

# Detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar

Danielle de Oliveira<sup>1,2</sup>, Alfredo Seiiti Urashima<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Via Anhanguera Km 174, CEP 13600-000, Araras, SP, Brazil. <sup>2</sup>Mestranda PPGPVBA (Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados), Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Via Anhanguera Km 174, CEP 13600-000, Araras, SP, Brazil. bolsista Capes

Autor para correspondência: Alfredo Seiiti Urashima (alfredo.urashima@ufscar.br)

Data de chegada: 01/06/2017. Aceito para publicação em: 02/10/2017.

10.1590/0100-5405/180882

## RESUMO

Oliveira, D.; Urashima, A.S. Detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. *Summa Phytopathologica*, v.44, n.3, p.223-228, 2018.

A primeira grande mudança nos últimos anos do setor sucroenergético brasileiro ocorreu quando a colheita mecânica substituiu os cortes manuais de canas queimadas. A segunda transformação começou com a mecanização de materiais de plantio e isso só está sendo possível pelo uso da nova metodologia: mudas pré-brotada (MPB). Para garantir o sucesso desta inovação é fundamental o uso de MPB sadia, especialmente contra a doença raquitismo-das-soqueiras, causada pela bactéria fastidiosa *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). Esta doença é considerada a mais importante da cultura e o único meio de introdução para novas áreas é o plantio de materiais propagativos contaminados. Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de desenvolver um exame diagnóstico para a detecção precoce de Lxx em MPB. No primeiro ensaio, a eficácia de

quatro pares de *primers* (Cxx ITSf # 5/Cxx ITSr # 5, Cxx1/ Cxx2, C2F/C2R, LX23SF/LX23SR) foi examinada para identificar plantas adultas contaminadas com diferentes títulos de Lxx, nas condições originais, bem como em adaptações propostas nesse estudo, as nossas próprias modificações. Para isso foram utilizadas cana-de-açúcar adulta. No segundo ensaio, os dois melhores *primers*/condições foram testadas em MPB de 45 e 60 dias de idade derivados de materiais contaminados com Lxx. Dados do presente estudo mostraram que o par de *primers* CXX ITSf # 5/Cxx ITSr # 5 sob nossas modificações foi o mais acurado, uma vez que Lxx foi detectada em todos os 52 MPB de 45 dias originadas de materiais propagativos contaminados com 10<sup>9</sup> até 10<sup>6</sup> UFC / mL de Lxx.

**Palavras-chave:** raquitismo-das-soqueiras, disseminação, controle, diagnóstico.

## ABSTRACT

Oliveira, D.; Urashima, A.S. Detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in presprouted seedcane. *Summa Phytopathologica*, v.44, n.3, p.223-228, 2018.

The first great change in recent years in the Brazilian sugarcane industry occurred when mechanical harvest replaced manual cuttings of burned canes. The second transformation has started with mechanization of planting materials thanks to new methodology such as presprouted seedcane (MPB in Portuguese). To ensure the success of such innovation, the use of healthy MPB is fundamental, especially against ratoon stunt, caused by *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). This is considered the most important disease of sugarcane and the only means of introducing it to new areas is by the planting of contaminated propagative materials. Therefore, the aim of this study was to develop a diagnostic assay for early detection of Lxx in MPB. In the first assay, the

efficacy of four primer pairs (Cxx ITSf#5/Cxx ITSr#5, Cxx1/Cxx2, C2F/C2R, LX23SF/LX23SR) was examined to identify adult plants contaminated with various titers of Lxx, under original conditions, as well as adapted conditions proposed in this study, our own modifications. Thus, adult sugarcane was used. In the second assay, the two best primers/conditions were tested in 45- and 60-day-old MPB derived from Lxx-contaminated materials. Data of the present study showed that the primer pair CXX ITSf # 5/CxxITSr # 5, under our modification conditions, was the most accurate since Lxx was detected in all 52 MPB aged 45 days from propagative materials contaminated with 10<sup>9</sup> to 10<sup>6</sup> CFU/mL.

**Keywords:** ratoon stunting, dissemination, control, diagnostic

Através da cana-de-açúcar podem-se obter vários produtos: açúcar, que é consumido mundialmente; o etanol, que é um combustível sustentável, sendo que o etanol produzido de cana tem maior rendimento quando comparada com o etanol de milho; e também energia elétrica, que é uma ótima opção sustentável, principalmente comparado com as termoeletricas (1).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar com a safra 2016/17 estimada em mais de 690 milhões de toneladas (5). A produção de cana tem crescido a cada ano, sendo que na safra de 2015/16 houve um aumento de 3,1% e na safra de 2016/2017 de 3,8%. Entretanto a produtividade não cresce na mesma proporção, tendo crescido apenas 2,4% em 2015 e sofrendo decréscimo de 1% em 2016 (4, 5), ou seja, o aumento de produção está ocorrendo mais pelo aumento de área do

que por aumento de produtividade.

