e como combustível adicionado à gasolina. Por meio desse programa, o Brasil poderia substituir parte do combustível derivado do petróleo e auxiliar o setor sucroalcooleiro através do deslocamento de parte da produção de açúcar para a produção de etanol. Foi nessa época que as usinas passaram a ter maior incentivo para produção do etanol e, mais recentemente, à bioeletricidade, aos alcoolquímicos e à comercialização de créditos de carbono.

A existência no exterior de políticas de fomento ao uso, produção e inserção de biocombustíveis, com destaque para o etanol, nas matrizes energéticas, oferece uma oportunidade ímpar para o Brasil, que dispõe de experiência e de tecnologias de produção adquiridas em quase um século de uso contínuo do etanol como combustível automotivo, e mais de 30 anos de existência do Proálcool. Essa experiência, associada à grande disponibilidade de terras agrícolas com aptidão para o cultivo da cana-de-açúcar, impulsionam o desenvolvimento de novas tecnologias para o aumento de produção do setor (Miranda Jr, 2008).

A produção de cana-de-açúcar estimada para a safra 2016/17 é de 690,98 milhões de toneladas. O crescimento está estimado em 3,8% em relação à safra anterior. A área cultivada foi de 9.073,7 mil hectares, aumento de 4,8%, se comparada com a safra 2015/16. A produção de açúcar deverá atingir 37,5 milhões de toneladas, 12% superior à safra 2015/16. A produção de etanol deve se manter acima de 30 bilhões de litros, redução de apenas 0,4%. A produção de etanol anidro deverá ter aumento de 4,7%, alcançando 11,7 bilhões de litros. Para a produção de etanol hidratado o total poderá atingir 18,6 bilhões de litros, redução de 3,4% ou 649 milhões de litros país (CONAB, 2016). São Paulo, maior produtor, possui 52% (4.678,7 mil hectares), seguido por Goiás com 10,1% (908 mil hectares), Minas Gerais com 9% (811,2 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 7,5% (677,9 mil hectares), Paraná com 6,6% (596 mil hectares), Alagoas com 3,8% (338,3 mil hectares), Pernambuco com 2,9% (264 mil

hectares) e Mato Grosso com 2,6% (230,3 mil hectares). Estes oito estados são responsáveis por 94,5% da produção nacional. Os outros 14 estados produtores possuem áreas menores, totalizando 5,5% da área total do país (CONAB, 2016).

Atualmente, no Brasil, atuam três programas de melhoramento de cana-de-açúcar: Instituto Agrônomo de Campinas-IAC, Centro de Tecnologia Canavieira – CTC e o Programa da RIDESA - Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor sucroenergético - composta pelas Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal de Alagoas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Universidade Federal de Viçosa, Universidade Federal de Goiás, Universidade Federal de São Carlos, Universidade Federal do Paraná, Universidade federal do Piauí, Universidade Federal, Universidade Federal de Sergipe e Universidade Federal de Mato Grosso.

Nos últimos anos, a área de cultivo vem se expandindo principalmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do país, englobando o oeste e noroeste do Estado de São Paulo, sudoeste de Minas Gerais, além dos Estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás. A estas se somam as potenciais novas fronteiras do Vale do São Francisco e do oeste da Bahia, Maranhão e Piauí. Assim, para que a produção agrícola da cana-de-açúcar no Brasil seja sustentável, é necessário compreender os mecanismos de resposta e adaptação da cultura aos fatores de estresses bióticos e abióticos às quais está submetida nestes variados ambientes de produção. Neste contexto, entre os fatores bióticos, destacam-se as doenças conhecidas como raquitismo da soqueira (RSD), causada pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) e escaldadura das folhas, causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans* (*X. albilineans*).

2.3 ESCALDADURA DAS FOLHAS - *Xanthomonas albilineans*

2.3.1 Histórico da escaldadura das folhas

A escaldadura das folhas em cana-de-açúcar foi primeiramente registrada na Austrália, em 1911 por North, mas fortes evidências indicam sua ocorrência nas Ilhas Fiji em 1908 (Davis *et al.*, 1997). A causa da doença foi descoberta em 1920 por Wilbrink, em Java, e por North, na Austrália. Logo depois, a doença foi encontrada nas Filipinas, Ilhas Maurício e Hawaii. Segundo Arruda (1944), *X. albilineans* foi

introduzida no Brasil em 1929, com a importação da cultivar Badila, da Austrália. A primeira ocorrência dessa doença no país foi feita em Piracicaba-SP e municípios vizinhos além de Campos, no Rio de Janeiro. Por volta de 1961, a escaldadura das folhas foi relatada em 22 países produtores de cana-de-açúcar (Davis et al., 1997) e, atualmente, a sua ocorrência foi constatada em praticamente todas as áreas produtoras.

2.3.2 A bactéria *Xanthomonas albilineans*

Xanthomonas albilineans foi primeiramente nomeada como *Bacterium albilineans* por Ashby em 1929 citado por Martin *et al.* (1961). Posteriormente o gênero *Phytomonas* foi proposto em lugar de *Bacterium* por ser, seguramente, uma bactéria que causava doenças em plantas, e em decorrência da sintomatologia, ficou conhecida como *Phytomonas albilineans* (Ashby). Em nova reclassificação proposta por Dowson (1943), o gênero *Xanthomonas* foi criado e passou a incluir "...bactérias com pigmentação amarela, apresentando único flagelo polar...". Por possuir essas características, *P. albilineans* foi reclassificada como *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson (1943). Sua taxonomia atual é filo Proteobacteria, ordem Xanthomadales, família Xanthomonadaceae (Birch, 2001).

Xanthomonas albilineans é uma bactéria Gram-negativa, não fastidiosa, aeróbica, medindo 0,25-0,3 x 0,6-1,0 µm, com um único flagelo polar, não é redutora de nitrato, apresenta atividade da enzima catalase e não usa asparagina como fonte de carbono e nitrogênio (Schaad & Stall, 1988; Tokeshi & Rago, 2005). Segundo Tokeshi & Rago (2005), quando recentemente isolada, a bactéria é de crescimento lento em meio de cultura, produzindo pequenas colônias amareladas, brilhantes, convexas e de bordos lisos. O meio de cultura mais recomendado para o crescimento de *X. albilineans* é o de Wilbrink (1920) citado por Akiba (1978) e a temperatura ótima de crescimento desta bactéria é de 25 a 28° (Davis et. al, 1994).

Além da cana-de-açúcar, seu principal hospedeiro, *X. albilineans* infecta naturalmente milho-doce, bambu, sorgo selvagem, capim colonião, capim elefante e algumas outras gramíneas como *Brachiaria piligera*, *Imperata cylindrica*, *Paspalum* sp., *Rottboellia cochinchinensis* (Martin & Wismer, 1961). A bactéria pode sobreviver em *Imperata cylindrica* (nome vulgar: Barão vermelho) por um longo período de tempo e, conseqüentemente, esta espécie pode atuar como fonte de inóculo. Em geral, quando essas

gramíneas estão infectadas, somente exibem faixas estreitas nas folhas ou o sintoma mais característico que é a estria branca (Birch, 2001).

X. albilineans possui genoma reduzido e exibe características genômicas distintas em comparação com outras espécies de *Xanthomonas* (Pieretti *et al.*, 2009; Margarettaz *et al.*, 2011). Por exemplo, o genoma de *X. albilineans* carece de dois locus necessário para patogenicidade do gênero *Xanthomonas* em outras plantas: a biossíntese de goma xantana, e a resposta de hipersensibilidade e patogenicidade (sistema de secreção tipo 3 - HRP-T3SS). Em contraste, embora em tamanho reduzido, o genoma de *X. albilineans* codifica características genômicas específicas, incluindo um 1-SPI da mesma da família de patogenicidade de *Salmonella* ilha-1 e a síntese de peptídeos em locus não-ribossomal (PNR) incluindo a biossíntese de albicidina (Margarettaz *et al.*, 2011; Royer *et al.*, 2013). Albicidina é um inibidor da DNA girase, uma fitotoxina responsável pelos sintomas da escaldadura e um antibiótico contribuindo para a competitividade de *X. albilineans* contra outras bactérias ao se espalhar no interior da cana-de-açúcar (Birch, 2001).

A Análise Multiloco de Sequência de DNA de quatro genes de referência resultou em distribuição de espécies de *Xanthomonas* em duas clades. A primeira é a principal englobando a maioria das espécies e a segunda contém *X. albilineans*, *X. saccari*, *X. theicola*, *X. hyacinthi* e *X. translucens* (Young *et al.*, 2008). Análises filogenéticas com a sequência GyrB indica que este grupo secundário também contém uma série de espécies de *Xanthomonas* que foram isoladas de arroz, banana ou cana-de-açúcar, mas que ainda não foram caracterizadas (Studholme *et al.*, 2011 e 2012). De forma interessante, dois multilocus dentre os estudados um com 28 genes e o outro com 228 genes, em que *X. albilineans* somente está presente no segundo grupo, mas resultou em uma ramificação para a clade de *Xylela fastidiosa* (Rodriguez *et al.* 2012; Naushad e Gupta, 2013). *Xylela fastidiosa* é uma bactéria limitada ao xilema e transmitida por insetos vetores em diversos hospedeiros, tem reduzido genoma e também falta o sistema de secreção tipo III- Hrp-T3SS (Simpson *et al.*, 2000).

Uma característica única de *X. albilineans* é a produção da fitotoxina albicidina, proteína responsável pelos sintomas das listras brancas foliares características da escaldadura das folhas da cana (Birch & Patil, 1985). Albicidina é um potente inibidor da DNA girase bloqueando assim a diferenciação dos cloroplastos. Ela também tem como alvo a girase bacteriana por um mecanismo diferente a partir de outros inibidores da girase de DNA como cumarinas e quinolonas (Hashimi *et al.*, 2007). Deste modo ela

também é responsável pela atividade antibacteriana potente de albicidina, que inibe o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas nos vasos do xilema (Birch & Patil, 1985). Assim, albicidina dá uma vantagem competitiva a *X. albilineans* contra outras bactérias dentro dos vasos do xilema. De maneira interessante, outras duas bactérias encontradas na cana-de-açúcar possuem um gene de resistência à albicidina *Leifsonia xyli* (Monteiro-Vitorello et al, 2004) e *Pantoea dispersa* (Zhang & Birch , 1997).

2.3.3 Variabilidade genética em *Xanthomonas albilineans*

Xanthomonas albilineans apresenta grande variabilidade genética intra-específica, com a existência de vários haplótipos, utilizando diferentes metodologias, incluindo electroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e a análise multi-locus de sequência (MLSA) (Davis et al., 1997; Pieretti et al., 2012). Além disso, três sorotipos associados com variações antigênicas dentro de *X. albilineans* foram detectadas utilizando três anti-soros (policlonais) produzidos contra cepas de três localizações geográficas diferentes. Sorotipagem de 215 amostras de 28 locais em todo o mundo canas afetadas pela doença escaldadura das folhas, três grupos de linhagens distintas foram distribuídos de acordo com o sorotipo: (i) sorotipo 1 representa o maior grupo, com cepas de várias localizações geográficas; (ii) sorotipo 2 consiste em cepas de países africanos tropicais; e (iii) o sorotipo 3 contém estirpes de ilhas das Caraíbas (Guadalupe, Martinica, Saint-Kitts), bem como da Ásia (Sri Lanka) e Oceania (Fiji) (Rott et al., 1986; Rott et al., 1994). Esta caracterização sorológica das estirpes de *X. albilineans* foi corroborada usando uma combinação de anticorpos monoclonais em 38 cepas de diferentes locais em todo o mundo (Alvarez et al., 1996).

Embora *X. albilineans* seja transmitida principalmente por meio de toletes infectados sintomáticos ou assintomáticos e implementos de corte infestados (Ricaud & Ryan, 1989), as transmissões aéreas foram registrados na década de 1990 em Guadalupe e na Maurícia (Klett & Rott, 1994; Saumtally et al., 1995; Daugrois et al., 2003). A transmissão aérea resultando em fase epífita da bactéria foram propostas como passos importantes no ciclo epidemiológico de escaldadura das folhas (Champouseau et al., 2009). Para entender melhor transmissão aérea e a sobrevivência epífitas deste patógeno cana, foi realizado um estudo em Guadalupe, em 1997, em parcelas experimentais criados com o tecido livre de doença de cana cultivadas em um local de cultivo de

banana, distante de qualquer outro campo de cana, treze semanas após o plantio, e durante um de dois dias de tempestade tropical, uma estirpe pertencente ao sorotipo 3 (XaS3) de *X. albilineans* foi isolado a partir de gotas de orvalho na superfície das folhas de cana de açúcar (Daugrois et al., 2003). Cinco semanas depois, pelo menos a metade do talhão do canavial experimental estava invadido por cepas XaS3. Durante o mesmo período, a densidade de população de estirpes XaS3 sobre as superfícies das folhas foi gradualmente aumentada. A subsequente diminuição da densidade populacional de estirpes XaS3 na superfície da folha se correlacionou com o aparecimento de uma segunda estirpe transmitida pelo vento e respingos, depois de outra tempestade, pertencente ao sorotipo 1 (XaS1) de *X. albilineans* (Daugrois et al., 2003). Ao contrário de XaS1, XaS3 foi incapaz de penetrar as folhas de cana ou de colonizar toletes de cana. XaS3 também não conseguiu induzir quaisquer sintomas de escaldadura nas folhas, após a inoculação artificial realizada em casa de vegetação, levando os autores a considerá-la como uma estirpe epífita não-agressiva (Mensi et al., 2014).

2.3.4 Importância Econômica da Escaldadura das folhas em Cana-de-açúcar

A escaldadura das folhas em cana-de-açúcar já foi relatada em mais de sessenta países, inclusive no Brasil. Sua importância tem sido subestimada devido aos erros de identificação que confundem os cálculos dos prejuízos dessa bactéria com aqueles causados pela bactéria do raquitismo da soqueira (Tokeshi & Rago, 2005). Quando a doença se manifesta em variedades extremamente suscetíveis, pode causar 100% de perdas por queima completa das folhas e apodrecimento dos colmos. Portanto, ela pode ter um grande efeito negativo sobre a produtividade da cana e tem o potencial para limitar gravemente o cultivo de espécies sensíveis. Sua distribuição é generalizada por todo o país, porque todas as variedades comerciais provavelmente são portadoras assintomáticas dessa doença (Tokeshi & Rago, 2005).

A severidade e importância da doença variam grandemente de um país para outro e dentro do mesmo país. Surtos esporádicos da doença, após longos períodos de ausência, não são incomuns (Jaufeerally-Fakim et al., 2000, Alvarez et al., 1995). Diferenças na suscetibilidade das variedades de cana ao patógeno tem sido notadas tanto entre como dentro de países, sendo esse fenômeno atribuído a fatores ambientais, variabilidade do patógeno ou mesmo reação das variedades cultivadas (Rott & Davis, 1997).

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

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

2.3.5 Sintomatologia

A doença é insidiosa por ter um período de latência (assintomática) que tem a duração de meses e, por vezes anos. A escaldadura é ainda mais complicada por se manifestar numa fase crônica ou fase aguda (Sandhu et al., 2009).

A infecção latente é a que prevalece na maioria das variedades comerciais, que apresentam tolerância, e, por isso, convivem com o patógeno por anos, sem manifestar sintomas externos. A diagnose da doença exige, neste caso, a aplicação de métodos sorológicos ou moleculares de detecção do patógeno, devido à maior precisão quando comparados à diagnose visual. A fase crônica é caracterizada por uma série de sintomas externos: o sintoma típico é uma linha branca de 1-2mm de largura que corre em paralelo com a nervura central e os vasos da folha; com o progresso da doença, necrose pode ocorrer nas folhas do ápice para a base da planta. Assim, brotações laterais podem ser bem ativas nesta fase. Em variedades suscetíveis a consequente morte da planta se torna frequente (Sandhu et al, 2009).

A infecção aguda só ocorre em variedades suscetíveis, intolerantes ou com resistência intermediária, em condições ambientais extremamente favoráveis ao patógeno. Quando ocorre a morte da gema apical, uma excessiva brotação lateral nos colmos adultos pode ser observada, diminuindo o tamanho dos mesmos, provocando murcha e possível morte das plantas afetadas (Casagrande et al., 1997).

2.3.6 Disseminação

A escaldadura é uma doença sistêmica que pode ser imperceptível (latente) por longos períodos de tempo, e toletes que servirão como mudas para plantio são uma das principais causas de disseminação da doença. Podões de corte, incluindo aqueles em máquinas, são importantes agentes de disseminação. O patógeno pode sobreviver em restolho, mas não parece sobreviver por longos períodos de tempo em solo ou palhada, hospedeiros alternativos podem oferecer outro meio de sobrevivência do patógeno. *X. albilineans* infecta naturalmente diversas gramíneas silvestres, tais como capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) (Sandhu et al, 2009).

Além da transmissão por facas e toletes de mudas, disseminação aérea do patógeno foi relatada na Flórida, Guadalupe (Antilhas) e Ilhas Maurício. Alguns pesquisadores relataram que o surto de Escaldadura das folhas que ocorreu na Flórida no final de 1980 foi causado por nova estirpe do patógeno que sobrevive melhor em folhas de cana ou tem maior propensão para a transmissão aérea (Sandhu et al., 2009).

No entanto, a contaminação de toletes é a maneira mais eficiente de disseminação da doença a longas distâncias. Implementos agrícolas, veículos de transporte, trabalhadores e animais podem disseminar o patógeno de um campo para o outro dentro de uma mesma propriedade. Portanto, a colheita mecânica pode ser muito importante como agente disseminador da doença. Além disso, o trânsito de colmos infectados pelos carreadores pode ser responsável pela infecção de outras plantas através do contato entre elas (Gatti, 2008).

2.3.7 Controle

O melhor método de controle de escaldadura é a prevenção da doença, pelo uso de variedades resistentes ou tolerantes. Entretanto, pelo fato de que a escaldadura das folhas ser uma doença em que os sintomas não são expressos, os produtores devem estar alertas para a infecção mesmo em variedades classificadas como resistentes (Rott et al., 2000). O uso de variedades tolerantes requer alguns cuidados, como: evitar plantio de mudas provenientes de campos com a doença; preparar áreas de viveiros para eliminar bactérias do solo e de restos de cultura e desinfestar equipamentos e ferramentas utilizadas no manejo da cultura. Não é conhecido até o momento qualquer produto

químico ou biológico que controle satisfatoriamente a escaldadura das folhas (Tokeshi & Rago, 2005).

Pode-se realizar o tratamento térmico dos toletes-muda, com o mergulho em água quente por determinado tempo para tentar eliminar o agente patogénico. Na Austrália, é utilizado o tratamento de 24 horas mergulhados em água a temperatura ambiente, seguido por um período de três horas à 50 °C. Usando semente de cana livre de doença, oriundas de cultura de tecidos também pode-se controlar a doença. Para evitar a disseminação mecânica do patógeno, todas as facas de cana de corte, incluindo aquelas em colheitadeiras mecânicas, devem ser desinfestadas quando proveniente de áreas suspeitas (Rott et al., 2000).

O plantio de toletes sabidamente sadios é fundamental, como também a realização do “roguing”, para eliminar plantas doentes, tanto em viveiros como em condições de campo, assim como a desinfestação frequente em facões de corte são também práticas recomendáveis, a fim de evitar a disseminação da doença e diminuição do potencial de inóculo (Gatti, 2008).

2.3.8 Detecção e diagnose

A diagnose da escaldadura das folhas há muito tempo é estudada e debatida, uma vez que o diagnóstico visual dos sintomas não é sempre possível, devido à latência que é relativamente comum quando a população de *X. albilineans* ainda é pequena na planta (Birch, 2001). O uso de meios de cultura seletivo consiste em método de diagnose, bastante eficiente, porém é lento, requerendo, no mínimo, oito dias para a formação de colônias características do patógeno (Persley, 1972). O uso de plantas-teste também é um método de diagnose muito utilizado, mas também possui como desvantagem o tempo longo para a diagnose, pela necessidade de espera do aparecimento dos sintomas para confirmação da doença. Persley (1972) preconiza o milho doce como planta-teste para se detectar *X. albilineans* e demonstrar sua patogenicidade. Neste caso não haveria o risco da planta estar previamente infectada, pois não ocorre a transmissão por semente de milho.

Métodos sorológicos, como imunofluorescência, ELISA, “Dot blot” e “Tissue blot” utilizando-se anticorpos policlonais têm se mostrado eficientes ferramentas na detecção da bactéria, constatando inclusive infecções latentes (Comstock & Irey, 1992). Porém, Ricaud et al. (1977) demonstraram que a reação sorológica não

consegue detectar uma infecção latente com baixa população, perdendo em precisão para inoculação do caldo em plantas-testes. Utilizando ELISA e Dot-blot, Wang et al. (1999) detectaram *X. albilineans* em concentrações até um limite de 10^5 UFC mL⁻¹ no extrato vascular, sendo, portanto, também métodos pouco eficientes para detecção de infecções latentes.

Por sua vez, a tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) causou uma verdadeira revolução na biologia tanto na pesquisa quanto nas áreas envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas. Esta técnica é uma das ferramentas mais úteis em biologia molecular, pois permite amplificar “*in vitro*”, milhões de vezes, fragmentos específicos de DNA. Este método de diagnose tem sido utilizado tanto na detecção não só de bactérias como de outros fitopatógenos (Nazar et al., 1991; Robertson et al., 1992; Harris et al., 1993 citado por Batista, 1993).

No caso da escaldadura das folhas, Pan et al. (1998) desenvolveram “primers” específicos para a detecção da bactéria a partir de suspensões celulares obtidas de culturas puras. Uma das combinações de “primers” utilizadas mostrou-se altamente específica, não produzindo amplificações quando outras *Xanthomonas* spp ou outras bactérias patogênicas ou saprófitas da cana-de-açúcar foram utilizadas nas PCRs. Segundo Coote (1990), a técnica de PCR apresenta muitas vantagens para diagnose porque além de permitir uma rápida e fácil avaliação das amostras, ainda permite uma inspeção visual direta dos produtos amplificados, no entanto, o maior desafio da técnica para a detecção da bactéria diretamente do fluído da cana-de-açúcar é a composição do extrato bruto, com a presença de fenóis, carboidratos e polissacarídeos que podem inibir a PCR, gerando falsos negativos. Assim, a etapa de extração de DNA é fundamental para a purificação do DNA antecedente a PCR.

Com PCR em tempo real (qPCR), existem atualmente três diferentes métodos de fluorescência disponíveis para detectar a produção de produtos de amplificação de PCR (Mackay et al., 2002): Sondas TaqMan, transferência de energia ressonante fluorescente “fluorescent resonance energy transfer” (FRET) sondas, e balizas moleculares “beacons”. Todos estes métodos baseiam-se na hibridação de sequências de sondas de oligonucleótidos marcadas com fluorescência para uma região específica dentro do fragmento amplificado por meio de tradicionais iniciadores de PCR (Schaad & Frederick, 2002). Garces et al. (2014) compararam PCR convencional e PCR em tempo real para detecção e quantificação de *X. albilineans* entre variedades de canas resistentes e suscetíveis e ainda compararam o sistema SyberGreen com o sistema

Taqman e o estudo mostrou que os ensaios de qPCR eram mais sensíveis do que a PCR convencional, sendo altamente sensível e viável para a detecção de *X. albilineans*, quantificando as populações bacterianas em plantas de cana infectadas. Os autores ainda verificaram que o menor custo de SYBR Green PCR torna este método adequado para testes em maior escala e TaqMan PCR pode ser utilizado em situações que exijam a capacidade de detecção mais sensível possível, tais como operações de quarentena e viveiros saudáveis.

2.3.9 Descobertas Recentes

Mensi e colaboradores (2014) descobriram em pesquisas recentes, baseadas em microscopia relacionadas com três regiões citológicas, que *X. albilineans*, bactéria de genoma reduzido, supostamente restrita aos vasos do xilema e floema de plantas hospedeiras, coloniza outras regiões da folha e do colmo da cana-de-açúcar; além dos vasos do xilema e floema, a bactéria também foi encontrada no esclerênquima, epiderme e várias células do parênquima. Eles observaram também que após a invasão dos vasos do xilema a bactéria é capaz de multiplicar em áreas intercelulares, penetrar nas células do parênquima e em outros tecidos não vasculares.

2.4 RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS – *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx)

2.4.1 Histórico e etiologia do Raquitismo das soqueiras

O Raquitismo das Soqueiras (RDS) foi descrito pela primeira vez na Austrália em 1944, mas o agente causal, a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), foi descoberta só no ano de 1980 (Davis *et al.*, 1980). Em 1989 já havia sido relatada em 61 países. No Brasil, ao ser descrita, já estava disseminada por todas as regiões canavieiras (Gatti, 2008).

Acreditava-se inicialmente que o agente causal do RDS, era um vírus, este fato ocorreu devido à dificuldade de isolamento do agente causal em meio de cultura e também porque a doença era facilmente disseminada mecanicamente por meio de instrumentos de corte (Matsuoka, 1972). Os pesquisadores conseguiram detectar a

presença de bactérias nos vasos do xilema de plantas infectadas somente no ano de 1973 (Gillaspie Jr. et al., 1973).

