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

OTIMIZAÇÃO DA DETECÇÃO DE RAQUITISMO DA SOQUEIRA E ESCALDADURA DAS FOLHAS EM CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO PCR

VANESSA DUARTE DIAS

Orientador:

Prof. Marcos Gomes da Cunha

Março – 2012

VANESSA DUARTE DIAS

OTIMIZAÇÃO DA DETECÇÃO DE RAQUITISMO DA SOQUEIRA E ESCALDADURA DAS FOLHAS EM CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO PCR

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como exigência para obtenção do título de mestre em Agronomia.
Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador:

Prof. Ph.D. Marcos Gomes da Cunha

Co-orientador:

Prof. Dr. Érico de Campos Dianese

Goiânia, GO - Brasil

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

D541o

Dias, Vanessa Duarte.
Otimização da detecção de raquitismo da soqueira e escaldadura das folhas em cana-de-açúcar utilizando PCR [manuscrito] / Vanessa Duarte Dias. - 2012.
xv, 59 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Ph.D. Marcos Gomes da Cunha; Coorientador: Prof. Dr. Érico de Campos Dianese.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2012.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras e tabelas.

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

CDU:633.61:632.35

Permitida a reprodução total ou parcial desse documento, desde que citada a fonte – O autor

AGRADECIMENTOS

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

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 Luiz Artur Mendes Bataus pela preciosa contribuição, disponibilidade e paciência;

Ao professor Érico Dianese pela co-orientação e suporte;

A Ridesa e a Manoella pelo apoio em campo;

As amigas do laboratório, Renata Alves e Adriana Teramoto pelo companheirismo;

As estagiárias Alessandra e Danyella pela ajuda durante os experimentos;

A Capes pela concessão da Bolsa de estudos;

A todos que contribuíram para a realização deste projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS..... 7

LISTA DE FIGURAS..... 8

RESUMO GERAL..... 9

GENERAL ABSTRACT..... 11

1 INTRODUÇÃO GERAL..... 12

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 14
2.1 SITUAÇÃO ATUAL DA CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL E EM GOIÁS..... 14
2.2 ESCALDADURA DAS FOLHAS – *Xanthomonas albilineans*..... 15
2.2.1 Histórico e etiologia da escaldadura das folhas em cana-de-açúcar..... 15
2.2.2 Importância econômica da escaldadura das folhas..... 16
2.2.3 Sintomatologia..... 16
2.2.4 Disseminação..... 18
2.2.5 Controle..... 18
2.2.6 Detecção e diagnose..... 19

2.3 RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS – *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*..... 20
2.3.1 Histórico e etiologia do raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar..... 20
2.3.2 Importância econômica do raquitismo da soqueira..... 21
2.3.3 Sintomatologia..... 21
2.3.4 Sobrevivência e disseminação..... 22
2.3.5 Controle..... 22
2.3.6 Detecção e diagnose..... 23

3 OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR ATRAVÉS DE ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE *Xanthomonas albilineans*, **AGENTE CAUSAL DA ESCALDADURA DAS FOLHAS EM CANA-DE-AÇÚCAR**..... 25
3.1 INTRODUÇÃO..... 27
3.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 28
3.2.1 Obtenção dos isolados de *Xanthomonas albilineans* **e dos colmos contaminados com a bactéria**..... 28
3.2.2 Obtenção do fluído vascular da cana-de-açúcar..... 29
3.2.3 Comparação de diferentes métodos de extração de DNA..... 29
3.2.3.1 Extração de DNA segundo Alsubel, (1992), com modificações – Método 1..... 31
3.2.3.2 Extração de DNA segundo Davis et al., (1997) – Método 2..... 32
3.2.3.3 Extração de DNA segundo Gomes et al.,(2000) – Método 3..... 32
3.2.3.4 Extração de DNA Bacteriano – Método 4..... 32
3.2.3.5 Extração de DNA segundo Gao et al., (2008) – Método 5..... 33
3.2.4 Integridade, quantificação e pureza do DNA extraído..... 33
3.2.5 Reações de PCR específico para detecção de *Xanthomonas albilineans*.. 33

3.2.5.1 Avaliação de compostos atenuantes de substâncias inibidoras da Taq à reação de PCR..... 34
3.3 SEQUÊNCIAMENTO DO FRAGMENTO DE DNA AMPLIFICADO..... 34
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 34
3.4.1 Produtos das extrações de DNA..... 34
3.4.2 Produtos das amplificações por PCR..... 37
3.5 CONCLUSÕES..... 41

4 OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR ATRAVÉS DE ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, **AGENTE CAUSAL DO RAQUITISMO DA SOQUEIRA EM CANA-DE-AÇÚCAR**..... 42
4.1 INTRODUÇÃO..... 44
4.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 45
4.2.1 Obtenção das células bacterianas de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e dos colmos contaminados com a bactéria..... 45
4.2.2 Obtenção do fluído vascular da cana-de-açúcar..... 45
4.2.3 Comparação de diferentes métodos rápidos de extração de DNA..... 46
4.3.3.1 Extração de DNA segundo Alsubel, (1992), com modificações-Método 1..... 47
4.3.3.2 Extração de DNA segundo Davis et al., (1997)-Método 2..... 48
4.3.3.3 Extração de DNA segundo Taylor et al., 2003-Método 3..... 48
4.3.3.4 Extração de DNA Bacteriano-Método 4..... 48
4.3.3.5 Extração de DNA segundo Gao et al., (2008)-Método 5..... 48
4.3.4 Reações de PCR específico para detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*... 49
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 49
4.5 CONCLUSÕES..... 52

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 53

6 REFERÊNCIAS..... 54

.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 DNA quantificado sobre luz UV e A260 nanômetros..... 36

Tabela 3.2 Pureza do DNA extraído a partir dos cinco métodos de extração de DNA a partir três fontes de DNA envolvidas, determinadas através da relação das leituras de absorbância sobre luz UV e A260/A280..... 37

Tabela 4.1 DNA quantificado sobre luz UV e absorbância de A260 nanômetros..... 50

Tabela 4.2 Concentração e pureza do DNA extraído a partir dos cinco métodos de extração a partir das três fontes de DNA envolvidas, determinadas através das leituras de absorbância sobre luz UV e A260/A280..... 50

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Sintoma de Escaldadura das folhas em cana-de-açúcar..... 17

Figura 3.1 Método de pressão positiva, usado para a extração do fluído vascular da cana-de-açúcar. Goiânia, 2011..... 29

Figura 3.2 Diluições para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). a) Quantificação de *X. albilineans* utilizada para extração de DNA em culturas puras; b) Quantificação de *X. albilineans* utilizada para extração de DNA da bactéria adicionada ao caldo de 5 diferentes variedades de cana-de-açúcar..... 30

Figura 3.3 Análise da integridade do DNA de *X. albilineans* extraídos por cinco diferentes métodos e três fontes distintas: a) bactéria pura; b) caldo de cinco variedades + bactéria; c) caldo de colmo infectado. O traço em vermelho representa as repetições de cada método de extração e as letras acima de cada um deles estão representados pelos métodos de extração de DNA (M1 a M5)..... 36

Figura 3.4 Produtos da reação de PCR do DNA de *X. albilineans* de : a) Bactéria pura; b) caldo de 5 variedades + bactérias; c) caldo de colmo infectado. A letra L representa o Ladder (marcador de bandas no gel). O traço branco representa as repetições de cada método de extração e as letras acima de cada um deles estão representados pelos métodos de extração de DNA (M1 a M5)..... 38

Figura 3.5 Amplificações de DNA extraído a partir de fluído de cana-de-açúcar com sintomas de escaldadura das folhas; a) números de 1 à 15 correspondem a diluição do DNA extraído para 10^{-1} e números 16 à 30 correspondem a diluição 10^{-2}; b) números de 1à 15 são correspondentes a diluição 10^{-3} e os números de 16 a trinta correspondem a diluição 10^{-4}. O traço branco representa as repetições de cada método de extração e as letras acima de cada um deles estão representados pelos métodos de extração de DNA (M1 a M5)..... 39

Figura 3.6 Alinhamento da sequência consenso Seq e a sequência de um isolado de *X. albilineans* (Acesso HM181909.1 do GenBank) que corresponde à parte da região ITS do RNA Ribossomal desta bactéria. As equivalências são representadas por traços entre as sequências. Os números à direita representam a posição do último nucleotídeo da linha na sequência original..... 40

Figura 4.1 Metodologia de extração de DNA. a) Materiais utilizados na extração; b) corte da parte basal do colmo; d) segmentos fibrovasculares da amostra sendo retiradas através de um furador cilíndrico; d) o segmento acondicionado em tubo eppendorff com auxilio de bastão de vidro..... 46

Figura 4.2 Produto das amplificações por PCR. a) amplificações a partir da bactéria pura; b) amplificações a partir da bactéria adicionadas ao caldo de colmos contaminados; c) Gel a partir de colmos sabidamente contaminados. Os traços em branco representam as repetições para cada método de extração de DNA (M1 a M5)..... 51

RESUMO GERAL

DIAS, V. D. **Otimização da detecção de raquitismo da soqueira e escaldadura das folhas em cana-de-açúcar por meio de PCR**. 2012. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012[1].

O cultivo de cana-de-açúcar está em expansão no Brasil, devido ao crescente consumo de etanol por carros bicombustíveis. 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% e nem sempre os sintomas são visualizados em campo, necessitando assim de técnicas avançadas de detecção. Dentre as técnicas para diagnose, a mais utilizada 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. A técnica de PCR é mais sensível, detectando níveis baixos da população dessa bactéria nos colmos, e as etapas de extrações de DNA devem purificar o DNA para a redução da presença de substâncias inibidoras presentes no extrato. Assim, neste trabalho foram testadas cinco diferentes metodologias de extração de DNA para *Xanthomonas albilineans* e *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* realizadas em três fontes: bactérias puras, bactérias adicionadas diretamente no caldo de cinco diferentes variedades de cana-de-açúcar, e caldo de colmos infectados com as bacterioses. Os resultados demonstram que as amplificações acontecem com maior freqüência e repetibilidade quando os produtos das extrações são diluídos em uma proporção de 10^{-4} para Escaldadura das folhas. Sem diluições as amplificações não ocorrem, mesmo com o método de extração de DNA com elevado grau de pureza, tal como CTAB. Assim, conclui-se que a detecção não ocorre se o produto das extrações de DNA não for diluído ao menos 1000 vezes, provavelmente reduzindo-se desta forma, o nível de inibidores presentes, proporcionando resultados positivos na técnica de amplificação via PCR. Para Raquitismo das soqueiras não conseguimos detectar *Leifonia xyli* subsp. *xyli* através de métodos rápidos de extração de DNA.

Palavras-chave: Xanthomonas albilineans, Leifsonia xyli subsp. *xyli*, diagnose molecular, extração de DNA, cana-de-açúcar.

---

[1]Orientador: Prof. Ph.D. Marcos Gomes da Cunha. EA – UFG.
Co-orientador: Prof. Dr. Érico de Campos Dianese. EA – UFG.

GENERAL ABSTRACT

DIAS, V. D. **Optimization of detection of Ratoon Stunting Disease and Leaf Scald Disease in sugarcane by PCR**. 2012. 59 f. Dissertation (Msc in Agronomy: Production Plant) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012[1].

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% and the symptoms are not always displayed in the field, thus requiring advanced techniques to detect such bacterial diseases. Among the most used techniques for diagnosis serological tests are quite common, which has as main advantage the capacity of quantitative detection of the presence of bacteria in the culms. However, this detection is only possible if the bacterial title is relatively high. The PCR technique method is more sensitive for detecting low levels of bacteria in stems, but the DNA extractions should be performed in order to purify the DNA to reduce the presence of inhibitory substances in the extract. Thus in this study five different methods of DNA extraction of *Xanthomonas albilineans* and *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* were tested and performed in three steps: pure bacteria, bacteria inoculated directly in the extract from five different varieties of sugarcane, and extract from a stem knowingly infected with these bacteria. The results indicate that the amplifications occur more frequently when the products and repeatability of the extractions are diluted by 10^{-4} in the Leaf Scald. Without this diluition steps, the amplification does not occur, even with the method of DNA extraction considered as a standard. Thus, it is concluded that the detection does not happen if the DNA extraction product is not diluted at least 1000 times, which should prevent the action of inhibitory factors that can hinder the PCR reactions. As for the ratoon stunting disease additional studies are needed to enable its detection by PCR.

Key words: Xanthomonas albilineans, Leifsonia xyli subsp. *xyli,* molecular diagnosis, DNA extraction, sugarcane.

---

[1]Adviser: Prof. PhD Marcos Gomes da Cunha. EA – UFG.
Co-adviser: Prof. Dr. Érico de Campos Dianese. EA – UFG.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Em um 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, hoje baseadas principalmente no consumo de petróleo, tornou-se tema central na pauta de discussão em quase todas as nações, neste cenário, o Brasil aparece em posição privilegiada por dominar a tecnologia de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar (Beling, 2006).