Uma das causas de declínio de produtividade da cana é o raquitismo-da-soqueira (RDS), que tem como agente causal a bactéria fastidiosa *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) que é uma das principais doenças da cultura. Em um estudo nos Estados Unidos, o RDS causou uma quebra que variou de 9 a 33% em sete das oito variedades testadas (11). Em outro experimento na Austrália a quebra variou de 12 a 37% (24). De acordo com Viswanathan (23) na Índia o declínio na produtividade foi de até 50%. No Brasil, em um experimento conduzido por Chagas & Matsuoka (2) a quebra foi de 21% e em outro experimento de 2009, variou de 1,6 a 27,5% (10).

Como a bactéria não possui vetor natural, a única forma de disseminação para novas áreas se dá por mudas infectadas e a

transmissão para as plantas sadias ocorre através de facões e implementos agrícolas (12). No Brasil, em busca de adequar as leis ambientais, diminuir custos e aumentar a qualidade, a produção de cana vem sendo mecanizada. Essa transformação do setor se iniciou na colheita e atualmente, está em processo de mecanização a fase do plantio com o emprego de mudas pré-brotadas (MPB) que traz grandes vantagens, como mudas de alta qualidade e maior uniformidade do canavial, além de minimizar a disseminação de pragas de solo e reduzir até 90% da quantidade de mudas que vão para o campo (13).

Para garantir o sucesso desta inovação e que seu emprego ocorra em todo o Brasil, é necessário que as MPB não sejam disseminadoras de patógenos. Comstock et al. (3) em sua pesquisa comprovou que quanto maior o inóculo inicial de Lxx, maior a incidência de RDS. Sendo assim, o sucesso no controle da Lxx está na efetividade da exclusão deste patógeno, pois uma vez instalada, a doença causa declínio da produtividade, podendo chegar ao ponto de ser inviável a manutenção do canavial, tendo como consequência a realização da reforma precoce (14).

Como a Lxx é de natureza fastidiosa, o RDS não apresenta sintomas característicos, tornando-se necessária a diagnose laboratorial (19). Atualmente a detecção da Lxx para exame de rotina tem sido feita por sorologia, que tem como material de análise a seiva da cana-de-açúcar, entretanto, como as MPB vão para o campo com 60 dias (13), não é possível coletar seiva nesta fase.

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

### Extração de DNA

A extração de DNA total foi realizada empregando-se o método CTAB (16). Para as canas adultas, o tecido do entrenó foi utilizado para a extração do DNA e nas MPB, o tecido do nó (Tabela 1).

### Diagnose Molecular

A diagnose molecular foi realizada empregando-se quatro pares de *primers*, a saber Cxx1 (5' – CCG AAG TGA GCA GAT TGA CC) e Cxx2 (5' – ACC CTG TGT TGT TTT CAA CG) (17), CxxITS#5 (5' – TCA ACG CAG AGA TTG TCC A) e CxxITS#5 (5' – GTA CGG GCG GTA CCT TTT C) (7), LX23SF (5' – ACC TCC TTT CTA AGG AGC) e LX23SR (5' – TGA ATT GAT CGG CTC ACC) (9) e C2F (5' – CGA GTT TGG GTT TCT GCC TGC) e C2R (5' – AGG TGG CAG CGA CAA CGG TGC) (20). Esses quatro pares de *primers* foram empregados nas condições de amplificação originais e para os três primeiros pares de *primers*, uma segunda condição foi adaptada, incorporando-se as condições de Taylor et al. (20) acrescido de 1°C na temperatura de anelamento. Já a adaptação para o *primer* de Taylor et al. (20) foi a incorporação das condições de amplificação de Pan et al. (17).