Entretanto, a bactéria foi identificada onze anos depois, em 1984, pelo pesquisador americano Dr. Michael J. Davis, que conseguiu isolá-la em cultura axênica e confirmar sua patogenicidade (Davis et al., 1984). A bactéria foi classificada como *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* e, reclassificada como *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Evtushenko et al., 2000). A bactéria *Lxx* é restrita ao xilema, mede 0,25-0,5 x 1-4 µm, é corineforme, reta ou ligeiramente curva, embora alguns talos sejam entumescidos no meio ou em uma das extremidades. É aeróbia, imóvel e gram-positiva, apresentando colônias circulares com margens inteiras, convexas e não-pigmentadas. É uma bactéria extremamente fastidiosa em seus requerimentos nutricionais e o seu isolamento é difícil mesmo em meio seletivo específico (Tokeshi & Rago, 2005), dificultando ainda mais a detecção.

O contato de *Lxx* com a cana-de-açúcar parece ter sido recente, uma vez que a bactéria não foi encontrada no centro de diversidade genética de *Saccharum officinarum*, em Papua, Nova Guiné, e só recentemente, foi identificada em plantações comerciais deste país (Margarey et al., 2002). A hipótese de contato recente é corroborada pelo fato de existir alta uniformidade genética entre isolados coletados em cana cultivada (Young et al., 2006). Além disso, *Lxx* apresenta maior crescimento em clones de *S. spontaneum* em comparação a *S. officinarum* (Roach & Jackson, 1992), o que levanta a hipótese de que *Lxx* tenha sido introduzida nas cultivares modernas após o cruzamento dessas espécies, sendo *S. spontaneum* o hospedeiro natural da bactéria (Brumbley et al., 2006). Diante do exposto, *Lxx* pode ser considerada um endófito obrigatório da cana-de-açúcar (Monteiro-Vitorello et al., 2004; Brumbley et al., 2006). De fato, a existência de uma bactéria semelhante a *Lxx* foi relatada em diversas espécies de gramíneas encontradas em áreas próximas a regiões de cultivo de cana-de-açúcar, porém os resultados não permitiram concluir, com certeza, tratar-se de *Lxx* (Mills et al., 2001).

O seu genoma possui elevado conteúdo de bases GC (67,7%) e de pseudogenes, o que sugere um processo de decaimento genético (Monteiro-Vitorello et al., 2004). Por outro lado, o número de genes de patogenicidade é baixo comparado a outras bactérias fitopatogênicas (Monteiro-Vitorello et al., 2004). Entre estes estão genes envolvidos na síntese de pectinase, celulase e lisozima. O sequenciamento do genoma de *Lxx* trouxe ainda informações relevantes sobre a presença de um *operon* carotenóide (genes *lctB*, *crtYe*, *crtB*, *crtl* e *crtE*) e uma enzima desaturase (*desA*) que

poderiam estar envolvidos na síntese de um análogo ao fitormônio ácido abscísico (ABA). Este é reconhecidamente um inibidor do crescimento em plantas e poderia ser o responsável pelo principal sintoma da doença, o raquitismo (Monteiro-Vitorello et al., 2004). Já foi demonstrado que extratos de sobrenadantes de culturas líquidas de *Lxx*, cultivadas sob estresse osmótico, inibem a germinação das sementes e o alongamento das radículas em alface, sugerindo que a bactéria é capaz de secretar um produto com ação similar ao ABA. Entretanto ainda não se conhece a composição desse extrato (Castro, 2012).

2.4.2 Importância econômica do Raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar

O RSD é uma das principais doenças da cana-de-açúcar (Brumbley et al., 2006) e pode causar perdas econômicas em importantes centros produtores como Austrália e Estados Unidos onde perdas superiores a 30% já foram relatadas (Young & Brumbley, 2004; Grisham et al., 2009). Estas perdas podem aumentar após sucessivos cortes da cultura. Grisham (1991) relata perdas na produtividade de 14% e 27%, em média, respectivamente para o primeiro e o terceiro corte das plantas.

No Brasil, um estudo conduzido por Gagliardi & Camargo (2009) com dez variedades, entre as quais se encontravam seis das dez variedades mais cultivadas no Estado de São Paulo e que ainda se classificam como tal segundo o censo varietal 2012 (RIDESA, 2012), indicou perdas de até 26% no peso médio das parcelas inoculadas com *Lxx*. Porém, perdas superiores a 50% já foram relatadas em genótipos altamente suscetíveis (Davis & Bailey, 2000). Em experimento em Macaé-RJ, onde seis variedades de cana-de-açúcar (CB 46-364, CB 45-3, CB 49-260, CO 421, CP 51-22 e NA 56-79) foram tratadas termicamente e comparadas com mudas inoculadas com *Lxx*, observaram-se reduções significativas de produtividade variando de 4 a 14 t ha⁻¹ (Matsuoka, 1972).

Considerada uma das principais doenças da cana-de-açúcar, o RSD leva a redução na produtividade da cultura, característica que se agrava após sucessivos cortes, com conseqüente redução da vida útil dos canaviais (Grisham *et al.*, 1991). Perdas anuais de US\$11 e US\$36 milhões, respectivamente, já foram relatadas na Austrália e Flórida (EUA) (Fegan et al., 1998; Dean & Davis, 1990). Estima-se que somente no estado de São Paulo, as perdas decorrentes do RSD superaram dois

bilhões de dólares, a partir da década de 80 (Tokeshi & Rago, 2005). Urashima e Marchetti (2013) relatam que a porcentagem de cultivares infectadas por *Lxx* no estado em 2010 foi de aproximadamente 70%. Resultados semelhantes foram obtidos por Ponte *et al.* (2010) em áreas de multiplicação de cana-de-açúcar no Espírito Santo, oeste de Minas Gerais e sul da Bahia. É importante salientar que estas áreas estão sujeitas a condições prolongadas de déficit hídrico, o que pode agravar as perdas ocasionadas pelo RSD (Brumbley *et al.*, 2006).

A intensidade dos danos parece estar relacionada às condições ambientais, já que a produtividade pode ser reduzida em 15-30% sob boas condições de cultivo e disponibilidade de água comparado a 20-40% sob déficit hídrico (Bailey *et al.*, 1999; Ngaruia *et al.*, 2005). Além disto, as perdas estão diretamente relacionadas ao título bacteriano (Davis *et al.*, 1998; Zekarias *et al.*, 2012), ou seja, as maiores perdas em produtividade foram identificadas em plantações com alta concentração do patógeno. Harrison e Davis (1988) correlacionaram a resistência dos cultivares de cana-de-açúcar ao RSD a menor densidade de *Lxx* na seiva xilemática.

2.4.3 Sintomatologia

O raquitismo se caracteriza por ser uma doença de difícil diagnose à campo, já que seus sintomas externos, que compreendem encurtamento dos entrenós e diminuição no porte da planta, podem ser causados por diversos outros fatores de estresse. Em casos extremos ocorrem murcha e necrose nas bordas das folhas em genótipos suscetíveis (Davis *et al.*, 1980). O efeito deletério da doença pode ser reflexo tanto do efeito de uma substância produzida pela bactéria (Kao & Damann, 1980; Monteiro-Vitorello *et al.*, 2004) como pelo entupimento dos vasos do xilema em decorrência da deposição de gomas ou tiloses pelo hospedeiro (Teakle *et al.*, 1975). Internamente, pode-se verificar a presença de pontuações ou vírgulas avermelhadas na região inferior do nó especialmente em colmos basais e também uma coloração rosada próximo ao meristema apical em plantas jovens (Pan *et al.*, 1998; Iglesia, 2003).

A intensidade dos sintomas e as perdas são variáveis, ambas dependem da cultivar, da idade da touceira e das condições climáticas, especialmente a ocorrência de déficit hídrico. Além destes fatores, outros aspectos podem estar relacionados como a intensidade de estresse causados por herbicidas; ocorrência de outras doenças

simultaneamente; tratos culturais inapropriados, levando a competição com plantas daninhas, excesso ou falta de nutrientes e compactação do solo (Tokeshi & Rago, 2005).

2.4.4 Sobrevivência e disseminação

Embora seja encontrada nas folhas e colmos, a distribuição de *Lxx* na planta é irregular, onde maiores títulos bacterianos são encontrados em vasos do xilema (Maramoroch et al., 1973; Kao & Damann, 1980) e dos colmos basais (Bailey, 1977; Harrison & Davis, 1988). Fatores como idade da planta, base genética da variedade (Bailey, 1977; Davis et al., 1988), temperatura (Teakle & Ryan, 1992; Ngaruiya et al., 2005) e estresse hídrico (Comstock, 2002) influenciam seu crescimento *in planta*. Ramos (2012), por exemplo, observou incremento no título de *Lxx* em plantas naturalmente colonizadas pela bactéria após submeter ao estresse hídrico e injúria mecânica às plantas.

A sobrevivência da bactéria no campo se dá com a presença da cana-de-açúcar, e sua transmissão ocorre durante os ciclos da cultura que incluem a renovação do canavial, cana-planta e socas, em que células viáveis que conseguem penetrar nos tecidos do colmo através de ferimentos causados por ferramentas (facões, colheitadeiras, etc) que tiveram contato com cana infectada (Giglioti, 1997). Mecanismos naturais de infecção são desconhecidos, muito embora nenhum estudo sistemático sobre insetos vetores ou hospedeiros alternativos tenha sido realizado (Monteiro-Vitorello *et al.*, 2004).

A dificuldade de identificação da doença (seja pela ausência de sintomas aparentes ou pela semelhança com outros males) somada à natureza do patógeno (habitante do xilema) favorece em muito a disseminação no campo por meio da utilização de instrumentos contaminados durante os tratos culturais e do plantio de órgãos propagativos infectados (Comstock et al., 1996). Dessa forma, a transmissão ocorre exclusivamente pelo homem através do uso de colheitadeiras, plantadoras, facões e outros materiais de corte que colocam plantas saudáveis em contato com fluido vascular de plantas doentes. Por ser facilmente transmitida por meios dos equipamentos, a desinfestação é um importante método para prevenção da doença. Todos os equipamentos usados para corte da cana devem ser desinfestados com produtos químicos ou pelo calor (Tokeshi & Rago, 2005).

2.4.5 Controle

O controle desta doença tem sido realizado por medidas baseadas em métodos de exclusão, principalmente no uso de material sadio para plantio oriundo do tratamento térmico dos toletes (Benda & Ricaud, 1978; Damann & Benda, 1983) ou do cultivo de meristemas *in vitro* (Hoy et al., 2003). No tratamento térmico, trabalha-se o binômio tempo-temperatura. Os toletes-sementes são submetidos à imersão em água quente por um tempo determinado na tentativa de destruir proteínas e enzimas da bactéria. Duas combinações são empregadas no Brasil: 52 °C por 30 minutos (COPERSUCAR, 1989) ou 50 °C por 2 horas (Damann & Benda, 1983). A primeira combinação é a preferencialmente adotada pelas unidades produtoras por demorar menos e permitir o tratamento de maior número de toletes por dia, no entanto, vários trabalhos vêm relatando escape em tais tratamentos.

A cultura de tecidos é bastante promissora no controle do RSD (Sandhu et al., 2009), entretanto, assim como o tratamento térmico, não é totalmente eficaz, podendo apresentar escapes que atuam como fonte de inóculo da bactéria (Fernandes Jr. et al., 2010). Grisham et al. (2004) e Urashima & Grachet (2012) já detectaram células bacterianas em amostras tratadas a 50°C por duas horas, reforçando assim a necessidade de experimentos adicionais para tentar eliminar ou reduzir drasticamente a bactéria nos toletes tratados que servirão de mudas para renovação de canavial ou expansão de novas áreas.

É importante ressaltar também que podões devem ser desinfestados, facões de colhedora e/ou todo material de corte, principalmente, quando usados em campos de propagação para área de expansão do canavial. A desinfestação geralmente é realizada por produtos a base de amônia quaternária. Outra alternativa para o controle do RSD é o uso de variedades resistentes. Embora até pouco tempo a produção de variedades resistentes tenha ficado em segundo plano, atualmente a maioria dos programas de melhoramento genético tem se preocupado em incluir atividades de rotina para a identificação de genótipos resistentes ou tolerantes ao raquitismo com a capacidade de limitar a frequência de infecções, a intensidade de colonização dos tecidos e as perdas ocasionadas pelo ataque da bactéria (Harrison & Davis, 1988). No entanto, a maior dificuldade consiste na seleção de variedades resistentes em função da dificuldade no diagnóstico rápido e eficiente da doença (Gagliardi et al., 2006).

O biocontrole por meio do uso de bactérias endofíticas é também uma promissora linha de pesquisa uma vez que consiste na aplicação de microrganismos que podem vir a competir com o patógeno pelos mesmos sítios de colonização ou induzir a resistência através da produção de bacteriocinas pelo hospedeiro (Olivares et al., 2000). Assim, variedades pouco resistentes ou tolerantes, mas que comportam boas características agrônomicas poderão ser melhor aproveitadas.

2.4.6 Detecção e diagnose

Desde que a bactéria *Lxx* foi reconhecida como agente causal da doença e foi isolada em meio de cultura, alguns métodos diagnósticos foram desenvolvidos para esta finalidade. Entre as principais técnicas empregadas estão a microscopia de luz, o teste ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), EB-EIA (*evaporative-binding enzyme-linked immunoassay*), TB-EIA (*tissue blot enzyme immunoassay*) e *dot blot enzyme immunoassay* (Comstock & Lentini., 2002; Iglesias et al., 2003; Carneiro Jr et al., 2004). Contudo, estas técnicas são demoradas e podem não detectar células bacterianas em baixas concentrações (Taylor et al., 2003).

Métodos baseados na técnica de PCR (*polimerase chain reaction*) são mais sensíveis e específicos para diagnóstico do que imunoenaios (Iglesias et al., 2003). Taylor *et al.* (2003) utilizaram a técnica de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) para identificar *Lxx* em pequenas concentrações no fluido fibrovascular da cana-de-açúcar. Grisham et al. (2007) e Carvalho et al. (2016) desenvolveram iniciadores específicos para a detecção precoce de *Lxx* via PCR em tempo real a partir de plantas jovens de cana-de-açúcar. Recentemente, foram desenvolvidos trabalhos para identificação de *Lxx* pelo sistema Taqman[®] qPCR (Pelosi et al., 2013), no entanto, tal técnica é ainda inviável para ser usada em análises de rotina e em larga escala, por ser bastante onerosa e exigir equipamentos bastantes sofisticados, diferentemente do que é observado na técnica de *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) (Liu et al., 2013, Ghai et al., 2014), na qual é uma técnica de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos. Em contraste com a reação em cadeia da polimerase (PCR) em que a reação é uma série alternada de ciclos de temperatura, a amplificação isotérmica é realizada a uma temperatura constante em torno de 60-65°C, e não necessita de um termociclador. Na reação de LAMP, a sequência alvo é amplificada utilizando dois ou três conjuntos de iniciadores e uma polimerase para

amplificação de grandes fragmentos. Tipicamente, quatro iniciadores diferentes são utilizados para identificar seis distintas regiões no gene-alvo, o que aumenta muito com a especificidade. Devido à natureza específica da ação destes iniciadores, a quantidade de DNA produzida em LAMP é consideravelmente mais elevada do que a amplificação baseada em PCR. A detecção de produto de amplificação pode ser determinada por meio de fotometria de turvação causada por um aumento da quantidade de pirofosfato de magnésio precipitado numa solução, como um subproduto da amplificação (Mori et al. 2001; Nagamine et al. 2002; Notomi et al. 2000).

3 REFERENCIAS

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

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

ARRUDA, S. C. **A escaldadura das folhas, doença da cana-de-açúcar nova no Brasil.** Arq. Inst. Biológico. São Paulo. 15 (12): 141-199, 1944.

BAYLEI, R.A. The systemic distribution and relative occurrence of bacteria in sugarcane varieties affected by ratoon stunting disease. **Proceedings of the South African Technologists Association**, Mont Edgecombe, v. 6, n. 9, p. 466-467, 1977.

BAILEY, R.A.; MCFARLANE, S.A. The incidence and effect of RSD of sugar cane in Southern and Central Africa. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, v. 73, p. 118-122, 1999.

BARBOSA, G.V.S.; SOUZA, A.J.R.; ROCHA, A.M.C.; RIBEIRO, C.A.G.; FERREIRA, J.L.C.; SOARES, L.; CRUZ, M.M.; SILVA, W.C.M. **Novas variedades RB de cana-de-açúcar para Alagoas.** Maceió: UFAL; Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar, 2000. 16p. (Boletim Técnico Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar).

BATISTA, M. F. Métodos moleculares para a identificação de patógenos de plantas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 165 - 196, 1993.

BENDA, G.T.A.; RICAUD, C. The use of heat treatment for sugarcane disease control. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, São Paulo, v.16, p. 483-496, 1978.

BIRCH, R.G. Investigation of the role a phytotoxin in the pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* causing a leaf scald disease of sugarcane. M. S. Thesis, University of hawaii, 163pp. BIRCH, R.G. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 2, n. 1, p. 1 – 11, 2001.

BIRCH, R. G.; PATIL, S. S. Correlation between albicidin production and chlorosis induction by *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen.

Physiological and Molecular Plant Pathology, London, v. 30, n. 2, p. 199 - 206, 1985.

BRUMBLEY, S.M.; PETRASOVITS, L.A.; HERMANN, S.R.; YOUNG, A.J.; CROFT, B.J. Recent advances in the molecular biology of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 35, n. 6, p. 681–689, 2006.

CARNEIRO JR, J. B.; SILVEIRA, S. F.; SOUZA FILHO, G. A.; OLIVARES, F. L.; GIGLIOTI, E. A. Especificidade de anti-soro policlonal à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n. 29, p. 614 - 619, 2004.

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**: v. 80: 51-55, 2016.

CASAGRANDE, M. V.; SANGUINO, A.; FERREZINI, E. Evolução, prejuízos e métodos de controle de quatro importantes doenças da cana-de-açúcar. In: COPERSUCAR, C. D. T. (Ed.). **VII SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA**. Piracicaba, 1997. 183 - 190 p.

CASTRO, F.R.O.S.R. **Caracterização do efeito tóxico de extratos de culturas líquidas de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* na germinação de sementes de alface**. 2012. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 307pp, 2004.

CHAMPOISEAU, P.; DAUGROIS, J. H.; GIRARD, J. C.; ROYER, M. AND ROTT, P. C. Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. **Phytopathology** 96: 33-45, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar (safra 2014/2015)**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_08_28_08_52_35_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_2014-15.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2016.

COMSTOCK, J. C.; IREY, M. S. Detection of the sugarcane leaf scald pathogen *Xanthomonas albilineans*, using tissue blot immunoassay, ELISA, and isolation techniques. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n. 10, p. 1033 - 1035, 1992.

COMSTOCK, J. C.; LENTINI, R. S. Sugarcane mosaic virus disease. Agronomy Department, Florida Cooperative Extension Service. **Institute of Food and Agricultural Sciences**. University of Florida. SS.AGR. 209, 2002.

COMSTOCK, J. C.; SHINE, J. M.; DAVIS, M. J.; DEAN, J. L. Relationship between resistance to *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* colonization in sugarcane and spread of ratoon stunting disease in the field. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, n. 6, p.704-708, 1996.

COOTE, J. G. Amplification of nucleic acids by the polymerase chain reaction. **Westminster column**, Houma, p. 57-59, 1990.

COPERSUCAR . Binômio tempo x temperatura no controle do raquitismo da soqueira (RSD) da cana-de-açúcar, pelo processo de termoterapia em gemas isoladas. **Cadernos COPERSUCAR**, Série Melhoramento, 25:1-5, 1989.

DAMANN JR., K. E.; BENDA, G. T. A. Evaluation of commercial heat treatment methods for control of ratoon stunting disease of sugarcane. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 9, p. 966- 967, 1983.

DAUGROIS, J. H.; DUMONT, V.; CHAMPOISEAU, P.; COSTET, L.; BOISNENOC, R. & ROTT, P. Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by two strains of *Xanthomonas albilineans*. **Eur J Plant Pathol** 109, 445–458, 2003.

DAVIS, M. J.; DEAN, J. L.; MILLER, J. D.; SHINE JR, J. M. A method to screen for resistance to ratoon stunting disease of sugarcane. **Sugar Cane**, Inglaterra, v. 6, p. 9 - 16, 1994.

DAVIS, M. J.; G., G. J. A.; HARRIS, R. W.; LAWSON, R. H. Ratoon stunting disease of sugarcane: isolation of the causal bacterium. . **Science**, Washington, v. 210, n. 4476, p. 1365 - 1367, 1980.

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

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

DAVIS, M. J.; ROTT, P.; ASTUA-MONGE, G. Nested, multiplex PCR for detection of both *Clavibacter xyli* and *Xanthomonas albilineans* in sugarcane. **ICPP Paper**, Gainesville n. 3.3.4, 1998.

DAVIS, M. J.; BAILEY, R. A. "Ratoon stunting." In **A Guide to Sugarcane Diseases**, edited BY PHILIPPE ROTT, ROGER A. BAILEY, JACK C. COMSTOCK, BARRY J. CROFT, AND A. SALEM SAUMTALLY, 49–54. Montpellier: CIRAD/ISSCT, La Librairie du Cirad. 2000.

DEAN, M. J.; DAVIS, M. J. Losses caused by by ratoon stunting disease of sugarcane in Florida. **American Society of Sugar Cane Technology**, Baton Rouge, v. 10, p. 66-72, 1990.

- D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetics and Genome Research**, Basel, v. 109, p. 27-33, 2005.
- DOWSON, W. J. On the genetic names *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Bacterium* for certain bacterial plant pathogens. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, London, v. 26, n. 1, p. 1 - 14, 1943.
- EVTUSHENKO, L. I.; DOROFEEVA, L.V.; SUBBOTIN, S. A.; COLE, J. R.; TIEDIE, J. M. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis *et al.* 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis *et al.* 1984) gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, Reading, v. 50, p. 371-380, 2000.
- 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**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 495-504, 1998.
- FERNANDES JÚNIOR, 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**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 60-64, 2010.
- GAGLIARDI, P. R.; CAMARGO, L. E. A. Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1222-1226, 2009.
- GAGLIARDI, P. R.; PACE, F. A.; FERREIRA, A. J. Comparação de três métodos de diagnose para a detecção da *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente casual do raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia. 2006, Salvador. **Fitopatologia Brasileira**.p 337.
- GAO, S. J.; PAN, Y. B.; CHEN, R. K.; CHEN, P. H.; ZHANG, H.; XU, L. P. Quick detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by PCR and nucleotide sequence analysis of PCR amplicons from Chinese *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* isolates. **Sugar Tech**, Gorakhpur, v. 10, p. 334 - 340, 2008.
- GARCES, F. F., GUTIERREZ, A.; HOY, J. Detection and quantification of *Xanthomonas albilineans* by qPCR and potential characterization of sugarcane resistance to leaf scald. **Plant Dis.** Iowa v. 98:121-126, 2014.
- GATTI, I. M. Doenças causadas por bactéria. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas, 2008. 450 p.
- GHAJ, M., SINGH, V., MARTIN, L. A., MCFARLANE, S. A., ANTWERPEN, T., & RUTHERFORD, R. S. A rapid and visual loop-mediated isothermal amplification assay to detect *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* targeting a transposase gene. **Letters in applied microbiology**, 59(6), 648-657, 2014.

- GIGLIOTI, E. A. **Método conciliado para avaliar os efeitos da colonização de colmos de cana-de-açúcar por *Clavibacter xyli* subsp. *xyli***. 1997. 134 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.
- GILLASPIE JR., A. G.; DAVIS, R. E.; WORLEY, J. F. Diagnosis of ratoon stunting disease based on the presence of a specific microorganism. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 57, n. 12, p. 987 - 990, 1973.
- GRISHAM, M. P. Effect of ratoon stunting disease on yield sugarcane grown in multiple three years plantings. **Phytopathology**, Ithaca, v. 81, n. 3, p. 337-340, 1991.
- GRISHAM, M. P. Sugarcane Pathology: bacterial and nematodes diseases. In: RAO, G. P.; SAUMTALLY, A. S.; ROTT, P. (Ed.). **Ratoon stunting disease**. Enfield: Science Publishers, 2004. 77 - 96 p.
- GRISHAM, M. P.; PAN, Y. B.; RICHARD JR, E. P. Early Detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 430-434, 2007.
- GRISHAM, M. P.; JOHNSON, R. M.; VIATOR, R.V. Effect of ratoon stunting disease on yield of recently released sugarcane cultivars in Louisiana. **Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists**, Baton Rouge, v. 29, p. 119-127, 2009.
- GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, n. 5, p. 122-127, 2001.
- HASHIMI, S. M.; WALL, M. K. The phytotoxin albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 181-7, 2007.
- HARRISON, N. A.; DAVIS, M. J. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, Saint Paul, n. 78, p. 722-727, 1988.
- HOY, J. W.; BISCHOFF, K. P.; MILLIGAN, S. B.; GRAVOIS, K. A. Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. **Euphytica**, Wageningen, n. 129, p. 237-240, 2003.
- IGLESIA, A. Review of ratoon stunting disease of sugarcane (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*). **Revista de Protección Vegetal**, Havana, v. 18, n. 1, p. 1-6, 2003.
- IRVINE, J. E. Saccharim species as horticultural classes. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 98, p. 186-194, 1999.
- JAUFEERALLY – FAKIM, Y.; AUTREY, J. C.; DOOKUN, A.; TOTH, I. K.; DANIELS, M. Genetic identification of the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, in Mauritius using a new set of specific primers. **Sugar Cane International**, Colney, UK, p. 7 – 13, 2000.

