



Métodos de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e efeito da termoterapia na brotação das gemas de diferentes variedades de cana-de-açúcar

Alfredo S. Urashima & Nathália G. Grachet

Departamento de Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, 13600-000, Araras, SP, Brasil

Autor para correspondência: Alfredo S. Urashima, e-mail: alfredo@cca.ufscar.br

RESUMO

O raquitismo-da-soqueira [*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx)] é uma das principais doenças da cana-de-açúcar. Sua identificação no campo é difícil e sua disseminação para plantas sadias e novas áreas é feita exclusivamente por toletes contaminados ou mecanicamente. A termoterapia (regime de 52°C/30min) é o controle adotado no Brasil para fornecer mudas sadias para novas áreas. O outro regime recomendado (50°C/2h) não tem sido muito usado no Brasil. Os objetivos do presente trabalho foram estudar a eficiência de diferentes métodos de detecção de Lxx em canas-de-açúcar de períodos de maturação diferentes com 4-9 meses de idade e o efeito da termoterapia (50°C/2h) sobre a brotação das gemas, inclusive em função de sua localização no colmo. A microscopia foi o melhor método de detecção, pois detectou Lxx em cana-planta de quatro meses, enquanto que o método sorológico - “dot blot” e o de PCR não permitiram identificar Lxx em colmos de cana-planta infectados com até nove meses. Modificação do procedimento envolvendo uma concentração do caldo permitiu que se detectasse Lxx eficientemente com “dot blot”. Observou-se falha na erradicação de Lxx em material tratado com termoterapia (regime 50°C/2h). Essa condição prejudicou a brotação de gemas na variedade RB935744, mas não nas variedades RB855156 e RB867515. Observou-se que a termoterapia aumentou a brotação das gemas do terço basal da RB867515 e diminuiu a das gemas dos terços médio e apical da RB935744.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum*, brotação de gemas, diagnose, diagnóstico, raquitismo-da-soqueira, tratamento térmico.

ABSTRACT

Detection method for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and effect of thermotherapy on bud germination in sugarcane varieties

Ratoon stunting disease [*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx)] is one of the main diseases of sugarcane and it is of difficult detection in the field. Its spread to uninfected plants and into new areas occurs exclusively through contaminated planting material or mechanically. Thermotherapy at a 52°C/30 min regime is broadly employed in Brazil for producing healthy seed cane. Another recommended regime (50°C/2h) has not been commonly used in Brazil. The purposes of this research were to examine the efficacy of different methods of detection of Lxx in 4-9 months-old plants in cane varieties having different periods of maturity and the effect of thermotherapy (50°C/2h) on bud germination including a consideration on the location of individual buds in the stalks. Microscopy was the best method allowing the detection of Lxx in plants of all ages whereas identification of Lxx in infected plants through dot blot and PCR methods, performed according to published protocols, failed for all treatments. A modification of the dot blot test involving the use of concentrated cane sap was successful in improving the method, allowing the identification of Lxx in infected nine-month old plants. Thermotherapy at a regime of 50°C/2h did not completely eradicate Lxx from infected planting material. This regime was harmful for the germination of buds in var. RB935744 but not for vars RB855156 and RB867515. It increased the percentage of germination of basal buds of RB867515 and decreased that of apical and mid length buds of RB935744.

Key words: *Saccharum officinarum*, bud germination, diagnosis, diagnostic, heat treatment, ratoon stunting disease.

INTRODUÇÃO

O Brasil lidera a produção mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), seguido por Índia e China. Segundo estimativa da Conab (2011), a área cultivada para a safra 2010/2011 foi de 8,03 milhões de hectares, sendo São Paulo o principal com 54,2%, seguido por Minas Gerais (8,1%) e Paraná (7,2%). A produção é de 624,99 milhões de toneladas, com incremento de 3,4% em relação à safra anterior e produtividade 77,80 t/ha, sendo que 53,8% é destinada à produção de álcool.