A demanda por bicombustíveis provoca 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. Além disso, entre as quatro doenças de maior importância para a cana-de-açúcar no âmbito mundial, duas delas são causadas por bactérias: raquitismo da soqueira e escaldadura das folhas.

A escaldadura das folhas, causada por *Xanthomonas albilineans*, apresenta grande potencial destrutivo, sobretudo em variedades suscetíveis. No Brasil, sua importância tem sido deixada de lado em função de erros de identificação e da confusão de seus prejuízos com aqueles causados pelo raquitismo da soqueira. A bactéria pode causar, ainda, má formação dos colmos, morte das touceiras, queda de produção e de riqueza em sacarose. Quando a doença se manifesta em variedades extremamente suscetíveis, pode causar perdas de até 100% (Tokeshi & Rago, 2005).

O raquitismo da soqueira causado por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* foi relatado pela primeira vez na Austrália, em 1944, mas o agente causal foi descrito muitos anos depois, em 1989 já havia sido relatada em 61 países. No Brasil, ao ser descrita, já estava disseminada por todas as regiões canavieiras. Dentre os anos de 1975 à 2005, a doença causou perdas estimadas em mais de dois bilhões de dólares, só no estado de São Paulo (Tokeshi & Rago, 2005).

Na maioria dos casos os sintomas externos dessas bacterioses não são percebidos visualmente, devido a infecção latente. Assim as bactérias podem se multiplicar e disseminar sem serem notadas no campo, tendo em vista à dificuldade na detecção por meio de sintomas, elas não se desenvolvem em meios de culturas seletivos e são difíceis de serem observadas através de técnicas de microscopia. Essas variações de sintomas dificultam a diagnose da doença, exigindo outras técnicas tais como métodos sorológicos, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e PCR (Polymerase Chain Reaction) (Pan et al., 1998; Tokeshi & Rago, 2005).

Com o aumento das áreas como o cultivo intensivo da cana-de-açúcar na região Centro Oeste, torna-se de grande importância a preservação da sanidade desta cultura visando manter seus potenciais produtivos. As doenças vasculares, causadas pelas bactérias *Xanthomonas albilineans* e *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* são bastante preocupantes, pela dificuldade de diagnose e controle, bem como pelos prejuízos que podem causar.

Métodos de detecção dessas bacterioses em cana-de-açúcar foram avaliados e a técnica de PCR é considerada a mais sensível, no entanto, ainda não é usada como rotina em análises de Raquitismo da soqueira e Escaldadura das folhas pelo fato do extrato bruto da cana-de-açúcar conter substâncias que inibem a reação de PCR e assim os resultados podem indicar falsos negativos e a porcentagem de detecção diminui em relação as demais técnicas de diagnose (Marcuz et al., 2009). Hoy et al. (1999) que ressaltaram a necessidade de desenvolvimento de um método sensível, precoce e confiável para detecção da bactéria para permitir um monitoramento preciso e assim, melhorar as estratégias de controle das doenças.

A detecção eficiente de tais doenças em canaviais é o primeiro passo para tentar impedir que elas continuem a se espalhar nos talhões de cultivo. E a técnica de detecção através de PCR por ser a técnica mais sensível, necessita ser otimizada para detecção de bacterioses em cana-de-açúcar. Com este intuito, neste trabalho, foram analisados métodos para se aumentar a precisão e a confiabilidade da técnica de PCR, com primers específicos para detecção dessas bactérias, visando tornar este um método de uso rotineiro em análise de raquitismo da soqueira e escaldadura das folhas em laboratório.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SITUAÇÃO ATUAL DA CANA- DE- AÇÚCAR NO BRASIL E EM GOIÁS

A lavoura de cana-de-açúcar continua em expansão no Brasil, as áreas de produção tiveram aumento considerável, sendo mais significativo nos Estados de Minas Gerais (83.100 ha), Mato Grosso do Sul (84.700 ha), Goiás (79.110 ha) e Mato Grosso (13.040 ha). Nestes Estados, além do aumento da área cultivada, outras novas usinas entraram em funcionamento na safra passada, ficando assim distribuídas: três no Estado de Minas Gerais, duas em São Paulo, duas em Goiás, uma em Mato Grosso, uma em Mato Grosso o Sul e uma no Rio de Janeiro(Conab - Companhia Nacional De Abastecimento, 2012)

Na safra 2010/2011 a expansão da área plantada com cana-de-açúcar teve comportamento diferenciado em todo o País. O maior percentual de aumento foi na região Sudeste, responsável por 38,04% do total da nova área agregada. São Paulo foi o Estado que apresentou o maior aumento, acrescentando 265.444 hectares a área existente. Em Minas Gerais o aumento foi de 117.540 hectares. Outra região que apresentou crescimento significativo na área de expansão foi a Centro-Oeste, primeiro Goiás pelo plantio de 110.763,8 hectares, seguido por Mato Grosso do Sul, 73.498,8 ha e Mato Grosso, 15.704,0 ha. Na região Sul, o Paraná plantou com cana-de-açúcar 39.555,2 hectares de novas lavouras. O total da área de expansão em todo País ficou em torno de 697.770,9 hectares (Conab - Companhia Nacional De Abastecimento, 2012).

A previsão do total de cana moída na safra 2011/12 é de 571.471,0 milhões de toneladas, com queda de 8,4% em relação à safra 2010/11, que foi de 623,905 milhões de toneladas. Isso significa que a quantidade que será moída deve ser 52 milhões de toneladas a menos que a moagem da safra anterior. A produção de cana da região Centro-Sul ficou em 501.380,4 milhões de toneladas, 10,6% menor que a produção da safra anterior (Conab - Companhia Nacional De Abastecimento, 2012).

As condições climáticas durante a safra 2011/12 não foram favoráveis. Além da seca no segundo semestre do ano passado, que atingiu as principais regiões produtoras do Centro-Sul, neste ano, além de ocorrerem geadas, a luminosidade e as diferenças de temperatura durante o inverno estimularam o florescimento das lavouras. No período de abril a

setembro também choveu pouco, o que acelerou a colheita, mas prejudicou o desenvolvimento e a renovação dos canaviais, além disso, o clima desfavorável pode estar favorecendo desordens fitossanitárias na cultura (Conab - Companhia Nacional De Abastecimento, 2012).

2.2 ESCALDADURA DAS FOLHAS – *Xanthomonas albilineans*

2.2.1 Histórico e etiologia 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. Por volta de 1961, a escaldadura das folhas foi relatada em 22 países produtores de cana-de-açúcar e, atualmente, a sua ocorrência foi constatada em praticamente todas as áreas produtoras. Em alguns países, a doença é um fator limitante na produção de cana-de-açúcar e um dos principais objetivos de obtenção de cultivares resistentes para a cultura (Davis et al., 1997).

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

Xanthomonas albilineans foi primeiramente nomeada como *Bacterium albilineans* por Ashby em 1929 citado por Martin et al. (1961), posteriormente foi proposto o gênero *Phytomonas* 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 Xanthomodales, 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 única 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 (1902) citado por Akiba (1978) e a temperatura ótima de crescimento desta bactéria é de 25 a 28ºC (Tokeshi & Rago, 2005)

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, consequentemente, esta espécie pode atuar como fonte de inóculo. Em geral, quando essas gramíneas estão infectadas, somente exibem faixas estreitas nas folhas ou o sintoma mais característico que é a estria branca (Birch, 2001).

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

A doença já foi relatada em mais de sessenta países e no Brasil, sua importância tem sido subestimada devido aos erros de identificação que confudem os cálculos de seus prejuízos causados por esta bactéria com aqueles causados pelo 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. Sua distribuição é generalizada por todo o país, porque todas as variedades comerciais podem ser portadoras assintomáticas (Tokeshei & Rago, 2005).

2.2.3 Sintomatologia

As plantas infectadas pela bactéria da escaldadura podem apresentar três formas de infecção: latente, crônica e aguda e por isso a dificuldade na identificação de plantas atacadas pela bactéria por avaliação fenotípica (Tokeshi & Rago, 2005). 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 identificação da doença exige, neste caso, a aplicação de métodos sorológicos ou

moleculares de detecção, devido à maior precisão quando comparados com a análise de sintomas. Na infecção crônica, estrias brancas estendem-se por extensas áreas do limbo foliar podendo atingir a bainha (Figura 2.1). Estas estrias podem evoluir para diversos graus de clorose foliar, de bordos indefinidos até a necrose, havendo, freqüentemente, brotação das gemas basais do colmo. Em corte longitudinal nesta área brotada, observa-se descoloração do xilema na região nodal, estendendo-se até o entrenó

A infecção aguda só ocorre em variedades suscetíveis, intolerantes ou com resistência intermediária, em condições extremamente favoráveis ao patógeno. Neste caso, há queima das folhas como se a planta tivesse sido escaldada, às vezes, sem manifestar sintomas de brotação lateral do colmo e a seca total das folhas dificultando a identificação. Somente após alguns dias os colmos brotam lateralmente, exibindo os sintomas crônicos da doença (Tokeshi & Rago, 2005). 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., 2007).

Figura 2.1 Sintomas de Escaldadura das folhas em cana-de-açúcar.

Internamente, quando se corta os colmos no sentido longitudinal, pode-se observar descoloração vascular, de cor avermelhada, principalmente na região dos nós. Os sintomas internos são mais visíveis em colmos com sintomas da fase crônica, aparecendo nos colmos com sintomas da fase aguda, somente nos casos em que há formação de brotos laterais (Tokeshi & Rago, 2005).

Estudos relatam que a clorose causada em plantas doentes tem origem no bloqueio da diferenciação dos cloroplastos causado por uma fitotoxina. Este composto é da família

da albicidina, produzido no xilema da cana-de-açúcar por *X. albilineans*. A fitotoxina inibe a replicação do DNA nos plastídeos, resultando no bloqueio da diferenciação dos cloroplastos (Birch & Patil, 1987).

A biossíntese de albicidina é altamente regulada em *X. albilineans* e nos demais organismos produtores de antibióticos, sendo acumulada quando a cultura de *X. albilineans* se aproxima da fase estacionária, e não durante a fase logarítmica. Esta é também muito sensível às condições de cultivo, incluindo a composição do meio. A produção de albicidina é estimulada na ausência de fosfato ou é fortemente inibida por vários aminoácidos que, substancialmente, estimulam a multiplicação do patógeno (Birch, 2001).

2.2.4 Disseminação

A infecção primária ocorre pelo plantio de toletes doentes ou pela contaminação de toletes sadios pelo uso de podões contaminados. As plantas resultantes da brotação dos toletes contaminados poderão se apresentar aparentemente sadias, com bom desenvolvimento, ou cloróticas, sem vigor, caso as condições ambientais sejam, respectivamente favoráveis ou não ao seu desenvolvimento (Gatti, 2008)

O tolete contaminado 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). Dessa forma, a doença é facilmente disseminada na colheita por meio de ferramentas de corte como o facão ou mesmo as colhedoras. Com o aumento da colheita mecanizada, as preocupações com essa doença se intensificaram.

2.2.5 Controle

A principal forma de controle da escaldadura das folhas é feita por meio de variedades resistentes e tolerantes. 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).

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 freqüente em facões de corte são também práticas recomendáveis, a fim de evitar a disseminação da doença e diminuição do potencial de inóculo (Gatti, 2008).

2.2.6 Detecção e diagnose

A diagnose da escaldadura das folhas foi há muito tempo estudada, uma vez que o diagnóstico visual dos sintomas não é confiável 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 culturas seletivo consistiu em método de diagnose, porém é um método lento, requerendo, no mínimo, oito dias para a formação de colônias características do patógeno (Persley, 1972). O uso de plantas-testes também é um método de diagnose muito utilizado, mas também possui como desvantagem por o tempo lento de diagnose, pela necessidade de espera do aparecimento dos sintomas para confirmação da doença, Persley (1972) preconiza o milho doce como planta-teste a se detectar *X. albilineans* e demonstrar sua patogenicidade, já que neste caso não haveria o risco da planta estar previamente infectada, pois não ocorre a transmissão por semente.

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 conseguiu detectar uma infecção latente, 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 um método pouco eficiente para 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 um fragmento específico de DNA. Este método de diagnose foi 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. (1999) desenvolveram "primers" 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 PCR's. Segundo Coote (1990), a técnica de PCR apresenta muitas vantagens nos casos de 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 reação de PCR, sendo assim, a etapa de extração de DNA é fundamental para a purificação do DNA antecedente a reação PCR.

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

2.3.1 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*, 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, recentemente, reclassificada como *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Evtushenko et al., 2000). A bactéria *Leifsonia xyli* subsp. x*yli* 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.