- KAO, J.; DAMANN, K. E. In situ localization and morphology of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. **Journal of Canadian Botany**, Ottawa, v. 3, n. 3, p. 310-315, 1980.
- KLETT, P.; ROTT, P. Inoculum sources for the spread of leaf scald disease of sugarcane caused by *Xanthomonas albilineans* in Guadeloupe. **Journal of Phytopathology**. 142:283291, 1994.
- LIU, J.; XU, L.; GUO, J.; CHEN, R.; GRISHAM, M. P.; QUE, Y. Development of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, p. 1-8, 2013.
- MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Survey and summary: Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Res.**, Oxon, v.30, n.6, p.1292-1305, 2002.
- MARTIN, J. P.; WISMER, C. A. Red strip. In: MARTIN, J. P.; ABBOTT, E. V.; HUGRES, C. G. (Ed.). **Sugarcane diseases of the world**. New York: Elsevier, 1961. 109 - 126 p.
- MAGAREY, R. C.; SUMA, S.; IRAWAN, K. L. S.; ALLSOPP, P. G. Sik na binatang bilong suka - 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**, Brisbane, v. 24, p. 219–227, 2002.
- MARAMOROSCH, K.; PLAVISIC-BANJAC, B.; BIRD, J.; LIU, L. J. Electron microscopy of the ratoon stunted sugar cane: microorganisms in xylem. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 77, p. 270-273, 1973.
- MARGUERETTAZ, M.; PIERETTI, I.; GAYRAL, P.; PUIG, J.; BRIN, C., COCIANCICH, S. Genomic and evolutionary features of the SPI-1 type III secretion system that is present in *Xanthomonas albilineans* but is not essential for xylem colonization and symptom development of sugarcane leaf scald. **Mol. Plant Microbe Interact**. 24, 246–259, 2011.
- MARTIN, J. P.; ROBINSON, P. E. Leaf Scald. In: MARTIN, J. P.; ABBOTT, E.V.; HUGHES, C.G. **Sugar cane diseases of the world**. New York: John Wiley. V.1, cap.111, p.79-108, 1961
- MATSUOKA, S. **Raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar: diagnose da moléstia e estudos sobre o agente causal**.1972. 77p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.
- MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F., CALHEIROS, G. G. Hibridação em cana-de-açúcar. Borém, A. (ed). **Hibridação artificial de plantas**. UFV. p 221-254, 1999.
- MENSI, I.; VERNEREY, M. S.; GARGANI, D.; NICOLE, M.; ROTT, P. Breaking Dogmas: the plant vascular pathogen *Xanthomonas albilineans* is able to invade non-vascular tissues despite its reduced genome. **Open Biology**: v.4:130116, 2014.
- MILLS, L.; LEAMAN, T. M.; TAGHAVI, S. M.; SHACKEL, L.; DOMINIAK, B.C., TAYLOR, P.W.J.; FEGAN, M.; TEAKLE, D. S. *Leifsonia xyli*-like bacteria are

endophytes of grasses in eastern Australia. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 30, n. 2, p. 145- 151, 2001.

MIRANDA, J.R. **History of sugarcane**, 2008. 167 p.

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.; WOOD, D.; DE OLIVEIRA, M. C.; MIYAKI, C.; TAKITA, M. A.; DA SILVA, A. C.; FURLAN, L. R.; CARRARO, D. M.; CAMAROTTE, G.; ALMEIDA, N. F. JR, CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; EL-DORRY, H. A.; FERRO, M. I.; GAGLIARDI, P. R.; GIGLIOTI, E.; GOLDMAN, M. H.; GOLDMAN, G. H.; KIMURA, E. T.; FERRO, E. S.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; MAURO, S. M.; MACHADO, M. A.; MARINO, C. L.; MENCK, C. F.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, G. G.; SIQUEIRA, W.; DE SOUZA, A. A.; TSAI, S. M.; ZANCA, A. S.; SIMPSON, A. J.; BRUMBLEY, S. M.; SETÚBAL, J. C. The genome sequence of the Gram positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 8, p. 827-836, 2004.

MORI, Y.; NAGAMINE, K.; TOMITA, N.; NOTOMI, T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. **Bioch. Biophys. Res. Comm.** 289: 150–154, 2001.

NAGAMINE, K.; HASE, T.; NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. **Mol. Cellul. Probes** 16: 223-229, 2002.

NAGARUIYA, P. N.; SHIPTON, W. A.; COVENTRY, R. Ratoon stunting disease of sugarcane as influenced by environmental stressors. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Brisbane, v. 27, p. 324-333, 2005.

NAUSHAD, H. S.; GUPTA, R. S. Phylogenomics and molecular signatures for species from the plant pathogen-containing order Xanthomonadales. **PLoS ONE**: San Francisco, v. 8 n.2:e55216, 2013.

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Res.** 28:e63, 2000.

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

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

PAN, Y. B.; GRISHAM, M. P.; BURNER, D. M.; DAMANN JR, K. E.; WEI, Q. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 3, p. 285-290, 1998.

PAN, Y. B.; GRISHAM, M. P.; BURNER, D. M. A polymerase chain reaction protocol for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agente of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 2, p. 189 - 194, 1999.

PELOSI, C. S.; LOURENÇO, M. V.; SILVA, M.; SANTOS, A. Z.; FRANÇA, S. C.; MARINS, M. Development of a Taqman real-time PCR assay for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 4, p. 343-345, 2013.

PERSLEY, G. L. Isolation methods for the causal agent of leaf scald disease. **Sugarcane Pathologists' Newsletter.**, Réduit, v. 8, n. 24, p. 32 - 36, 1972.

PIERETTI, I.; ROYER, M.; BARBE, V.; CARRERE, S.; KOEBNIK, R.; COULOUX, A. Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. **BMC Genom.** v. 13:658, 2012.

PONTE, E. C.; SILVEIRA, S. F.; CARNEIRO JR., J. B.; LIMA, R. M. P. Incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em áreas de multiplicação de cana-de-açúcar no Espírito Santo, sul da Bahia e oeste de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, p. 313-321, 2010.

RAMOS, A. T. M. **Avaliação da cinética populacional de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em resposta a fatores do hospedeiro e do ambiente.** 2012. 86 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTICO. **Censo varietal 2012.** Disponível em: <pmgca.dbv.cca.ufscar.br/dow/RevistaCensoVarietal202012.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2016.

RICAUD, C.; SULLIVAN, S.; FELIX, S.; FERRE, P. Comparison of serological and inoculation methods for detecting latent infection of leaf scald. In: Congress of the International Society of SugarCane Technologists. 1977. **Resumos.** São Paulo.p 439 - 448.

RICAUD, C.; RYAN, C. C. Leaf scald. in: **Diseases of Sugarcane. Major Diseases.** C. RICAUD, B. T. EGAN, A. G. GILLASPIE JR. AND C. G. HUGHES, eds.Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 39-53p, 1989.

ROACH, B. T.; JACKSON, P. A. Screening sugar cane clones for resistance to ratoon stunting disease. **Sugar Cane**, Saint Paul, v. 2, n. 6, p. 2-12, 1992.

RODRIGUEZ-R, L.; GRAJALES, A.; ARRIETA-ORTIZ, M.; SALAZAR, C.; RESTREPO, S.; BERNAL, A. Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. **BMC Microbiol.**12:43, 2012.

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

- ROTT, P.; ARNAUD, M.; BAUDIN, P. Serological and lysotypical variability of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, Causal agent of sugarcane leaf scald disease. **J. Phytopathol.** 116, 201–211, 1986.
- ROTT, P.; DAVIS, M. J.; BAUDIN, P. Serological variability in *Xanthomonas albilineans*, causal agent of leaf scald disease of sugarcane. **Plant Pathol.** v. 43, 344–349, 1994.
- ROTT, P.; MOHAMED, I. S.; KLETT, P.; SOUPA, D.; DE SAINT-ALBIN, A.; FELDMANN, P.; LETOURMY, P. Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. **Phytopathology** v. 87, 1202–1213, 1997.
- ROTT, P.; DAVIS, M. J. “Leaf Scald” In: “**A guide to sugarcane diseases.**” P. ROTT, R.A. BAILEY, J.C. COMSTOCK, B.J. CROFT, A.S. Saumtally (eds.). CIRAD-ISSCT. ISBN 2-87614386-0. p. 38-44, 2000.
- ROYER, M.; KOEBNIK, R.; MARGUERETTAZ, M.; BARBE, V.; ROBIN, G.; BRIN, C. Genome mining reveals the genus *Xanthomonas* to be a promising reservoir for new bio active non-ribosomally synthesized peptides. **BMC Genom.**14:658, 2013.
- SANDHU, S. K.; GOSAL, S. S.; THIND, K. S.; UPPAL, S. K.; SHARMA, B.; MEETA, M.; SINGH, K.; CHEEMA, G. S. Field performance of micropropagated plants and potential of seed cane for stalk yield and quality in sugarcane. **Sugar Tech**, New York, v. 11, n. 1, p. 34- 38, 2009.
- SAUMTALLY, S.; MEDAN, H.; AUTREY, L. In Evolution of Aerial Infection of Leaf Scald Caused by *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson in Sugarcane. In Proceedings of the XXII Congress; COCK, J., BREKELBAUM, T., Eds.; International Society of Sugarcane Technologists: Cartagena, Colombia; **Abstract...**pp. 493–497; 1995.
- SCHAAD, N. W.; STALL, R. E. **Plant Pathogenic Bacteria. LABORATORY GUIDE FOR IDENTIFICATION OF.** St Paul: APS PRESS., 1988.
- SCHAAD, N. W.; FREDERICK, R. D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 24(3), 250-258, 2002.
- SIMPSON, A.; REINACH, F.; ARRUDA, P. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature** 406, 151–157, 2000.
- SOOPRAMANIEN, C. G. Sugarcane Morphology, Anatomy and Physiology. In: ROTT, P. C.; BAILEY, R. A.; COMOSTOCK, J. C.; CROFT, B. J. and SAUMATALLY S. A. (Ed.) **A Guide to sugarcane disease.** Cirad, Montpellier, França. Cap. 1, p. 13-19. 2000.
- STUDHOLME, D. J., WASUKIRA, A., PASZKIEWICZ, K., ARITUA, V., THWAITES, R., SMITH, J. Draft genome sequences of *Xanthomonas sacchari* and two banana associated xanthomonads reveal insights into the *Xanthomonas* Group 1 Clade. **Genes:** v.2, 1050–1065, 2011.

- STUDHOLME, D. J., WASUKIRA, A., PASZKIEWICZ, K., ARITUA, V., THWAITES, R., SMITH, J. Correction: Studholme *et al.*, Draft genome sequences of *Xanthomonas sacchari* and two banana-associated xanthomonads reveal insights into the *Xanthomonas* Group 1 Clade. *Genes* 2011, v. 2, 1050–1065. **Genes**: v.3, 88–89, 2012.
- TEAKLE, D. S.; RYAN, C. C. The effect of high temperature on the sugar cane ratoon stunting disease bacterium, *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, in vitro and in vivo. **Sugar Cane**, Saint Paul, v. 6, p. 5–6, 1992.
- 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**, London, v. 12, n. 1, p. 83-91, 1975.
- TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da Cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. São Paulo, 2005. 197 - 223 p.
- UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em fev. 2016.
- URASHIMA, A. S.; GRACHET, N. G. Métodos de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e efeito da termoterapia na brotação das gemas de diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 1, p. 57-64, 2012.
- 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**, Berlin, v. 161, n. 7, p. 478-484, 2013.
- WANG, Z. K.; COMSTOCK, J. C.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N. W. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathology**, Oxford, UK, v.48, n.2, p. 245 – 252, 1999.
- YOUNG, A.; BRUMBLEY, S. Ratoon stunting disease of sugarcane: history, management and current research. In: RAO, G.P.; SAUMTALLY, A.S.; ROTT, P. (Ed.). **Sugarcane pathology: bacterial and nematodes diseases**. New York: Enfield Science Publ., 2004. p. 97- 124.
- YOUNG, A. J.; PETRASOVITS, L. A.; CROFT, B. J.; GILLINGS, M.; BRUMBLEY, S.M. Genetic uniformity of international isolates of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 35, n. 5, p. 503– 511, 2006.
- YOUNG, J. M.; PARK, D. C.; SHEARMAN, H. M.; FARGIER, E. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. **Syst.Appl.Microbiol** v..31, 366–377, 2008.
- ZEKARIAS, Y.; YIREFU, F.; BAISSA, T.; TAFESSE, A.; MENGISTU, L. Effect of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* concentration on yields of four sugarcane varieties in the

sugarcane plantations of Ethiopia. **Ethiopian Journal of Science and Technology**, BAHIR DAR, V. 3, N. 2, P. 25-30, 2012.

ZHANG, L.; BIRCH, R. The gene for albicidin detoxification from *Pantoea dispersa* encodes a nesterase and attenuates pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.94, 9984–9989, 1997.

RESUMO

DETECÇÃO DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* EM CANA-DE-AÇÚCAR ADVINDAS DE TOLETES TRATADOS TERMICAMENTE EM ASSOCIAÇÃO COM ANTIBIÓTICO.

O tratamento térmico dos toletes é uma das principais medidas de controle de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em cana-de-açúcar e é atualmente recomendado e utilizado nas unidades produtoras de cana. No Brasil os tratamentos recomendados são: a elevação da temperatura de 52°C por 30 minutos ou 50°C por 2 horas, assim os toletes são imersos na tentativa de destruir as proteínas e as enzimas da bactéria, sem injuriar em demasia as proteínas e enzimas das gemas dos toletes. No entanto, pesquisadores já detectaram células bacterianas em amostras após o tratamento térmico. Portanto, vem ocorrendo o escape ou a bactéria está sobrevivendo a tais tratamentos. Assim o objetivo do trabalho foi realizar o tratamento térmico dos toletes de cana, com diferentes combinações de tempo versus temperatura com ou sem a adição de antibiótico casugamicina à dosagem de 300mL/100L de H₂O com o intuito de tentar reduzir o escape bacteriano dentre os tratamentos padrões: T1= 52°C/30'; T2= 52°C/1hr; T3= 50°C/1hr; T4= 50°C/2hrs; T5= 52°C/30' + antibiótico; T6= 52°C/1hr + antibiótico; T7= 50°C/1hr + antibiótico; T8= 50°C/2hrs + antibiótico; T9= antibiótico e T10= testemunha. A detecção do patógeno dentre os tratamentos testados também foi avaliada, testando protocolos de extração de DNA e diferentes iniciadores para que não ocorressem falsos negativos durante a avaliação do experimento. Utilizando PCR convencional foi possível detectar a presença do DNA bacteriano de *Lxx* somente para o T1= 52°/30 min (tratamento mais utilizado atualmente nas unidades produtoras que realizam o tratamento térmico de toletes) e pela Nested-PCR, o DNA de *Lxx* foi detectado em todos os tratamentos adotados. Assim, nenhum dos tratamentos adotados na termoterapia foi capaz de eliminar *Lxx* dos toletes como também o uso da casugamicina não propiciou a eliminação da bactéria nos tratamentos em que o produto foi adotado.

Palavras-Chave: Tratamento térmico, controle, raquitismo-das-soqueiras, Nested-PCR

¹Orientador: Prof. PhD Marcos Gomes da Cunha. EA – UFG.

Co-orientador: Prof. Dr. Érico de Campos Dianese. EA – UFG.

ABSTRACT

DETECTION OF *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* ON SUGARCANE FROM SETS TREATED WITH THERMOTERAPY IN ASSOCIATION WITH ANTIBIOTIC.

The hot-water treatment is the main recommended treatment and consists of an immersion of sugarcane cuttings in running water at 52 ° C for 30 minutes or 50 ° C for 2 hours, the sets are immersed in an attempt to destroy proteins and enzymes of the bacteria without injuring proteins and enzymes of the buds. However, despite its wide use as a control method for *Lxx*, the heat treatment does not completely eliminate this bacterium. Thus, the objective was to make the heat treatment of billets with the addition of kasugamycin antibiotic dosage 300mL/100L H₂O in order to try to reduce bacterial escape from the standard treatments, as well as in other proposed time and temperature combinations: T1 = 52 ° C / 30'; T2 = 52 ° C / 1hr; T3 = 50 ° C / 1hr; T4 = 50 ° C / 2hrs; T5 = 52 ° C / 30' + antibiotic; T6 = 52 ° C / 1hr + antibiotic; T7 = 50 ° C / 1hr + antibiotic; T8 = 50 ° C / 2hrs + antibiotic; T9 = antibiotic and T10 = control. The detection of the pathogen among the treatments tested were also evaluated by testing DNA extraction protocols and different primers that do not occurred false negatives during the experiment evaluation. From conventional PCR test results we could detect the presence of *Lxx* bacteria only to T1 = 52°/30 min (treatment most widely used in industrial plants that carry out the heat treatments) and the nested PCR, the bacterium was detected in all treatments adopted. Thus, none of the treatments used in the thermotherapy was able to eliminate *Lxx* of cuts, as well as the use of kasugamycin not led to the elimination of bacteria in treatments where the product was adopted.

Key-words: hot-water treatment, Control, Ratoon Stunting Disease, Nested-PCR

¹Adviser: Prof. PhD Marcos Gomes da Cunha. EA – UFG.

Co-adviser: Prof. Dr. Érico de Campos Dianese. EA – UFG.

4.1 INTRODUÇÃO

O Brasil domina a tecnologia de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar. Neste sentido, o país aparece em posição privilegiada no momento em que o mundo busca a sustentabilidade econômica, social e ambiental com novas maneiras de se relacionar com os recursos naturais, portanto, encontrar alternativas para o suprimento das necessidades energéticas da sociedade moderna (Beling, 2006). A demanda por biocombustíveis provoca a expansão da produção da matéria prima. Tal expansão, leva a uma multiplicação inadequada da cana-planta que, por muitas vezes, é colhida em talhões comerciais sem nenhuma inspeção ou tratamento e utilizada em plantios de renovação de canavial ou expansão de novas áreas. Com este tipo de manejo, aumentam-se também os problemas fitossanitários.

O Raquitismo das soqueiras (RSD) causado pela bactéria Gram-positiva e de hábito fastidioso, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) é uma das principais doenças da cana-de-açúcar, pois pode causar perdas por volta de 30% dependendo da variedade (Young & Brumbley, 2004; Grisham et al., 2009) e das condições ambientais (Bailey & Mcfarlane, 1999; Ngaruiya et al., 2005). Variedades com imunidade total são desconhecidas, o que se conhece é variação quanto ao grau de susceptibilidade ou tolerância (Teakle et al., 1975).

Nas variedades suscetíveis, os sintomas à campo mais comuns associados a essa doença são: crescimento irregular e raquitismo das plantas; afinamento e encurtamento dos internódios; sintomas de deficiência hídrica em períodos de veranicos e, conseqüentemente, baixa produtividade. Internamente, os colmos maduros podem apresentar descoloração dos feixes vasculares (Tokeshi & Rago, 2005; Fernandes Jr et al, 2010). No entanto, tais sintomas podem ser confundidos com sintomas de deficiência nutricional, estresse hídrico ou com sintomas de outras doenças da cultura.

O único método eficiente de controle do RSD é o plantio de toletes livres do patógeno. Atualmente o tratamento térmico dos toletes que servirão como mudas para viveiros de futuros plantios é o método mais utilizado nas unidades produtoras. No

tratamento térmico, trabalha-se o binômio tempo-temperatura. Os toletes-ementes são submetidos à imersão em água quente por um tempo determinado na tentativa de destruir proteínas e enzimas da bactéria. Duas combinações são empregadas no Brasil: 52 °C por 30 minutos (COPERSUCAR, 1989) ou 50 °C por 2 horas (Damann & Benda, 1983). A primeira combinação é a preferencialmente adotada pelas unidades produtoras por demorar menos e permitir o tratamento de maior número de toletes por dia. No entanto, o tratamento térmico por si só não é totalmente eficaz já que um residual de bactérias ativas ainda persiste dentro dos colmos tratados (Gillaspie Jr. & Teakle, 1989). Ademais, a combinação tempo-temperatura está próxima da capacidade de sobrevivência da bactéria e do ponto de morte térmica das gemas (James, 1996). A não eliminação completa do patógeno gera escapes que servem como nova fonte de inóculo (Benda, 1994).

Dessa forma, o presente trabalho objetivou o objetivo do trabalho foi realizar o tratamento térmico dos toletes de cana, com diferentes combinações de tempo versus temperatura, com ou sem a adição de antibiótico. Além disso, a detecção do patógeno dentre os tratamentos testados também foi avaliada, testando protocolos de extração de DNA e diferentes iniciadores para que não ocorressem falsos negativos nas reações de PCR durante a avaliação do experimento e assim fornecer subsídios para as unidades produtoras que adotam tal metodologia ao comparar níveis de detecção e tratamentos adotados.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos independentes em locais distintos. O primeiro trabalho foi realizado nas dependências do Núcleo de Pesquisa em Fitopatologia da Universidade Federal de Goiás, situada a 16°35'45.0" de latitude Sul e 49°16'47.7" de longitude Oeste, na altitude 722m. O Segundo experimento foi realizado nas dependências da Usina Jalles Machado em Goianésia-GO, situada a 15°10' de latitude Sul, 49°15' de longitude Oeste e altitude de 640m. No primeiro experimento utilizamos a variedade CB 460 um padrão suscetível ao RSD, tratando toletes de uma só gema. No segundo utilizamos a variedade comercialmente utilizada RB 92 579, toletes de três gemas, na qual, por análise prévia, apresentou altos índices de infestação à doença (dados não apresentados).

4.2.1 Tratamento térmico com adição de antibiótico em toletes de uma gema

Para o tratamento térmico de toletes de uma gema, colmos da variedade CP 460 acima de nove meses de idade, comprovadamente infectados via PCR convencional, foram colhidos e cortados em toletes de apenas uma gema, de comprimento médio de 8 cm. Para cada tratamento, 30 toletes foram embalados em sacos reticulados (tipo aninhagem) para facilitar o manuseio e submetidos ao tratamento térmico em aparelho banho-maria (*Thermo Scientific*, Modelo 260) contendo água destilada com ou sem adição do antibiotico casugamicina à dosagem de 300mL/100L de H₂O. O experimento constou de 10 tratamentos: T1= 52°C/30'; T2= 52°C/1hr; T3= 50°C/1hr; T4= 50°C/2hrs; T5= 52°C/30' + casugamicina; T6= 52°C/1hr + casugamicina; T7= 50°C/30min + casugamicina; T8= 50°C/1hrs + antibiótico; T9= casugamicina (imersão em casugamicina 300mL/100L de H₂O, temperatura ambiente) e T10= testemunha (imersão em água na temperatura ambiente).

Os toletes foram distribuídos em bandejas plásticas, contendo substrato Biofertil e as bandejas foram colocadas em casa de vegetação, com temperatura média de 30°C +/- 7°C e umidade relativa do ar variando de 40 a 70%. O turno de rega foi diário, sempre no início da manhã. Trinta dias após o plantio, tentou-se realizar a porcentagem de germinação dentre os tratamentos, no entanto, a maioria dos toletes foram acometidos pela doença podridão do abacaxi, interferindo na porcentagem de germinação total dos toletes, inviabilizando a contagem da porcentagem de brotos por tratamento. Dez toletes de cada tratamento, que estavam com pelo menos 30 cm de altura foram transplantados na área experimental da EA-UFG. O delineamento experimental foi inteiramente casualizados, dispostos em parcelas alinhadas de 1 à 10. Nove meses após transplântio, as amostras foram coletadas em número de três por tratamento (três repetições), sendo 10 tratamentos, totalizando 30 amostras coletadas para análise. Da parte basal de cada colmo, toletes foram cortados, lavados, descascados e retirado uma sessão transversal. Estes cortes foram colocados em uma pequena prensa adaptada (amassador de alho) para extrair aproximadamente 2mL de caldo por amostra. As análises foram realizadas por meio de dois protocolos de extração de DNA distintos:

- Protocolo 1 - CTAB 2x adaptado segundo Boiteux et al. (1999)

A extração de DNA segundo Boiteux et al. (1999) foi feita pelo método CTAB 2X modificado com passos extras de purificação com solventes orgânicos. Seguindo a seguinte descrição: centrifugação do volume total a 12.000 rpm por dez minutos, o sobrenadante foi descartado, e 600 µL de CTAB (15 mL de CTAB + 30 µL de β-mercaptoethanol + 0.05g de sulfite de sódio) foram adicionados, as suspensões foram aquecidas à 65°C por 10 minutos, em seguida 600 µL da suspensão clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 24:1 (15 mL de cloroformio + 625 µL de álcool isoamílico) foram adicionados e vortexados por 30 segundos, e centrifugadas à 12.000 rpm por cinco minutos, o sobrenadante (aproximadamente 600 µL) foram transferidos para novos tubos eppendorfs de 1.5 mL de capacidade e 0.6x o volume de isopropanol foram adicionados, os tubos foram invertidos manualmente por 30 segundos e deixados descansar em freezer por no mínimo 20 minutos. Após esse tempo de precipitação em freezer, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos, os sobrenadantes foram descartados, os pellets foram lavados com etanol gelado à 70% e secos a temperatura ambiente, 50 µL de água ultrapura foram adicionadas em cada tubo para que os pellets fossem ressuspensos e armazenados a -20°C até a realização das análises por PCR.