A atividade está em plena expansão, o que pode ser visualizado pelo crescimento da capacidade produtiva existente e pela implantação de novas unidades em novas áreas agrícola. O plantio de cana-de-açúcar acompanha essas novas áreas produtivas. Além de São Paulo, a cultura está se expandindo para outros estados como Minas Gerais, Paraná, Goiás, Alagoas, Mato Grosso do Sul e Pernambuco. Uma das mais sérias ameaça aos novos canaviais é a possibilidade do uso de toletes infectados com doenças sistêmicas no cultivo de novas áreas, caso a análise da sanidade do material a ser plantado não seja realizada

adequadamente. Doenças como mosaico (*Sugarcane mosaic virus*), escaldadura das folhas [*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson], carvão (*Ustilago scitaminea* Sydow) são algumas das enfermidades que podem ser disseminadas dessa maneira (Tokeshi & Rago, 2005). Além desta, tem especial importância o raquitismo-da-soqueira (RSD), causada por *Leifsonia xyli* subsp *xyli* (Lxx) (Evtushenko et al., 2000). O plantio de toletes contaminados e a transmissão mecânica se constituem nos únicos meio de disseminação dessa bactéria entre plantas e para novas áreas (Hoy et al., 1999). O RSD é considerado uma das principais doenças que afetam a produção comercial de cana-de-açúcar, pois causa redução de produtividade, que varia de 14 a 31%, em função da variedade, ambiente e número de cortes (Matsuoka, 1984, Grisham, 1991, Iglesia et al., 2003). A doença ocorre em todas as regiões produtoras do mundo e em todos os estados brasileiros (Tokeshi & Rago, 2005). A identificação da doença no campo é dificultada pela ausência de sintomas característicos (Pan et al., 1998) e seu manejo é dificultado pela ausência de variedades imunes (Teakle et al., 1975).

Os sintomas em lavoura de cana-de-açúcar 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. No entanto, esses sintomas podem ser facilmente confundidos com outros problemas abióticos como déficit hídrico e bióticos como escaldadura das folhas. Além disso, os sintomas sofrem alterações em função da idade da planta, do tipo de solo, da variedade cultivada e outros. Internamente, os colmos maduros de plantas doentes podem ou não apresentar escurecimento dos feixes vasculares (Tokeshi, 1997).

A ausência de sintomas característicos torna a diagnose da doença no campo uma missão difícil e pouco confiável. Assim, a diagnose laboratorial tem grande importância, representando a única maneira segura da identificação da doença. Dentre os métodos de detecção estão: a microscopia, os testes sorológicos, respostas induzidas no hospedeiro e os testes baseados na análise do DNA (Grisham, 2004). A escolha do método vai depender de vários fatores como a finalidade e urgência dos resultados, a quantidade de amostras a ser analisada, a disponibilidade de equipamentos e a habilidade dos avaliadores. Já a sua eficiência é dependente da distribuição e concentração da bactéria na planta (Grisham, 2004). Apesar da disponibilidade dessas técnicas, ainda não existe consenso sobre qual seja o melhor método. Segundo Hoy et al. (1999) o uso da técnica sorológica de “dot blot” apresentou resultado igual ao obtido com microscopia enquanto que para Grisham (2004) os testes sorológicos são mais sensíveis que os microscópicos. Fegan et al. (1998) concluíram que o método de PCR foi mais sensível que a microscopia. Mais recentemente, Brumatti et al. (2010) consideraram a microscopia como mostrou superior ao “dot blot” e ao PCR,

o que contrasta com as observações de Fegan et al (1998) de que PCR foi mais sensível que a microscopia. Isso mostra a importância de se determinar qual o método de detecção deve ser adotado.

Como o único método eficiente de controle do RSD é a exclusão, devido a impossibilidade de controle da doença quando instalada no campo, o exame diagnóstico correto que assegure o plantio de toletes obtidos de plantas livres do patógeno e a disponibilidade de métodos eficazes de tratamento dos toletes potencialmente infectados são de importância crucial.