### Parâmetros de avaliação da eficácia dos *primers*

O desempenho dos *primers* e suas adaptações foi avaliado em três etapas. Na primeira etapa, foi utilizado materiais com diferentes títulos da Lxx (Tabela 1), cujas concentrações foram determinadas utilizando a técnica sorológica de *Dot-ELISA*, onde o limite mínimo para detecção é de 10<sup>6</sup> UFC/ml (22). Nessa etapa o parâmetro empregado foi sensibilidade, ou seja, a capacidade do *primer* de detectar indivíduos doentes. Na segunda, foi utilizado DNA de diferentes microrganismos (Tabela 1), patogênicos ou não à cana-de-açúcar e avaliado sua capacidade de identificar indivíduos sadios ou sem o

**Tabela 1.** Lista de DNA utilizados nos testes de sensibilidade, especificidade e acurácia dos *primers* específicos para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

Hospedeiro	Patogeno	Concentração patógeno	Localização
Cana-de-açúcar	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	10 <sup>6</sup> UFC/mL	Araras, SP
Cana-de-açúcar	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	10 <sup>7</sup> UFC/mL	Araras, SP
Cana-de-açúcar	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	10 <sup>8</sup> UFC/mL	Araras, SP
Cana-de-açúcar	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	10 <sup>9</sup> UFC/mL	Araras, SP
Cana-de-açúcar	S.P	Neg. Dot-ELISA	Araras, SP
Cana-de-açúcar	S.P	Neg. Dot-ELISA	Araras, SP
Cana-de-açúcar	S.P	Neg. Dot-ELISA	Araras, SP
Cana-de-açúcar	S.P	Neg. Dot-ELISA	Araras, SP
MPB com 45 dias	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	10 <sup>6</sup> UFC/mL	Araras, SP
MPB com 45 dias	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	10 <sup>7</sup> UFC/mL	Araras, SP
MPB com 45 dias	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	10 <sup>8</sup> UFC/mL	Araras, SP
MPB com 45 dias	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	10 <sup>9</sup> UFC/mL	Araras, SP
MPB com 60 dias	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	10 <sup>6</sup> UFC/mL	Araras, SP
MPB com 60 dias	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	10 <sup>7</sup> UFC/mL	Araras, SP
MPB com 60 dias	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	10 <sup>8</sup> UFC/mL	Araras, SP
MPB com 60 dias	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	10 <sup>9</sup> UFC/mL	Araras, SP

MPB = Mudas pré-brotadas; S.P = Sem patógeno.

## RESULTADOS

patógeno (especificidade) e a porcentagem de acerto entre sensibilidade e especificidade (acurácia). Na última etapa, diluições seriadas a partir de DNA total com  $10^6$  UFC/mL de Lxx, foram empregadas para a avaliação de sensibilidade.

Para análise de sensibilidade, especificidade e acurácia dos *primers* foram utilizadas as fórmulas:

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

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

Legenda:

VP: Resultado verdadeiramente positivo                      FN: Falso-negativo

VN: Resultado verdadeiramente negativo                      FP: Falso-positivo

N: VP+VN+FN+FP

### Formação de MPB

Para a formação de MPB, foi empregado gemas individuais, originadas de canas com mais de 12 meses, com diferentes títulos de Lxx, determinadas pela técnica de *Dot-ELISA* conforme empregado anteriormente (22) com antissoro produzido no laboratório empregando-se coelho. Esses materiais foram plantados em copos plásticos de 250 mL com substrato a base de casca de pinus e fibra de coco, mantidos em estufa e irrigados apenas com água por um período de 45 e 60 dias.

### Validação dos *primers*

As duas combinações de *primers* e condição de amplificação que obtiveram os melhores resultados na diagnose molecular de canas adultas foram validadas em MPB de 45 e 60 dias (Tabela 1) através do parâmetro sensibilidade.

### Seleção de *primers*:

Quando utilizado as condições de corrida recomendadas pelos autores, de um total de 12 amostras, nenhuma foi amplificada com os *primers* CxxITSf#5/CxxITSr#5, resultando em 12 amostras falso negativas para Lxx e com isso obtendo-se 0% de sensibilidade. Quando os *primers* LX23SF/LX23SR foram empregados uma amostra foi identificada, com os *primers* Cxx1/Cxx2 foram 6 amostras e com os *primers* C2F/C2R foram 10 amostras, que em porcentagem corresponderam a 8,3%; 50% e 83,3% de sensibilidade, respectivamente.

Após as adaptações nas condições de corrida dos *primers*, de um total de 12 amostras, nenhuma foi amplificada com os *primers* C2F/C2R, 8 com os *primers* LX23SF/LX23SR e 12 para cada um dos *primers* Cxx1/Cxx2 e CxxITSf#5/CxxITSr#5. Obtendo assim 0; 66,7, 100 e 100% de sensibilidade, respectivamente.