- Protocolo 2 – adaptado de Garces et al. (2014)

O volume total do fluido fibrovascular (2 mL) foi centrifugado à 12.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 50-µl de tampão de ruptura (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1% Tween 20, pH 8.3), a suspensão foi ressuspensa em vortex, e depois, aquecida à 95°C/10 min, colocada em gelo por 3 min, seguido de novo aquecimento à 95°C por 3 min, as amostras foram armazenadas à -20°C até a realização das PCR's.

Após as extrações, cada amostra de DNA teve sua concentração e pureza determinadas através das leituras de absorbância à 260 nm (Concentração do DNA em $\text{ng mL}^{-1} = \text{Abs} \times 100 \times 50$) (Sambrook et al., 2001) e a 280 nm (quantificação de proteínas), no espectrofotômetro NanoDrop. A razão entre as leituras a 260 nm e a 280 nm foi utilizada como indicativo da pureza do DNA obtido. Cada amostra de DNA extraído, após a quantificação teve sua concentração foi ajustada para 20 ng/mL.

4.2.2 Tratamento térmico com adição de antibiótico em toletes de três gemas

No experimento de tratamento térmico com três gemas, colmos da variedade RB 92579 com nove meses de idade comprovadamente infectadas (através de reações de PCR), obtidas de um talhão comercial da usina Jalles Machado (área com infestação acima de 90% de plantas doentes) foram colhidas e cortadas em toletes de três gemas, comprimento médio de 15 cm. Os toletes foram colocados em sacos de ráfia e mergulhados em água com ou sem a adição de antibióticos, combinando tempo-temperatura. O experimento constou de 10 tratamentos: T1= 52°C/30'; T2= 52°C/1hr; T3= 50°C/1hr; T4= 50°C/2hrs; T5= 52°C/30' + casugamicina; T6= 52°C/1hr + casugamicina; T7= 50°C/30min + casugamicina; T8= 50°C/1hrs + casugamicina; T9= casugamicina (merguho em antibiótico casugamicina na dosagem de 3mL/L de H₂O à temperatura ambiente) e T10= testemunha (água na temperatura ambiente).

Posteriormente, os toletes foram distribuídos em dois blocos de cinco parcelas cada, sendo eles inteiramente casualizados de 1 à 5 e 10 à 6, as parcelas foram dispostas em quatro linhas de cinco metros de comprimento. Nove meses após plantio, foram coletadas, sendo amostrados aleatoriamente dez colmos por tratamento, totalizando 100 amostras, para avaliação da eficácia dos tratamentos por meio de detecção por PCR. O fluído fibrovascular foi extraído da parte basal de cada um deles por meio de pressão positiva, com auxílio de compressor. As análises foram realizadas utilizando três protocolos de extração de DNA distintos, citados abaixo:

- Protocolo 1 - CTAB 2x adaptado segundo Boiteux et al. (1999): O protocolo foi realizado com as mesmas descrições do item anterior.
- Protocolo 2 – adaptado de Garces et al. (2014): O protocolo também foi realizado com as mesmas descrições do item anterior.
- Protocolo 3- Uso de Kit comercial: PureLink® Plant total DNA Purification Kit: Conforme as instruções do fabricante: para cada amostra adicionou 250 µL de tampão

de ressuspensão, as amostras foram vortexadas, e 15 μL de SDS à 20% RNase A (20 mg/mL) foram adicionados em cada tubo. As amostras foram encubadas à 55°C por 15 min e centrifugadas a 120 rpm/5min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e 100 μL de tampão de precipitação (N2) foram adicionados. Misturou-se bem e encubou-se em gelo por 5 min. As amostras foram centrifugadas a 120 rpm por 5 min à temperatura ambiente e 250 μL do sobrenadante foram transferidos para novos tubos com 375 μL de tampão de ligação (B4), misturou-se bem. As amostras foram repassadas para as colunas e centrifugadas a 12.000 rpm por 30 s, descartou-se o fluído do tubo coletor e o que restou na coluna foi lavado com 500 μL de tampão de lavagem (W5) e centrifugados à 12.000 rpm/30s, esse passo foi repetido mais uma vez, sendo que na segunda a coluna foi centrifugada a 12.000 rpm/2min para descartar o excesso de tampão de lavagem. A coluna foi colocada sobreposta em tubos ependorffs estereis de 1.5 mL e fez-se uma eluição com 50 μL de tampão de eluição, encubando por 1 min e centrifugou a 12.000 rpm por 1 min, esta etapa foi repetida mais uma vez. O DNA extraído foi quantificado e ajustado para 20 ng/mL e armazenado à -20°C até a análise por PCR.

4.2.1.3 Integridade, quantificação e pureza do DNA extraído

Após as extrações, cada amostra de DNA teve sua concentração e pureza determinadas através das leituras de absorbância à 260 nm (Concentração do DNA em $\eta\text{g mL}^{-1} = \text{Abs} \times 100 \times 50$) (Sambrook et al., 2001) e a 280 nm (quantificação de proteínas), no espectrofotômetro NanoDrop. A razão entre as leituras a 260 nm e a 280 nm foi utilizada como indicativo da pureza do DNA obtido. Para cada amostra de DNA extraído, após a quantificação a concentração foi ajustada para 20 ng/mL.

4.2.2 PCR convencional

Foram utilizados dois pares de “primers” distintos e específicos para realização das análises por PCR, conforme descrito por Taylor et al. (2003): *Lxx* C2F (5’–CGAGTTTGGGTTTCTGCCTGC 3’) e *Lxx* C2R (5’–AGGTGGCAGCGACAACGGTGC 3’). O segundo par foi a partir de protocolo Nested desenvolvido por Davis et al., (1998): RSD33 (5’–CTGGCACCTGTGTTGTTTC-3’) e RSD297 (5’TTCGGTTCTCATCrCAGCGTC-

3) para PCR e RST60 (5'-TCAACGCAGAGATTGTCCAG-3') e RST59 (5'CGTCTTGAAGACACAGCGATGAG-3') para Nested-PCR.

O preparo de 10 µL mix para a reação de PCR, constou de 2 µL de uma aliquota do DNA extraído a partir de amostras do colmo ou de cultura pura de *Lxx*, 3,6 µL de água ultrapura, 5,0 µL de EmeraldAmp®GT PCR Master Mix e 0,2 µL de cada primer à concentração de 2,5 µM. As condições de amplificação foram iniciadas com aquecimento inicial à 94° C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação inicial à 94°C por 40s, anelamento à 54° C por 40 s e extensão à 72° C por 45 s; e uma extensão final à 72°C/10 min. Nove dos dez microlitros dos produtos de PCR foram revelados em gel de agarose 1,5% em tampão TAE à 80 Volts, por 40 min e visualizados em translaminador UV fotodocumentado pelo equipamento Loccus. O tamanho dos fragmentos gerados foram estimados com base em comparações com marcador molecular 100 pb DNA Ladder.

4.2.3 Nested-PCR

Para evitar possíveis contaminações resultantes da mudança de tubos e manipulação do DNA “amplificado” no ato do preparo do mix e dos produtos da PCR previamente amplificados, o volume remanescente de cada microtubo (1µL) foi utilizado para preparo da reação de Nested-PCR. O Mix Nested-PCR foi preparado seguindo o mesmo padrão da reação de PCR anterior, mas com outros pares de primers, que anelam dentro da região amplificada pelos primeiros: 1 µL do produto da PCR, citado anteriormente, 3,6 µL de água ultrapura, 5,0 µL de EmeraldAmp®GT PCR Master Mix e 0,2 µL de cada nested-primer à concentração de 2,5 µM.. Portanto, na Nested-PCR os iniciadores utilizados na primeira rodada de amplificação são substituídos para a segunda reação e subsequentes ciclos de amplificação, o DNA amplificado na primeira é alvo para o segundo par de primers, aumentando a sensibilidade e especificidade da PCR. As condições de amplificação foram as mesmas da reação de PCR, citadas anteriormente. Os dez microlitros dos produtos de Nested-PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TAE e tensão elétrica de 80 Volts, por 40 min, visualizados em translaminador UV e fotodocumentado com máquina digital Loccus. Os tamanhos dos fragmentos gerados foram estimados com base em comparações com marcador molecular 100 pb DNA Ladder.

4.2.4 Sensibilidade da detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em DNA total extraído do fluido fibrovascular de cana-de-açúcar.

Para simular a detecção da bacteriose dentro do seu hospedeiro, o teste de sensibilidade da reação de PCR e Nested-PCR foi realizado a partir de DNA total extraído de cana “sadia” misturado ao DNA da bactéria *Lxx* proveniente de cultura pura da bactéria. A concentração do DNA total da cana foi fixada em 20 ng/μL e o DNA de *Lxx* foram adicionados à uma concentração inicial de 25 ng/μL e diluída em série até a concentração $2,5 \times 10^{-6}$. Assim, 1 μL da solução inicial de DNA de *Lxx* foi transferida para tubo contendo 9 μL de suspensão de DNA total de cana-de-açúcar “sadia” à 20ng/μL, e assim sucessivamente para cada diluição do DNA de *Lxx* ($10^{-7} = 2,5 \times 10^{-6}$ ng/μL). Portanto, ao invés de utilizar água na diluição seriada, utilizou-se DNA extraído de fluido fibrovascular de cana-de-açúcar sadia, para se ter um parametro da sensitivdade da detecção do DNA da bactéria quando misturado ao DNA total de cana-de-açúcar. Com as diferentes diluições do DNA bacteriano foram realizadas ampliações por meio de PCR convencional e, em seguida, por Nested-PCR com iniciadores desenhados por Davis et al. (1998), conforme descritos nos itens 4.2.2 e 4.2.3.

4.2.5 Sequenciamento dos padrões amplificados por NESTED-PCR

No sequenciamento, utilizou-se o método Sanger para a geração de DNA barcodes de uma região conservada do genoma de *Lxx* visando a identificação de espécies, a partir de amostras de DNA amplificada por PCR convencional. Para o sequenciamento do produto amplificado, dez amostras de amplificação por Nested-PCR foram escolhidas aleatoriamente para comprovar a identidade do patógeno. A purificação dos produtos previamente amplificados seguiu o protocolo SEPHADEX G50. As sequências das dez amostras amplificadas por Nested-PCR foram alinhadas utilizando o programa BLAST e comparadas com a sequencia de *Lxx* isolado CTCB07, cujo o genoma completo está depositado no GenBank.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Toletes de uma gema tratados termicamente

No tratamento térmico de toletes com uma gema, as análises iniciais foram realizadas com a extração de DNA de acordo com o protocolo de Garces et al. (2014) e PCR com iniciadores de Taylor et al. (2003). Houveram amplificação somente do controle positivo na altura de banda esperada de 520 bp, para os demais tratamentos não houve ampliações visíveis para qualquer dos tratamentos termicos associados a antibióticos ou não (Figura 1).

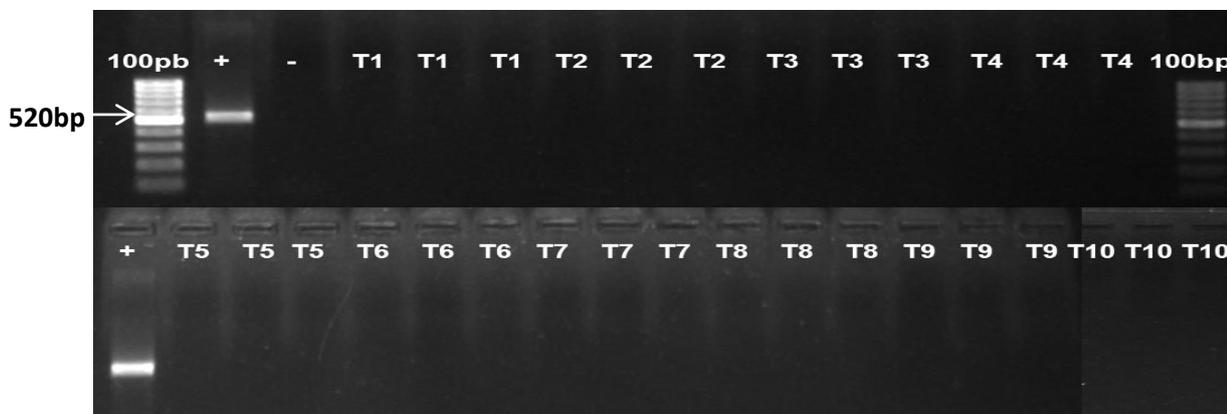


Figura 1. Amplificações por PCR convencional com iniciadores de Taylor et. al. (2001) separadas em gel de agarose à 1,5%, Ladder de 100 pares de base na primeira coluna da esquerda para direita do gel, seguido de controle positivo e negativo da extração de DNA e das três repetições de cada tratamento, na sequência T1 à T10: T1= 52°C/30'; T2= 52°C/1hr; T3= 50°C/1hr; T4= 50°C/2hrs; T5= 52°C/30' + casugamicina; T6= 52°C/1hr + casugamicina; T7= 50°C/30min + casugamicina; T8= 50°C/1hrs + casugamicina; T9= casugamicina (imersão em antibiótico 3mL/L) e T10= testemunha (imersão em água na temperatura ambiente).

Posteriormente com o mesmo DNA da análise anterior realizou-se nova PCR

convencional, mas desta vez com iniciadores propostos por Davis et al. (1998). Também houve amplificação somente do controle positivo, banda de 265 bp, constituído de material vegetal padrão suscetível com elevados títulos bacterianos presentes no colmo (dados não mostrados). Entretanto, quando realizamos NESTED-PCR, amplificações de fragmentos de DNA de 229 bp, ocorreram em algumas repetições dos tratamentos 1, 5, 6, 7 e 10 (figura 2).

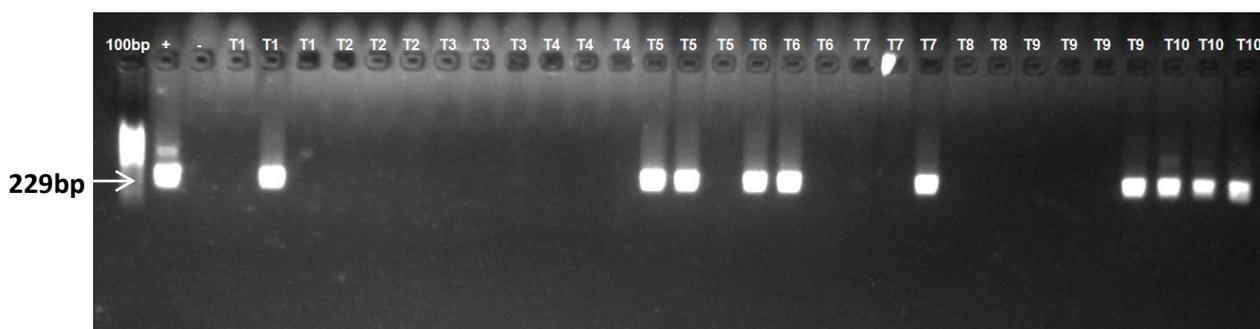


Figura 2. Amplificações por NESTED-PCR, com iniciadores desenhados por Davis et al. (1998), a partir de DNA extraído por Garces et al. (2014) separadas em gel de agarose à 1,5%, Ladder de 100 pares de base na primeira coluna da esquerda para direita do gel, seguido de controle positivo e negativo da extração de DNA e das três repetições de cada tratamento, na sequência T1 à T10: T1= 52°C/30'; T2= 52°C/1hr; T3= 50°C/1hr; T4= 50°C/2hrs; T5= 52°C/30' + casugamicina; T6= 52°C/1hr + casugamicina; T7= 50°C/30min + casugamicina; T8= 50°C/1hrs + casugamicina; T9= casugamicina (imersão em antibiótico 3mL/L) e T10= testemunha (imersão em água na temperatura ambiente).

Outra análise do tratamento térmico foi realizada seguindo o protocolo CTAB 2x modificado para extração de DNA, e PCR convencional com iniciadores Davis et al.(1998) para PCR e NESTED-PCR. Nas reações de PCR convencional não foram visualizadas amplificações em qualquer dos tratamentos, com a exceção do controle positivo, que foi constituído de material vegetal padrão suscetível com elevados títulos bacterianos no colmo. No entanto, amplificações foram detectadas em pelo menos uma das repetições de cada tratamento por meio de Nested-PCR (figura 3).

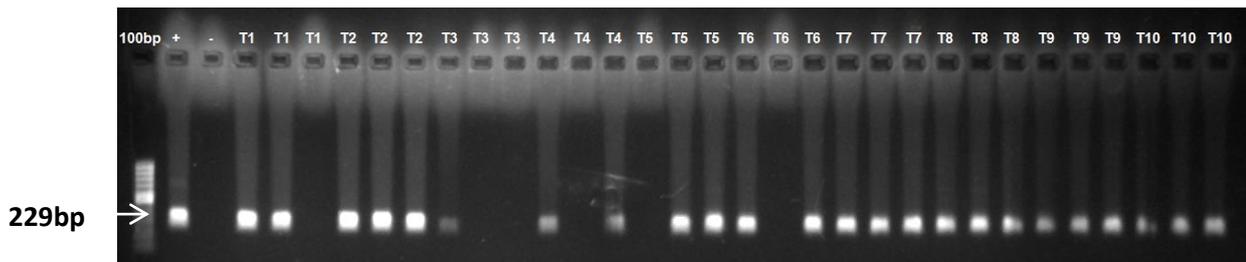


Figura 3. Amplificações por NESTED-PCR, com iniciadores desenhados por Davis et al. (1998), a partir de DNA extraído pelo protocolo CTAB 2x modificado. Os fragmentos foram separados em gel de agarose à 1,5%, Ladder de 100 pares de base na primeira coluna da esquerda para direita do gel, seguido de controle positivo e negativo da extração de DNA e das três repetições de cada tratamento, na sequência T1 à T10: T1= 52°C/30'; T2= 52°C/1hr; T3= 50°C/1hr; T4= 50°C/2hrs; T5= 52°C/30' + casugamicina; T6= 52°C/1hr + casugamicina; T7= 50°C/30min + casugamicina; T8= 50°C/1hrs + casugamicina; T9= casugamicina (imersão em antibiótico 3mL/L) e T10= testemunha (imersão em água na temperatura ambiente).

4.3.2 Toletes com três gemas

Com base nas análises do tratamento térmico com toletes de uma gema, do experimento anterior, as amplificações de DNA foram realizadas usando os primers sugeridos por Davis et al. (1998) tanto para PCR convencional e para Nested-PCR. Na primeira avaliação da eficiência dos tratamentos térmicos, o protocolo de extração de DNA descrito por Garces et al. (2014) e os iniciadores propostos por Davis et al. (1998) foram empregados para as amplificações específicas de DNA. Não houve amplificações de DNA de *Lxx* para qualquer dos tratamentos térmicos nas reações de PCR convencional. Já para NESTED-PCR, houveram amplificações de DNA bacteriano em uma ou mais repetições dos tratamentos térmicos, exceto nos tratamentos seis (52°C/1hr + casugamicina) e sete (50°C/30 min + casugamicina), onde nenhuma banda apareceu em qualquer das três repetições dos tratamentos (Figura 5).

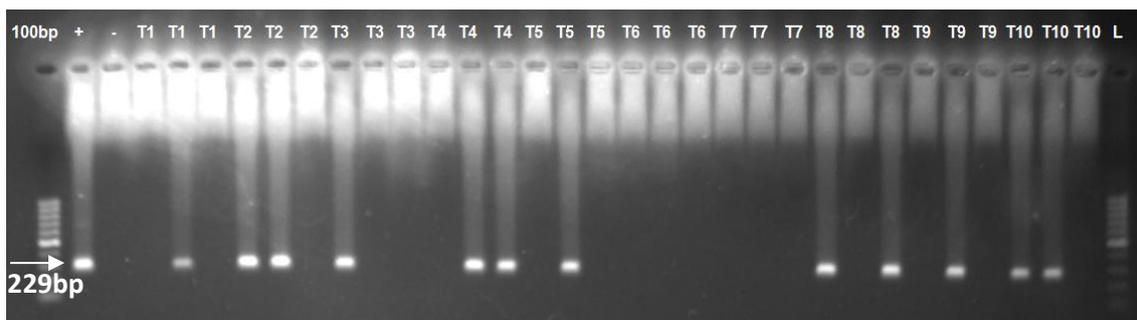


Figura 5. Fragmentos amplificados por NESTED-PCR, em gel de agarose a 1,5%. A partir de DNA extraído pelo protocolo Garces et al. (2014) e iniciadores desenhados por Davis et al. (1998). Ladder de 100 pares de base na primeira coluna da esquerda para direita do gel, seguido de controle positivo e negativo da extração de DNA e das três repetições de cada tratamento, na sequência T1 à T10: T1= 52°C/30'; T2= 52°C/1hr; T3= 50°C/1hr; T4= 50°C/2hrs; T5= 52°C/30' + casugamicina; T6= 52°C/1hr + casugamicina; T7= 50°C/30min + casugamicina; T8= 50°C/1hrs + casugamicina; T9= casugamicina (imerssão em antibiótico 3mL/L) e T10= testemunha (imerssão em água na temperatura ambiente).

Na segunda avaliação da eficiência dos tratamentos térmicos, o DNA bacteriano foi extraído seguindo o protocolo de extração CTAB 2X modificado descrito por Boiteux et al. (1999). Semelhante a primeira avaliação, também não houve detecção de ampliações de DNA bacteriano para qualquer dos tratamentos térmicos nas reações de PCR convencional (dados não apresentados), já para NESTED-PCR, houve ampliações de DNA bacteriano em uma ou mais repetições dos tratamentos térmicos, exceto no tratamento cinco (52°C/30 min + antibiótico), onde nenhuma banda apareceu em qualquer das três repetições do tratamento (Figura 6).

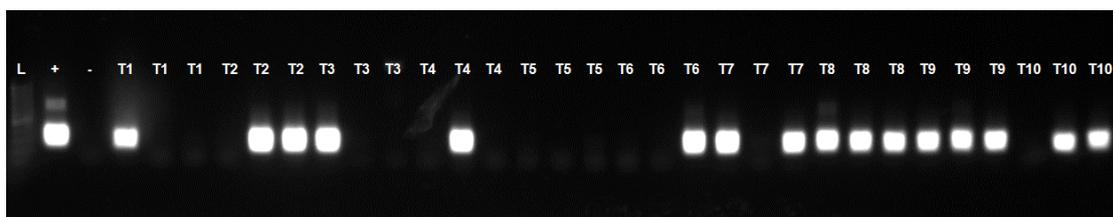


Figura 6. Amplificações por NESTED-PCR, a partir de DNA extraído pelo protocolo CTAB 2X modificado e iniciadores sugeridos por Davis et al. (1998) em gel de agarose à 1,5%, Ladder de 100 pares de base na primeira coluna da esquerda para direita do gel, seguido de controle positivo e negativo da extração de DNA e das três repetições de cada tratamento, na sequência T1 à T10: : T1= 52°C/30'; T2= 52°C/1hr; T3= 50°C/1hr; T4= 50°C/2hrs; T5= 52°C/30' + casugamicina; T6= 52°C/1hr + casugamicina; T7= 50°C/30min + casugamicina; T8= 50°C/1hrs + casugamicina; T9= casugamicina (imerssão em antibiótico 3mL/L) e T10= testemunha (imerssão em água na temperatura ambiente).

Na terceira avaliação da eficiência dos tratamentos térmicos, o DNA bacteriano foi extraído por meio Purelink Plant Total DNA Purification Kit e semelhante as duas primeiras avaliações de eficiência dos tratamentos térmicos, detecção de amplificações de DNA bacteriano não foram registradas para qualquer dos tratamentos nas reações de PCR convencional (dados não apresentados), mas para NESTED-PCR, as amplificações foram visíveis em uma ou mais repetições de todos os tratamentos (figura 7).

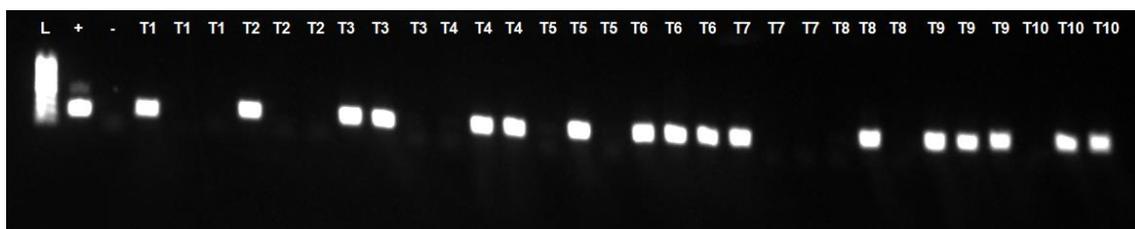


Figura 7. Amplificações por NESTED-PCR, a partir de DNA extraído pelo Kit Purelink Plant Total DNA Purification e iniciadores sugeridos por Davis et al. (1998) em gel de agarose à 1,5%, Ladder de 100 pares de base na primeira coluna da esquerda para direita do gel, seguido de controle positivo e negativo da extração de DNA e das três repetições de cada tratamento, na sequência T1 à T10: T1= 52°C/30'; T2= 52°C/1hr; T3= 50°C/1hr; T4= 50°C/2hrs; T5= 52°C/30' + casugamicina; T6= 52°C/1hr + casugamicina; T7= 50°C/30min + casugamicina; T8= 50°C/1hrs + casugamicina; T9= casugamicina (imersão em antibiótico 3mL/L) e T10= testemunha (imersão em água na temperatura ambiente).