Atualmente, a técnica mais empregada para o tratamento dos toletes é a termoterapia. Nessa operação, trabalha-se o binômio tempo-temperatura e procura-se inativar as bactérias, sem injuriar as gemas dos toletes. Três combinações são empregadas atualmente nos países produtores: 52°C por 30 min (Copersucar, 1989), 50°C por 2 h (Damann Jr & Benda, 1983) e 50°C por 3h (Grisham, 2004). Dessas, a primeira combinação (52°C/30 min) é a empregada no Brasil pelas unidades produtoras por ser mais rápido e permitir o tratamento de um número maior de toletes. No entanto, um fato preocupante é que essa combinação de tempo e temperatura apresenta alto índice de escape, ou seja, não elimina completamente a população bacteriana de Lxx (Fernandes Jr et al., 2010), fazendo com que permaneça o risco de que toletes tratados termicamente ainda contenham a bactéria viva e sejam inadvertidamente usados no plantio. Esse fato é extremamente preocupante, principalmente para áreas de expansão da cultura, pois pode levar a um comprometimento da sanidade dos novos canaviais. No entanto, a adoção de outro regime para o tratamento (50°C/2 h) pode ter efeito deletério na brotação dos toletes (Fernandes Jr et al., 2010). Isso merece um estudo mais detalhado pois essa condição de termoterapia, que é a empregada nos Estados Unidos, seria uma alternativa para eliminar o escape do tratamento que ocorre quando se usa o regime adotado no Brasil. Como não existe consenso sobre a resposta desse tratamento na brotação da cana já que Damann Jr & Benda (1983) observaram aumento na brotação dos toletes tratados, usando-se o regime 50°C/2 h é de fundamental importância que se esclareça qual sua real influência na brotação para uma recomendação de mudança de regime na termoterapia para controle de Lxx para as usinas de cana-de-açúcar no Brasil não resulte em prejuízo à brotação do material propagativo.

Assim, os objetivos do presente trabalho foram: a) estudar a eficiência de diferentes métodos de detecção de Lxx em três variedades de cana-de-açúcar com épocas de maturação diferentes e b) avaliar o efeito da termoterapia na brotação das gemas.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do material vegetal

As variedades empregadas foram RB855156 (cana de maturação precoce), RB867515, (maturação média)

e RB935744 (maturação tardia). O material propagativo foi obtido de cana de primeiro corte com idade entre 10 a 11 meses no campus do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos. A escolha das três variedades empregadas se baseou no fato de que RB8551556 se destaca pela sua precocidade, tendo sido a quarta variedade mais plantada no ano de 2009 com 6,8% da área total, RB867515 foi a variedade mais plantada no país com 19,7% e RB935744 foi a quinta variedade mais plantada com 3,3% da área total, sendo uma boa opção para final de safra devido aos elevados índices de produtividade (Chapola et al., 2010).

A análise da brotação foi feita em função da localização de cada gema no colmo. Os toletes de cana foram divididos em três partes (basal, média e apical) e em seguida cortados deixando-se uma única gema por segmento.

Tratamento térmico

A termoterapia empregada foi de 50°C/2 h (Damann Jr & Benda, 1983). Os segmentos de toletes foram acondicionados em sacos vazados de fios de náilon, em seguida em caixotes de plástico e submersos em tanque de 2000 L na temperatura e tempo estipulados. Em seguida os caixotes foram retirados e os toletes resfriados naturalmente à temperatura ambiente, nos tratamentos onde a inoculação de Lxx foi realizada, essa foi feita após esse resfriamento.

Inoculação de Lxx

O método de inoculação utilizado foi o de Grisham (1991) por meio da imersão dos toletes em caldo de cana madura infectada, mas com uma pequena modificação no tempo de imersão, que passou da recomendada de 10 min para 5 min. O caldo foi obtido de colmos provenientes de planta da variedade CB49-260 para a qual a presença de Lxx havia sido previamente confirmada por exame sorológico “dot blot”, revelando concentração de 10⁷ UFC/mL. O volume total de caldo empregado foi de 20 L com imersão completa de todos os segmentos de toletes, mantendo-se a relação 1 kg de segmentos de tolete para 5 litros de caldo. As testemunhas consistiram de segmentos do mesmo lote imersos em água pelo mesmo tempo. Essas operações foram realizadas a temperatura ambiente.

Plantio em bandeja

Após o tratamento térmico e a inoculação, os segmentos de toletes foram plantados em bandejas plásticas de 39×28×10 cm contendo substrato composto de 33% solo + 33% esterco bovino + 33% vermiculita a uma profundidade de 2-3 cm e mantidos em casa-de-vegetação com temperatura de 24-28°C.

Plantio em vasos

Após 3 meses, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos de 30 L contendo solo, vermiculita e substrato (1:1:1) a profundidade de 8-10 cm e mantidas a céu aberto

até a avaliação final. Uma planta foi transplantada para cada vaso, representado uma repetição, e o delineamento estatístico foi de blocos ao acaso com quatro repetições.