Com esses resultados, os *primers* Cxx1/Cxx2 e CxxITSf#5/CxxITSr#5, na condição de corrida adaptada 1, foram novamente desafiados utilizando os parâmetros especificidade e acurácia. Os resultados desse ensaio mostraram que todas as 18 amostras verdadeiramente negativas e todas as 10 verdadeiramente positivas foram corretamente identificadas. Esse resultado somado com a correta identificação das 12 amostras positivas da primeira etapa, demonstraram que esses *primers* tiveram 100% de especificidade e acurácia (Tabela 2).

### Detecção de Lxx em DNA N4 ( $10^6$ UFC/mL) em diluição seriada

Os dois pares de *primers* que obtiveram 100% de sensibilidade, especificidade e acurácia, foram novamente desafiados utilizando diluição seriada de DNA total extraído de cana que estava infectada com Lxx na concentração N4 ( $10^6$  UFC/mL). Das 30 amostras testadas (somatória das três amostras de cada concentração desafiada), 20 foram amplificadas pelo par de *primers* Cxx1 e Cxx2 adaptado, sendo que somente na diluição limite de 1:15, ou seja  $0,5 \times 10^5$  UFC/mL todas

**Tabela 2.** Eficiência da detecção molecular de *Leifsonia xyli subsp. xyli*.

Primer	Condição de amplificação do DNA	VP	VN	FN	FP	N	Sensibilidade relativa SE (%)	Especificidade relativa SP (%)	Acurácia relativa AC (%)
							$\frac{\text{VP} \times 100}{\text{VP} + \text{FN}}$	$\frac{\text{VN} \times 100}{\text{VN} + \text{FP}}$	$\frac{(\text{VP} + \text{VN}) \times 100}{\text{N}}$
Cxx1 e Cxx2	Pan et al. (1998)	6	-	6	-	12	50,0	-	-
CxxITSf#5 e CxxITSr#5	Fegan et al. (1998)	0	-	12	-	12	0,0	-	-
C2F e C2R	Taylor et al. (2003)	10	-	2	-	12	83,3	-	-
LX23SF e LX23SR	Gagliardi e Camargo (2003)	1	-	11	-	12	8,3	-	-
Cxx1 e Cxx2	Adaptada 1	22	18	0	0	40	100,0	100	100
CxxITSf#5 e CxxITSr#5	Adaptada 1	22	18	0	0	40	100,0	100	100
C2F e C2R	Adaptada 1	0	-	12	-	12	0,0	-	-
LX23SF e LX23SR	Adaptada 2	8	-	4	-	12	66,7	-	-

Sensibilidade = Verdadeiro Positivo X 100/ (Verdadeiro Positivo + Falso Negativo); Especificidade = Verdadeiro Negativo X 100/ (Verdadeiro Negativo + Falso Positivo); Acurácia = (Verdadeiro Positivo + Verdadeiro Negativo) X 100/ Total número de amostras; Adaptada 1= Corrida recomendado por Taylor et al. (2003) com aumento de 1°C no anelamento; Adaptada 2= Corrida recomendada por Pan et al. (1998).

as repetições foram identificadas. Já para os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5, na condição adaptada, a diluição para que todas as amostras positivas fossem identificadas foi de 1:50, ou seja  $2 \times 10^4$  UFC/mL (Figura 1).

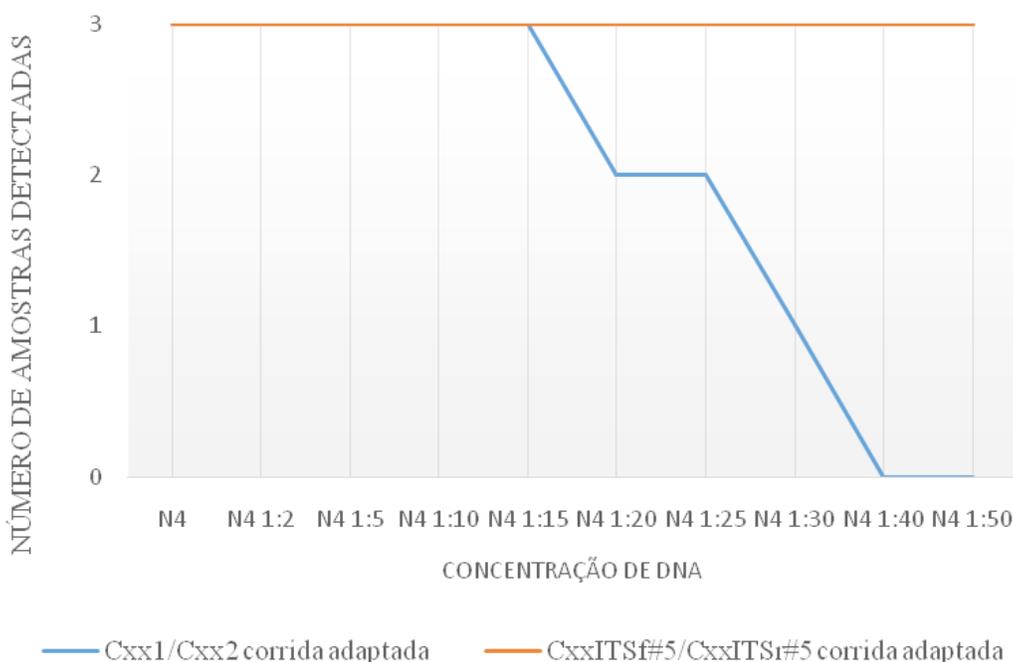
#### Validação dos *primers* e condição de corrida em MPB de 45 e 60 dias:

Em MPB de 60 dias, originadas de canas positivas para Lxx, de um total de 42 amostras, em 30 foi detectada a bactéria quando se utilizou o conjunto de *primers* Cxx1 e Cxx2, na condição de corrida adaptado, e 33 foram positivas para Lxx com os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5, na condição de corrida adaptado, obtendo 71,4% e 78,6% de sensibilidade, respectivamente (Tabela 3). De um total de 52 MPB de 45 dias, originadas de canas doente, a bactéria foi detectada em 35, quando se utilizou os *primers* Cxx1 e Cxx2, na condição de corrida adaptada, tendo como resultado final 67,3% de sensibilidade. E todas as 52 MPB de 45 dias foram positivas para a presença de Lxx, quando

se utilizou os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5, na condição de corrida adaptado, obtendo 100% de sensibilidade (Tabela 3).

A análise estatística foi dispensada em todas essas análises, uma vez que para a detecção de Lxx é essencial a identificação de 100% das amostras com a bactéria, pois o controle se baseia na exclusão. Com isso, após a adaptação, foi possível obter uma combinação de *primers* e condição de corrida que apresentasse 100% de sensibilidade na detecção de Lxx, inclusive em MPB com idade de 45 dias. Os outros *primers* mesmo com taxa de mais de 60% de identificação, não são recomendados por apresentar escapes.

A reação de PCR realizada em MPB de 45 dias com os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5, na condição de corrida adaptado, resultou na amplificação de fragmentos de fácil identificação, com isso, não deixando dúvidas na visualização do fragmento e sem falsos negativos, independentemente da concentração da bactéria (Figura 2A). O mesmo não foi observado em MPB de 60 dias, que obtiveram falsos negativos (Figura 2B).

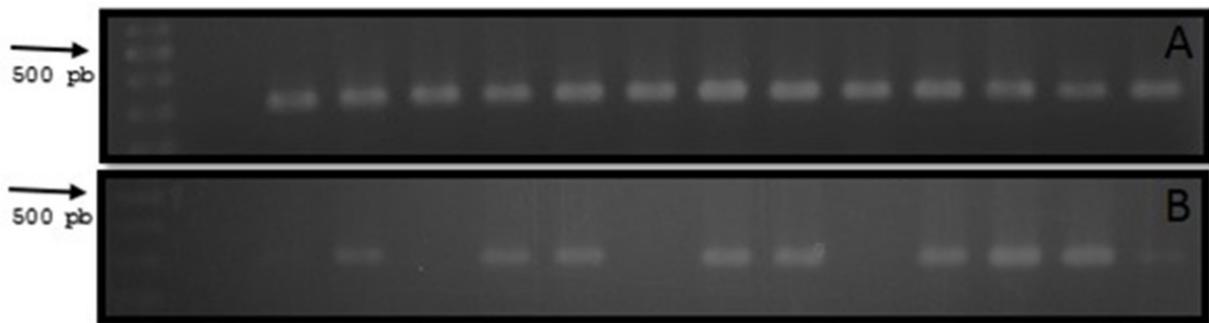


**Figura 1.** Gráfico da sensibilidade da detecção molecular de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx) em diluição seriada de DNA N4 ( $10^6$  UFC/mL). N4= DNA total de cana-de-açúcar com Lxx na concentração de  $10^6$ UFC/mL; Corrida adaptada= corrida recomendada por Taylor et al. (2003) com aumento de  $1^\circ$  C no anelamento.