Analisando os resultados da PCR convencional e NESTED-PCR em conjunto (Tabela 1), podemos perceber que a técnica de avaliação da eficiência dos tratamentos térmicos é fundamental para evitar resultados falsos negativos. Se fossemos considerar somente a avaliação por meio de PCR convencional, todos os tratamentos seriam considerados eficientes no controle de *Lxx* no colmo, inclusive o tratamento 10 (colmos mergulhados em água a temperatura ambiente-testemunha), o que contradiz essa conclusão, pois nessas condições a viabilidade de *Lxx* não estaria comprometida. Ao contrário da PCR convencional que apresentou baixa sensibilidade de detecção de *Lxx*, a NESTED-PCR demonstrou nitidamente que nenhum tratamento térmico é capaz de eliminar as populações de *Lxx* de colmo de cana-de-açúcar, pois a detecção da bactéria variou de 16 a 66% no ensaio com toletes de uma gema e de 22 a 77% no ensaio com toletes de três gemas.

Tabela 1. Detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* a partir de colmo de cana-de-açúcar após serem tratados termicamente, utilizando dois sets de *primers* específicos.

		TOLETE 1 GEMA									
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Taylor	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>primers</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Davis Nested	3/6	3/6	1/6	2/6	4/6	4/6	4/6	3/6	4/6	6/6	
<i>primers</i>	50%	50%	16%	33%	66%	66%	66%	50%	66%	100%	
		TOLETE 3 GEMAS									
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Davis Nested	3/9	5/9	4/9	5/9	2/9	4/9	3/9	6/9	7/9	6/9	
<i>primers</i>	33%	55%	44%	55%	22%	44%	33%	66%	77%	66%	

*Todas as amostras foram testadas pelo menos duas vezes

**T1 à T10: T1= 52°C/30'; T2= 52°C/1hr; T3= 50°C/1hr; T4= 50°C/2hrs; T5= 52°C/30' + casugamicina; T6= 52°C/1hr + casugamicina; T7= 50°C/30min + casugamicina; T8= 50°C/1hrs + casugamicina; T9= casugamicina (imerssão em antibiótico 3mL/L) e T10= testemunha (imerssão em água na temperatura ambiente)

As análises das sequencias amplificadas por Nested-PCR, escolhidas aleatoriamente com a finalidade de comprovar a identidade do patógeno, alinhadas no software BLAST, apresentaram 100% de identidade com a sequência base de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, Cultura CTCB07 cujo genoma completo esta depositado no GenBank[®] (figura 9).

Leifsonia xyli subsp. xyli str. CTCB07, complete genome
 Sequence ID: [ref|NC_006087.1](#) Length: 2584158 Number of Matches: 1

Range 1: 135341 to 135527 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
346 bits(187)	7e-91	187/187(100%)	0/187(0%)	Plus/Minus
Query 9	ACAGCGTGCATGTGCGAGGCTCCCGGTCCGAACTGTTTCCTTCCTGCAAGCAGGCGTACT			68
Sbjct 135527	ACAGCGTGCATGTGCGAGGCTCCCGGTCCGAACTGTTTCCTTCCTGCAAGCAGGCGTACT			135468
Query 69	AAGTTCGAGCCGTTTCGGCTCCGCACCAATGTCAATGTTCCACCCATGAGCTGACCGGCTG			128
Sbjct 135467	AAGTTCGAGCCGTTTCGGCTCCGCACCAATGTCAATGTTCCACCCATGAGCTGACCGGCTG			135408
Query 129	AGACCCAGTCGTACCGATGTGATAAGTACTGTCTCAGATCCGGCGCCTGGACAATCTCTG			188
Sbjct 135407	AGACCCAGTCGTACCGATGTGATAAGTACTGTCTCAGATCCGGCGCCTGGACAATCTCTG			135348
Query 189	CGTTGAA	195		
Sbjct 135347	CGTTGAA	135341		

Figura 9. Resultado de alinhamento utilizando *BLAST* do GenBank[®] de seqüências de fragmentos de DNA *Leifsonia xyli subsp. xyli*, amplificadas por Nested-PCR.

Diante das diferenças de sensibilidade da PCR convencional e NESTED-PCR, analisamos a performance dessas duas técnicas em ampliações de uma diluição seriada de DNA de *Lxx* diluído em suspensão de DNA total de cana-de-açúcar “sadia” à 20ng/μL. A PCR convencional amplificou eficientemente DNA de *Lxx* em concentração igual ou superior a $2,5 \times 10^{-2}$ ng/μL, enquanto NESTED-PCR foi eficiente até $2,5 \times 10^{-5}$ ng/μL (Figura 8). O grau de sensibilidade de NESTED-PCR foi mil vezes maior que o da PCR convencional.

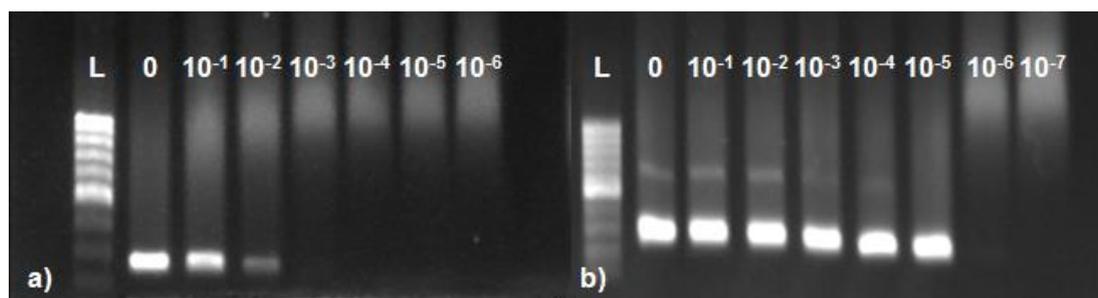


Figura 8. Amplificações de DNA de *Lxx* proveniente de diluição seriada. a) Reação de PCR convencional e ampliações na altura de banda esperada até $2,5 \times 10^{-2}$ ng/μL e b) Reação de Nested-PCR da diluição seriada até $2,5 \times 10^{-5}$ ng/μL.

As análises por Nested-PCR, independentemente da variedade de cana testada (padrão suscetível ou variedade comercial), nos permite inferir em função de sua significativa sensibilidade de detecção, que nenhum dos tratamentos térmicos foi capaz de eliminar a bactéria dos toletes tratados, sendo eles de uma ou três gemas. Entretanto,

percebe-se em todos os casos, inclusive na testemunha (não tratada), que o título bacteriano foi reduzido de uma população inicial de até $2,5 \times 10^2$ UFC/mL (Figura 8a), que foi detectada por PCR convencional (inicialmente detectada antes de submeter os toletes ao tratamento térmico), para um título bacteriano certamente inferior a $2,5 \times 10^5$ CFU/mL (Figura 8b), detectável apenas por Nested-PCR, após corte, tratamento térmico e plantio.

Essa redução no título bacteriano pode ter sido por várias causas diretas ou indiretas, como ambiente e temperaturas não favoráveis ao desenvolvimento de *Lxx* nos colmos e brotações, já que os dois experimentos foram conduzidos na época mais fria do ano. A redução pode ter sido por causa da interrupção do fluxo normal de seiva após o corte dos colmos em toletes, ou ainda devido a diluição bacteriana da fase de crescimento de novos perfilhos ou crescimento lento da bactéria *Lxx*, devido ao seu habito fastidioso. Os pesquisadores Chalkley & Koornhof (1985) compararam o tempo de geração de *Escherichia coli* (não fastidiosa), cujo tempo de geração é de 15 minutos com o de *Lxx* (fastidiosa) cujo tempo foi 6,9 horas.

Em todos os tratamentos houve redução no título bacteriano, inclusive na testemunha, não tratada. Em nenhum dos tratamentos em questão houve a completa eliminação de *Lxx* dos toletes tratados, e a redução no título de células bacterianas contrariou a hipótese de aumento da infecção com o passar do tempo em toletes não tratados termicamente. Nossos resultados corroboram com Carvalho et al. (2016), que desenvolveram um protocolo para avaliar diferentes combinações do tratamento termico através de PCR quantitativo, e também verificaram que o tratamento térmico apenas reduz o título bacteriano nos toletes tratados, com a PCR quantitativa eles também verificaram que a redução foi maior nos toletes tratados por mais de uma hora para as temperaturas de 50 e 52°C, comparados com tratamentos de tempo inferior e a testemunha.

Esses resultados estão de acordo com os diversos estudos já realizados ao demonstrarem que o tratamento térmico não proporciona a limpeza absoluta das mudas de cana-de-açúcar (Damann & Benda, 1983; Benda, 1994; Grisham et al., 2007; Urashima & Grachet, 2012). Urashima & Grachet (2012) compararam microscopia, *Dot Blot* e PCR convencional para detecção de *Lxx* em toletes tratados termicamente. Eles verificaram que *Dot Blot* e PCR convencional só detectaram a bactéria nos controles positivos, mas a microscopia demonstrou que a bactéria ainda estava presente em todos os tratamentos analisados. Assim, os autores reforçaram a necessidade de

modificações nas técnicas de análise da eficiência dos tratamentos, pois quando eles dobraram o volume inicial do caldo para análise via *Dot blot* algumas amostras testaram positivo para *Lxx*, já para PCR convencional os autores não sugeriram adaptações da técnica, consideraram-na uma técnica promissora. Assim, o presente estudo ao adotar o uso da NESTED-PCR reforça a necessidade do uso de técnicas de maior grau de sensibilidade e confiabilidade para avaliação da eficiência de tratamentos que visam eliminar *Lxx* do colmo de cana-de-açúcar utilizado para propagação da cultura.

O trabalho em questão foi inovador ao utilizar antibiótico aliado ao tratamento térmico de toletes com a presença da bactéria *Lxx*, no entanto, em tais tratamentos não observamos um maior controle bacteriano em relação à testemunha, portanto, o princípio ativo casugamicina não apresentou eficácia em conjunto com a termoterapia para eliminar a bactéria *Lxx* dos toletes em questão. A casugamicina foi escolhida por ser antibiótico e fungicida sistêmico e por ser o único antibiótico liberado comercialmente, no entanto, não há relatos deste princípio ativo ter sido testado para bacterioses em cana-de-açúcar.

Técnicas sorológicas para exames diagnósticos vêm sendo empregadas como parte do manejo integrado de RSD em vários países (Rao *et al.*, 2004). Grande parte das análises via *Dot Blot* já adotadas são eficientes somente em plantas com altos níveis populacionais de infecção, por isso a maioria do material propagativo analisado, utilizado no plantio em diversas regiões do mundo, considerados livre de *Lxx*, podem estar propagando a bactéria em títulos bacterianos muito baixos. Fernandes Jr. *et al.* (2010), por exemplo, analisando tratamentos térmicos via *Dot Blot* relataram a eliminação completa de *Lxx* em toletes da variedade CB49-260 submetidos às mesmas condições do tratamento à 50°/2 hrs. Urashima & Grachet (2012), conseguiram melhorar a sensibilidade de *Dot Blot*, trabalhando com um maior volume inicial de amostras, mas não obtiveram o mesmo sucesso para as reações de PCR. No presente trabalho, foi possível obter altos níveis de sensibilidade com o uso da Nested-PCR. Os resultados dos testes indicaram que a PCR para DNA diluído em DNA do líquido fibrovascular saltou de $2,5 \times 10^{-2}$ ng/ μ L para $2,5 \times 10^{-5}$ ng/ μ L na Nested-PCR, portanto, foi mil vezes mais sensível que a PCR convencional (Figura 8).

O protocolo Nested-PCR, sugerido por Davis *et al.* (1998) e testado e adaptado neste estudo, é promissor para exame diagnóstico de RSD em grande número de amostras, pois é altamente específico, sensível, rápido e permite que as amostras sejam

armazenadas por um maior período, antes de seu processamento, como ocorre com amostras utilizadas em PCR convencional.

4.4 CONCLUSÕES

- Nenhum dos tratamentos adotados na termoterapia foi capaz de eliminar *Lxx* dos toletes tratados, inclusive os tratamentos padrões de 50°C/2 hrs e 52°C/30 min, já adotados por unidades produtoras de cana-de-açúcar.
- A Nested-PCR foi fundamental pra verificar que não foi possível eliminar a bactéria em nenhum dos tratamentos testados;
- O uso de casugamicina não ajudou a eliminar *Lxx* em nenhum dos tratamentos em que foi usado, independentemente dos toletes serem tratados com uma ou três gemas;
- A detecção de *Lxx* variou mais em relação ao protocolo de DNA usado do que em relação ao tratamento térmico adotado;
- Houve redução do título bacteriano em todos os tratamentos testados, inclusive na testemunha não tratada;

4.5 REFERENCIAS

BAILEY, R.A.; MCFARLANE, S.A. The incidence and effect of RSD of sugar cane in Southern and Central Africa. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, v. 73, p. 118-122, 1999.

BELING, R. R. **Anuário brasileiro da agroenergia**. Santa Cruz do Sul, 2006, 136 p.

BENDA, G. T. A. Serial hot-water treatment for sugarcane disease control. In: Rao GP, Gillaspie Jr AG, Upadhyaya PP, Bergamin Filho A, Agnihotri VP, Chen CT (Eds.) Current trends in sugarcane pathology. New Delhi. International Books and Periodicals Supply Service, 1994 pp. 297-310.

BOITEUX, L.S., FONSECA, M.E.N. & SIMON P.W. Effects of plant tissue and DNA purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.124, p. 32-38, 1999.

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**: v. 80: 51-55, 2016.

CHALKLEY, L. J., KOORNHOF, H. J. Antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* determined by the killing curve method: antibiotic comparisons and synergistic interactions. **Antimicrob Agents Chemother** v. 28(2):331-42, 1985.

COPERSUCAR . Binômio tempo x temperatura no controle do raquitismo da soqueira (RSD) da cana-de-açúcar, pelo processo de termoterapia em gemas isoladas. Cadernos COPERSUCAR, Série Melhoramento, 25:1-5, 1989.

DAMANN JR., K.E.; BENDA, G.T.A. Evaluation of commercial heat treatment methods for control of ratoon stunting disease of sugarcane. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 9, p. 966- 967, 1983.

DAVIS, M.J.; ROTT, P.; ASTUA-MONGE, G. Nested, multiplex PCR for detection of both *Clavibacter xyli* and *Xanthomonas albilineans* in sugarcane. **ICPP Paper**, Gainesville n. 3.3.4, 1998.

FERNANDES JÚNIOR, 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**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 60-64, 2010.

GARCES, F. F., GUTIERREZ, A., AND HOY, J. Detection and quantification of *Xanthomonas albilineans* by qPCR and potential characterization of sugarcane resistance to leaf scald. **Plant Dis**. Iowa v. 98:121-126, 2014.

GILLASPIE, A.G., TEAKLE, D.S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE, J.R.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of sugarcane**. New York:

Elsevier Science, 1989. p. 59-80.

GRISHAM, M.P.; PAN, Y.B.; RICHARD JR, E.P. Early Detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 430-434, 2007.

GRISHAM, M.P.; JOHNSON, R.M.; VIATOR, R.V. Effect of ratoon stunting disease on yield of recently released sugarcane cultivars in Louisiana. **Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists**, Baton Rouge, v. 29, p. 119-127, 2009.

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

NGARUIYA, P.N.; SHIPTON, W.A.; COVENTRY, R. Ratoon stunting disease of sugarcane as influenced by environmental stressors. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Brisbane, v. 27, p. 324-333, 2005.

RAO, G. P.; GIRAD, J. C.; ROTT, P. Current scenario and future perspectives of sugarcane bacterial diseases. In: RAO, G. P, SAUMTALLYAS, ROTT, P. (Eds.) Sugarcane pathology: bacterial and nematode diseases. New Hampshire. **Science Publishers**, 2004, pp. 3-12

SAMBROOK, J.; MACCALLUM, P.; RUSSEL, D. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Springs Harbour Press, 2001. 446 p.

TAYLOR, P.M. J.; PETRASOVITS, L.A.; VAN DER VOLD, 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**, Clayton, v. 32, p. 367-375, 2003.

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**, London, v. 12, n. 1, p. 83-91, 1975.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da Cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. São Paulo, 2005. 197 - 223 p.

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

YOUNG, A.; BRUMBLEY, S. Ratoon stunting disease of sugarcane: history, management and current research. In: RAO, G.P.; SAUMTALLY, A.S.; ROTT, P. (Ed.). **Sugarcane pathology**: bacterial and nematodes diseases. New York: Enfield Science Publ., 2004. p. 97- 124.

RESUMO

DIAGNOSE DE ESCALDADURA DAS FOLHAS EM CANA-DE-AÇÚCAR POR PCR BASEADA NO MÍNIMO RESIDUAL BACTERIANO EM FASE DE LATENCIA DA DOENÇA.

A escaldadura das folhas é uma das mais importantes doenças que afetam a cana-de-açúcar. Trabalhos anteriores relatam a dificuldade de detecção por PCR convencional quando aplicada em material vegetal assintomático, onde os níveis populacionais do patógeno estão abaixo do limite detectável pela técnica de PCR convencional. Devido a este fator e à resiliência da Escaldadura das folhas em fase latente, o trabalho objetivou aprimorar protocolos, tanto de extração do fluido fibrovascular da cana-de-açúcar quanto protocolos de extração de DNA, para que a detecção ocorra mesmo quando o residual bacteriano da amostra é mínimo. Quatro técnicas de extração do fluido fibrovascular da cana foram testadas: compressor, prensa, macerado e fluxo bacteriano em água e mais quatro protocolos para extração de DNA de tais fluídos, sendo dois deles considerados rápidos ou simples, um CTAB modificado e por último um Kit comercial, para extração de DNA a partir de material vegetal com baixos índices populacionais de fitopatógenos. Os resultados indicaram que PCR convencional não é sensível o suficiente para detectar essa bactéria durante a fase de latência quando o título bacteriano é baixo. No entanto, aplicando o protocolo de extração de DNA sugerido por Davis *et al.*, (1998) e adaptado neste trabalho, NESTED-PCR detectou *X. albilineans* a partir de fluido fibrovascular extraído pelo uso do compressor, prensa e fluxo bacteriano em água, mesmo em baixas concentrações bacteriana (fase de latência).

Palavras-chave: *Xanthomonas albilineans*, latência, Nested-PCR e cana-de-açúcar

¹Orientador: Prof. PhD Marcos Gomes da Cunha. EA – UFG.

Co-orientador: Prof. Dr. Érico de Campos Dianese. EA – UFG.

ABSTRACT

PCR-BASED ON MINIMAL RESIDUAL DISEASE FOR DIAGNOSTICS OF LEAF SCALD DISEASE IN SUGARCANE.

Leaf scald is one of the major diseases affecting sugarcane. Previous studies have reported the conventional PCR detection of difficulty when applied in asymptomatic plant material, where the population of the pathogen level is below the detectable limit by PCR. Because of this factor and the resilience of scald disease leaves a latent stage, the study aimed to enhance protocols, both extraction fluid fibrovascular of sugarcane as DNA extraction protocols for the detection occur even when the residual bacterial sample is minimal. We tested four techniques of extraction fluid fibrovascular of sugarcane: positive pressure, press, macerated and bacterial flow in water and four protocols for DNA of fluid extraction, two of them considered quick or simple, a modified CTAB and the last one Kit commercial, for DNA extraction from plant material with low pathogenic population indices. The results indicated that only by conventional PCR was it not possible to detect the disease when undergoing latency and low populations. However, with the Nested-PCR, and using the DNA extraction protocol suggested by Davis *et al.*, 1998 and adapted in this work, we could detect *X. albilineans* from vascular fluid extracted by the use of the positive pressure, press and bacterial flow water at low bacterial concentrations (latent phase).

Key words: *Xanthomonas albilineans*, Nested-PCR, latency and sugarcane.

¹Adviser: Prof. PhD Marcos Gomes da Cunha. EA – UFG.

Co-adviser: Prof. Dr. Érico de Campos Dianese. EA – UFG.

5.1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* ssp.) tem sido importante para a economia do Brasil desde o início do século XVI, quando Martin Afonso de Souza trouxe as primeiras mudas no ano de 1533 (Baer, 1965, citado por Calmon, 2002), desde então encontra-se em contínua expansão. Recentemente, devido principalmente ao aumento do consumo de etanol pelos carros bicombustíveis houve um aumento progressivo da capacidade produtiva e de área plantada ao longo dos últimos anos, sendo hoje o país o principal produtor mundial (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011; Neves & Trombim, 2014).

A área cultivada que deverá ser colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2015/16 é de 8.995,5 mil hectares. São Paulo, maior produtor, possui 52% (4.678,7 mil hectares), seguido por Goiás com 10,1% (908 mil hectares), Minas Gerais com 9% (811,2 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 7,5% (677,9 mil hectares), Paraná com 6,6% (596 mil hectares), Alagoas com 3,8% (338,3 mil hectares), Pernambuco com 2,9% (264 mil hectares) e Mato Grosso com 2,6% (230,3 mil hectares). Estes oito estados são responsáveis por 94,5% da produção nacional (Conab, 2016).

Com o intenso consumo de etanol e a crescente demanda por carros bicombustíveis, faz com que os produtores busquem o aumento da área plantada. Essa expansão tem sido acompanhada de uma multiplicação inadequada da cana-planta. Com este tipo de manejo aumentam-se também os fatores limitantes para o aumento da produtividade de cana-de-açúcar. Destacando-se a ocorrência e a severidade de doenças causadas por bactérias, fungos e vírus, além do ataque de pragas (Dinardo-Miranda & Gil, 2007). Desde o século passado, mais de uma centena de doenças já foram identificadas na cultura da cana-de-açúcar, entre elas destacam-se cinco como as mais importantes por causarem danos substanciais às lavouras: i. carvão – causado pelo fungo *Sporisorium scitamineum*; ii. ferrugens – causada pelos fungos *Puccinia melanocephala* (ferrugem marrom) e *Puccinia kuehnii* (ferrugem alaranjada); iii. raquitismo das soqueiras – causado pela bactéria *Leifsonia xyli*; iv. mosaico – causado pelo vírus do mosaico; e v. escaldadura das folhas – causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans* (Martin et al., 1961).

A escaldadura das folhas, causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson apresenta grande potencial destrutivo, quando a doença se manifesta em variedades extremamente suscetíveis, podendo causar perdas de até 100% (Tokeshi & Rago, 2005). A bactéria se multiplica principalmente nos feixes vasculares causando má formação do colmo e conseqüente redução severa na produtividade e na qualidade da sacarose (Ricaud & Ryan, 1989; Rott & Davis, 2000), além de provocar também a degenerescência da variedade em cultivo. Essa doença já foi relatada em mais de 66 países e ao redor do mundo (Rott & Davis, 2000).

No caso de variedades suscetíveis a doença é caracterizada pelas fases crônica e aguda e os sintomas variam desde uma simples linha branca paralela à nervura central, necrose das folhas, do meristema apical, brotações laterais até a morte total da touceira (Ricaud & Ryan, 1989; Rott, et al., 1997; Wang, et al., 1999). No entanto, na maioria dos casos, as variedades em cultivo não expressam sintomas externos, mas elas podem ser portadoras assintomáticas devido às infecções latentes, dificultando a diagnose da doença (Ricaud & Ryan, 1989; Rott, et al., 1997). Assim a bactéria pode estar se multiplicando e disseminando de forma despercebida e as perdas na produtividade podem estar ocorrendo.

A maioria dos laboratórios especializados em diagnoses de doenças em cana-de-açúcar realizam análises por técnicas sorológicas, como *Dot Blot*. Estas técnicas só são eficientes quando a bactéria atinge altas concentrações, momento em que a produção já está comprometida e o patógeno bem estabelecido nas plantações (Honeycutt et al., 1995). No caso de infecções latentes, onde geralmente a população bacteriana ainda está baixa, as técnicas utilizadas não são eficientes a ponto de detectar o patógeno.

Pesquisadores ao utilizarem técnicas moleculares, como a “Polymerase Chain Reaction” (PCR) (Pan, et al., 1997; Pan et al., 1999; Wang et al, 1999), afirmam que são técnicas mais sensíveis e que detectam até uma célula bacteriana por reação, no entanto, quando a população do patógeno está drasticamente baixa, “*in situ*”, ou seja, o patógeno espalhado no material vegetal, somando ao processo de extração de DNA total da planta (interferências de proteína vegetal), e ainda a aleatoriedade na pipetagem, a alta sensibilidade da técnica não acontece. Assim, o desenvolvimento de estratégias para o diagnóstico da escaldadura das folhas da cana, principalmente no caso de infecções latentes, de maneira mais rápida, sensível e segura, prestará um grande auxílio não só por impedir o avanço da bactéria em campos de cultivo, mas também para os programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar, que objetiva selecionar variedades

altamente tolerantes ou imunes à *Xanthomonas albilineans*. O objetivo deste trabalho foi otimizar a detecção molecular de *X. albilineans* em altas e baixas densidades populacionais, comparando desde a eficiência de técnicas de extração do fluido fibrovascular da cana, protocolos de extração de DNA, PCR e Nested-PCR para detecção, visando também a detecção em larga escala de *Xanthomonas albilineans*, agente causal da escaldadura das folhas em cana-de-açúcar.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Aquisição das plantas e preparação das amostras

Colmos com sintomas e sem sintomas acima de nove meses de idade foram coletados em uma fazenda no município de Senador Canedo-GO, latitude 16° 44' 26"S; longitude 49°6'32"O; Altitude 740m . Os colmos foram trazidos para o laboratório do Nucleo de Pesquisa em Fitopatologia-UFG, lavados em água corrente e enxutos com papel tipo toalha. Três colmos de cada planta sintomática e planta assintomática foram separados e cortados em toletes de uma gema cada um.