Análise da brotação

A brotação dos toletes tratados termicamente foi comparada com a dos toletes não tratados, em função da localização original das gemas nos colmos nas três variedades num esquema fatorial 2x2, com 4 repetições. O número de gemas por variedade foi de 13 gemas/bandeja na variedade RB855156, 12 na variedade RB867515 e 11 na variedade RB935744. A análise da brotação foi feita após 35 dias, pela observação visual dos brotos que emergiram acima do solo. Os resultados foram analisados estatisticamente com o programa Assistat (2008).

Coleta dos caldos

O caldo foi coletado do internódio mais basal de plantas de cana-de-açúcar do experimento, com auxílio de uma prensa e recolhidos em microtubos de 2 mL. Quando a detecção não foi realizada no mesmo dia, os microtubos foram armazenados a -20°C até seu processamento.

Métodos de detecção de Lxx

Método 1: microscopia

Empregou-se o método de Hoy et al. (1999). Neste uma gota de aproximadamente 70 µL de caldo é colocada sobre uma lâmina de vidro e coberta com uma lamínula para observação ao microscópio de luz. Uma lâmina foi preparada para cada repetição, totalizando quatro lâminas por tratamento. Utilizou-se microscópio marca Leica, modelo CM E, equipado com lente objetiva panacromática de contraste de fase, aumento 1.000X para detectar a presença da bactéria reconhecida por sua morfologia típica: baciliforme, reta ou ligeiramente curvada (Tokeshi & Rago, 2005). O lote onde a bactéria foi detectada em pelo menos uma repetição foi considerado positivo para a presença de Lxx.

Método 2: sorológico - dot blot enzyme immunoassay

Para esse método seguiu-se o procedimento descrito por Hsu (2009) e detalhado para Lxx por Carneiro Jr et al. (2004). Amostras de 100 µL do caldo foram aplicadas em membrana de nitrocelulose e secas em estufa a 80°C por 15 min, em seguida bloqueada por 30 min a temperatura ambiente com uma solução salina contendo leite em pó desnatado, lavada três vezes com solução salina, incubada com anti-soro de coelho por 1 h, lavada novamente três vezes em solução salina, incubada com IgG cabra anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina por 1h. Em seguida foi feita nova lavagem em solução salina (três vezes) e, por fim, cada membrana foi incubada no escuro com a solução de revelação por 40 min. Ao final, cada membrana foi lavada com hipoclorito de sódio e seca em estufa por 10 min. O resultado foi determinado pela observação

do desenvolvimento de coloração azul nas amostras consideradas positivas para a presença de Lxx quando comparadas com a coloração dos controles positivos, que foram empregados em cada membrana. Os controles positivos foram constituídos de cultura pura de Lxx nas concentrações de 1×10^7 UFC/mL, 1×10^6 UFC/mL, 1×10^5 UFC/mL e 1×10^4 UFC/mL. O controle negativo constou de água destilada autoclavada.

Complementarmente, foram também testadas duas modificações para o método descrito acima. Utilizando-se caldo de cana obtido de plantas de nove meses foi conduzido procedimento igual ao descrito acima, mas: a) utilizando-se um volume maior de caldo para cada amostra (200 μ L); b) utilizando-se 2000 μ L de caldo que foi concentrado através de duas centrifugações - uma na primeira de 3000 rpm por 5 min, seguida de uma segunda em que o sobrenadante foi centrifugado a 12000 rpm por 10 min (centrífuga marca Eppendorf, modelo 5415 D), sendo o sobrenadante da amostra descartado e o pellet ressuspendido em 50 μ L de água destilada autoclavada e utilizado na análise.

Método 3: PCR

Para a detecção molecular por PCR empregou-se o método de Pan et al. (1998) com DNA extraído do caldo através da metodologia de Murray & Thompson (1980). A programação do termociclador consistiu de preaquecimento de $95^\circ\text{C}/5$ min seguida de 40 ciclos de $95^\circ\text{C}/1$ s, $57^\circ\text{C}/1$ s e $72^\circ\text{C}/30$ s e uma extensão final de $72^\circ\text{C}/5$ min. As reações foram realizadas em um volume de 25 μ L, contendo 10% do volume final de KCl, 2mM de MgCl_2 , 0,2mM de cada dNTP, 0,4 μ M de cada primer (Cxx1: 5'-CCG AAG TGA GCA GAT TGA CC 3' e Cxx2: 5'-ACC CTG TGT TGT TTT CAA CG 3'), 0,625 unidades de Taq DNA polimerase e 2 μ L do DNA extraído do caldo coletado. A visualização dos fragmentos amplificados foi feita em gel de agarose a 1,8% em TBE 1X, colorido com brometo de etídeo e observado em transiluminador UV. A amplificação de uma banda de 438-bp é esperada nas amostras infectadas. Em cada corrida foi empregado um controle positivo da cultura pura de Lxx e um negativo sem a presença de DNA.