2.3.2 Importância econômica do raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar

Pesquisadores consideram o raquitismo da soqueira a mais importante doença da cana-de-açúcar em todo o mundo. O raquitismo pode causar prejuízos de 5 a 30% da produtividade e infectar até 100% do canavial (Tokeshi & Rago, 2005). Em São Paulo, Giglioti (1997) estimou que o raquitismo das soqueiras ocasionou redução da lucratividade em mais de U$ 2 bilhões nos últimos 30 anos. 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).

2.3.3 Sintomatologia

A doença causa crescimento retardado das touceiras e colmos menores, tornando o canavial desuniforme. Nas touceiras doentes observam-se, então, colmos mais finos e internódios (região entre os nós) curtos, o que causa redução da produtividade. Se ocorrer de faltar água às plantas durante a manifestação do raquitismo da soqueira, seus efeitos serão mais intensos e ocorrerá enrolamento das folhas (Tokeshi & Rago, 2005).

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).

Nas variedades mais suscetíveis pode-se observar internamente, na parte mais velha de colmos maduros, na altura do nó, vasos com a coloração alterada variando de alaranjado-claro a vermelho-escuro, podendo-se observar "vírgulas" e traços ou pontos localizados preferencialmente nas partes mais profundas do colmo. Estes sintomas repetem-se em praticamente todos os nós maduros do colmo. Quando não ocorrem sintomas na região nodal de colmos infectados, a ausência de sintomas pode ser explicada como resultado da reação da planta à presença de organismos estranhos (Gatti, 2008).

2.3.4 Sobrevivência e disseminação

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). 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).

2.3.5 Controle

O controle desta doença tem sido realizado por medidas baseadas em métodos de exclusão, principalmente no uso de material sadio para plantio. Podões devem ser desinfestados, principalmente quando usados em campos de propagação em área de expansão do canavial e a desinfestação geralmente é realizada por produtos a base de amônia quaternária.

O tratamento térmico também é recomendado, eleva-se a temperatura da água a 52°C por 30 minutos ou 50°C por 2 horas, os toletes são imergidos, na tentativa de destruir as proteínas e as enzimas da bactéria, sem injuriar em demasia as proteínas e enzimas das gemas dos toletes (Fernandes Jr et al., 2010). No entanto, Grisham et al. (2004) já detectaram células bacterianas em amostras tratadas a 50°C por duas horas, Fernandes Jr et

al. (2010), com esse mesmo tratamento, eliminou completamente Lxx dos toletes contaminados.

Outra forma de controle do raquitismo da soqueira é por meio de resistência varietal. 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).

2.3.6 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. Dentre estes, pode-se citar a microscopia de contraste de fase ou de imunofluorescência, para constatar sua presença em extrato do xilema, assim como métodos sorológicos como "Tissue blot" e "Dot blot" (Carneiro Jr et al., 2004) e moleculares (Pan et al., 1998; Taylor et al., 2003).

Em relação às técnicas moleculares, foi desenvolvido o método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar Lxx do caldo da cana e estes ensaios de PCR demonstraram ser mais sensíveis. Porém ainda não é favorável quando se trata de um grande número de amostras, por envolver etapas de extração de DNA, que demanda mais tempo na preparação das amostras e serem mais caros que os métodos de extração de proteínas totais utilizados em sorologia (Pan et al., 1998).

Pan et al. (1998) publicaram protocolo para detecção de *Lxx* através da técnica de PCR. Foram desenhados "primers" específicos e foi observado que esta técnica é altamente sensível para detecção da bactéria pura (em torno de 1 pg de DNA de Lxx). Esta técnica também foi capaz de amplificar o DNA de células bacterianas contidas em extratos de planta, conteúdo líquido dos vasos condutores e colônias em placa ou meio de cultura líquido, no entanto, para extrato de plantas de sessenta amostras de cana-de-açúcar inoculadas com Lxx analisadas, somente 61,6% resultaram em positivas através de PCR contra 68,3% pelo método do tissue blot immunobinding assay (TB – IBA). Em ambos os métodos o índice de falso negativo ainda é muito elevado, por volta de 30% das amostras testadas (Gagliardi et al., 2006). Considerando que PCR é bastante sensível, as falhas na reação decorre provavelmente de ação de substâncias inibidoras presentes no caldo da cana-de-açúcar, ou seja, substâncias que persiste mesmo após o processo de extração de DNA.

A comparação de três metodologias de diagnose (microscopia de contraste de fase, Dot-blot e PCR) para a detecção de *Lxx* e sua utilização em analises rotineira, foi realizada por Gagliardi et al. (2006) e demonstraram que a técnica de diagnose por PCR é bastante sensível, detectando o nível de 10^1 células mL^{-1}. O Dot-blot permitiu diferenciar, quantitativamente, as concentrações dos níveis acima de 10^3 células mL^{-1} e a microscopia de contraste de fase apenas a partir de 10^6 células mL^{-1}. Já Fernandes Jr et al. (2010) alcançaram o limite de detecção por "dot blot" de 10^6 UFC mL^{-1}, coincidindo com o nível obtido por Carneiro Jr. et al. (2004), além da baixa sensibilidade, esse método tem o inconveniente de detectar tanto células bacterianas viáveis e não viáveis por basear-se na especificidade antígeno-anticorpo (Hsu, 2009).

3 OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR ATRAVÉS DE ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE *Xanthomonas albilineans*, AGENTE CAUSAL DA ESCALDADURA DAS FOLHAS EM CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO

O cultivo da cana-de-açúcar constitui-se atualmente em uma das principais atividades econômicas do agronegócio Brasileiro devido à produção de açúcar e do álcool. Apesar de estar ocorrendo expansão da área plantada, a produtividade da cultura vem decaindo, e vários fatores podem ser apontados para tal queda, dentre eles os problemas fitossanitários da lavoura. A escaldadura das folhas é uma das doenças que podem comprometer a produtividade do canavial, causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans*, apresenta grande potencial destrutivo, sobretudo em variedades suscetíveis. No Brasil, sua importância tem sido deixada de lado em função dos erros de identificação e, pelo fato de, na maioria dos casos, os sintomas externos de bacterioses não serem percebidos visualmente (infecções denominadas latentes). Assim a bactéria pode estar se multiplicando e disseminando de forma despercebida. A diagnose dessa doença em lavouras ou em campos de multiplicação é extremamente necessária, para tentar impedir sua disseminação. A técnica de PCR é a mais sensível, dentre as técnicas em uso para diagnose, mais ainda não é a mais segura e viável. A presença de substâncias inibidoras no fluído fibrovascular da cana-de-açúcar, que induzem falsos negativos nos resultados de PCR, sugere que a extração de DNA não está sendo de boa qualidade, dificultando à análise de grande número de amostras demandadas por produtores. Assim o objetivo do trabalho foi comparar cinco métodos rápidos de extração de DNA para que a detecção por PCR se torne confiável e exeqüível para a diagnose em larga escala da escaldadura das folhas. Os métodos rápidos de extração de DNA foram realizados a partir de: Cultura pura, adição direta de isolado da bactéria em caldo de cinco diferentes variedades de cana-de-açúcar e a partir do colmo de plantas com sintomas da doença. Constatou-se que as metodologias rápidas testadas se equiparam com a técnica padrão utilizando-se do tampão CTAB. A diagnose em larga escala desta doença pode ser realizada por meio de PCR, e as metodologias de

extração de DNA dois, quatro ou cinco, combinada com diluição de 10^{-3} do produto final, podem ser indicadas para este intuito por serem rápidas, simples e não utilizar fenol como reagente.

Palavras – chave: Xanthomonas albilineans, detecção molecular, PCR, extração de DNA.

3 OPTIMIZATION OF A PCR TECHNIQUE THROUGH COMPARATIVE ANALYSIS OF DNA EXTRACTION METHODS OF *Xanthomonas albilineans,* CAUSAL AGENT OF THE LEAF SCALD IN SUGARCANE

ABSTRACT

The cultivation of sugarcane is in one of the main economic activities in Brazil due to the production of sugar and alcohol. Although it is occurring an expansion of planted areas, the yield has been decreasing, and several factors can be singled out for this fall, including phytosanitary problems. The Leaf Scald is a disease that can compromise the productivity of sugarcane caused by *Xanthomonas albilineans*. This disease has great destructive potential, especially in susceptible varieties. In Brazil, its importance has been left out on the basis of misidentification and in most cases the external fire blight symptoms are not perceived visually (whith is a characteristic of latent infection). So the bacteria may multiply and spread unnoticed. The diagnosis of this disease in crops or in fields of multiplication is extremely necessary to try to prevent the advance of this type of disease. The PCR is the most sensitive among the detection techniques in use, but still not the most safe and feasible, mainly because of the presence of inhibitory substances present in fibrovascular fluid of sugarcane, which induce false negative results. There is a need for DNA extraction of good quality which would makes possible the analysis of large numbers of samples. Thus the objective of this study was to compare five methods for rapid extraction of DNA for the PCR detection to become reliable and feasible for large-scale diagnosis of the Leaf Scald. The rapid methods of DNA extraction were performed from three sources: pure culture, direct addition of bacteria isolated to the broth of five different varieties of sugarcane, and from the stems of plants with symptoms of the disease. The diagnosis of this disease on a large scale can be performed by PCR, and the methods of DNA extraction from two, four or five, combined with 10^{-3} dilution of the final product

may be shown for this purpose since they are rapid, simple and not using phenol as the reagent.

Key words: Xanthomonas albilineans, molecular detection, PCR, DNA extraction.

3.1 INTRODUÇÃO

A lavoura de cana-de-açúcar está em expansão no Brasil. As áreas em produção tiveram aumento considerável, sendo mais significativo nos Estados de Minas Gerais (83.100 ha), Mato Grosso do Sul (84.700 ha), Goiás (79.110 ha) e Mato Grosso (13.040 ha). Nestes Estados, além do aumento da área cultivada, outras novas usinas entraram em funcionamento na safra passada. Porém, a produção nacional de cana-de-açúcar a ser moída pela indústria sucroalcooleira na safra 2011/2012 é 8,4% inferior ao registrado no ciclo passado. A produtividade da cana destas novas unidades é superior as demais, o que colaborou para que a queda da produtividade não fosse ainda maior (Companhia Nacional de Desenvolvimento- CONAB, 2012).

A queda da produtividade é devido a diversos fatores, dentre eles destaca-se os problemas fitossanitários da lavoura, como o aumento da incidência de doenças no canavial. Além disso, com o intenso consumo de etanol e a crescente demanda por carros bicombustíveis, faz com que os produtores busquem o aumento da área plantada para minimizar a redução da produtividade e tal expansão leva a uma multiplicação inadequada da cana-planta, que por muitas vezes a cana originada de cultivos comerciais, é multiplicada em plantio, sem nenhuma inspeção ou tratamento. Com este tipo de manejo aumentam-se também os problemas fitossanitários. Segundo Gatti (2008), as doenças da cana-de-açúcar são muito graves porque causam a degenerescência das variedades em cultivo, obrigando a sua substituição periódica. Dentre as quatro doenças de maior importância para a cana-de-açúcar no âmbito mundial, se destaca a escaldadura das folhas.

A escaldadura das folhas, causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans* apresenta grande potencial destrutivo, ela pode causar, má formação dos colmos, morte das touceiras, que levam também a queda de produção e teor de sacarose. Quando a doença se manifesta em variedades extremamente suscetíveis, pode causar perdas de até 100% (Tokeshi & Rago, 2005).

Na maioria dos casos os sintomas externos de bacterioses não são percebidos visualmente devido à infecções latentes. Assim as bactérias podem estar se multiplicando e

disseminando de forma despercebida, tendo em vista que é muito difícil detectá-la por métodos convencionais baseados em sintomas, meios de culturas seletivos e observações via microscopia. Essas variações de sintomas dificultam a diagnose da doença, exigindo outras técnicas tais como métodos sorológicos e moleculares (Pan et al., 1999; Tokeshi & Rago, 2005).

Alguns laboratórios especializados em diagnoses de bacterioses em cana-de-açúcar e nestes as análises têm são realizadas por técnicas sorológicas, e estas técnicas só são eficientes quando a bactéria atinge altas concentrações, momento em que a produção já está comprometida e o patógeno disseminado para outras plantas (Honeycutt et al., 1995). A sensibilidade da PCR é maior e estudos estão sendo realizados comprovando que a PCR pode ser realizada em qualquer fase de desenvolvimento da planta.

Apesar dos avanços nas metodologias de diagnósticos da escaldadura das folhas por PCR, o método ainda não é totalmente seguro. Assim desenvolvimento de estratégias para o diagnóstico da escaldadura das folhas da cana de maneira mais rápida e segura poderá prestar um grande auxílio não somente na diagnose comercial como também para o melhoramento visando resistência genética à doença, desenvolvido tanto pela RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do setor Sucroenergético) como por outros programas de melhoramento da cana-de-açúcar (Silva, 2006).