A parte mais basal de cada colmo foi usada para a extração do fluido fibrovascular, por meio de pressão positiva, usando compressor adaptado a uma teteira de borracha. De cada colmo, foi retirado por volta de 1 mL de fluido fibrovascular em tubos tipo ependorff de 1,5mL e armazenado em freezer até o processamento das amostras.

Para quantificar os níveis populacionais da bactéria nos colmos, em câmara de fluxo, a superfície externa de cada colmo com e sem sintomas foi mergulhada em álcool 70%, passada rapidamente em chama para esterilização da superfície externa e um corte transversal com tesoura de poda estéril foi realizado na extremidade inferior do colmo e foi realizado o "tissue print" em meio de wilbrink (10 g sacarose, 5 g peptona bacteriológica, 0.5 g K₂HPO₄, 3H₂O, 0.25 g MgSO₄, 1 L água destilada, pH 6.8-7.0). Dois cortes foram realizados em cada colmo sintomático e assintomático e pressionados contra o meio em placa de petri (Figura 10a). Além disso, retirou-se mais uma secção transversal de cada colmo e a casca do remanescente. Desses colmos descascados foram cortados pequenos fragmentos de 1,0cm x 1,0cm x 1,0cm em colocados em água estéril

2mL (Figura 10b). Os pedaços ficaram mergulhados em água por duas horas e depois 1,0mL das suspensões foram transferidas para tubos eppendorf tipo de 1,5 mL. Uma subamostra de 100 μ L foi retirada para realizar a diluição em série (1:10) (Figura 10c), visando determinar o número de CFU/mL de *Xanthomonas albilineans* por amostra. A cada diluição a suspensão foi submetida a agitação em vórtex e 40 μ L foram transferidos para placas de Petri com meio Wilbrink conforme a figura 10c. A suspensão remanescente foi estocada à -20°C até o dia seguinte, no qual seguiu-se com os protocolos de extração de DNA.

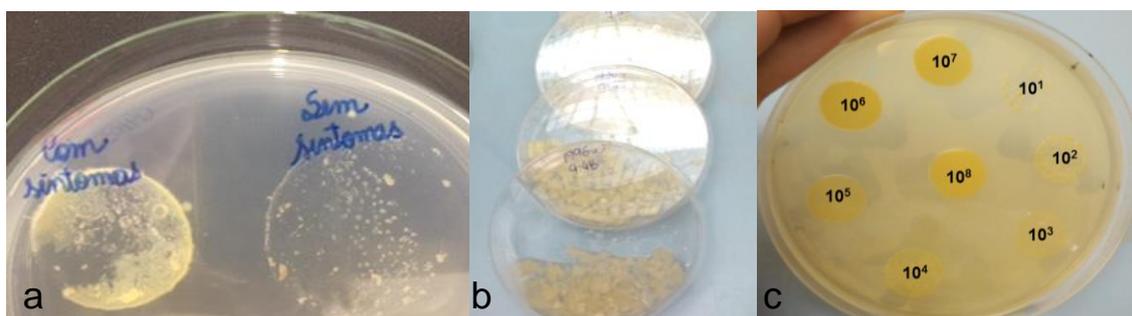


Figura 10. (a) Tissue print de toletes advindos de planta sintomática e assintomática; (b) pequenos pedaços mergulhados em água por 2hs para extração de suspensão bacteriana e posterior quantificação de amostras através da pipetagem da diluição seriada em placas de petri com meio de Wilbrink (c)

5.2.2 Extração do fluido vascular da cana-de-açúcar

Para determinar uma metodologia de extração do fluido vascular da cana-de-açúcar que proporcione fluido vascular favorável em quantidade e qualidade necessária para a detecção bacteriana por PCR, foram testadas quatro metodologias: compressor, macerado, prensa e fluxo bacteriano em água. O uso do compressor e fluxo bacteriano em água, já foram descritos acima. O macerado foi realizado cortando o colmo em pequenos pedaços (0,5cm x 0,5cm x 0,5cm) em cadinho de porcelana e macerados em tampão CTAB. Para o método da prensa foi utilizado um espremedor manual de alho e o líquido extraído foi transferido para tubos tipo eppendorf, colocados em freezer, até o dia do processamento das amostras. Para cada metodologia foi extraído fluido fibrovascular suficiente para oito tubos tipo eppendorf, possibilitando duas repetições por protocolo de extração de DNA.

5.2.3 Extração de DNA das amostras

Quatro protocolos de extração de DNA foram testados para obtenção de DNA bacteriano. Três deles foram adaptados do protocolo original (sendo dois deles protocolos simplificados e o outro um protocolo CTAB) e por último um Kit comercial para extração de DNA: Purelink Plant Total DNA Purification Kit (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. Os métodos de extração do fluido vascular da cana, foram submetidos a cada um dos protocolos de extração de DNA propostos. Assim o experimento constou de quatro metodologias de extração do fluido fibrovascular, e combinados com quatro protocolos de extração de DNA, e duas repetições para cada combinação. Os protocolos foram seguidos conforme descrição a seguir:

- Protocolo adaptado por Davis et al. (1998): cada amostra foi centrifugada à 12.000rpm por 10 min, descartou-se o sobrenadante, 50µL de TAE 1x (Tris-Acetato de EDTA) foram adicionados, e encubadas à 95°C por 10min em aparelho banho maria, resfriou em gelo por 3min, novamente aquecidas à 95°C por 10 min, o DNA extraído foi quantificado e ajustado para 20ng/mL e armazenado à -20°C até a análise por PCR.

- Protocolo adaptado por Garces et al, (2014): cada amostra foi centrifugada à 12.000rpm por 10 min, descartou-se o sobrenadante, 50µL de tampão de quebra “lysis buffer” (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1% Tween 20, pH 8.3) foram adicionados, encubadas à 95°C por 10min em aparelho banho maria, resfriadas em gelo por 3min, novo aquecimento à 95°C por 10 min, o DNA extraído foi quantificado e ajustado para 20ng/mL e armazenado à -20°C até a análise por PCR.

- Protocolo CTAB adaptado de Doyle e Doyle, (1987). O método de CTAB modificado constou de amostras de 250 mg acondicionadas em microtubos de 2mL e acrescentado de 1000 µL do tampão CTAB 2% (NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100mM (pH 8,0), EDTA 20 mM), previamente aquecido a 65 °C, e duas esferas de vidro para facilitar a ruptura das células. Não foram utilizados β-mercapto-etanol, polivinilpirrolidone (PVP) e fenol-clorofórmio nos procedimentos. Os microtubos foram incubados em banho-maria à 65 °C por uma hora, com leve agitação a cada dez minutos. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo, e adicionados 520 µL da solução CIA (clorofórmio/álcool isoamílico) 24:1 (v/v) com inversão manual continua por 96 vezes. Para a precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g

por dez minutos, e 600 μL do sobrenadante foi transferido para novos microtubos de 1,5 mL. Em seguida, acrescentaram-se 300 μL de acetato de amônio ($7,5 \text{ mol L}^{-1}$) e 600 μL de isopropanol 96 % gelado. Após ser manualmente invertidos em movimentos contínuos e suaves, a solução foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 70 % e novamente centrifugado a 12.000 g por dez minutos, sendo ressuspensionado em 50 μL de TE (Tris = 10 mM; EDTA = 1 mM, pH 8,0). Foi adicionado 1 μL de RNase A (10 mg mL^{-1}) e levado para incubação a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por trinta minutos. O DNA extraído foi quantificado e ajustado para 20ng/mL e armazenado à -20°C até a análise por PCR.

- Kit comercial de extração DNA Invitrogen: Purelink Plant Total DNA Purification Kit. Para cada amostra adicionou-se 250 μL de tampão de ressuspensão, as amostras foram vortexadas, e 15 μL de SDS à 20% RNase A (20mg/mL) foram adicionados em cada tubo. As amostras foram encubadas à 55°C por 15min e centrifugadas à 120rpm/5min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e 100 μL de tampão de precipitação (N2) foram adicionados. Misturou-se bem e encubou-se em gelo por 5 min. As amostras foram centrifugadas à 120rpm por 5 min à temperatura ambiente e 250 μL do sobrenadante foram transferidos para novos tubos com 375 μL de tampão de ligação (B4), misturou-se bem. As amostras foram repassadas para as colunas e centrifugadas à 12.000rpm por 30s, descartou-se o fluído do tubo coletor e o que restou na coluna foi lavado com 500 μL de tampão de lavagem (W5) e centrifugados à 12.000 rpm/30s, esse passo foi repetido mais uma vez, sendo que na segunda a coluna foi centrifugada à 12.000rpm/2min para descartar o excesso de tampão de lavagem. A coluna foi colocada sobreposta em tubos ependorffs estereis de 1.5 mL e fez-se uma eluição com 50 μL de tampão de eluição, encubando por 1 min e centrifugou à 12.000rpm por 1 min, esta etapa foi repetida mais uma vez. O DNA extraído foi quantificado e ajustado para 20ng/mL e armazenado à -20°C até a análise por PCR.

Ao final de todos os protocolos de extração de DNA foram feitos controle branco (controle de extração), utilizados para demonstrar a ausência de contaminação por ácido nucleico externo e controle positivo (padrão suscetível contaminada com altos níveis populacionais de *X. albilineans*).

5.2.4 Aplicação da metodologia para diferentes variedades de cana-de-açúcar

Os mesmos protocolos também foram testados em cinco diferentes variedades comerciais de cana-de-açúcar, escolhidas aleatoriamente, sem sintomas, comprovadamente infectadas por Escaldadura em folhas. Assim, o intuito foi certificar que o método de extração de DNA independe da variedade de cana analisada. As análises foram testadas em duplicata, dois colmos por variedade e duas repetições distintas. Dessa forma, neste caso, tivemos o total de 160 amostras por análise: quatro metodologias para extração de fluído fibrovascular, quatro protocolos de extração de DNA, cinco variedades e dois colmos por variedade.

5.2.5 Reações de PCR convencional

O preparo de 10- μ l mix para a reação de PCR convencional, constou de 2 μ l de uma alíquota do DNA extraído a partir de amostras do colmo ou de cultura pura de *Lxx*, 3,6 μ l de água ultrapura, 5,0 μ l de EmeraldAmp®GT PCR Master Mix e 0,2 μ l de cada primer XaAlb2-f3 CAC ACA CAC AAT ACA GCA TTG CGG e XaAlb2-r3 CCC AAC TTA CTT GAG GCT ATG G à concentração de 2,5 μ M. As condições de amplificação foram inicial à 94° C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação inicial à 94°C por 40s, anelamento à 54° por 40s e extensão à 72°C por 45s; e uma extensão final à 72°C/10 min. Nove microlitros da reação de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE, com tensão elétrica de 80 Volts, por 40min. O produto da PCR foi visualizados em translaminador UV (Loccus) e fotodocumentado. Os tamanhos dos fragmentos gerados foram estimados com base em comparações com marcador molecular 100 pb DNA Ladder.

5.2.6 Nested-PCR

Para evitar possíveis contaminações nas mudanças de tubos e manipulação do DNA “amplificado” no ato do preparo do mix e dos produtos da PCR convencional, o volume remanescente em cada microtubo (1 μ L) foi utilizado na reação de Nested- PCR. O Mix Nested-PCR foi preparado seguindo o mesmo padrão da reação de PCR convencional, mas utilizando outros pares de primers, no qual anelam dentro da região amplificada pelos primers da PCR convencional: 1 μ l do produto da PCR convencional,

descrita anteriormente, 3,6 µl de água ultrapura, 5,0 µl de EmeraldAmp®GT PCR Master Mix e 0,2 µl de cada nested-primer XaAlb2-f4 (CTT CTG CAG CTT GCT CGT C) e XaAlb2-r4 (GCT CAG TTA CGC TCA GCT AAT C) à concentração de 2,5µM. Portanto, na Nested-PCR os iniciadores utilizados na primeira rodada de amplificação foram substituídos por outros de tal forma que o DNA amplificado na PCR convencional se torna o alvo para o segundo par de primers, aumentando a sensibilidade e especificidade da PCR, ambos iniciadores foram desenvolvidos por Davis et al.(1998).

As condições de amplificação foram a mesma da reação de PCR: aquecimento inicial à 94° C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação inicial à 94°C por 40s, anelamento à 54° por 40s e extensão à 72°C por 45s; e uma extensão final à 72°C/10 min. Nove microlitros da reação de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE, com tensão elétrica de 80 Volts, por 40min. O produto da PCR foi visualizados em translaminador UV (Loccus) e fotodocumentado. Os tamanhos dos fragmentos gerados foram estimados com base em comparações com marcador molecular 100 pb DNA Ladder.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para aprimorar a detecção de *X. albilineans* em infecções latentes, foram testadas quatro metodologias de extração do fluído fibrovascular da cana-de-açúcar, combinados a quatro diferentes protocolos de extração de DNA seguidos de PCR convencional e Nested-PCR. Inicialmente o título bacteriano nos colmos de plantas sintomáticas e assintomáticas foi determinado em meio de Wilbrink. As concentrações populacionais médias nos colmos sintomáticos e assintomáticos foram muito próximas, na ordem de 10^4 UFC/mL e 10^3 UFC/mL, respectivamente. Portanto, independente da expressão dos sintomas, a bactéria *Xanthomonas albilineans* estava presente nos colmos, mas numa concentração populacional considerada baixa, mesmo para plantas sintomáticas, pois, na maioria dos casos, quando a planta expressa sintomas, a população bacteriana geralmente está acima de 10^6 CFU/mL (Garces et al., 2014).

Dentre os quatro protocolos de extração de DNA testados, os protocolos de extração de DNA que atingiram maior quantidade de DNA foram Davis et al, (1998) e Garces et al, (2014), seguidos pelo protocolo CTAB (Doyle & Doile, 1987) e Kit de extração comercial Purelink Plant Total DNA Purification Kit Invitrogen®. Os

protocolos de Davis et al, (1998) e Garces et al, (2014) extraíram maior quantidade de DNA como já era esperado, pois são considerados protocolos simples por utilizarem somente um tampão de extração de DNA, combinado a centrifugações e fervura, por isso, não houveram perdas significativas de DNA em todo o processo. O protocolo CTAB, apesar de menor quantidade, também produziu DNA em quantidade suficiente para realizações de diferentes tipos de PCR, exceto quando associado a técnica de extração do fluido vascular empregou o procedimento de fluxo bacteriano em água. Entretanto, o Kit de extração apresentou muito baixo rendimento de extração de DNA, sempre inferior a 8.5 ng/mL, independente da técnica empregada para extração do fluido vascular.

A qualidade do DNA extraído pelo protocolo CTAB, visualizada pela relação das leituras na razão 260/280nm foram superiores aos demais (Tabela 2). No entanto, a qualidade do DNA extraído, não foi fator crucial, pelo contrário, pois como as amostras utilizadas neste trabalho estavam com os níveis populacionais baixos, e sendo extraídos diretos de material vegetal, os resultados obtidos demonstram que nestes casos, seria melhor tentar preservar todo o DNA extraído, do que tentar “limpá-lo” e perder DNA alvo, usando protocolos elaborados ou Kits comerciais. Oliveira et al. (2014) afirmou que a qualidade do DNA extraído é importante quando será feito o sequenciamento das amostras, ou quando é necessário um tempo longo de estocagem de amostras ou ainda quando se fará a construção de bibliotecas genômicas para usos futuros. Além disso, para diagnose de bacterioses Gram-negativas é muito comum, o uso de DNA extraído por simples fervura no inglês “boiling” como demonstrando Nogueira et al. (2004), na qual não encontraram resultados positivos na RAPD-PCR para bactérias Gram-positivas, mas obtiveram sucesso em detectar bactérias Gram-negativas com DNA extraído por simples fervura, como também relatado por Alexopoulou et al. (2006).

Tabela 2. Concentração média de DNA (ng/mL) e qualidade de DNA determinada através da razão entre as leituras a 260 nm e 280nm, em função de protocolos de extração de DNA e a técnicas de extração do fluido vascular de colmo de cana-de-açúcar.

Técnica de Extração de Fluido	Kit		CTAB		Davis et al., 1998		Garces et al., 2014	
	ng/mL	260/280nm	ng/mL	260/280nm	ng/mL	260/280nm	ng/mL	260/280nm
compressor	5.4	1.55	57	1.86	171	1.26	234	1.21
macerado	8.5	1.45	78	1.98	218	1.14	340	1.03
prensa	4.7	1.45	92	2.00	530	1.28	625	1.26

fluxo	3.5	1.48	26	1.82	174	1.27	216	1.27
-------	-----	------	----	------	-----	------	-----	------

Independente do método de extração do fluído vascular ou do protocolo de extração do DNA, a PCR convencional não amplificou significativamente qualquer segmento do DNA genômico de *X. albilineans*, (figura não apresentada), com exceção dos controles positivos, que apresentaram uma banda de tamanho esperado para *X. albilineans* de 440 pb.

Empregando Nested-PCR, além das ampliações dos controles positivos para cada protocolo de extração de DNA testado, ampliações foram visualizadas apenas em amostras de DNA extraídos pelo protocolo adaptado de Davis et. al., (1998). As reações de Nested-PCR resultaram em um fragmento de tamanho esperado de 308 pb para *X. albilineans*, entretanto apareceu uma banda inespecífica de altura maior, em torno de 1000 pb, inclusive nos controles positivos de cada um dos protocolos testados (Figura 11).

O protocolo adaptado de Davis et al. (1998), resultou em ampliações tanto para plantas sintomáticas quanto para assintomáticas e variou em relação à técnica de extração do fluído fibrovascular. Para plantas sintomáticas obtivemos ampliações para o fluído extraído por meio do compressor, da prensa e do fluxo bacteriano em água e para plantas assintomáticas obtivemos ampliações somente para compressor e fluxo bacteriano em água (Figura 11). Já no teste de variedades, obtivemos ampliações por meio da prensa e do fluxo bacteriano em água (Figura 12).

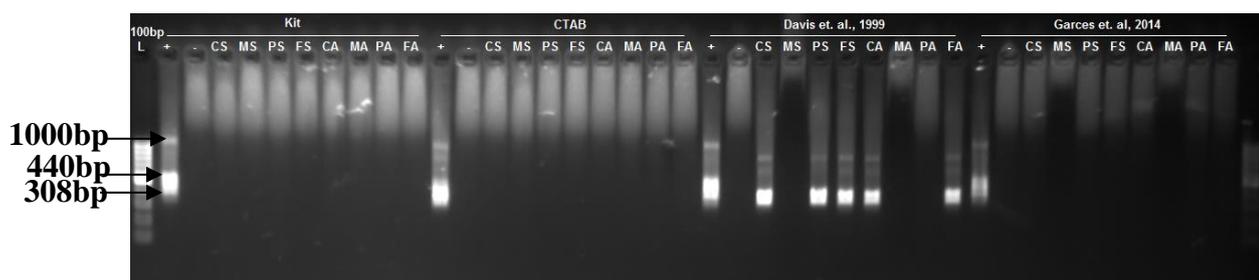


Figura 11. Resultado da reação de Nested-PCR para DNA genômico de *X. albilineans* extraídos com Kit comercial, protocolo CTAB 2X modificado, Davis *et al.*, (1998) ou Garces *et al.*, (2014) a partir de fluído fibrovascular de cana-de-açúcar sintomáticas e assintomáticas, extraídos por compressor, macerado, prensa ou fluxo em água. L= Ladder 100bp; += controle positivo da reação de Nested, para cada protocolo de extração de DNA; (-) = controle negativo (cana não infectada com a bactéria *X. albilineans*) utilizado para cada protocolo de extração de DNA; CS= compressor e cana sintomática; MS= macerado e cana sintomática; PS= prensa e cana sintomática; FS= fluxo em

água e cana sintomática; CA= compressor e cana assintomática; MA= macerado e cana assintomática; PA= prensa e cana assintomática; FA= fluxo em água e cana assintomática;

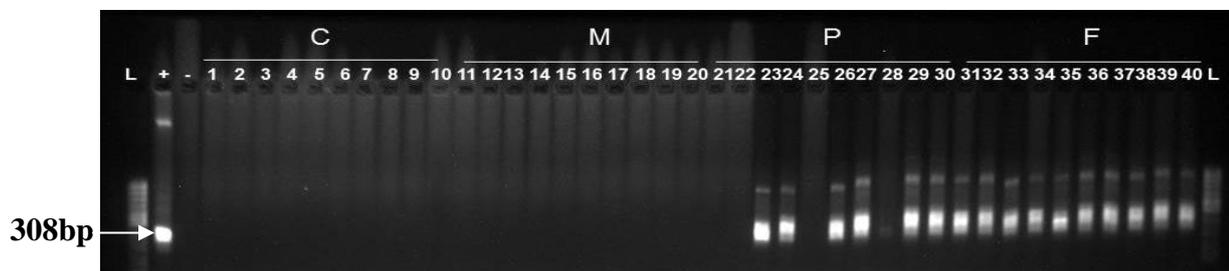


Figura 12. Resultado da reação de Nested para DNA genômico de *X. albilineans* extraídos pelo: protocolo adaptado de Davis *et al.*, 1998 a partir de fluído fibrovascular de cana-de-açúcar assintomáticas, extraídos por compressor (C), colunas 1 à 10; macerado (M) colunas 11 à 20; prensa (P) colunas 21 à 30; e fluxo em água (F) colunas 31 à 40. L= Ladder 100bp; += controle positivo da reação de Nested; (-) = controle negativo (cana não contaminada com a bactéria *X. albilineans*).

Ao testar as quatro metodologias de extração do fluído vascular da cana-de-açúcar e quatro protocolos de extração de DNA, em plantas sintomáticas e assintomáticas, com baixos índices de população bacteriana, pôde-se ter um parâmetro para considerar a detecção eficiente para no caso de infecções latentes. Nestes casos, em que a população bacteriana estava abaixo de 10^3 UFC/mL, não foi possível detectar a bactéria por meio de PCR convencional, pois o título bacteriano não foi suficiente para produzir DNA suficiente para realização da reação de amplificação, exceto nos controles positivos (fluído fibrovascular com populações acima de 10^8 UFC/mL) em que resultaram em bandas visíveis após a amplificação do DNA por PCR. Resultados semelhantes foram alcançados por Davis *et al.* (1998), pois também não obtiveram amplificações por PCR quando a população bacteriana se encontrava até 10^3 UFC/mL e Wang *et al.* (1999), quando as populações não estavam pelo menos na ordem de 10^4 UFC/mL (20 UFC/ reação de PCR). Já Pan *et al.* (1998) conseguiram detectar *X. albilineans* em 3 de 15 plantas assintomáticas.

Em relação aos protocolos de extração de DNA testados, o protocolo CTAB apresentou melhores índices de qualidade do DNA extraído, no entanto, não houveram amplificações por este protocolo, provavelmente pelas baixas concentrações de DNA bacteriano em relação ao DNA total da cana-de-açúcar. Portanto, a quantidade de DNA

bacteriano extraído não deve ter sido suficiente para as ampliações serem alcançadas. Apesar dos protocolos “simples” adaptados de Davis et al. (1998) e Garces et al. (2014) extraírem quantidades equiparáveis de DNA, o único deles que resultou em ampliações foi o protocolo adaptado por Davis et al. (1998). O tampão utilizado neste caso, foi mais eficiente em romper a parede celular e liberar o DNA para o meio do que o tampão proposto por Garces et al. (2014), já que o processo descrito é praticamente o mesmo, mudando apenas o tampão utilizado.

A PCR convencional falhou para todas as amostras, sendo elas sintomáticas ou assintomáticas. Resultados diferentes foram encontrados por Urashima & Zavaglia (2012), na qual conseguiram 100% de detecção por PCR, independentemente do tipo de sintoma apresentado. No entanto, coletaram material advindo de uma mesma touceira amostrada, em que os colmos apresentavam ou não sintomas evidentes. Assim, como os colmos amostrados eram advindos de uma mesma touceira e que já apresentava sintomas na fase aguda da doença, provavelmente a população bacteriana se encontrava em níveis populacionais bem elevados. Neste trabalho, a população bacteriana foi quantificada em cada colmo amostrado, encontrando-se baixos níveis populacionais bacterianos. Por isso a reação de NESTED-PCR foi necessária para que o DNA fosse amplificado em quantidade suficiente para que as bandas fossem visualizadas.

Quando o DNA foi extraído seguindo o protocolo adaptado por Davis et al. (1998), os primers adotados neste estudo amplificam parte da região genômica de *X. albilineans* que codifica a produção da toxina albicidina (produzida apenas por esta espécie de bactérias) cujo fragmento é da ordem de 440pb para PCR. Utilizando os produtos “amplificados” da primeira PCR como molde, os iniciadores da NESTED-PCR amplificaram uma região menor dentro da primeira, com 308 pb, deste mesmo complexo de gene.