Seleção do método mais eficiente

Foi considerado o melhor método aquele que conseguiu identificar Lxx nas amostras com idade mais precoce em cada uma das três variedades estudadas.

RESULTADOS

Os resultados obtidos pelos diferentes métodos de detecção em canas de quatro a nove meses de idade mostraram que a detecção por microscopia de luz foi o único método que conseguiu detectar a bactéria. Com este método já era possível detectar a presença de Lxx a partir do quarto mês de idade da cana nas três variedades analisadas. O fato de essa detecção ter sido positiva nas quatro repetições mostra a confiabilidade desse

método de detecção. Além disso, observou-se a mesma eficácia de detecção de Lxx nas amostras pelo uso deste método dos meses seguintes até o final (nono mês). Com os outros dois métodos utilizados, "dot blot" e PCR, não foi possível conseguir detectar a presença de Lxx mesmo nas plantas infectadas com nove meses de idade. Com esses dois métodos, a detecção de Lxx só foi possível nos controles positivos, demonstrando que, embora eles tenham sido totalmente inadequados para a detecção de Lxx em caldo obtidas de plantas infectadas não houve falha de procedimento na aplicação dos métodos..

O simples aumento do volume de caldo na análise "dot blot" (modificação a), conforme testado, não resultou em melhora na capacidade do teste em detectar Lxx. Já com a modificação b, envolvendo um volume inicial de caldo de 2000 μ L e duas centrifugações, a presença da bactéria foi detectada nas três variedades. Adicionalmente, Lxx foi detectada com este procedimento modificado tanto nos toletes tratados termicamente e não inoculados (com erradicação incompleta da bactéria) como nos toletes inoculados com a bactéria. Esse resultado indica que o tratamento térmico empregado ($50^\circ\text{C}/2$ h) permitiu o escape, isto é, não houve destruição completa de Lxx após o procedimento. Em nenhuma das variedades tratadas termicamente o resultado foi negativo para presença de Lxx. A aplicação do método baseado em PCR não resultou na detecção de Lxx em qualquer dos tratamentos além dos controles positivos. As variedades reagiram diferentemente ao tratamento térmico em termos de brotação das gemas (Tabela 1). Efeito deletério na brotação foi observado na RB935744 que apresentou brotação de gemas para apenas 25,64% dos toletes tratados termicamente enquanto que a brotação dos toletes no controle foi de 57,41%. Por outro lado, a termoterapia não causou nenhum efeito negativo sobre a brotação das variedades RB855156 (que apresentou 82% nas canas tratadas e 83% naquelas não tratadas termicamente) e RB867515 (que apresentou 30% de brotação nas canas tratadas e 31% nas não tratadas).

A diferenciação do colmo em apical, média e basal permitiu examinar com mais detalhes a reação das gemas de cada posição no colmo à termoterapia (Tabela 2). Observou-se resposta diferente para cada uma das variedades analisadas. Para a variedade RB855156 não houve diferença estatística entre os percentuais de brotação das gemas apicais, médias

TABELA 1 - Efeito da termoterapia ($50^\circ\text{C}/2$ h) sobre a brotação de gemas de diferentes variedades de cana-de-açúcar

Variedades	Porcentagem de brotação	
	Termoterapia	Controle
RB855156	82,05a	83,34a
RB867515	30,13b	31,41b
RB935744	25,64c	57,41d

CV(%) = 17,35

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

e basais entre as gemas tratadas e não tratadas. Para RB867515, a termoterapia foi benéfica para a brotação de gemas basais, com incremento de 10,42 para 20,83%. Não se observou diferença para gemas em outras posições nesta variedade. Para a variedade RB935744 o tratamento térmico teve um efeito negativo sobre as gemas apicais e médias, pois a brotação das gemas apicais foi reduzida de 88,64 (no controle) para 18,18% após o tratamento térmico enquanto nas gemas da porção mediana houve uma redução do percentual de brotação de 63,64 para 22,73. Para as gemas basais dessa mesma variedade, a redução do percentual de brotação foi de 38,64 para 27,27%. Esta redução não foi significativa estatisticamente.