**Tabela 3.** Validação da detecção molecular em mudas-pré-brotadas (MPB) com raquitismo-das-soqueiras

Primer	Condição de amplificação DNA	Idade MPB	VP	FP	N	Sensibilidade relativa SE (%)	
						VPx100	VP+FN
Cxx1 e Cxx2	Adaptado	45 Dias	35	0	52	67,3	
CxxITSf#5 e CxxITSr#5	Adaptado	45 Dias	52	0	52	100,0	
Cxx1 e Cxx2	Adaptado	60 Dias	30	0	42	71,4	
CxxITSf#5 e CxxITSr#5	Adaptado	60 Dias	33	0	42	78,6	

Sensibilidade = Verdadeiro Positivo X 100 / (Verdadeiro Positivo + Falso Negativo). Corrida adaptada= corrida recomendada por Taylor et al. (2003) com aumento de  $1^\circ$  C no anelamento.



**Figura 2** – Detecção molecular de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx) em DNA total extraído de Mudas-pré-brotadas originadas de canas positivas para Lxx nas concentrações entre  $10^9$  e  $10^6$  UFC/mL. A= Gel de agarose corado com brometo de etídio (concentração de  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) com resultado da detecção molecular em MPB de 45 dias usando os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5, na condição de corrida adaptado, com tamanho de fragmento de 305 pb. B= Gel de agarose com brometo de etídio (concentração de  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) com resultado da detecção molecular em MPB de 60 dias usando os *primers* CxxITSf#5 e CxxITSr#5, na condição de corrida adaptado, com tamanho de fragmento de 305 pb.

## DISCUSSÃO

Atualmente, existem três tipos de produtores de cana-de-açúcar em relação ao RDS: aqueles que não fazem qualquer controle da doença, os que apenas fazem a diagnose laboratorial em seu matrizeiro e aqueles que fazem a diagnose laboratorial do matrizeiro, juntamente com o controle do RDS pelo tratamento térmico. Nos casos em que diagnose laboratorial é feita, essa emprega a técnica sorológica, por apresentar maior praticidade em relação aos outros métodos de detecção e custo acessível ao setor produtivo.

Contaminação por Lxx em material propagativo de cana-de-açúcar tem sido um problema de longa data, visto que presença de Lxx foi observada em 23,6% das amostras recebidas para diagnóstico de rotina de RDS em 2009 (21). Esse índice foi ainda maior em 2010 e 2011, com um total de 27,1% e 25,8% respectivamente. Os números são ainda mais alarmantes se assumirmos que as amostras enviadas para análise laboratorial foram coletadas dos melhores talhões da usina, visto que o propósito é servir de viveiros de multiplicação.

Outro fato a se considerar, é que mesmo as amostras negativas pelo diagnóstico sorológico podem estar com a presença da bactéria, pois o limite de detecção da técnica *Dot-ELISA* é de  $10^6$  UFC/mL (21). Com isso, os produtores que fazem apenas diagnóstico sorológico, podem estar usando materiais infectados para montar seu matrizeiro, tendo como consequência produção de mudas com a bactéria.

Os produtores que fazem o diagnóstico sorológico e o tratamento térmico de  $52^\circ\text{C}$  por 30 minutos também correm o risco de ter matrizeiro contaminado com Lxx. Isso porque tratamento térmico de  $52^\circ\text{C}$  por 30 minutos apresentou escape, onde controle de Lxx não foi total (8). Esses fatos aliados a natureza fastidiosa da bactéria fazem com que mudas contaminadas com Lxx estejam sendo produzidas, mesmo que as duas principais recomendações de controle de RSD estejam sendo realizadas.

Para o grupo de produtores que não fazem nenhum controle da Lxx, o nível de contaminação das mudas pode ser ainda mais preocupante, com índices de RDS ainda maiores do que os outros dois grupos de produtores. Levantamento sobre a incidência de RSD em lavouras comerciais do Centro Sul brasileiro mostraram que 9,4% dos 307 talhões com cana-planta examinadas e 32% das 50 usinas amostradas empregaram mudas contaminadas com Lxx em áreas de reforma (22) revelando quão disseminada está a doença e a dificuldade de controle efetivo do problema.

Dentre os sistemas de produção de mudas recentemente desenvolvidas por diferentes empresas/institutos, a tecnologia MPB que foi produzida pelo IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) vem se destacando, sendo que uma das vantagens mencionada é a sanidade das mudas (13). No entanto, as limitações na identificação e no controle de Lxx mostra a importância de tecnologia desenvolvida no presente estudo para garantir a sanidade das mudas MPB, uma vez que RSD não apresenta nenhum sintoma da doença, especialmente nesta fase vegetativa, cuja consequência seria danosa para disseminação de Lxx durante a colheita (18).