A técnica de PCR é a mais sensível, mas ainda não é a mais segura e viável, porque além da presença de substâncias inibidoras da PCR presentes no fluído fibrovascular da cana-de-açúcar, que induzem falsos negativos nos resultados, havendo a necessidade de extração de DNA de boa qualidade dificultando à análise de grande número de amostras. Assim, o objetivo do trabalho foi comparar cinco métodos rápidos de extração de DNA para detecção por PCR, em larga escala, de *Xanthomonas albilineans* agente causal da escaldadura das folhas em cana-de-açúcar.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção dos isolados de *Xanthomonas albilineans* e dos colmos contaminados com a bactéria

Culturas puras de *Xanthomonas albilineans* foram cedidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Colônias bacterianas foram repicadas para o meio de

Wilbrik's contendo 5g de bactopeptona, 10g de sacarose, 0,5g de $K_2PO_4.3H_2O$, 0,25g de Mg $SO_4.7H_2O$, 0,05g de Na_2SO_3 e 15g de Agar para preparar 1 litro de meio de cultura.

Os colmos de cana contaminados foram retirados de talhões de cana-de-açúcar em cultivo experimental da Usina Jalles Machado, em Goianésia, que eram clones de área experimental da RIDESA, no qual apresentavam sintomas evidentes da doença.

3.2.2 Obtenção do fluído vascular da cana-de-açúcar

A metodologia utilizada para a obtenção do fluído vascular foi realizada de acordo com Gao et al. (2008). Primeiramente foi feito um corte transversal na parte inferior e um corte transversal na parte superior da base dos colmos (entre o segundo e o terceiro entrenós). Posteriormente foi realizada a extração da seiva de xilema, usando um compressor de baixa pressão conectado a uma teteira de borracha (tipo ordenhadeira) na extremidade da mangueira para facilitar a extração, conforme ilustrado na Figura 3.1.

De cada colmo amostrado, foi extraído no mínimo 0,3 mL do fluído vascular e transferidos para microtubos de plástico (tipo Eppendorf) de 1,5 mL de capacidade. Em cada microtubo foram adicionadas duas gotas de solução estabilizadora Amonex 0,2% ou Merthiolate incolor (Pan et al., 1998).

Figura 3.1 Método de pressão positiva, usado para a extração do fluído vascular da cana-de-açúcar. Goiânia, 2011.

3.2.3 Comparação de diferentes métodos de extração de DNA

Cinco diferentes metodologias de extração de DNA foram testadas com o objetivo de diminuir a variação da técnica de PCR. O método do tampão CTAB foi utilizado como padrão para comparar com os métodos rápidos de extração de DNA.

As extrações de DNA foram feitas a partir de três fontes distintas, a primeira foi realizada para extrair DNA da bactéria pura; na segunda foram adicionadas células bacterianas ao fluído da cana e por último foram realizadas as extrações a partir de colmos de cana infectados.

Células bacterianas em fase lag de crescimento de *X. albilineans*, em meio de Wilbrink's, foram transferidas para um tubo falcon contendo 2,5 mL de água milli Q autoclavada. A suspensão bacteriana foi homogeneizada em vortex e alíquotas de 160 µL foram transferidas para 15 tubos do tipo eppendorff, para testar os cinco métodos rápidos de extração e cada método testado foi feito em triplicata. E para quantificar o total de células bacterianas utilizadas nas extrações, 1 µL da suspensão foi submetida a diluições seriadas de 10^{-1} à 10^{-5} em solução salina (0,85% NaCl) estéril contendo 0,5 % de tween 80. Dez microlitros referentes a cada diluição foram depositadas no centro de placas de petri de 6 mm de diâmetro, contendo meio de Wilbrink para posterior contagem do número de unidades formadoras de colônias (Figura 3.2a).

Para testar o efeito de variedades de cana-de-açúcar na inibição da PCR, os mesmo procedimentos anteriores foram realizados, porém, as colônias bacterianas foram transferidas para tubo eppendorf que continha 255 µL de água milli Q autoclavada. A solução bacteriana foi misturada em vórtex e alíquotas de 10 µL foram transferidas para 25 tubos eppendorfs contendo 150 µL de fluído vascular, sendo que cada cinco tubos correspondiam à uma variedade de cana-de-açúcar diferente (RB 952857, RB 925211, RB 925345, RB 867515 e RB 72454) para cada método de extração de DNA avaliado. E para quantificar a bactéria adicionada às amostras foi realizado o mesmo procedimento de quantificação bacteriana do parágrafo anterior (Figura 3.2b).

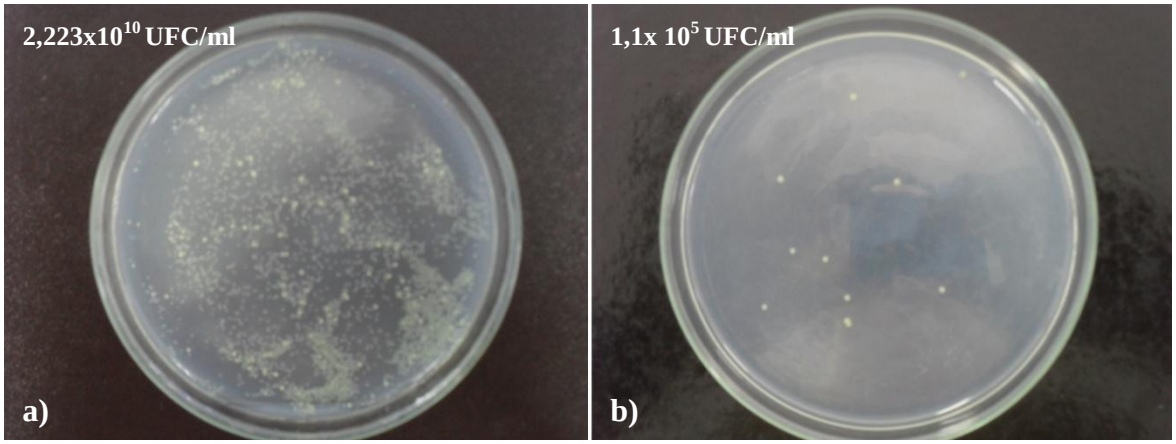

Figura 3.2 Diluições para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). a) Quantificação de *X. albilineans* em suspensão de culturas puras; b) Quantificação de *X. albilineans* utilizada para extração de DNA da bactéria adicionada ao caldo de cinco diferentes variedades de cana-de-açúcar.

Por último, colmos de cana com sintomas evidentes da doença foram coletados e o fluído vascular foi extraído, conforme metodologias descritas anteriormente. Assim, 15 amostras foram retiradas da parte basal dos colmos para testar cinco métodos com três repetições.

Após as extrações, cada amostra de DNA teve sua concentração e pureza determinadas através das leituras de absorbância em 260 nm (Concentração do DNA em mg/mL = Absx100x50) (Sambrook et al., 1980) em 280 nm (quantificação de proteínas), no espectrofotômetro Amershan Pharmacia Biotech. A razão entre as leituras em 260 nm e 280 nm foi utilizada como um indicativo da pureza do DNA obtido.

3.2.3.1 Extração de DNA segundo Alsubel, (1992), com modificações – Método 1

O volume inicial de 160 µL foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 567 µL de TE (1 mL de Tris 1 M pH 8.0, 200 µL de EDTA 0.5 M pH 8.0, adicionado com H_2O para 100 mL) mais 30 µL de SDS 10% e 5 µL de proteinase K 20mg/mL (concentração final de 100 µg mL^{-1}). A amostra foi encubada por 1 hora a 55°C. Após este período, foi adicionado 100 µL de NaCl 5 M e 160 µL de CTAB 5%, incubando a mesma por 10 minutos a 65°C. Em seguida, foi adicionado 800 µL de clorofórmio/álcool isolamílico (24:1, respectivamente), a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 12.000 rpm.

A fase superior foi transferida para outro tubo de microcentrífuga e adicionado igual volume de clorofórmio/álcool isolamílico (24:1), centrifugando novamente por 5 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 2 V de etanol. A mistura foi mantida à -20°C durante duas horas, centrifugando após este período por 5 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 600 µl de etanol 70% seguida de centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi lavado com 300 µl de etanol 100% e novamente centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. Após secagem, o pellet foi dissolvido em 50 µL de 1/10 de TE + Rnase e mantido à -20°C.

3.2.3.2 Extração de DNA segundo Davis et al., (1997) – Método 2

Centrifugou-se 160 µL de volume inicial a 6.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de TAE (0,04 de Tris-Acetato; 1,0 mM de EDTA pH 8.0). Foi realizada uma nova centrifugação a 6.000 rpm por 15 minutos, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi coberto com 0,5 mL de TAE ajustado com 0,4% de "Skim Milk" (leite desnatado em pó, marca Itambé). As amostras foram incubadas por duas vezes a 100°C por 10 minutos, em seguida resfriadas em gelo/água por 3 minutos.

3.2.3.3 Extração de DNA segundo Gomes et al., (2000) – Método 3

O volume inicial de cada amostra foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 200 µL de Tris (0,1 mol/L), em seguida acrescentou-se 200 µl de NaOH 0,2N e 1% de SDS, homogeneizou-se a suspensão em vortex e, logo depois, adicionou-se 700 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 25:24:1. Centrifugou-se as amostras a 10.000 rpm por 10 minutos, sendo que a fase aquosa (superior) foi transferida para novos tubos eppendorffs. Acrescentou-se 1 mL de etanol 95% e uma nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos foi realizada. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de etanol 70% para uma segunda lavagem do DNA. Centrifugou-se novamente a 10.000 rpm por 10 minutos o sobrenadante descartado e o pellet depois de seco ressuspendido em 100 µL água milli Q autoclavada.

3.2.3.4 Extração de DNA Bacteriano – Método 4

O volume inicial de 160 µL foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado, o pellet foi ressuspendido em 500 µL de Tris-EDTA (Tris 50mM e EDTA a 1mM) + SDS 2%, misturou-se em vortex e as amostras foram mergulhadas por 5 minutos em banho fervente, após resfriar em bancada adicionou-se 50 µL de NaCl 3 M, misturou-se as amostras em vórtex em seguida adicionou-se 1 mL de etanol 100%, e colocados em freezer por 30 minutos, decorrido o tempo centrifugou-se a 10.000 rpm por

10 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 100 µL de água milli Q autoclavada.

3.2.3.5 Extração de DNA segundo Gao et al. (2008) – Método 5

As amostras com volume inicial de 160 µL foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 50 µL de tampão A (0,1 M de NaOH + 2 % de tween 20), a suspensão misturada em vortex e encubada a 95°C por dez minutos e resfriada em gelo por 3 minutos, em seguida, adicionou-se 50 µL de tampão B (0,1 M de Tris-HCl [pH 8.0] + 2mM EDTA) e, para finalizar, homogeneizou-se em vórtex.

3.2.4 Integridade, quantificação e pureza do DNA extraído

Após a realização das extrações, os produtos de cada uma delas (10µL) foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a integridade do DNA. Após as extrações, cada amostra de DNA teve sua concentração e pureza determinadas através das leituras de absorbância em 260 nm (Concentração do DNA em MG mL^{-1} = Absx100x50) (Sambrook et al., 1980) e em 280 nm (quantificação de proteínas), no espectrofotômetro Amershan Pharmacia Biotech. A razão entre as leituras em 260 nm e 280 nm foi utilizada como um indicativo da pureza do DNA obtido.

3.2.5 Reações de PCR específicas para detecção de *Xanthomonas albilineans*

As reações de PCR com 20 µL de volume total foram constituídas por 1 µL do DNA, tampão da enzima polimerase (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,3), 0,8 mM MgCl2, 0,2 mM de cada dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1,0 µM dos primers PGBL1 - 5’CTTTGG GTC TGT AGC TCA GG e PGBL2 - 5’GCC TCA AGG TCA TAT TCA GC) e uma unidade de Taq polimerase (Invitrogen) (Pan et al., 1999). As condições de amplificação foram um ciclo de desnaturação a 95oC por cinco minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95oC por 30 segundos, anelamento a 57oC por trinta segundos, extensão a 72oC por trinta segundos, e extensão final a 72°C por dez minutos (Gao et al., 2008).

Os produtos da amplificação foram visualizados após serem carregados em gel de agarose 1,5% em solução tampão de Tris borato de EDTA (TBE), com gradiente de 6,6

V cm^{-1}, por cerca de duas horas. Anterior a essa corrida, o gel foi corado com 2 µl do reagente Gel red (Invitrogen) adicionado juntamente com o tampão de carregamento e observado sob luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos amplificados foram estimados mediante comparação com fragmentos de tamanhos conhecidos (1 kb Plus DNA Ladder – Invitrogen).