DISCUSSÃO

No contexto deste estudo, a microscopia foi o melhor método para se detectar Lxx em plantas com RSD. Com este método a presença da bactéria foi detectada em cana-planta já aos quatro meses de idade, para as três variedades testadas. Como essa idade foi a primeira da amostragem no presente estudo, existe a possibilidade que, com esse método seja possível detectar Lxx em cana-planta ainda mais jovem. A rápida identificação da bactéria é um dos principais fatores para o sucesso no manejo do RSD, pois a doença não é facilmente identificada no campo por não produzir sintomas externos característicos (Rao et al., 2004) e a suspeita da presença da enfermidade pode ocorrer apenas tardiamente, devido à queda acentuada na produtividade a medida que os cortes forem se sucedendo (Duttamajumder, 2004). O reconhecimento tardio do problema pode permitir que descuidos ocorram e a bactéria seja transmitida pelos instrumentos de corte de plantas doentes para outras sadias no campo (Grisham, 2004).

A despeito da eficiência da microscopia, conforme observado no presente estudo, ela apresenta algumas desvantagens que limitam seu amplo emprego nos exames diagnósticos de rotina. Trata-se de um método que exige o envolvimento de observador bem treinado, uma vez que Lxx pode ser confundida com outros microrganismos com morfologia semelhante. Também, o número de amostras a ser analisada não pode ser elevado, pois o exame de muitas amostras é cansativo e pode comprometer a qualidade do trabalho pela fadiga do examinador. Além disto, o recomendável é o envolvimento de mais de um observador, numa duplicação dos exames para se garantir uma avaliação segura. Portanto, outros métodos são desejáveis para análise de RSD quando grande número de amostras tem que ser analisado.

No entanto, para que esses métodos possam ser adotados, é necessário que eles tenham sua eficiência aumentada consideravelmente. Conforme se observou, em nenhuma das avaliações realizadas mensalmente até o nono mês, foi possível detectar Lxx em material infectado por Lxx com o uso dos métodos “dot blot” ou PCR, aplicados conforme descrito na literatura, em contraste

com os resultados alcançados com o uso da microscopia. Esses resultados, confirmam os de Hoy et al. (1999) e Brumatti, et al. (2010) e demonstram a confiabilidade da microscopia, como técnica de detecção de Lxx. No entanto, Rao et al. (2004) concluíram que os testes sorológicos eram mais sensíveis que as técnicas convencionais como a microscopia, enquanto que Fegan et al. (1998) verificaram que cinco dentre as 17 amostras que foram negativas para Lxx por microscopia, em seu estudo, foram positivas por PCR. A controvérsia envolve também Gao et al. (2008), para quem o método baseado em PCR é menos sensível que o de “dot blot”.

Técnicas sorológicas para exames diagnósticos vêm sendo empregadas como parte do manejo integrado de RSD em vários países (Rao et al., 2004) por permitirem o processamento de mais de 90 amostras por membrana e o armazenamento desta para processamento posterior (Grisham, 2004). Além disto, o método permite quantificar a concentração de bactéria presente no caldo (Viswanathan, 2004). Resultados do presente estudo mostraram que o método “dot blot”, com as modificações introduzidas no presente estudo, tem potencial de substituir a microscopia para exames em grande número de amostras e ainda com alta eficiência de detecção. Quando o volume de caldo originalmente recomendado (Hoy et al., 1999, Hsu, 2009) (100 µL) foi testado o método foi inadequado e resultou em falsos-negativos para a presença de Lxx para todas as amostras infectadas por Lxx, com exceção do controle. O simples aumento do volume de caldo para o dobro do recomendado foi igualmente inadequado pelo mesmo motivo, tendo produzido resultados idênticos aos anteriores e ainda prolongando o exame devido ao tempo mais longo tomado na absorção gravitacional do caldo pela membrana. Mas, quando a “modificação b” foi testada, envolvendo um volume vinte vezes maior de caldo e duas centrifugações, a presença de Lxx foi prontamente identificada nas amostras infectadas e no controle positivo. Isso demonstra que a sensibilidade de cada técnica é determinada pelo volume e concentração da amostra utilizada, confirmando observação de Davis & Dean (1984). Essa modificação no método somente foi empregada em amostra de caldo obtido de cana de nove meses de idade. Assim, existe a possibilidade, a ser testada, de que o “dot blot” seja eficiente na detecção de Lxx em cana-planta mais jovem.