Uma técnica que tem se mostrado efetiva na detecção de doenças é o Teste de PCR, pois é baseada unicamente na detecção da sequência de DNA do patógeno, onde a visualização de um fragmento de tamanho específico após o Teste de PCR, indicaria a presença do patógeno na amostra (25). Para tanto, a escolha dos *primers* com melhor desempenho é essencial. Dentre os vários *primers* específicos para Lxx, quatro pares foram selecionados, baseados nos diferentes *loci* das regiões 16S e 23S e regiões codificadoras de proteínas para elaborar um protocolo de detecção precoce de Lxx em MPB: Cxx1 e Cxx2 (17), CxxITSf#5 e CxxITSr#5 (7), C2F e C2R (2) e LX23SF e LX23SR (9).

O parâmetro empregado para avaliação do desempenho dos *primers* foi sensibilidade (Tabela 2). Isso porque nas diferenças entre os *primers* foi importante identificar o desempenho do marcador para detectar indivíduos doentes, para que a bactéria não seja disseminada para novas áreas.

Nas modificações realizadas nesse trabalho para aumentar a eficiência da detecção de Lxx incluíram ajustes nas quantidades dos reagentes e condições de corrida da reação de PCR, como quantidade de cloreto de magnésio, dNTP e *Taq polimerase*, além da temperatura de anelamento. Cloreto de magnésio é um componente crítico da reação de PCR, uma vez que algumas *Taq polimerase* são dependentes do magnésio. Além disso, os iniciadores de DNA e dNTP se ligam ao magnésio, com isso, a concentração de Mg depende da concentração de dNTP e DNA molde. O  $\text{MgCl}_2$ , *Taq polimerase* e dNTP em condições inadequadas reduziram o produto no Teste de PCR (15).

No processo de seleção do melhor par de *primers*, existiu a necessidade de que a detecção de Lxx fosse em MPB de 45 e 60 dias. Isso porque a idade da muda de 60 dias é a recomendada para o plantio no campo (14). Já mudas de 45 dias foram desafiadas, pois permitiria que os resultados da sanidade fossem conhecidos antes do plantio a

campo. Como o MPB são constituídas basicamente por uma gema e seu respectivo nó (13), foi utilizado o tecido desse último para a extração do DNA, uma vez que nesta região há uma grande concentração de feixes vasculares por área (6).

A detecção de Lxx foi possível em MPB de 45 e 60 dias embora com desempenho melhor dos *primers* em MPB de 45 dias (Tabela 3), sugerindo que MPB ainda mais precoces possam ser empregados para análise de sanidade de Lxx, sem afetar a sensibilidade (Figura 2A e 2B).

Os resultados deste estudo demonstraram que os *primers* CxxITS#5 e CxxITS#5 nas condições adaptadas no presente estudo foi o mais sensível, específico e acurado para detecção de Lxx, com uma taxa de 100% para todos esses parâmetros em MPB de 45 dias.

Para doenças fastidiosas em citros já existe legislação estadual para comercialização de mudas, onde laudos de sanidade são exigidos. O presente estudo visou antecipar a mesma exigência, desenvolvendo uma tecnologia de diagnose precoce de Lxx em mudas de cana, que fosse eficaz e com custo não proibitivo para o setor produtivo.

#### AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e ao Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar (PMGCA) pelo apoio logístico.