3.2.5.1 Avaliação de compostos atenuantes de substâncias inibidoras da *Taq* à reação de PCR

Nas reações de PCR, a partir das cinco extrações de DNA do colmo infectado, foram adicionados substâncias na reação que supostamente atenuam substâncias inibidoras da *Taq* presentes no extrato da cana. O teste foi realizado com o objetivo de verificar se adicionando tais substâncias a reação, a detecção poderia ser realizada sem a necessidade de diluição do extrato e, assim, facilitar a diagnose. Três reagentes que são comumente utilizados em reações de PCR foram escolhidos: BLOTTO (10% de Skim Milk) à 2% (v/v) (De Boer et al., 1995); PVP (polivinilpirrolidona 8%) à 10% (v/v) e BSA (bovine serum albumin) à 10% (v/v) sobre o volume final da reação de PCR.

3.3 SEQUÊNCIAMENTO DO FRAGMENTO DE DNA AMPLIFICADO

Para confirmar se os produtos amplificados via PCR correspodiam à sequência de DNA de *X. albilineans*, estes produtos foram primariamente purificados utilizando-se o Kit comercial Ilustra GFX PCR and Gel Band Elution Kit (GE Healthcare) seguindo-se as especificações do fabricante. As purificações foram seqüenciadas, utilizando-se o primer PGBL1, pelo método automatizado de Sanger por capilar pela empresa Macrogen Corp. Coréia do Sul. As homologias das sequências nucleotídicas obtidas foram determinadas pelo programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul, 1997), e foram alinhadas com sequências de *X. albilineans* disponíveis no banco genômico (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Produtos das extrações de DNA

Para verificar os níveis de degradação do DNA extraído dez microlitros dos produtos das cinco extrações de DNA a partir das três fontes foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 3.3). Com uma maior quantidade de bactérias e sem a presença de material vegetal, o produto de extração mais perceptível foi o obtido a partir da bactéria pura (Figura 3.3a) e dentre os métodos de extração de DNA, vizualiza-se DNA íntegro nos métodos 1, 2 e 4. Na Figura 3b, cujos produtos são a partir das extrações de DNA da bactéria *Xanthomonas albilineans* adicionadas ao caldo de cinco diferentes variedades de cana, percebe-se a presença de DNA nas extrações 2, 4 e 5 (Figura 3.3b) estes métodos foram igualmente eficiente independente da origem varietal do caldo utilizado para a formação da suspensão bacteriana, ou seja, não houve influência das variedades das canas no processo de extração de DNA. Quando se fez extrações de DNA de canas infectadas os produtos são quase imperceptíveis, mas nota-se vestígios de DNA nas extrações dos métodos 2 e 4 (Figura 3.3c).

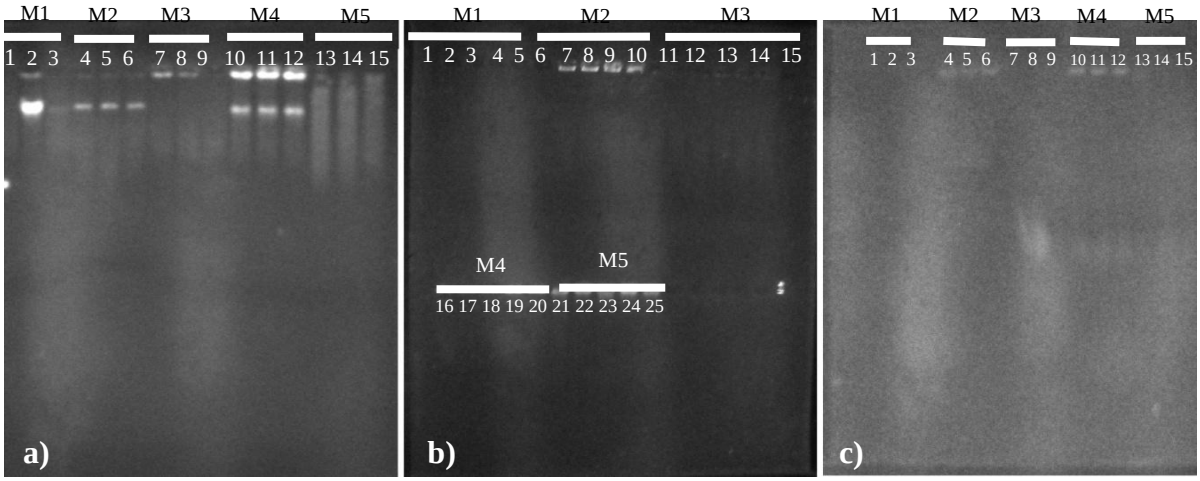

Figura 3.3 Análise da integridade do DNA de *X. albilineans* extraídos por cinco diferentes métodos e três fontes distintas: a) bactéria pura; b) caldo de cinco variedades + bactéria; c) caldo de colmo infectado. O traço em branco representa as repetições de cada método de extração e as letras acima de cada um deles estão representados pelos métodos de extração de DNA (M1 a M5).

Para a quantificação do DNA por espectrofotometria, fez-se uma média das extrações que foram realizadas com três ou cinco repetições (Tabela 3.1). As médias dos produtos de extração variaram de 3,82 ng mL^{-1} a 173,23 ng mL^{-1} , sendo que o método 1 (CTAB), considerado neste trabalho como método padrão para extração de DNA, foi o método que atingiu a menor concentração de DNA dentre os métodos testados (3,82 ng

mL^{-1}), e o quinto método foi o que atingiu maiores concentrações de DNA extraído (173,23 ng mL^{-1}). E ao relacionar o rendimento das extrações com o gel da figura anterior, percebe-se que concentrações elevadas de DNA extraído pode não ser de boa qualidade, já que através do método de extração cinco percebe-se (Figura 3.3a) traços de DNA e pode ser indicativo de DNA degradado, para os métodos dois e quatro que produziram DNA com rendimento intermediário visualiza-se a presença de DNA íntegro e mostrou que a quantidade de quebra de DNA foi pequena, obtendo-se bandas bem visíveis com pouco sinal de degradação.

Tabela 3.1. DNA quantificado por meio de luz UV e A260 a partir de três fontes e cinco diferentes métodos de extração de DNA de *X. albilineans*.

Bactéria Pura	Média[ng ml^{-1}]	Bactéria +caldo	média[ng ml^{-1}]	Colmo infectado	média[ng ml^{-1}]	Média
M1	4,83	M1	4,80	M1	1,83	3,82
M2	15,17	M2	32,50	M2	102,83	50,16
M3	0,33	M3	1,30	M3	15,33	5,65
M4	12,33	M4	6,90	M4	36,17	18,46
M5	8,17	M5	163,70	M5	347,83	173,23

*M1 = método de extração 1; M2 = método de extração 2; M3 = método de extração 3; M4 = método de extração 4 e M5= método de extração 5.

Baseado nos valores da razão da absorbância de 260nm/280nm mostrou-se que o método de extração que mais se aproxima dos valores de amostras puras, amostras com valores entre 1,8 e 1,9 (Sambrool et al., 1989), foi o quarto método cujos valores variam de 1,35 a 2,20. Os métodos dois e cinco também obtiveram valores que se aproximaram do ideal, no entanto, obtiveram valores elevados quando a extração de DNA foi realizada a partir da bactéria pura, sendo que valores acima de 2,0 indicam excesso de proteínas e abaixo de 1,8 excesso de RNA no produto das extrações de DNA (Sambrook et al., 1989).

Tabela 3.2 Concentração e pureza do DNA extraído a partir dos cinco métodos de extração a partir das três fontes de DNA envolvidas, determinadas através das leituras de absorbância sobre luz UV e A260/A280nm.

Bactéria Pura									
	A260/A280		A260/A280		A260/A280		A260/A280		A260/A280
M1	0	M2	2,33	M3	0	M4	1,50	M5	12,00
M1	0	M2	1,44	M3	0	M4	2,13	M5	0
M1	0	M2	5,17	M3	0	M4	2,20	M5	13,00
Bactéria adicionada ao caldo da cana-de-açúcar									
	A260/A280		A260/A280		A260/A280		A260/A280		A260/A280
M1.1	0	M2.1	1,94	M3.1	0	M4.1	1,38	M5.1	1,41
M1.2	8,5	M2.2	1,71	M3.2	0	M4.2	1,73	M5.2	2,39
M1.3	0	M2.3	1,56	M3.3	0	M4.3	1,82	M5.3	1,39
M1.4	1,82	M2.4	1,71	M3.4	0	M4.4	1,80	M5.4	1,42
M1.5	0	M2.5	1,89	M3.5	0	M4.5	1,50	M5.5	1,27
Caldo de colmo infectado									
	A260/A280		A260/A280		A260/A280		A260/A280		A260/A280
M1	0	M2	1,53	M3	1,76	M4	1,35	M5	1,34
M1	0	M2	1,49	M3	0	M4	1,54	M5	1,28
M1	0	M2	1,38	M3	0	M4	1,70	M5	1,24

*M1 = método de extração 1; M2 = método de extração 2; M3 = método de extração 3; M4 = método de extração 4 e M5= método de extração 5.

3.4.2 Produtos das amplificações por PCR

Os resultados das reações de PCR realizadas diretamente após as extrações de DNA estão na Figura 3.4. Nas amplificações utilizando DNA da bactéria pura (Figura 3.4a), percebemos que houve amplificações a partir de DNAs extraídos pelos métodos 1, 3, 4 e 5. As médias das concentrações de DNA extraído pelos métodos 1 e 3 foram baixas, com 4,83 e 0,33 ng mL^{-1}, respectivamente, contudo, houve amplificações de DNA a partir de tais métodos, demonstrando a sensibilidade da técnica de PCR e também que a qualidade do DNA extraído é mais importante do que o rendimento do DNA obtido.

Para as cinco diferentes variedades de cana com bactérias adicionadas diretamente no caldo (Figura 3.4b), também foram observadas amplificações a partir dos métodos de extração de DNA 1, 3, 4 e 5, houve falhas apenas nas amplificações da quinta variedade de cana nos métodos três e quatro. As falhas nas amplificações dos métodos três e quatro ocorreram na mesma variedade, no entanto, ainda não podemos relacionar tais falhas de amplificação com a variedade de cana-de-açúcar correspondente, pois as amplificações ocorreram pelos métodos um e cinco. Constatamos nesta fase, que o caldo da cana-de-açúcar não é fator limitante às reações de PCR e a amplificação do DNA bacteriano em questão, podendo ele influenciar na detecção, mas não comprometê-la a ponto de viabilizá-la.

Para a PCR de extrações de DNA a partir de colmos infectados (Figura 3.4c), não houve nenhuma amplificação, e a ausência de amplificação em todas as amostras provenientes do colmo contaminado pode ser explicada pela presença de polissacarídeos (provenientes da planta), que atuariam inibindo a amplificação da seqüência alvo, inclusive vários autores têm demonstrado a ação inibitória de carboidratos em PCRs (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Jaueerally-Fakin et al., 2002) ou ainda porque substâncias presentes no extrato bruto da cana-de-açúcar poderiam inibir a ação da *Taq* DNA polimerase (Pan et al., 1999; Marcuz et al., 2009).

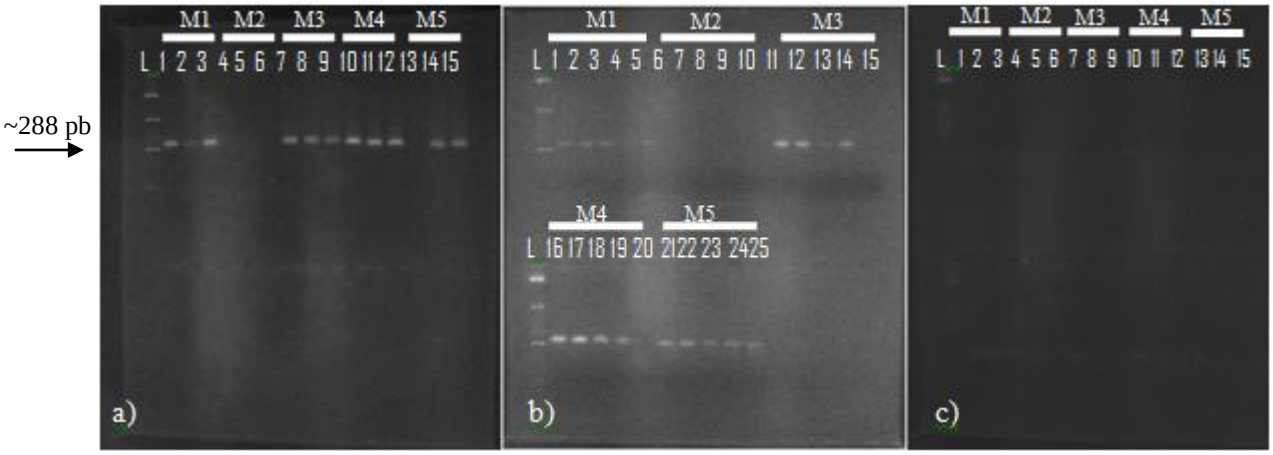

Figura 3.4 Produtos da reação de PCR do DNA de *X. albilineans* de : a) Bactéria pura; b) caldo de 5 variedades + bactérias; c) caldo de colmo infectado. A letra L representa o Ladder (marcador de bandas no gel). O traço branco representa as repetições de cada método de extração e as letras acima de cada um deles estão representados pelos métodos de extração de DNA (M1 a M5).