A sensibilidade da NESTED-PCR foi comparável ao da PCR em tempo real do protocolo desenvolvido por Garces et al., (2014), no qual comparam a detecção de *X. albilineans* em amostras de cana a partir de material resistente e suscetível, sendo que em material resistente (assintomático), com baixa severidade da doença, a concentração bacteriana estava em torno de 10^2 CFU/mL e a porcentagem de detecção para tais amostras foram apenas em 8% dos casos. Ao se extrair o fluído pelo fluxo bacteriano em água e seguindo o protocolo Davis et al. (1998), chegou-se a um resultado ainda melhor, detectando um título bacteriano em torno de 10^3 CFU/mL em até 100% dos casos (Figura 12), somente adaptando o protocolo de extração de DNA sugerido pelos

mesmos autores. Com um custo mais acessível, laboratórios não equipados com termocicladores de última geração necessários para a PCR em tempo real, este protocolo pode ser realizado com duas horas a mais comparado ao tempo de 3 horas da qPCR e processa o mesmo número de amostras suportado pelo primeiro.

Trabalhamos com técnicas moleculares, pois técnicas sorológicas, como imunofluorescência, ELISA, “Dot blot” e “Tissue blot” utilizando-se anticorpos policlonais têm se mostrado eficientes ferramentas na detecção da bactéria quando esta se encontra concentrações até um limite de 10^5 ufc mL⁻¹ no extrato vascular, sendo, portanto, também métodos pouco eficientes para detecção de infecções latentes, como constatado por Ricaud et al. (1977) e Wang et al. (1999), onde os autores demonstraram que a reação sorológica não consegue detectar uma infecção latente com baixa população bacteriana. E PCR em tempo real é uma técnica bastante eficiente, mas ainda é considerada onerosa para detecção em larga escala e restrita a poucas clínicas fitopatológicas.

O diagnóstico preciso e rápido é essencial para tentar impedir que várias doenças de plantas, principalmente em estado de latência, se disseminem para outras regiões e impeçam uma futura epidemia. Em geral, o diagnóstico de doenças teve um grande avanço com a técnica de PCR (Mullis et al., 1986). A técnica de PCR convencional, entretanto, pode não ser adequada para o diagnóstico de doenças, nas quais o patógeno apresenta a estratégia de permanecer oculto em algum órgão ou tecido, quando em baixas populações, caracterizando a infecção em estado latente. Portanto, para cada patossistema, a técnica de PCR e Nested-PCR para detecção de fitopatógenos, pode e deve ser aprimorada para que se alcance uma maior sensibilidade para detecção da população nos tecidos da planta, principalmente no caso de latência, como foi demonstrado neste trabalho para detectar Escaldadura das Folhas em cana-de-açúcar.

5.4 CONCLUSÃO

A extração do fluido por meio de fluxo bacteriano em água, juntamente com o protocolo de extração de DNA adaptado por Davis et al. (1998), seguidas de PCR e Nested-PCR, com iniciadores também sugeridos por Davis et al. (1998), podem ser utilizados para detecção de Escaldadura das folhas em cana-de-açúcar, tanto para plantas sintomáticas quanto para assintomáticas, em altas ou em baixas densidades

populacionais, e por utilizar método simplificado de extração de DNA das amostras, é factível também em larga escala.

5.5 REFERENCIAS

ALEXOPOULOU K, FOKA A, PETINAKI E, JELASTOPULU E, DIMITRACOPOULOS G, SPILIOPOULOU I. Comparison of two commercial methods with PCR restriction fragment length polymorphism of the tuf gene in the identification of coagulase-negative staphylococci. **Lett Appl Microbiol.**;43:450-4, 2006.

BAER, W. A industrialização e o desenvolvimento econômico do Brasil. Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas, 1965.

CALMON, P. História social do Brasil: espírito da sociedade colonial. v. 1, São Paulo: Martins Fontes, 2002. 80p.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A., DE ABREU, H. M. C., ARRUDA, P., BESPALHOK FILHO, J. C., BURNQUIST, W. L., CRESTE, S., DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; FIGUEIRA, A. V. O.; FILGUEIRAS, T. S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; GUZZO, E. C.; HOFFMAN, H. P.; LANDELL, M. G. A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F. C.; ROMANO, E.; SILVA, W. J.; FILHO, M. C. S.; CÉSAR ULIAN, E. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, Bethesda, USA: 4(1), 62–89, 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar (safra 2014/2015)**. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_08_28_08_52_35_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_2014-15.pdf>. Acesso em: 01 abril. 2016.

DAVIS, M.J.; ROTT, P.; ASTUA-MONGE, G. Nested, multiplex PCR for detection of both *Clavibacter xyli* and *Xanthomonas albilineans* in sugarcane. **ICPP Paper**, Gainesville n. 3.3.4, 1998.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; GIL, M. A. Estimativa do nível de dano econômico de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: cercopidae) em cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 1, p. 81-88, 2007.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

GARCES, F. F., GUTIERREZ, A., AND HOY, J. Detection and quantification of *Xanthomonas albilineans* by qPCR and potential characterization of sugarcane resistance to leaf scald. **Plant Dis.** Iowa v. 98:121-126, 2014.

HONEYCUTT, R. J.; SOBRAL, B. W. S.; MCCLELLAND, M. tRNA intergeneric spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology**, New York, v. 141, n. 5, p. 3229 - 3239, 1995.

MARTIN, J. P.; ABBOTT, E. V.; HUGRES, C. G. (Ed.). **Sugarcane diseases of the world**. New York: Elsevier, 1961; 109 - 126 p.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**: 51(Part 1): 263-73, 1986.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G. (Org.). A dimensão do setor Sucoenergético: mapeamento e quantificação da safra 2013/14. Markestrat, **Fundace**. Ribeirão Preto: FEA- RP/USP, 2014.

NOGUEIRA, C. A. M; MOMESSO, C. A. S; MACHADO, R. L. D; DE ALMEIDA, M. T. G; ROSSIT, A. R. B. Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. **Rev Panam Infectol**; 6:35-8, 2004.

OLIVEIRA, C.F.; PAIM, T.G.S.; REITER, K.C.; RIEGER, A. & D'AZEVEDO, P.A. Evaluation of four different DNA extraction methods in coagulase-negative staphylococci clinical isolates. **Rev. Inst. Med. Trop.** Sao Paulo, 56 (1): 29-33, 2014.

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

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

RICAUD, C.; SULLIVAN, S.; FELIX, S.; FERRE, P. Comparison of serological and inoculation methods for detecting latent infection of leaf scald. In: Congress of the International Society of SugarCane Technologists. 1977. **Resumos..** São Paulo.p 439 - 448.

RICAUD, C., AND RYAN, C. C. Leaf scald. in: Diseases of Sugarcane. Major Diseases. C. RICAUD, B. T. EGAN, A. G. GILLASPIE JR. AND C. G. HUGHES, eds.Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 39-53p, 1989.

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

ROTT, P. AND DAVIS, M. J. “Leaf Scald” In: “**A guide to sugarcane diseases.**” P. ROTT, R.A. BAILEY, J.C. COMSTOCK, B.J. CROFT, A.S. Saumtally (eds.). CIRAD-ISSCT. ISBN 2-87614386-0. p. 38-44, 2000.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da Cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. São Paulo, 2005. 197 - 223 p.

URASHIMA, A.S., ZAVAGLIA, A.C. Comparação de dois métodos diagnósticos de escaldadura-das-folhas (*Xanthomonas albilineans*) da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, Botucatu. V.38, n.2, p.155-158, 2012.

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

COMPARISON OF LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP), POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR), AND SELECTIVE ISOLATION ASSAYS FOR DETECTION OF *Xanthomonas albilineans* FROM SUGARCANE. Duarte Dias, V., Fernandez, E., Cunha, M. G., Pieretti, I., Roumagnac, P., Comstock, J. C., and Rott, P. 2016. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), polymerase chain reaction (PCR), and selective isolation assays for detection of *Xanthomonas albilineans* from sugarcane.

ABSTRACT

A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay was developed and compared to polymerase chain reaction (PCR), nested PCR, and selective isolation assays for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald. The pathogen was isolated on selective medium from 44 of 45 (98%) samples taken from symptomatic stalks, and from 43 of 70 (61%) samples from asymptomatic stalks but collected from plots with symptomatic stalks. Forty two (93%), 41 (91%), and 42 (93%) symptomatic samples tested positive by LAMP, PCR and nested PCR, respectively. The pathogen was detected in 19 (27%), 8 (11%), and 25 (36%) of the 70 asymptomatic samples by LAMP, PCR and nested PCR, respectively. Symptomatic stalks were mainly, but not always, associated with high populations of the pathogen (10^7 - 10^9 CFU/ml), and asymptomatic stalks with low populations ($<10^3$ CFU/ml) or no bacteria. Although LAMP and nested PCR detected 10 CFU/ml of *X. albilineans* from pure culture, these techniques sometimes failed to detect the pathogen in samples with low pathogen populations. More than one technique should therefore be used for detection of the pathogen in asymptomatic stalks, especially in quarantine programs. This new LAMP assay will be useful to rapidly diagnose *X. albilineans* from sugarcane.

6.1 INTRODUCTION

Xanthomonas albilineans is a xylem-invading bacterial pathogen that causes leaf scald, one of the major diseases of sugarcane (Rott and Davis 2000). This pathogen colonizes the vascular system of sugarcane leaves and stalks, but it is also able to infect parenchyma cells of the sugarcane plant, a unique feature among cultivable bacterial pathogens (Mensi et al. 2014). Plants infected with *X. albilineans* can display various symptoms during disease progress. Characteristic “white pencil lines” surrounding invaded vascular bundles (hence the epithet *albilineans*) can be seen along the leaf blade. Once the pathogen is well established within the stalk, leaves can emerge with extensive white chlorosis while the pathogen is often absent in these chlorotic leaves (Martin et al., 1932; Orian, 1942; Birch, 2001). These chlorotic symptoms are due to the toxin albicidin produced by the pathogen. Albicidin inhibits differentiation of chloroplasts and is a potent DNA gyrase inhibitor whose chemical structure was only recently characterized (Cociancich et al. 2015).

Other symptoms include necrosis spreading from the leaf margins along the invaded bundles (scalding), red vascular streaks and cavity formation in stalks, growth of side shoots from nodal buds along the stalk, stunting, wilting and rapid death in highly susceptible varieties with the acute form of the disease (Ricaud and Ryan 1989; Rott and Davis 2000). These symptoms can be explained as consequences of xylem blockage and the diffusion of metabolic wastes, when the pathogen multiplies and reaches high populations in invaded xylem elements (Birch et al, 2001). However, in most cases, disease symptoms are not visually noticeable because of latent infection. Sugarcane stalks can be infected by *X. albilineans* for several weeks or months without exhibiting symptoms (Rott and Davis, 2000). Thus, bacteria can multiply and spread without being detected, especially in the beginning of the plant cycle due to latent infections (Comstock and Irej, 1992). Use of efficient diagnostic tools is therefore needed to detect the pathogen as early as possible in symptomless plants, especially in seed-cane nurseries and in breeding or quarantine programs.

Several diagnostic techniques have been developed and are currently available to detect and identify *X. albilineans* from infected stalks such as isolation on Wilbrink's medium (Ricaud and Ryan 1989) or on a semi-selective medium (Davis et al. 1994), serological methods using monoclonal or polyclonal antiserum (Alvarez et al. 1996; Comstock and Irey 1992; Rott et al. 1994), polymerase chain reaction (PCR) methods (Jaufeerally et al. 2002; Pan et al. 1998; Wang et al. 1999), and quantitative PCR (qPCR) (Garces *et al.* 2014). However, all these techniques are time consuming or request specialized equipment and materials, and there is a need for new, easy, rapid and simple methods that require only a few reagents and basic laboratory equipment for reaction processing. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), which was recently developed for detecting several bacterial, fungal and viral pathogens, fulfills these conditions (Mori et al. 2001; Nagamine et al. 2002; Notomi et al. 2000). LAMP is an auto-cycling strand displacement DNA synthesis method involving the use of the large fragment of *Bst* DNA polymerase and a set of four to six primers (Nagamine et al. 2002). This method enables the synthesis of larger amounts of both DNA and byproducts that can, for example, be visualized using a metal ion indicator such as hydroxyl naphthol blue (HNB) (Goto et al. 2009).

LAMP assays have recently been developed for several sugarcane pathogens such as *Colletotrichum falcatum* causing red rot (Chandra et al. 2015), *Sugarcane mosaic virus* and *Sorghum mosaic virus* causing mosaic (Keizerweerd et al. 2015), *Sugarcane yellow leaf virus*, the causal agent of yellow leaf (Amata et al. 2016), and *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* causing ratoon stunting (Ghai et al. 2014; Liu et al. 2013). In this study, we developed a colorimetric LAMP assay for rapid and easy identification of *X. albilineans*, and we compared its efficacy with PCR, nested PCR and selective isolation using symptomatic and symptomless sugarcane stalks.

6.2 MATERIAL AND METHODS

6.2.1 Plant material and sample preparation

Seventy three 14-15 month-old stalks were sampled in spring 2015 from 30 sugarcane varieties in selection stage II (2013 series) at the USDA-ARS Sugarcane Field Station in Canal Point FL (Supplementary Table 1). Among those, 27 stalks exhibited leaf scald symptoms and 46 were symptomless. A 10-cm piece was taken from the lower third of each stalk, and additional 10-cm pieces were also taken from the upper and medium third of 21 stalks, yielding a total 115 stalk samples. As a result, the sample collection contained 45 stalk samples from symptomatic stalks and 70 samples from asymptomatic stalks but collected from plots with symptomatic stalks (Supplementary Table 1).

The outer surface of the stalks pieces was cleaned with absorbent paper and ethanol in the laboratory. A transversal stalk tissue section (approximately 6 g of tissue) was aseptically removed from each piece and cut into small fragments in a Petri dish containing 1-2 ml of sterile distilled water. The tissue homogenates were maintained at room temperature without agitation for 2 h, and then transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes and vortexed. A subsample of each homogenate was used to determine the number of CFU/ml of *X. albilineans* as described below and the remaining homogenate was stored at -20°C until further processing (DNA extraction and detection of the pathogen by LAMP, PCR and nested PCR).

6.2.2 Isolation of *Xanthomonas albilineans* on selective medium and determination of pathogen population densities.

Tenfold serial dilutions of each homogenate were plated in triplicate on Wilbrink's medium (10 g sucrose, 5 g bacto-peptone, 0.5 g K₂HPO₄·3H₂O, 0.25 g MgSO₄, 1 liter deionized water, pH 6.8-7.0) supplemented with cephalixin (25

mg/liter), novobiocin (30 mg/liter), and cycloheximide (50 mg/liter) (Davis et al. 1994). Bacterial colonies were counted after 4-5 days of incubation at 28°C.

6.2.3 DNA extraction from sugarcane stalk samples

Two DNA extraction protocols were used. The first one was a modification of the protocol described by Davis et al. (1998) and was used for the LAMP assays. One ml of each stalk homogenate was transferred to a 1.5-ml tube and centrifuged for 10 min at 500 x g (2240 rpm, Eppendorf Centrifuge 5430). A 0.8-ml portion of the supernatant was then centrifuged for 10 min at 16,050 x g (12,700 rpm). The supernatant was discarded, and the pellet was suspended in 10 µl of Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer amended with 0.4% Carnation nonfat dry milk. Samples were incubated in a water bath at 100°C for 10 min and then in an ice/alcohol bath for 3 min.

The second DNA extraction protocol was a modification of the protocol described by Garces et al. (2014) and was used for the PCR assays. One ml of each stalk homogenate was transferred to a 1.5-ml tube and centrifuged at 500 x g for 10 min. A 0.8 ml portion of the supernatant was then centrifuged at 16,050 x g for 5 min. The supernatant was discarded, and the pellet was suspended in 100 µl or 10 µl of lysis solution (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1% Tween 20, pH 8.3) for processing of the PCR1 and the PCR2 assay, respectively. After vortex mixing, samples were incubated in a water bath at 95°C for 10 min and then in an ice/alcohol bath for 3 min.

6.2.4 DNA extraction from *Xanthomonas albilineans* strains.

Nine strains of *X. albilineans* representing the genetic diversity of this pathogen were used (Champoiseau et al. 2006): HVO005 from Burkina Faso, MTQ032 from Martinique, USA048 from Florida, TWN052 from Taiwan, LKA070 from Sri Lanka, FIJ080 from Fiji, GPE PC86 from Guadeloupe, and REU174 and REU209 from Reunion Island. Pure cultures of bacterial strains were grown for 48 h at 28°C in Wilbrink's liquid medium before isolation of total genomic DNA using the Qiagen DNeasy Tissue extraction kit (Qiagen SA, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's recommendations. One and 2 µl of 1/10 diluted total DNA were used in the LAMP and PCR reaction mix, respectively.

6.2.5 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primer design

Sequence of *albXIV* (XALc_1515; Pieretti et al. 2009) was chosen for designing LAMP primers. This ORF is highly conserved among strains of *X. albilineans* (Pieretti et al., unpublished data). It encodes a putative efflux pump transmembrane protein of albicidin, a toxin which is only known to be produced by the sugarcane leaf scald pathogen. Primer Explorer (Eiken Chemical Co, Ltd, <http://primerexplorer.jp/e/>) was used to design a set of four primers: two outer primers (F3 and B3) and two inner primers (FIP and BIP) (Table 1). Primers were synthesized by Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT).

6.2.6 LAMP assays

LAMP-1 and LAMP-2 assays were both based on the LAMP reaction described by Goto *et al.* (Goto et al. 2009) that uses hydroxy naphthol blue (HNB) colorimetric detection. The two assays were carried out in 25- μ l reaction mixtures containing 1 μ l of DNA extracted from stalk samples or pure culture suspensions of *X. albilineans*, 1.6 μ M each of FIP and BIP primers (Table 1), 0.2 μ M each of F3 and B3 (Table 1), 1.36 mM of each dNTP, 8 U of *Bst* DNA polymerase large fragment (New England Biolabs), and 120 μ M HNB in 2.5 μ l of 10X ThermoPol Reaction Buffer (New England BioLabs). The LAMP reaction mixture also contained 6 mM (LAMP-1 assay) or 4 mM (LAMP-2 assay) MgSO_4 . All reaction mixtures were incubated at 63°C for 90 min and then heated at 85°C for 5 min in a Biometra Thermal Cycler.

6.2.7 Polymerase chain reaction (PCR) assays

Two different protocols were tested and primers were all synthesized by IDT. Protocol 1 (PCR-1) was based on the protocol described by Renier et al. (2007). The 25- μ l PCR reaction mix contained a 2- μ l aliquot of DNA extracted from stalk samples or pure culture suspensions of *X. albilineans*, 8.35 μ l of nuclease free water, 12.5 μ l of FailSafeTM PCR 2X PreMix (Epicenter), 1 μ l of each of 2.5 μ M NRPS2-For and NRPS2-Rev primers (Primer set PCR Xa-1; Table 1), and 0.15 μ l of Taq DNA polymerase (Fisher Scientific). The conditions of amplification were as follows: an initial step at 94°C for 2 min; followed by 35 cycles of DNA denaturation at 94°C for

40 s, annealing at 54°C for 40 s, and extension at 72°C for 45 s; and a final extension at 72°C for 10 min.

Protocol 2 (PCR-2) was performed as described by Garces *et al.* (2014). The 25- μ l PCR reaction mix contained a 2- μ l aliquot from each DNA extract (stalk sample or pure culture of *X. albilineans*), 12.5 μ l of GoTaq master mix (2X; Promega BioSciences), 0.1 μ l of each forward and reverse primer (Primer set PCR Xa-2; 100 μ M; table 1), 10.16 μ l of nuclease-free H₂O, and 0.14 μ l of bovine serum albumin fraction V (100 μ g/ μ l). The conditions of amplification were as follows: an initial step at 94°C for 4 min; followed by 31 cycles of DNA denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, and polymerization at 65°C for 3 min; and a final extension at 65°C for 3 min. The PCR products were subject to electrophoresis in 1.0% agarose gel in TAE buffer, stained with SYBR® Safe (ThermoFisher Scientific), and viewed with a G:BOX imaging system (Syngene).

6.2.8 Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) assay

Nested PCR was performed as described above (PCR-2 protocol) using a 2- μ l aliquot of the PCR-2 product and 0.1 μ l of each forward and reverse primer of PCR Xa2 nested primer set (100 μ M; Table 1).

6.2.9 Sensitivity of detection of *Xanthomonas albilineans* from pure cultures

Strain XaFL14-1 freshly isolated from diseased sugarcane cultivar CP13-2128 was used to determine the detection limit of the pathogen using all assays described above. Tenfold serial dilutions of bacteria in sterile deionized water were prepared from initial suspensions of 10⁸ CFU/ml. DNA was extracted from each suspension as described above with homogenates obtained from stalk samples. Bacterial population densities were determined by plating in triplicate the 10-fold dilutions on plates containing Wilbrink's medium. The CFUs of *X. albilineans* were counted after 4-5 days of incubation at 28°C.

6.3 RESULTS

6.3.1 Optimization of the LAMP assay

Initial LAMP reaction mix contained 0.8 M betaine as described in other protocols (Amata et al. 2016). However, in our hands, this product resulted in almost indiscriminating color changes between positive and negative samples, and it was therefore removed from the reaction mix. The LAMP-1 protocol that was first tested contained 6.0 mM MgSO₄ (1.5 µl of a 100 mM solution). Because this protocol revealed to lack sensitivity in preliminary trials, we tested addition of different amounts of MgSO₄ to the reaction mix: 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, and 2 µl of a 100 mM MgSO₄ solution. Addition of only 1 µl of this solution significantly increased sensitivity of the method, and was subsequently used for protocol LAMP-2. Three different incubation period (60, 75 and 90 min) and two reaction temperature (60°C and 63°C) were also tested and best results were obtained at 63°C for 90 min using pure culture suspensions of *X. albilineans* and a few plant samples (data not shown). Although LAMP-1 assay containing 6 mM MgSO₄ seemed to be less sensitive than LAMP-2 assay containing 4 mM MgSO₄, both assays were used for detection of the leaf scald pathogen in the stalk samples.

6.3.2 Detection limit of *Xanthomonas albilineans* in deionized water suspensions using LAMP and PCR assays

LAMP-1 assay detected up to 10⁴ CFU/ml prepared with a pure culture of *X. albilineans* strain XaFL14-1, whereas as few as 10 CFU/ml (= 1 bacterial cell in the reaction tube) resulted in a positive reaction with the LAMP-2 assay (Table 2 and Fig. 1). PCR-1 and PCR-2 assays detected up to 10⁵ and 10³ CFU/ml, respectively, but a bacterial concentration as low as 10 CFU/ml tested positive by nested PCR-2 (Table 2 and Fig. 2).

6.3.3 Detection of *Xanthomonas albilineans* in sugarcane stalks with and without leaf scald symptoms.

Six different assays were used to detect *X. albilineans* in 115 sugarcane stalk samples: isolation of bacteria on selective medium, LAMP-1, LAMP-2, PCR-1, PCR-2, and nested PCR-2 assays (Table 3). The pathogen was isolated on selective medium from 44 of 45 (98%) samples taken from plants exhibiting disease symptoms (Table 3). The sample that failed to yield colonies of the pathogen on the culture medium was taken from the upper part of a stalk that was dead for several weeks. A few colonies of the pathogen were, however, recovered from the medium and basal sections of that stalk. *X. albilineans* was detected in 41 (91%), 42 (93%), 41 (91%), 41 (91%), and 42 (93%) of the 45 samples using LAMP-1, LAMP-2, PCR-1, PCR-2, and nested PCR-2 assays, respectively. The four stalk samples that tested negative with the molecular assays were colonized with very low populations of the pathogen and were taken from stalks killed by *X. albilineans* (see below).

X. albilineans was isolated from 43 of 70 (61%) samples that were obtained from stalks that were symptomless. Fifty four of the 70 symptomless samples originated from sugarcane varieties that had stalks exhibiting leaf scald symptoms in the same stool or in different stools. The remaining 16 samples were obtained from varieties that did not show any leaf scald symptom in the selection field. Comparatively to isolation on selective medium, *X. albilineans* was detected in less asymptomatic stalks using molecular assays. Only two of the 70 (3%) tested positive using the LAMP-1 and PCR-1 assays. *X. albilineans* was detected in 19 (27%), 8 (11%), and 25 (36%) asymptomatic samples using LAMP-2, PCR-2, and nested PCR-2 assays, respectively.

6.3.4 Relationship between disease symptoms, population size of *Xanthomonas albilineans* and detection limit of the pathogen.

Pathogen population densities were higher than 10^6 CFU/ml in 41 of 45 (91%) samples taken from symptomatic stalks, and the bacterial concentration in 31 of these samples was even higher than 10^8 CFU/ml (Table 4). Regarding the four remaining samples, the pathogen was not isolated from one sample and the three others had low bacterial populations (less than 10^3 CFU/ml). These four samples were all taken from

dead plants showing the characteristic scalding aspect of the leaves and stalk side shoots with severe necrosis. The 41 samples infected by more than 10^6 CFU/ml all tested positive by LAMP-2 and PCR-2 or nested PCR-2. One of the four samples that were infected with populations of *X. albilineans* lower than 10^3 CFU/ml tested positive, and the other three samples tested negative for both LAMP-2 and nested PCR-2.