O PCR também pode ser promissor para exame diagnóstico de RSD em grande número de amostras por empregar DNA e ser altamente específico, sensível, rápido e permitir que as amostras sejam armazenadas por um maior período, antes de seu processamento (Fegan et al., 1998, Pan et al., 1998). Para isso, modificações no método são necessárias, pois quando essa técnica foi empregada conforme especificação de Pan et al. (1998), ela foi totalmente inadequada, gerando falsos-negativos para todas as amostras testadas que, sabidamente, estavam infectadas por Lxx. Mesmo após modificação, em que se utilizou caldo concentrado e período mais longo de aquecimento (4 h) seu

desempenho não foi melhorado. O PCR em tempo real é uma técnica bastante onerosa e por isso não é aplicável para exame diagnóstico de rotina para grande quantidade de amostras.

O tratamento térmico testado no presente estudo não foi eficiente para eliminar completamente as bactérias presentes nos toletes, conforme verificado por microscopia. Esta é uma constatação muito importante, pois esse regime é um dos dois mais recomendados para termoterapia de toletes de cana no Brasil para o controle de RSD. O outro tratamento (52°C/30 min), que é o mais empregado, já é reconhecido com falho para o controle de RSD (Fernandes Jr et al., 2010). Infelizmente, nenhuma recomendação para um novo regime de termoterapia foi feito por aqueles autores, pois tratamento a 50°C/2 h teve efeito deletério na variedade de cana incluída naquele estudo, embora, segundo aqueles autores, tenha resultado na completa eliminação de Lxx. Já, no presente estudo 50°C/2 h foi um regime também incapaz de erradicar completamente Lxx. A provável causa da divergência entre os resultados dos dois estudos está no uso não modificado do método “dot blot” no trabalho de Fernandes Jr et al. (2010) envolvendo um volume de caldo de 100 µL que, conforme visto aqui, é inadequado para uma avaliação precisa da presença de Lxx e possivelmente resultou em falsos-negativos. No decorrer deste trabalho observou-se que a extração do caldo a partir das amostras com uso de prensa permitiu que uma quantidade maior de caldo (e conseqüentemente de maior quantidade de células de Lxx), pudesse ser extraída quando comparado com o uso de compressor e centrifuga, como atualmente adotado (Hoy et al., 1999, Viswanathan, 2004). Recomenda-se então, que a extração de caldo com o uso de prensa passe a ser adotada rotineiramente para exame diagnóstico de Lxx por “dot blot”.

A ineficiência na eliminação completa de Lxx também com o uso de termoterapia de 50°C/2 h também já havia sido observada por Damann Jr & Benda (1983) e mostra a necessidade de se investigar novas alternativas de tratamento térmico como as pesquisadas por Fernandes Jr et al (2010). Com o advento crescente da colheita mecanizada na cultura, a importância do tratamento térmico para controle

de RSD ganha ainda maior destaque já que, diferentemente da colheita manual, nesse sistema não é feita a desinfecção das lâminas de corte das colheitadeiras na mudança dos talhões, o que favorece uma maior disseminação da bactéria. Com isso, a adoção cada vez maior de tecnologia moderna na cultura de cana-de-açúcar no Brasil pode por outro lado, favorecer a disseminação de uma de suas principais doenças.

A despeito da termoterapia 50°C/2 h não ter eliminado Lxx no presente estudo, está claramente demonstrado que essa diminuiu a concentração da bactéria, pois sua presença foi detectada apenas com o emprego de um maior volume de caldo e é mais eficiente na destruição das células bacterianas que 52°C/30 min (Fernandes Jr, 2010) e, portanto, pode ser recomendada para substituir o regime atualmente empregado pelas usinas no Brasil.