Mesmo ao adicionar a reação atenuantes de substâncias inibidoras da reação de PCR presentes no caldo, sendo elas BLOTTO, 10% de Skim Milk e à 2% (v/v) (De Boer et al., 1995); PVP (polivinilpirrolidona 8%) à 10% (v/v) e BSA (bovine serum albumin) à 10% (v/v), os resultados não foram satisfatórios, pois não houve amplificações dos produtos da extração do controle positivo (dados não mostrados). Tais resultados não foram semelhantes para De Boer et al. (1995), na qual o DNA extraído de amostras de batata foi amplificado por PCR quando adicionaram BLOTTO a 2%, enquanto que nas reações sem este componente não visualizou-se amplificações no gel de eletroforese na mesma reação.

Melhores resultados nas PCRs a partir de colmos contaminados foram alcançados com diluições do DNA que foi extraído através das cinco metodologias testadas. Detectamos a presença de DNA nos géis após algumas diluições antecedentes à PCR, e a detecção foi melhorando à medida que se diluia os produtos das extrações de DNA em todos os métodos (Figura 3.5), sendo que para a diluição 10^{-3}, conseguimos 100% de amplificações e para diluição 10^{-4} conseguimos 93%, assim além de diluir o DNA extraído estaríamos certamente dissipando os polissacarídeos inibidores da reação de PCR, ressaltando a alta sensibilidade da técnica de PCR, tornando recomendada para a detecção da bactéria mesmo em suspensões muito diluídas. Segundo Pan et al. (1999), a sensibilidade dos "primers" PGBL1 e PGBL2 é estimada em torno de 1 pg de DNA genômico de *X. albilineans*, o que equivale a quatro células da bactéria por reação.

Todas as reações para as diluições em questão foram repetidas cinco vezes para testar se as amplificações iriam variar ou manter a reprodutibilidade. Os resultados foram idênticos para todas as reações. Dessa forma, verificou-se que as reações de PCR dos produtos de DNA diluídos na proporção de 1:1000, além de proporcionar 100% de detecção para todos os métodos de extração de DNA testados, alcançaram reprodutibilidade.

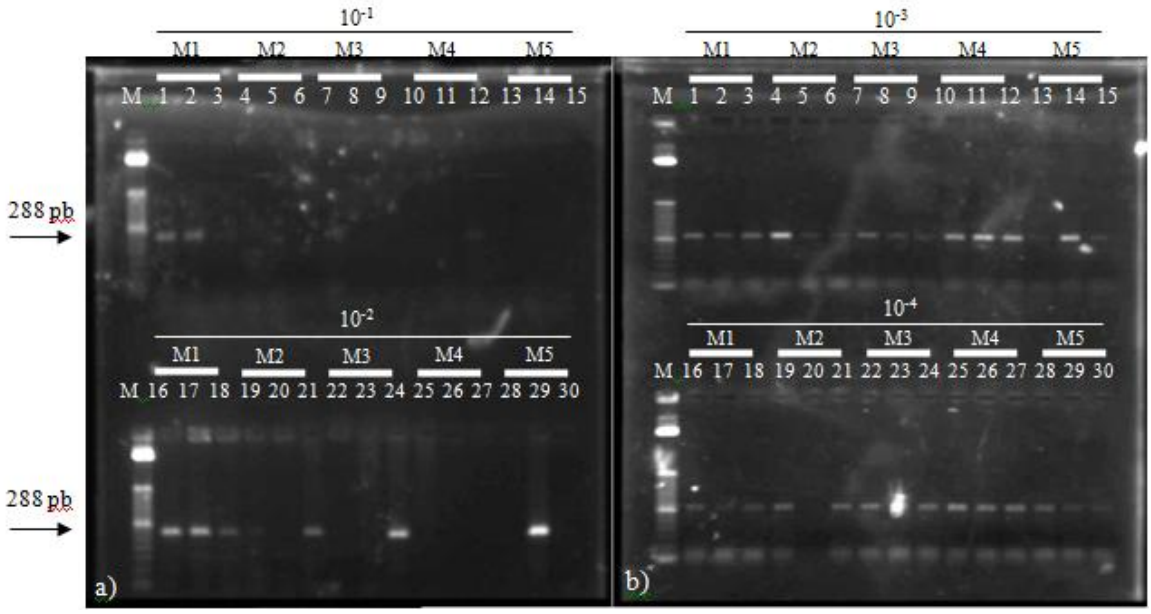

Figura 3.5 Amplificações de DNA extraído a partir de fluído de cana-de-açúcar com sintomas de escaldadura das folhas; a) números de 1 à 15 correspondem a diluição do DNA extraído para 10^{-1} e números 16 à 30 correspondem a diluição 10^{-2}; b) números de 1à 15 são correspondentes a diluição 10^{-3} e os números de 16 a trinta correspondem a diluição 10^{-4}. O traço branco representa as repetições de cada método de extração e as letras acima de cada um deles estão representados pelos métodos de extração de DNA (M1 a M5).

As sequências obtidas a partir de duas reações de PCR de colônia pura foram comparadas com sequências de *X. albilineans* presentes no GenBank. Estas sequências foram alinhadas através do programa Clustal W (Thompson et al., 1994) e uma sequência consenso foi gerada. Esta sequência consenso, denominada Seq, foi comparada com a sequência base do Acesso HM181909.1, denominada X. alb. Os resultados das comparações levaram a um índice de identidade de 98% com o Acesso HM181909.1 (Schneider et al., 2011) que corresponde à sequência de parte da região ITS do RNA ribossomal de *X. albilineans* (Figura 3.6).

```
Seq     CCTGATATGG-TGAGGTCGGTGGTTCGAGTCCTCCCAGACCCACCACTCTGAATGTATCG  68
        ||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
X.alb   CCTGATAAGGGTGAGGTCGGTGGTTCGAGTCCTCCCAGACCCACCACTCTGAATGTATCG  247

Seq     CACACGAAGAATTTGAATGATTCGGCGCTGAGGCCGGGTCGTGTTCTTTAATAATTAGTG  128
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
X.alb   CACACGAAGAATTTGAATGATTCGGCGCTGAGGCCGGGTCGTGTTCTTTAATAATTAGTG  307

Seq     ATGTAGCGAACGTTTGAGAACAATACTCTCGACGTGTCGTTGTGGCTAAGGCGGGGACTT  188
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
X.alb   ATGTAGCGAACGTTTGAGAACAATACTCTCGACGTGTCGTTGTGGCTAAGGCGGGGACTT  367

Seq     CGAGTCCCTAAAATTGAGTCGTTATAGTTCGCGTCCGGGCTTTGTACCCCTGGGCTGAAT  248
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
X.alb   CGAGTCCCTAAAATTGAGTCGTTATAGTTCGCGTCCGGGCTTTGTACCCCTGGGCTGAAT  427

Seq     AAACCCTTGAGGC  261
        |   |||||||||
X.alb   ATGACCTTGAGGC  440
```

Figura 3.6. Alinhamento da sequência consenso Seq e a sequência de um isolado de *X. albilineans* (Acesso HM181909.1 do GenBank) que corresponde à parte da região ITS do RNA Ribossomal desta bactéria. As equivalências são representadas por traços entre as sequências. Os números à direita representam a posição do último nucleotídeo da linha na sequência original.

Estes resultados confirmaram que todas as amplificações a partir da bactéria pura e consequentemente das demais fontes trata-se da sequência de um fragmento genômico de 280 pb de *X. albilineans*, resultante da amplificação dos primers PGBL1 e PGBL2 específicos para esta espécie que anelam na região compreendida entre os genes que codificam para as subunidades 16S e 23 S do RNA ribossomal (Pan et al., 1999). Poucos estudos foram realizados para a diagnose molecular da escaldadura das folhas, mas

Pan et al. (1998; 1999) avaliaram vários “primers”, concluindo que a melhor combinação era proporcionada por PGBL1 e PGBL2.

3.5 CONCLUSÕES

O alto índice de similaridade entre a sequência obtida e a sequência de *X. albilineans* no GenBank (98%), confirma que as bandas resultantes são de DNA amplificado de *X. albilineans.*

Métodos rápidos podem ser tão eficientes quanto a metodologia padrão CTAB, todas as metodologias apresentam uma alta porcentagem de detecção de *X. albilineans*, quando a suspensão de extração de DNA foi diluída em mil vezes.

A diagnose em larga escala desta doença pode ser realizada por meio de PCR, e as metodologias de extração de DNA dois, quatro ou cinco, combinada com diluição de 10^{-3} do produto final, podem ser indicadas para este intuito por serem rápidas, simples e não utilizar fenol como reagente.

Os atenuantes de substâncias inibidoras BLOTTO (10%), PVP (8%) e BSA (10%) da PCR, não bloqueam as substâncias presentes no extrato da cana-de-açúcar, consequentemente não melhora as performances da reação de PCR.

4 OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR ATRAVÉS DE ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, AGENTE CAUSAL DO RAQUITISMO DA SOQUEIRA EM CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO

O Raquitismo das soqueiras é a mais importante doença da cana-de-açúcar, pois pode comprometer a produtividade do canavial. A bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* apresenta grande potencial destrutivo, sobretudo em variedades suscetíveis. No Brasil, sua importância tem sido deixada de lado em função dos erros de identificação e da confusão de seus prejuízos com aqueles causados por problemas de stress hídrico. Assim as bactérias podem estar se multiplicando e disseminando de forma despercebida. A diagnose dessa doença em lavouras ou em campos de multiplicação é extremamente necessária, para tentar impedir o avanço deste tipo de doença. A técnica de PCR é a mais sensível, dentre as técnicas em uso, mais ainda não é a mais viável, porque além da presença de substâncias inibidoras presentes no fluído vascular da cana-de-açúcar, que induzem falsos negativos nos resultados, os protocolos de extração de DNA de boa qualidade consomem muito tempo o que dificulta à análise de grande número de amostras. Por isso, comparamos cinco diferentes métodos rápidos de extração de DNA de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* a partir de três fontes: Cultura pura, inoculações diretas de isolado da bactéria em caldo de cinco diferentes variedades de cana-de-açúcar, e a partir do colmo de plantas infectadas. Todos os métodos buscaram como objetivo a otimização das reações de PCR, para viabilizar as análises em larga escala de amostras provenientes das usinas sucroenergéticas. Constatamos que métodos rápidos de extração, inclusive o CTAB não consegue detectar a bactéria presente no caldo do colmo infectado, estudos adicionais precisarão ser realizados para viabilizar a utilização de PCR como método de diagnose de raquitismo da soqueira em larga escala.

Palavras – chave: Gram positiva, fastidiosa, detecção molecula
cadeia da polimerase.

4 OPTIMIZATION OF A PCR TECHNIQUE THROUGH COMPARATIVE ANALYSIS OF DNA EXTRACTION METHODS OF *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, CAUSAL AGENT OF THE RATOON STUNTING DISEASE IN SUGARCANE

ABSTRACT

The Ratoon Stunting disease can compromise the productivity of sugarcane, caused by the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, it has great destructive potential, especially in susceptible varieties. In Brazil, its importance has been left out on the basis of misidentification and confusion of their losses to those caused by problems of water stress. Thus bacteria may be multiplying and spreading unnoticed. The diagnosis of this disease in crops or in fields of multiplication is extremely necessary to try to prevent the spread of such disease. PCR is the most sensitive among the techniques in use, but still not the most safe, as well as the presence of inhibitory substances present in fluid of sugarcane, which makes analysis of large numbers of samples. This work compares five different methods of rapid DNA extraction from three sources of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* DNA from pure culture, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* broth directly in five different varieties of sugarcane, and stalk infected individuals. The main objective was to optimize the PCR reactions, to enable the large scale analysis from plants in the production areas. It was found that rapid methods of extraction, including CTAB can’t detect the bacteria present in the juice of the infected stem. More studies need to be done to succeed in transforming the PCR method for detection of ratoon stunting disease on a large scale.

Key words: Leifsonia xyli subsp. *xyli*, molecular detection, polymerase chain reaction, DNA extraction

4.1 INTRODUÇÃO

O raquitismo-da-soqueira (RDS), causado por *Leifsonia xyli* subsp *xyli* (Lxx) é uma das principais doenças da cana-de-açúcar, podendo causar prejuizos de 5 a 30% na produtividade. A doença causa danos à cultura nas principais regiões do mundo onde a agroindústria sucroalcooleira está presente (Davis et al., 1994).

Nas variedades suscetíveis os sintomas em 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 veranico 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, stress hídrico ou com sintomas de outras doenças da cultura.