The pathogen was detected by isolation on selective medium in 44 of 70 (63%) samples that were taken from plants showing no symptoms of leaf scald. Population size of *X. albilineans* in these infected samples varied from 10 to 10^7 CFU/ml (Table 4). However, the populations of the pathogen were relatively low (10^2 - 10^4 CFU/ml) in 40 of these samples, and only four samples had bacterial concentrations higher than 10^4 CFU/ml. Thirteen (33%) and 19 (48%) of the 40 samples with bacterial concentrations varying between 10^2 and 10^4 CFU/ml tested positive by LAMP-2 and PCR-2 (or nested PCR-2), respectively. The four samples infected by more than 10^4 CFU/ml all tested positive by LAMP-2 and PCR-2 (or nested PCR-2). Two samples from which the pathogen was not isolated on selective medium showed a positive reaction by LAMP-2, suggesting occurrence of DNA from dead cells of *X. albilineans* in these samples or bacteria unable to grow because of antibiotic sensitivity.

High populations of the pathogen (10^7 - 10^9 CFU/ml) were isolated from samples taken from the lower, medium and upper third of stalks exhibiting symptoms (Table 5). Similarly, low populations of the pathogen (10 - 10^4 CFU/ml) were found in all three stalk locations from symptomless plants.

6.3.5 Identification of genetic variants of *Xanthomonas albilineans* by LAMP and PCR assays

The nine strains of *X. albilineans* representing the genetic diversity of the pathogen all tested positive by LAMP-2 and PCR-2 assays.

6.4 DISCUSSION

Proper diagnosis of plant diseases depends on accurate detection and identification of pathogens from plant samples (López et al. 2009; Miller et al. 2009). Selective isolation, PCR and LAMP assays were herein all efficient for detecting *X. albilineans* in sugarcane plants showing symptoms. With a few exceptions (dead stalks), pathogen population densities in sampled tissue were high enough ($>10^6$ CFU/ml) to be above the detection limits of these techniques and to result in positive testing. Detection threshold is a critical factor to be considered when using a technique for diagnosis or detection of a pathogen. In our study, the detection limit of *X. albilineans* by PCR in water suspensions prepared with pure cultures of the pathogen (10^3 CFU/ml) was similar to the one reported by Garces and collaborators (2014). However, LAMP and nested PCR assays detected bacterial concentrations that were 100 times lower (10 CFU/ml or one bacterial cell per reaction tube) and this detection limit was similar to the one recently reported for the detection of *X. albilineans* by real-time quantitative PCR (Garces et al. 2014).

Selective isolation on culture medium proved to be the most sensitive method to detect the leaf scald pathogen in asymptomatic samples infected with very low bacterial populations (10 - 10^3 CFU/ml). Although PCR or nested PCR and LAMP were efficient in detecting these low populations in bacterial suspensions prepared with pure cultures of the pathogen, these methods failed to yield a positive result in over 50% of the sugarcane samples with population densities between 10 and 10^3 CFU/ml (Table 4). Occurrence of amplification inhibitors in these samples, or other technical issues such as pipetting errors due to low bacterial cell density and pelleting bacteria in a sucrose containing environment, may explain this result. LAMP was found efficient in detecting 10 CFU/reaction of pure culture of *Pseudomonas fuscovaginae* (Ash et al. 2013), *Erwinia amylovora* (Bühlmann et al. 2013), and *Ralstonia solanacearum* (Lenarčič et al. 2014), but detection threshold in plant samples was at least 100 times higher for these pathogens. The detection limit of 10^2 - 10^4 CFU/ml observed in our samples from

symptomless sugarcane plants is in agreement with other studies that used serological and molecular assays for detection of *X. albilineans* (Davis et al. 1998; Wang et al. 1999). Detection threshold of LAMP assays developed recently for other xanthomonads varied from 18 CFU per sample (Rigano et al. 2010) to 10^4 - 10^5 CFU/ml (Lang et al. 2014).

The detection limit of bacterial pathogens using molecular techniques depends on the nature of the sample (pure culture, diseased plant tissue) and the DNA extraction procedures, but also optimized reaction for DNA amplification. Concentration of $MgCl_2$ is critical in LAMP assays when HNB is used as a visualization agent (Ghai et al. 2014; Liu et al. 2013). In our study, reducing the initial amount of $MgCl_2$ in the reaction mix from 6 mM (LAMP-1 assay) to 4 mM (LAMP-2 assay) allowed us to improve the detection of *X. albilineans* both in suspensions from pure cultures of the pathogen and in plant samples. Consequently, LAMP-2 protocol was more sensitive than LAMP-1 protocol. Similarly, initial use of betaine as an enhancing agent in the amplification reaction proved to have a negative effect, and was therefore removed from the reaction mixture. Different primer sets and polymerases were used in the PCR-1 and PCR-2 protocols and PCR-2 protocol followed by nested PCR was the most sensitive PCR assay.

Two samples from which *X. albilineans* was not isolated on selective medium tested positive by LAMP in repeated assays. These two samples were taken from symptomless plants and, although the occurrence of non-cultivable or dead cells of *X. albilineans* cannot be ruled out, these data can be considered as false-positive results because the samples also tested negative by nested PCR-2 which is as sensitive as the LAMP-2 assay. False-positive results were reported in LAMP assays for other plant pathogens such as *X. oryzae* pv. *oryzae* (Lang et al. 2014) and *Erwinia amylovora* (Bühlmann et al. 2013). Therefore, critical samples should always be analyzed using at least two different techniques.

Sugarcane is known to be a latent disease and stalks can be infected by *X. albilineans* for several weeks or months without showing symptoms (Rott and Davis 2000). Asymptomatic sugarcane plants can be infected with high population densities of the pathogen, especially in the lower part of the stalk (Rott et al. 1997), but also with very low populations as shown in this study. These low populations were found in different stalk locations (Table 5), and sampling more than one sample per stalk should be considered when detecting *X. albilineans* in asymptomatic plants for quarantine

purposes. In the plants sampled in this study, leaf scald symptoms were associated most of the time with high populations of the pathogen (> 90% of the samples). The few samples with low or undetectable populations were associated with stalks killed by *X. albilineans*, thus suggesting that the pathogen cannot survive in dead tissue for a long period of time.

The primers and LAMP assay were validated on a collection of *X. albilineans* strains representing the genetic diversity of the leaf scald pathogen. This assay will therefore be useful to diagnose the presence of *X. albilineans* in samples originating from any sugarcane growing location, especially for quarantine purposes, seed-cane certification and epidemiological studies. An advantage of LAMP over other molecular detection assays such as PCR and qPCR is that sophisticated equipment is not required to perform LAMP. Another advantage of the assay developed in this study is that no dye needs to be added postreaction as it is the case for other LAMP protocols in which a dye needs to be added after opening the tube. LAMP assays are very sensitive and opening tubes postreaction may result in aerosolization of the amplicons and subsequent cross-contamination between samples (Goto et al. 2009). Use of HNB as a colorimetric reagent proved to be very efficient in the protocol developed herein for *X. albilineans*. Additionally, LAMP assays have proven to be simple, cost-effective, specific, sensitive, and rapid (Saharan et al. 2014). This new LAMP assay will therefore be useful for researchers and diagnosticians to rapidly diagnose the presence of *X. albilineans* in sugarcane plants showing symptoms of leaf scald, but also to detect the pathogen in asymptomatic plants in addition to previously developed detection methods.

6.5 ACKNOWLEDGEMENTS

Vanessa Duarte Dias was supported by a fellowship from the Brazil Scientific Mobility Program sponsored by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). This work would not have been possible without the financial support of the Florida Sugarcane League.

6.6 LITERATURE CITED

ALVAREZ, A. M., SCHENCK, S., AND BENEDICT, A. A. Differentiation of *Xanthomonas albilineans* strains with monoclonal antibody reaction patterns and DNA fingerprints. **Plant Pathol.** 45:358-366, 1996.

AMATA, R. L, FERNANDEZ, E., FILLOUX, D., MARTIN, D., ROTT, P., AND ROUMAGNAC, P. Prevalence of *Sugarcane yellow leaf virus* in sugarcane producing regions in Kenya revealed by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method. **Plant Dis.** 100:in press, 2016.

ASH, G. J., LANG, J. M., TRIPLETT, L. R., STODART, B. J., VERDIER, V., VERA CRUZ, C., ROTT, P., AND LEACH, J. E. Development of a genomics-based LAMP (loop-mediated isothermal amplification) assay for detection of *Pseudomonas fuscovaginae* from rice. **Plant Dis.** 98:909-915, 2014.

BIRCH, R. G. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. **Mol. Plant Pathol.** 2:1-11, 2001.

BÜHLMANN, A., POTHIER, J. F., REZZONICO, F., SMITS, T. H. M., ANDREOU, M., BOONHAM, N., DUFFY, B., AND FREY, J. E., *Erwinia amylovora* loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight. **J. Microbiol. Methods** 92:332-339, 2013.

CHAMPOISEAU, P., DAUGROIS, J.-H., GIRARD, J.-C., ROYER, M., AND ROTT P. C. Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. **Phytopathology** 96:33-45, 2006.

CHANDRA, A., KEIZERWEERD, A. T., QUE, Y., AND GRISHAM, M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of *Colletotrichum falcatum* causing red rot in sugarcane. **Mol. Biol. Rep.** DOI 10.1007/s11033-015-3875-9, 2015.

COCIANCICH, S., PESIC, A., UHLMANN, S., PETRAS, D., KRETZ, J., SCHUBERT, V., VIEWEG, L., DUPLAN, S., MARGUERETTAZ, M., NOËLL, J., PIERETTI, I., HÜGELLAND, M., KEMPER, S., ROTT, P., ROYER, M., AND SÜSSMUTH, R. D. The gyrase inhibitor albicidin consists of para-aminobenzoic acids and cyanoalanine. **Nature Chem. Biol.** DOI:10.1038/NCHEMBIO.1734, 2015.

COMSTOCK, J. C., AND IREY, M. S. Detection of the sugarcane leaf scald pathogen *Xanthomonas albilineans*, using tissue blot immunoassay, ELISA, and isolation techniques. **Plant Dis.** 76:1033-1035, 1992.

DAVIS, M. J., ROTT, P., AND ASTUA-MONGE, G. Nested, multiplex PCR for detection of both *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and *Xanthomonas albilineans* in sugarcane. In: Offered papers abstracts, Vol. 3, 7th Intl. Congress Plant Pathol., Edinburgh, Scotland. 9-16 August 1998. Abstract 3.3.4. Edinburgh, **Intl. Soc. Plant Pathol.**, 1998.

DAVIS, M. J., ROTT, P., BAUDIN, P., AND DEAN, J. L. Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. **Plant Dis.** 78:78-82, 1994.

GARCES, F. F., GUTIERREZ, A., AND HOY, J. Detection and quantification of *Xanthomonas albilineans* by qPCR and potential characterization of sugarcane resistance to leaf scald. **Plant Dis.** 98:121-126, 2014.

GHAJ, M., SINGH, V., MARTIN, L. A., MCFARLANE S. A., VAN ANTWERPEN T., AND RUTHERFORD, S. A rapid and visual loop-mediated isothermal amplification assay to detect *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* targeting a transposase gene. **Lett. Appl. Microbiol.** 59:648-657, 2014.

GOTO, M., HONDA, E., OGURA, A., NOMOTO, A., AND HANAKI, K. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. **Bio Tech.** 46:167-172, 2009.

JAUFEEERALLY-FAKIM, Y., AUTREY, J. C., TOTH I., DANIELS, M., AND DOOKUN, A. Amplification polymorphism among *Xanthomonas albilineans* strains, using a single oligonucleotide primer. **Eur. J. Plant Pathol.** 108:121-130, 2002.

KEIZERWEERD, A. T., CHANDRA, A., AND GRISHAM, M. P. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the detection of *Sugarcane mosaic virus* and *Sorghum mosaic virus* in sugarcane. **J. Virol. Methods** 212:23-29, 2015.

LANG, J. M., LANGLOIS, P., NGUYEN, M. H. R., TRIPLETT, L. R., PURDIE, L., HOLTON, T. A., DJIKENG, A., VERA CRUZ, C. M., VERDIER, V., AND LEACH, J. E. Sensitive detection of *Xanthomonas oryzae* pathovars *oryzae* and *oryzicola* by loop-mediated isothermal amplification. **Appl. Environ. Microbiol.** 80:4519-4530, 2014.

LENARČIČ, R., MORISSET, D., PIRC, M., LLOP, P., RAVNIKAR, M., AND DREO, T. Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. **PLoS ONE** 9(4):e96027, 2014.

LIU, J., XU, L., GUO, J., CHEN, R., GRISHAM, M. P., AND QUE, Y. Development of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane. **BioMed Res. Intern.** Volume 2013, Article ID 357692, 8 pages, 2013.

LÓPEZ, M. M., LLOP, P., OLMOS, A., MARCO-NOALES, E., CAMBRA, M., AND BERTOLINI, E. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Curr. Issues Mol. Biol.** 11:13-46, 2009.

MARTIN, J. P., CARPENTER, C. W., AND WELLER, D. M. Leaf scald disease of sugarcane in Hawaii. **Hawaiian Planters Rec.** 36:145-196, 1932.

MENSI, I., VERNEREY, M. S., GARGANI, D., NICOLE, M., AND ROTT, P. Breaking dogmas: The plant vascular pathogen *Xanthomonas albilineans* is able to invade non-vascular tissues despite its reduced genome. **Open Biol.** 4:130116, 2014.

MILLER, S. A., BEED, F. D., AND LAPAIRE HARMON, C. Plant disease diagnostic capabilities and networks. **Annu. Rev. Phytopathol.** 47:15-38, 2009.

MORI, Y., NAGAMINE, K., TOMITA, N., AND NOTOMI, T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. **Bioch. Biophys. Res. Comm.** 289: 150–154, 2001.

NAGAMINE, K., HASE, T., AND NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. **Mol. Cellul. Probes** 16: 223-229, 2002.

NOTOMI, T., OKAYAMA, H. MASUBUCHI, H., YONEKAWA, T., WATANABE, K., AMINO, N., AND HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Res.** 28:e63, 2000.

ORIAN, G. Artificial hosts of the sugarcane leaf scald organism. **Rev. Agric. Sucr. Ile Maurice** 21:285-304, 1942.

PAN, Y.-B., GRISHAM, M. P., BURNER, D. M., LEGENDRE, B. L., AND WEI, Q. Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. **Plant Dis.** 83:218-222, 1999.

PIERETTI, I., ROYER, M., BARBE, V., CARRERE, S., KOEBNIK, R., COCIANCICH, S., COULOUX, A., DARRASSE, A., GOUZY, J., JACQUES, M.-A., LAUBER, E., MANCEAU, C., MANGENOT, S., POUSSIER, S., SEGURENS, B., VERDIER, V., ARLAT M., AND ROTT, P. The complete genome of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. **BMC Genomics** 10:616, 2009.

RENIER, A., VIVIEN, E., COCIANCICH, S., LETOURMY, P., PERRIER, X., ROTT, P. C., AND ROYER, M. Substrate specificity-conferring regions of the nonribosomal peptide synthetase adenylation domains involved in albicidin pathotoxin biosynthesis are highly conserved within the species *Xanthomonas albilineans*. **Appl. Environ. Microbiol.** 73:5523-5530, 2007.

RICAUD, C., AND RYAN, C. C. Leaf scald. Pages 39-53 in: **Diseases of Sugarcane.** Major Diseases. C. RICAUD, B. T. EGAN, A. G. GILLASPIE JR. AND C. G. HUGHES, eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1989.

RIGANO, L. A., MARANO, M. R., CASTAGNARO, A. P., MORAIS DO AMARAL, A., AND VOJNOV, A. Rapid and sensitive detection of citrus bacterial canker by loop-mediated isothermal amplification combined with simple visual evaluation methods. **BMC Microbiol.** 10:176, 2010.

ROTT, P., AND DAVIS, M. J. Leaf scald. Pages 38-44 in: **A Guide to Sugarcane Diseases**. P. ROTT, R. A. BAILEY, J. C. COMSTOCK, B. J. CROFT AND A. S. SAUMTALLY, eds. La Librairie du Cirad, Montpellier, France, 2000.

ROTT, P., DAVIS, M. J., AND BAUDIN, P. Serological variability in *Xanthomonas albilineans*, causal agent of leaf scald disease of sugarcane. **Plant Pathol.** 43:344-349, 1994.

ROTT, P., MOHAMED, I. S., KLETT, P., SOUPA, D., DE SAINT-ALBIN, A., FELDMANN, P., AND LETOURMY, P. Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. **Phytopathology** 87:1202-1213, 1997.

SAHARAN, P., DHINGOLIA, S., KHATRI, P., DUHAN, J. S., AND GAHLAWAT S. K. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of bacteria: A review. **African J. Biotechnol.** 13:1920-1928, 2014.

WANG, Z. K., COMSTOCK, J. C., HATZILOUKAS, E., AND SCHAAD, N. W. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathol.** 48:245-252, 1999.

- 1 **Table 1.** Primers used to detect *Xanthomonas albilineans* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP), polymerase chain reaction
 2 (PCR) and nested polymerase chain reaction (Nested PCR).

Primer set name	Primer name	Sequence (5'-3')	Source
LAMP Xa	Xa-F3	TCG TGA TCT TTC TGC AGC AA	This study
	Xa-B3	CAC TGC GCG TGA TGA TGA	This study
	Xa-FIP	AAT CGC CAC GCC GAC AGG GTT TTG ACT GGC GTA TTC GGC ACT	This study
	Xa-BIP	CAC GTC GAA AGC CTA CGC GCT TTT CCC ACA AGG CCA GAT AGC T	This study
PCR Xa-1	NRPS2 For	TTC TGC CGA ACT GGC GAA TA	Renier <i>et al.</i> (2007)
	NRPS2 Rev	GGC TGT GTG ATC CAC AAT TC	Renier <i>et al.</i> (2007)
PCR Xa-2	XaAlb2-f3	CAC ACA CAC AAT ACA GCA TTG CGG	Davis <i>et al.</i> (1998)
	XaAlb2-r3	CCC AAC TTA CTT GAG GCT ATG G	Davis <i>et al.</i> (1998)
PCR Xa-2	XaAlb2-f4	CTT CTG CAG CTT GCT CGT C	Davis <i>et al.</i> (1998)
Nested			
	XaAlb2-r4	GCT CAG TTA CGC TCA GCT AAT C	Davis <i>et al.</i> (1998)

3

4

5 **Table 2.** Detection of *Xanthomonas albilineans* in 10-fold dilution series from a suspension of 10^7 CFU/ml using different diagnostic
6 techniques

Technique ^a	Suspension of <i>Xanthomonas albilineans</i> at (CFU/mL)							
	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
LAMP-1	+ ^b	+	+	+	-	-	-	-
LAMP-2	+	+	+	+	+	+	+	-
PCR-1	+	+	+	-	-	-	-	-
PCR-2	+	+	+	+	+	-	-	-
Nested PCR-2	nd	nd	nd	+	+	+	+	-

7 ^a All techniques were tested at least three times each with freshly prepared suspensions from a pure culture
8 of *Xanthomonas albilineans*.

9 ^b + = positive reaction, - = negative reaction, nd = not determined.

10

11 **Table 3.** Detection of *Xanthomonas albilineans* in 115 sugarcane stalk samples using six different diagnostic methods

Samples from	Number of <i>X. albilineans</i> positive samples using ^a					
	Selective isolation	LAMP-1	LAMP-2	PCR-1	PCR-2	Nested PCR-2 ^b
Symptomatic stalks (45 samples)	44 (98%)	41 (91%)	42 (93%)	41 (91%)	41 (91%)	42 (93%)
Asymptomatic stalks (70 samples)	43 (61%)	2 (3%)	19 (27%)	2 (3%)	8 (11%)	25 (36%)

12 ^aAll samples were tested at least twice.13 ^bSamples that tested PCR-2 positive were considered Nested PCR-2 positive.

14

15 **Table 4.** Detection of *Xanthomonas albilineans* using LAMP and PCR techniques in stalk samples infected by different population sizes of
 16 the pathogen

<i>X. albilineans</i> CFU/ml	Samples from symptomatic stalks			Samples from asymptomatic stalks		
	Number of samples (out of 45)	Number of <i>X. albilineans</i> positive samples using ^a		Number of samples (out of 70)	Number of <i>X. albilineans</i> positive samples using ^a	
		LAMP-2	PCR-2 or Nested PCR-2		LAMP-2	PCR-2 or Nested PCR-2
0	1	0	0	26	2	0
1-10	0	-	-	0	-	-
10-10 ²	2	0	0	14	5	5
10 ² -10 ³	1	1	1	22	5	10
10 ³ -10 ⁴	0	-	-	4	3	4
10 ⁴ -10 ⁵	0	-	-	1	1	1
10 ⁵ -10 ⁶	0	-	-	1	1	1
10 ⁶ -10 ⁷	1	1	1	2	2	2
10 ⁷ -10 ⁸	9	9	9	0	-	-
10 ⁸ -10 ⁹	31	31	31	0	-	-

17 ^a All samples were tested at least twice.

18

19

20 **Table 5.** Variation of *Xanthomonas albilineans* population size in symptomatic and asymptomatic sugarcane stalks

Sample taken from the stalk	<i>X. albilineans</i> CFU/ml ^a	Number of samples	Number of samples from stalks	
			With symptoms	Without symptoms
Upper third (21 samples)	0	7	1	6
	1-10	0	0	0
	10-10 ²	3	0	3
	10 ² -10 ³	3	1	2
	10 ³ -10 ⁴	1	0	1
	10 ⁴ -10 ⁵	0	0	0
	10 ⁵ -10 ⁶	0	0	0
	10 ⁶ -10 ⁷	0	0	0
	10 ⁷ -10 ⁸	3	3	0
10 ⁸ -10 ⁹	4	4	0	
Medium third (21 samples)	0	2	0	2
	1-10	0	0	0
	10-10 ²	7	1	6
	10 ² -10 ³	2	0	2
	10 ³ -10 ⁴	0	0	0
	10 ⁴ -10 ⁵	0	0	0
	10 ⁵ -10 ⁶	1	0	1
10 ⁶ -10 ⁷	1	0	1	

	10^7-10^8	1	1	0
	10^8-10^9	7	7	0
Lower third	0	18	0	18
(73 samples)	1-10	0	0	0
	$10-10^2$	6	1	5
	10^2-10^3	18	0	18
	10^3-10^4	3	0	3
	10^4-10^5	1	0	1
	10^5-10^6	0	0	0
	10^6-10^7	2	1	1
	10^7-10^8	5	5	0
	10^8-10^9	20	20	0

21 ^a Data are the mean of three dilution plates per sample.

22

23

Figure legends

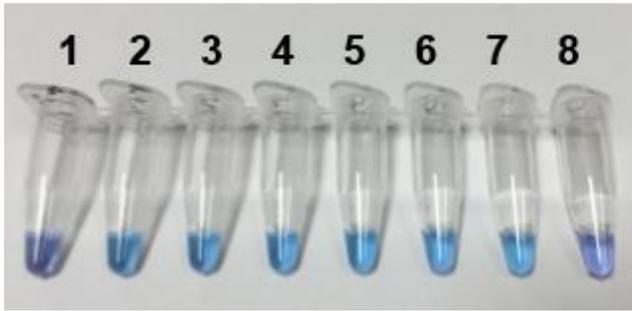


Figure 1. Detection of *Xanthomonas albilineans* by LAMP-2 in water suspensions from a pure culture of the pathogen (10-fold dilutions). Tube 1 = negative control (Tris-acetate-EDTA buffer with 0.4% carnation nonfat dry milk); tubes 2-8 = 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, and 1 CFU/ml, respectively. Tubes showing a violet color of the reaction mixture are negative (lanes 1 and 8) and tubes with a sky blue color are positive (lanes 2-7: 10^6 -10 CFU/ml).

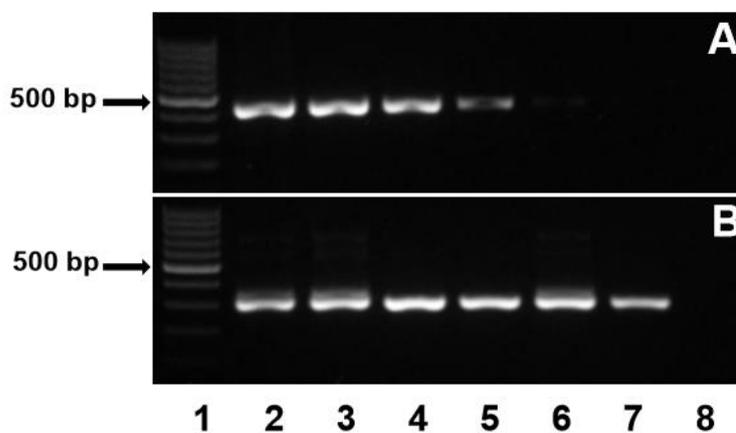


Figure 2. Detection of *Xanthomonas albilineans* by PCR-2 (A) and nested PCR-2 (B) in water suspensions from a pure culture of the pathogen (10-fold dilutions). Lane 1 = 100 bp ladder; lanes 2-8 = 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, and 1 CFU/ml, respectively. The size of the PCR (A) and nested PCR (B) amplicon is 440 and 308 bp, respectively.