#### REFERÊNCIAS

- BRASKEM. **O etanol**. Disponível em: <<http://www.braskem.com.br/site.aspx/Etanol>>. Acesso em: 07. ago. 2015.
- CHAGAS, P.R.R.; MATSUOKA, S. Medidas de controle do raquitismo da soqueira. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 106, p. 40-44, 1988.
- COMSTOCK, J.C.; SHINE JR, J.M.; DAVIS, M.J.; DEAN, J.L. Relationship between resistance to *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* colonization in sugarcane and spread of Ratoon Stunting Disease in field. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, n. 6, p. 704-708, 1996.
- Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar, Safra 2015/2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 05 ago 2015.
- Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar, Safra 2016/2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 23 jul 2016.
- SCARPARI, M.S.; BEAUCLAIR, E.G.F. Anatomia e Botânica. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-Açúcar**. 1ed. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. cap. 2, p.45-56.
- FEGAN, M.; CROFT, B.J.; TEAKLE, D.S.; HAYWARD, A.C.; SMITH, G.R. Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. **Plant Pathology**, London, v. 47, p. 495-504, 1998.
- FERNANDES JR, A.R.; GANEM JR, E.J.; MARCHETTI, L.B.L.; URASHIMA, A.S.; Avaliação de diferentes tratamentos térmicos no controle do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 60-64, 2010.
- GAGLIARDI, P.R.; CAMARGO, L. E. A. **Análise estrutural e comparativa do genoma de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 2003. 81f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- GAGLIARDI, P.R.; CAMARGO, L.E.A. Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 1222-1226, 2009.
- GRISHAM, M. P. Effect of ratoon stunting disease on yield of sugarcane grown in multiple three-year plantings. **Phytopathology**, Saint Paul, v.81, p.337-340, 1991.
- 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**, Saint. Paul v. 83, p. 1170-1175, 1999.
- LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A.; DINARDO-MIRANDA, L. L.; SCARPARI, M. S.; GARCIA, J. C.; BIDOIA, M. A. P.; SILVA, D. N.; MENDONÇA, J. R.; KANTHACK, R. A. D.; CAMPOS, M. F.; BRANCALIAO, S. R.; PETRI, R. H.; MIGUEL, P. E. M. **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB) oriundas de gemas individualizadas**. Campinas: Instituto Agronômico, 2012. 16p; (Documento IAC, N. 109). Disponível: <[http://www.udop.com.br/biblio/pagina/arquivos/2013\\_sistema\\_multiplicacao\\_cana\\_com\\_mudas\\_pre\\_brotadas.pdf](http://www.udop.com.br/biblio/pagina/arquivos/2013_sistema_multiplicacao_cana_com_mudas_pre_brotadas.pdf)>. Acesso em: 12 fev. 2015.
- MAGAREY, R.C.; SUMA, S.; IRAWAN.; KUNIATA, L.S.; ALLSOPP, P.G. Diseases and pests encountered during a survey of *Saccharum* germplasm in the wild in Papua New Guinea. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Mackay, v.24, p. 219-227, 2002.
- MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 16, p. 47-51, 2002.
- MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.
- PAN, Y.-B.; GRISHAM, M.P.; BURNER, D.M.A. Polymerase Chain Reaction Protocol for the Detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the Causal Bacterium of Sugarcane Ratoon Stunting Disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n.3, p. 285-290, 1998.
- RICAUD, C. Ratoon stunting disease. Mauritius Sugar Industry Research Institute. Port Louis. **Annual Report**, p. 54, 1968. Disponível em: <<http://www.beep.ird.fr/collect/msiri/index/assoc/HASH0187.dir/Annual%20Report%201967-%20Full%20Text.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2015.
- ROSA, D. D.; CAMARGO, L. E. A. **Uma abordagem genômica para o entendimento do crescimento fastidioso de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 2006. 79f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- TAYLOR, P.W.J.; PETRASOVITS, L.A.; VAN DER VELDE, R.; BIRCH, R.G.; CROFT, B.J.; FEGAN, M.; SMITH, G.R.; BRUMBLEY, S.M. Development of PCR-based markers for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in fibrovascular fluid of infected sugarcane plants. **Australasian Plant Pathology**, Sidney, v. 32, p. 367-375, 2003.
- URASHIMA, A. S.; MARCHETTI, L. B. L. Incidence and Severity of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* Infection of Sugarcane in Sao Paulo State, Brazil. **Journal of Phytopathology**, Gottingen, v. 161, p. 478-484, 2013.
- URASHIMA, A. S.; SILVA, M.F.; CORREA, J.J.; MORAES, M.C.; SINGH, A.V.; SMITH, E.C.; SAINZ, M.B. Prevalence and severity of ratoon stunting in commercial Brazilian sugarcane fields. **Plant Disease**, Saint Paul, v.101, p. 815-821, 2017.
- VISWANATHAN, R. Serodiagnosis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* causing ratoon stunting disease in sugarcane. In: Rao, G.P.; Saumtally, A.S.; Rott, P. (eds) **Sugarcane Pathology: Bacterial and Nematodes Diseases**. Enfield, USA: Science Publishers, 2004. v. 3, p. 153-173.
- YOUNG, A.; BRUMBLEY, S. Ratoon stunting disease of sugarcane: history, management and current research. In: Rao, G.P.; Saumtally, A.S.; Rott, P. (eds) **Sugarcane Pathology: Bacterial and Nematodes Diseases**. Enfield, USA: Science Publishers, 2004. v. 3, p. 97-124.
- YOUNG, A.; NOCK, C.J. Novel diagnostic method for ratoon stunting disease: Development and implications for RSD management. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Mackay, v. 36, p. 237-243, 2014.