Com expansão de área de cana-de-açúcar pelos principais estados produtores, a doença pode estar sendo disseminada pela multiplicação inadequada da cana-planta, que por muitas vezes, é multiplicada sem nenhuma inspeção ou tratamento. A lavoura de cana-de-açúcar apresentou nesta safra um desenvolvimento aquém do ideal e inferior ao da safra passada, levando a uma produtividade menor que a estimada inicialmente pelos produtores (Conab - Companhia Nacional De Abastecimento, 2012). Além dos fatores climáticos, fatores fitossanitários também podem estar causando a degenerescência do canavial.

Para tentar diminuir as causas da redução da produtividade nas lavouras é imprescindível a constatação da doença principalmente em talhões de viveiro ou talhões que futuramente servirão de mudas para expansão de áreas de cultivo comercial. Tal constatação vem sendo realizada por alguns laboratórios no Brasil, e as análises são realizadas por métodos sorológicos, que apresentam a vantagem de detectar a bactéria quantitativamente, mas apresenta a desvantagem de que o nível de sensibilidade da bactéria *Lxx* é inferior ao da técnica de PCR.

A PCR, embora seja considerada o método de detecção mais sensível, é o que apresenta o menor percentual de detecção, como demonstraram Gao et al., (2008) ao comparar os métodos de detecção por PCR, Dot blot e EB-ELISA, constataram que o Dot blot e o EB-ELISA permitem detecção de 90%, contra 61% pela técnica de PCR. Além

disso, Marcuz et al. (2009) compararam a detecção por Dot blot e PCR e verificaram que a reprodutibilidade das amplificações por PCR não eram constantes, provavelmente devido à ação de inibidores da reação presentes nos extratos brutos da cana-de-açúcar, os quais anteriormente já foram apontados como um problema a ser superado para que esse método possa ser utilizado na diagnose de rotina do Raquitismo das soqueiras.

A técnica da reação em cadeia da polimerase é mais sensível, mas ainda não é a mais segura e viável, porque além da presença de substâncias inibidoras presentes no fluído vascular da cana-de-açúcar, que induzem falsos negativos nos resultados, e os protocolos de extração de DNA de boa qualidade demanda muito tempo, o que dificulta à análise de grande número de amostras. Isto inviabiliza a utilização de PCR rotineiramente em laboratório de diagnose de RDS, assim este trabalho objetivou comparar cinco metodologias rápidas de extração de DNA para que a detecção por PCR.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção das células bacterianas de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e dos colmos contaminados com a bactéria

As células bacterianas foram cedidas por pesquisadores da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ). A variedade de cana-de-açúcar utilizada como controle positivo foi a CB 49-260, sabidamente infectada com a bactéria Lxx.

4.2.2 Obtenção do fluído vascular da cana-de-açúcar

O fluído vascular dos colmos contaminados foi obtido através da metodologia descrita por Carneiro Jr et al. (2004). A parte basal dos colmos foram descascadas (Figura 4.1b) e segmentos de cana de 5 mm de diâmetro por 1 cm de comprimento foram retirados (Figura 4.1c). Cada segmento foi acondicionado em tubos eppendorf de 1,5 mL (Figura 4.1d) e estes por sua vez centrifugados a 3.000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o segmento foi descartado e para cada tubo com o fluído extraído, adicionou-se uma gota de Amônia quaternária 2% para estabilizar a solução contendo a bactéria.

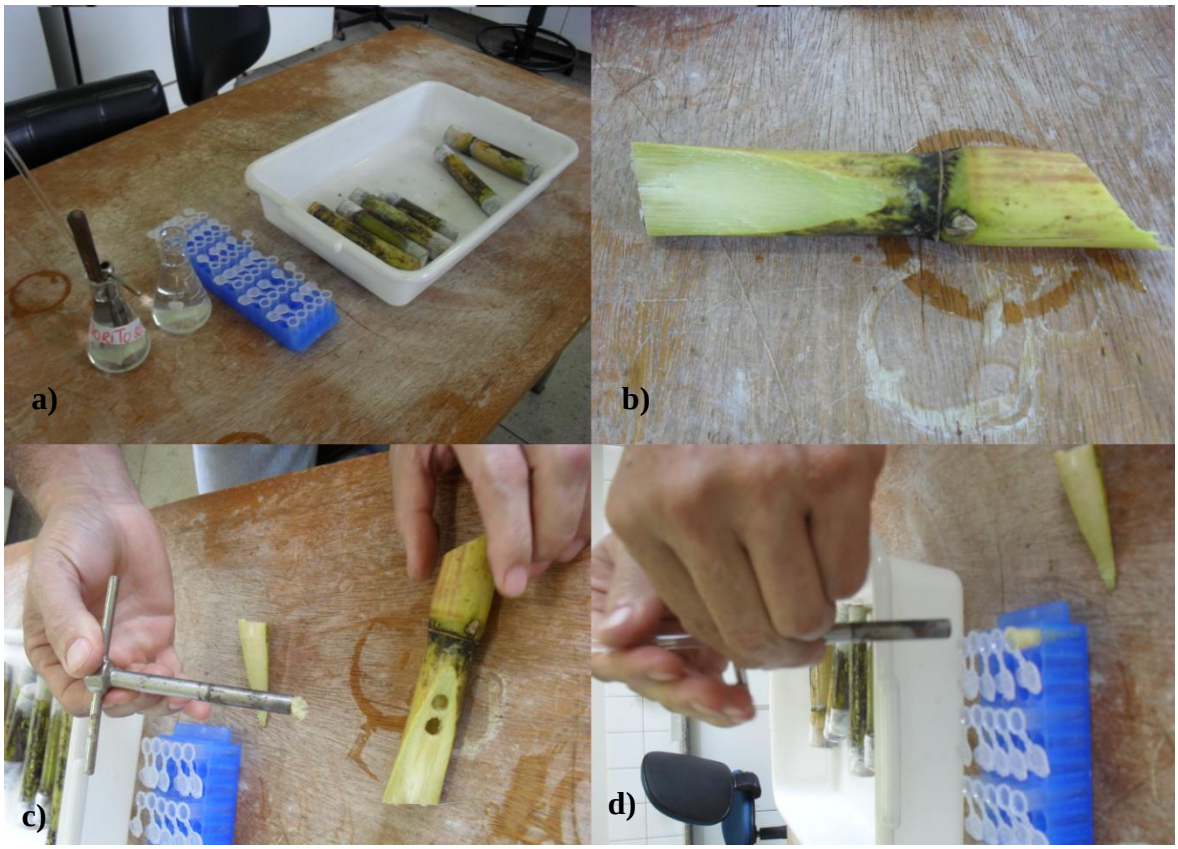

Figura 4.1 Metodologia de extração de DNA. a) materiais utilizados na extração; b) corte da parte basal do colmo; c) segmentos fibrovasculares da amostra sendo retiradas com auxílio de um furador cilíndrico; d) o segmento acondicionado em tubo eppendorf com auxilio de bastão de vidro.

4.2.3 Comparação de diferentes métodos rápidos de extração de DNA

A primeira delas foi escolhida como um método padrão (denominado CTAB) e as demais classificadas como métodos rápidos de extração de DNA. As extrações foram feitas a partir de três fontes distintas: cultura bacteriana pura, células bacterianas adicionadas ao fluído da cana e, por último, fluídos de colmos de canas infectadas com Lxx.

Para a primeira fonte, 50 µL de células bacterianas de Lxx em meio líquido S8 foram diluídas em 50 mL de PBS (tampão de fosfato 0,1M em solução salina, com pH ajustado para 7,0). Após a diluição as células bacterianas foram quantificadas em espectrofotomêtro OD 660. A solução bacteriana foi homogeneizada em vortex e alíquotas de 160 µL foram transferidas para 15 tubos do tipo eppendorf, para extração de DNA comparando cinco metodologias distintas e assim cada método de extração de DNA a ser

testado foi realizado em triplicata. Para a segunda fonte, 10 µL da suspensão bacteriana foram transferidas para 25 tubos eppendorf, contendo 150 µL de fluído vascular de 5 variedades diferentes de cana-de-açúcar (RB 952857, RB 925211, RB 925345, RB 867515, RB 72454) e testou-se os cinco métodos de extração de DNA.

Na terceira e última fonte, colmos de cana com sintomas evidentes da doença foram coletados e extraídos o fluído vascular, conforme metodologias descritas anteriormente. Sendo que 15 amostras foram retiradas da parte basal dos colmos e cinco diferentes metodologias de extração de DNA foram comparadas, dessa forma os testes também foram realizados em triplicata (três repetições para cada método de extração).

Após as extrações, cada amostra de DNA teve sua concentração e pureza determinadas através das leituras de absorbância em 260 nm (Concentração do DNA em mg/mL = Absx100x50) (Sambrook et al., 1989) em 280 nm (quantificação de proteínas), no espectrofotômetro Amershan Pharmacia Biotech. A razão entre as leituras em 260 nm e 280 nm foi utilizada como um indicativo da pureza do DNA obtido.

4.2.3.1 Extração de DNA segundo Alsubel, (1992), com modificações – Método 1

O volume inicial foi de 160 µL e este volume centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 567 µL de TE (1 mL de Tris 1 M pH 8.0, 200 µL de EDTA 0.5 M pH 8.0, completando com H_2O para 100 mL) mais 30 µl de SDS 10% e 5 µL de proteinase K 20mg mL^{-1} (concentração final de 100 µg mL^{-1}). A amostra foi encubada por 1 hora a 55°C. Após este período, foi adicionado 100 µL de NaCl 5 M e 160 µL de CTAB 5%, incubando a mesma por 10 minutos a 65°C. Em seguida foi adicionado 800 µL de clorofórmio/álcool isolamílico (24:1, respectivamente), centrifugando a amostra por 5 minutos a 12.000 rpm.

A fase superior foi removida para outro tubo de microcentrífuga e adicionado igual volume de clorofórmio/álcool isolamílico (24:1), centrifugando novamente por 5 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 2 V de etanol. A mistura foi mantida à -20°C durante duas horas, centrifugando após este período por 5 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 600 µL de etanol 70% seguida de centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi lavado com 300 µL de etanol 100% e novamente centrifugado a

10.000 rpm por 5 minutos. Após secagem, o pellet foi dissolvido em 50 µL de 1/10 de TE + Rnase e mantido à -20°C.

4.2.3.2 Extração de DNA segundo Davis et al. (1997) – Método 2

Centrifugou-se 160 µL de volume inicial a 6.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de TAE (0,04 de Tris-Acetato; 1,0 mM de EDTA pH 8.0). Foi realizada uma nova centrifugação a 6.000 rpm por 15 minutos, descartou-se o sobrenadante e o pellet coberto 0,5 mL de TAE ajustado com 0,4% de "Skim Milk" (leite desnatado em pó). As amostras foram encubadas por duas vezes a 100°C por 10 minutos, em seguida resfriadas em gelo/água por 3 minutos.

4.2.3.3 Extração de DNA segundo Taylor et al. (2003) – Método 3

O fluído fibrovascular foi centrifugado à 10.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O pellet foi ressuspendido e lavado duas vezes em água destilada e esterilizadas. A suspensão foi colocada por dois minutos em banho fervente e logo em seguida resfriada em gelo por 10 minutos.

4.2.3.4 Extração de DNA Bacteriano – Método 4

O volume inicial de 160 µL foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado, o pellet foi ressuspendido em 500 µl de Tris-EDTA (Tris 50mM e EDTA a 1mM) + SDS 2%, misturou-se em vortex e as amostras foram mergulhadas por 5 minutos em banho fervente, após resfriar em bancada adicionou-se 50 µL de NaCl 3 M, misturou-se as amostras em vórtex e m seguida adicionou-se 1 mL de etanol 100%, e colocados em freezer por 30 minutos, decorrido o tempo centrifugou-se por 10.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 100 µL de água milli Q autoclavada.

4.2.3.5 Extração de DNA segundo Gao et al. (2008) – Método 5

As amostras com volume inicial de 160 µL foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 50 µL de buffers A (0,1 M de NaOH + 2 % de tween 20), a solução misturada em vortex e encubada a 95°C por 10 minutos e refriada em gelo por 3 minutos, em seguida adicionou-se 50 µL de buffer B (0,1 M de Tris-HCl [pH 8.0] + 2mM EDTA) e para finalizar misturou-se em vórtex.

4.2.4 Reações de PCR específicas para detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

As reações de PCR com 20 µL de volume total foram constituídas por 1 µL do DNA, tampão da enzima polimerase (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,3), 0,8 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1,0 µM de cada primer Cxx1 - 5' ACCCTGTGTTGTTTTCAACG 3' e Cxx2 - 5' CCGAAGTGAGCAGATTGACC 3') (Pan et al., 1998) e uma unidade de *Taq* polimerase. As condições de amplificação foram um ciclo de desnaturação a 95°C por cinco minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por trinta segundos, extensão a 72°C por trinta segundos, e extensão final a 72°C por dez minutos (Gao et al., 2008).

Os produtos da amplificação foram visualizados após serem carregados num gel de 1,5% de agarose numa solução tampão de Tris borato de EDTA, com gradiente de 6,6 V cm^{-1}, por cerca de duas horas. Anterior a essa corrida o gel foi corado com 2 µL Gel red (invitrogen) adicionado juntamente com o tampão de carregamento e observado sob luz ultravioleta.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na quantificação do DNA extraído, fez-se uma média entre cada um dos métodos de extrações que foram realizadas com três ou cinco repetições (Tabela 4.1). O método 1 (tampão CTAB), considerado neste trabalho como o método padrão de extração de DNA, foi o método que produziu a menor concentração de DNA, com média de 4,11ng mL^{-1}. Dentre os outros quatro métodos, os métodos de extração de DNA que recuperam maior concentração de DNA foram os métodos cinco, três e quatro que atingiram médias de 44,98; 30,88 e 26,37 ng mL^{-1}, respectivamente.

Tabela 4.1. Média do resultado do DNA quantificado sobre luz UV e absorbância de A260 nanômetros.

Bactéria Pura	média[ng/mL]	Bactéria + caldo	média[ng/mL]	Colmo infectado	média[ng/mL]	**Média**
M1	2,83	M1	6	M1	3,5	**4,11**
M2	9,33	M2	10,7	M2	4,83	**5,17**
M3	31,33	M3	57,5	M3	3,83	**30,88**
M4	41,50	M4	33,8	M4	9,83	**26,37**
M5	51,83	M5	61,8	M5	21,33	**44,98**

*M1 = método de extração 1; M2 = método de extração 2; M3 = método de extração 3; M4 = método de extração 4 e M5= método de extração 5.

As leituras obtidas com os filtros de absorbância de A260 e A280nm foram utilizados para calcular a relação A260/A280 e inferir o grau de pureza das amostras de DNA extraídos a partir das três fontes de DNA de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Tabela 4.2). Amostras com valores entre 1,8 e 1,9 podem ser consideradas puras, e os que mais se aproximaram destes valores foram os métodos de extração de DNA 4 e 5, com valores entre 1,25 e 2,26; 1,51 e 2,06 respectivamente.

Tabela 4.2 Concentração e pureza do DNA extraído a partir dos cinco métodos de extração com três fontes de fontes de DNA, determinadas através das leituras de absorbância sobre luz UV e A260/A280.

Bactéria Pura									
	A260/A280		A260/A280		A260/A280		A260/A280		A260/A280
M1	0	M2	0	M3	1,61	M4	1,73	M5	1,60
M1	0	M2	2,73	M3	1,82*	M4	1,70	M5	1,92
M1	0	M2	0	M3	0	M4	1,72	M5	1,82*
Bactéria Pura + caldo									
	A260/A280		A260/A280		A260/A280		A260/A280		A260/A280
M1.1	0	M2.1	0	M3.1	1,42	M4.1	2,26	M5.1	1,59
M1.2	0	M2.2	2,5	M3.2	1,32	M4.2	1,25	M5.2	1,48
M1.3	0	M2.3	10,5	M3.3	1,43	M4.3	1,88*	M5.3	1,51
M1.4	0	M2.4	9,33	M3.4	1,47	M4.4	1,26	M5.4	1,67
M1.5	0	M2.5	0	M3.5	1,85*	M4.5	2,4	M5.5	2,06
Caldo Infectado									
	A260/A280		A260/A280		A260/A280		A260/A280		A260/A280
M1	0	M2	0	M3	1,61	M4	1,73	M5	1,60
M1	0	M2	2,7	M3	1,82*	M4	1,70	M5	1,92
M1	0	M2	0	M3	0	M4	1,72	M5	1,82*

* Amostras consideradas puras estão entre os valores de 1,8 e 1,9.

As amplificações de DNA por PCR a partir da bactéria pura, caldo de cinco variedades + bactéria adicionada diretamente no caldo e caldo de colmo infectado com a bactéria estão expostas na Figura 9. Na primeira fonte de DNA, ocorreram no total seis amplificações de quinze amostras, sendo três a partir do método de extração de DNA três, duas a partir do método de extração de DNA quatro e uma no método de extração de DNA dois. Para a bactéria adicionada ao caldo de cinco variedades diferentes de cana-de-açúcar as amplificações ocorreram apenas nos métodos de extração de DNA dois e quatro, mas com 100% de eficiência. Já ao realizar a PCR a partir de extrações de DNA de colmos infectados com Lxx, não ocorreu amplificação alguma, independentemente do método testado.

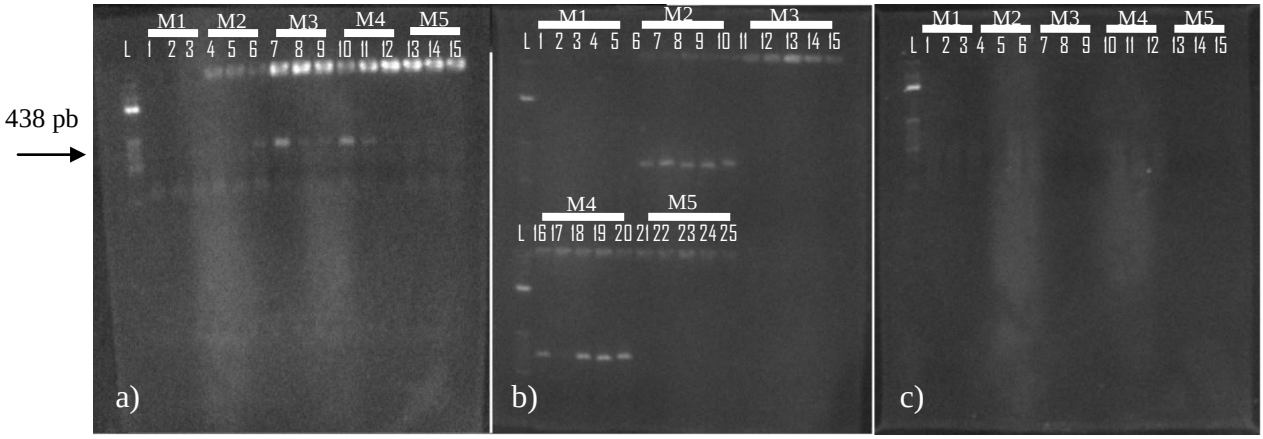

Figura 4.2. Produto das amplificações por PCR. a) amplificações a partir da bactéria pura; b) amplificações a partir da bactéria adicionadas ao caldo de colmos contaminados; c) Gel a partir de colmos sabidamente contaminados. Os traços em branco representam as repetições para cada método de extração de DNA (M1 a M5).

Nem mesmo ao realizar diluições a 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} do caldo infectado não houve amplificações do DNA da bactéria Lxx presentes no extrato. Três repetições de cada reação e de cada diluição foram realizadas para testar se realmente não ocorriam amplificações. Marcuz et al. (2009) também não constataram a presença de *Leifsonia xyli subsp. xyli* nas variedades e clones RB, e mesmo nos testes com amostras de CB-49260 e SP70-1078 utilizadas como controles positivos, a reprodutibilidade das amplificações por PCR não eram constante, provavelmente devido à ação de inibidores da reação presentes nos extratos brutos da cana-de-açúcar, os quais anteriormente já foram apontados como um problema a ser superado para que esse método possa ser utilizado na diagnose de rotina do RSD (Pan et al., 1998).

4.5 CONCLUSÕES

Para extrair DNA de Lxx da cultura pura, verificamos que o método de extração de DNA que pode ser recomendado por ser simples, rápido e eficaz para posterior amplificação por PCR é o método três.

Para amplificações do extrato de cana infectado com a bactéria não conseguimos obter amplificações em nenhum dos métodos testados.

Estudos adicionais são necessários para se conseguir detectar Raquitismo da soqueira através de métodos rápidos de extração de DNA para análise laboratorial por PCR em larga escala.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Visto a importância das bacterioses em cana-de-açúcar em relação à produtividade do canavial, é necessário divulgar para os grandes grupos sucroenergéticos do país a importância de conhecer os problemas fitossanitários que podem vir a prejudicar a lavoura. Destaca-se a importância de diagnosticar Raquitismo das soqueiras e Escaldadura das folhas pelo menos em áreas que servirão para futuras multiplicações e expansões do canavial.

Por isso, analisou-se neste trabalho a viabilização de métodos de detecção por PCR, por este ser o mais sensível, para detecção em grande escala no laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Goiás. E com este trabalho concluímos que a detecção de *Xanthomonas albilineans* através de PCR pode ser realizada usando métodos rápidos de extração de DNA, mas que seu produto deve ser diluído em pelo menos mil vezes para que a detecção possa atingir níveis aceitáveis de confiabilidade e reprodutibilidade. Já para detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* não conseguimos viabilizá-la através de métodos rápidos de extração de DNA.

6 REFERÊNCIAS

AKIBA, F. **Isolamento, inoculação e sobrevivência de Xanthomonas albilineans e avaliação de resistência à escaldadura das folhas em cana-de-açúcar**. 1978. 97 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) -, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiros/ USP, Piracicaba, 1978.

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

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHAND, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D.J.K BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 325, n. 6, p. 3389 - 3402, 1997.

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

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

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, 1987.

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.

CASAGRANDE, M. V.; SANGUINO, A.; FEREZINI, 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 AGRONOMICA**. Piracicaba, 1997. 183 - 190 p.

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

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Avaliação da safra agrícola de cana-de-açúcar. **3º Levantamento da safra 2011**. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 10 de jan 2012.

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

DAVIS, M. J.; DEAN, J. L.; MILLER, J. D.; SHINE JR, J. M. A method to screen for resistance to ratoon stuting 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 containg 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.

DE BOER, S. H.; WARD, L. J.; LI, X.; CHITTARANJAN, S. Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. **Nucleic Acids Research**, oxford, v. 23, p. 2567 - 2568, 1995.

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.; DOROFEEVA, L. V.; SUBBOTIN, S. A.; COLE, J. R.; TIEDJE, J. M. Leifsonia poae gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on Poa annua, and reclassification of Corynebacterium aquaticum Leifson 1962as 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., com. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol,**, PUSHCHINO, v. 50, n. 50, p. 371 - 380, 2000.

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

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.

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.

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.

GOMES, L. H.; DUARTE, K. M. R.; ANDRINO, F. G.; TAVARES, F. C. A. A Simple Method For DNA Isolation From *Xanthomonas* spp. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 553 - 555, 2000.

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.

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

HOY, J. W.; GRISHAM, M. P.; DAMANN, K. E. Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. **Plant Disease**, Houma, v. 83, n. 12, p. 1170 - 1175, 1999.

HSU, H. T. Development of enzyme linked, tissue blot and dot blot immunoassays for plant virus detection. **Plant Pathology**, Madison, v. 508, n. 1, p. 15 - 25, 2009.

JAUEERALLY-FAKIN, Y.; AUTREY, J. C.; DANIELS, M. J.; DOOKUN, A. Genetic polymorphism among *Xanthomonas albilineans* strains, using a single oligonucleotide primer. **European Journal of Plant Pathology**, Roma, v. 108, n. 2, p. 121 - 130, 2002.

MARCUZ, F. S.; SOUTO, E. R.; VIEIRA, R. A.; MARRAFON, M. A.; BARBOZA, A. A. L.; DAROS, E. Levantamento da incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em plantios de cana-de-açúcar do noroeste do Paraná. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, n. 4, p. 1935 - 1939, 2009.

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: Elservier, 1961. 109 - 126 p.

MATSUOKA, S. **Raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar: diagnose da moléstia e estúdios sobre o agente causal**. 1972. 77 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) -, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1972.

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

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.

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 Technologistis. 1977, São Paulo.p 439 - 448.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 720 p.

SCHAAD, N. W.; STALL, R. E. **Plant Pathogenic Bacteria. LABORATORY GUIDE FOR IDENTIFICATION OF**. St Paul: APS PRESS., 1988.

SCHNEIDER, S.; SMITH, T.; HANSEN, U. SCOREM: statistical consolidation of redundant expression measures. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, n. 3, p. 1 - 12, 2011.

SILVA, K. M. M. **DETECÇÃO MEDIANTE TÉCNICA DE PCR E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Xanthomonas albilineans*, AGENTE CAUSAL DA ESCALDADURA DAS FOLHAS EM CANA-DE-AÇÚCAR**. 2006. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) - Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2006.

TAYLOR, P. W. J.; PETRASOVITS, L. A.; VAN DER VELDE, R. G.; 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**, Queensland, v. 32, n. 5, p. 367 - 375, 2003.

THOMPSON, J.; HIGGINS, D.; GIBSON, T. CLUSTAL W:Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment though sequence wighting, position-specific gap penalties and weitht matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673 - 4680, 1994.

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.

WANG, Z. K.; COMSTOCK, J. C.; HATZILOUKAS, E.; SHAAD, N. W. Comparasion of PCR, Bio-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of , the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pahology**, Oxford, n. 2, v. 48, p. 245 - 252, 1999.