Uma das razões para a pouca aceitação desse tratamento (50°C/2 h) no Brasil é o temor do efeito deletério na brotação dos toletes em comparação ao 52°C/30 min, fenômeno esse já observado por Fernandes Jr et al., (2010). Dados do presente trabalho mostraram que essa reação à termoterapia não é comum para todas as variedades. Dentre as empregadas na presente pesquisa, RB855156 e RB867515 não apresentaram nenhum efeito negativo na brotação. Somente RB935744 mostrou diminuição da porcentagem de brotação das gemas tratadas termicamente (Tabela 1). Esses dados confirmam observação anterior de que variedades diferem em sua resposta ao tratamento térmico e que suas características genéticas é que determinam sua resistência ou suscetibilidade à injúria térmica (Benda, 1994), havendo, portanto, a necessidade de avaliação individual das variedades. A classificação das gemas em função de sua posição no tolete, que foi empregada no presente estudo, permitiu uma análise mais detalhada da reação das variedades incluídas ao tratamento térmico (Tabela 2). Assim, para a variedade RB867515, o emprego de 50°C/2 h ocasionou um efeito benéfico, estimulando a brotação das gemas basais, fenômeno esse que já havia sido verificado para o clone L 62-96 num estudo de avaliação do tratamento térmico usado comercialmente nos EUA (Damann Jr & Benda, 1983). As gemas das partes medianas

TABELA 2 - Efeito da termoterapia (50°C/2 h) sobre a brotação de gemas de diferentes variedades de cana-de-açúcar em função da localização das gemas

Tratamentos	Posição gema	Variedades		
		RB855156	RB867515	RB935744
Termoterapia	Apical	78,85a	35,42b	18,18b
	Mediana	78,85a	27,08b	22,73b
	Basal	78,85a	20,83b	27,27b
Controle	Apical	90,39a	60,42b	88,64a
	Mediana	82,69a	14,58b	63,64a
	Basal	61,54a	10,42c	38,64b

CV(%) = 26,40

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05)

e apicais não tiveram sua brotação estimulada, o que se refletiu na reação da variedade como um todo observado na Tabela 1. A necessidade da análise individualizada de cada variedade à termoterapia também ficou demonstrada quando se observa que para a variedade RB935744 o efeito da termoterapia foi oposto ao verificado para RB867515. Gemas basais foram as únicas a resistirem ao tratamento enquanto que as gemas de partes medianas e apicais tiveram a brotação prejudicada.

O presente estudo demonstra que existe necessidade de se substituir o tratamento térmico atualmente empregado (52°C/30 min) para 50°C/2 h, visando reduzir as ameaças de expansão da ocorrência de RDS. Antes de se adotar este regime em larga escala, um estudo sobre a reação individualizada das variedades utilizadas pela unidade produtora é fundamental, inclusive com a discriminação da reação em função da localização das gemas na planta.

AGRADECIMENTOS

Projeto desenvolvido com apoio financeiro do MAPA-SDA / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. N.G. Grachet agradece à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela bolsa I.C. (09/52295-9).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Assistat (2008) Softwares. Downloads. Versão 7.5 beta. <http://www.assistat.com>
- Benda GTA (1994) Serial hot-water treatment for sugarcane disease control. In: G. P. Rao GP, Gillaspie AG, Agnihotri VP, Filho AP, Upadhyay PP (Eds.) Current trends in sugarcane pathology. International Books and Periodicals Supply Service, Delhi. pp. 297-310.
- Brumatti CR, Vieira MAS, Urashima AS (2010) Diagnóstico de raquitismo das soqueiras em diferentes variedades de cana-de-açúcar em função dos métodos de detecção. *Summa Phytopathologica* 36:148.
- Carneiro Jr JB, Silveira SF, Souza Filho GA, Olivares FL, Gigliotti EA (2004) Especificidade de anti-soropoliclonal à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Fitopatologia Brasileira* 29:614-619.
- Chapola RG, Hoffmann HP, Bassinello AI, Fernandes Jr AR, Brugnaro C, Rosa JRBF, Vieira MAS, Schiavinato SR (2010) Censo varietal de cana-de-açúcar de 2009 dos estados de São Paulo, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. *STAB* 28:34-37.
- Companhia Nacional de Abastecimento Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar: safra 2010/2011: terceiro levantamento. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_09_14_50_boletim_cana_3o_lev_safra_2010_2011..pdf. 27 de janeiro de 2011.
- Copersucar (1989) Binômio tempo x temperatura no controle do raquitismo da soqueira (RSD) da cana-de-açúcar, pelo processo de termoterapia em gemas isoladas. *Cadernos COPERSUCAR, Série Melhoramento*, 25:1-5.
- Damann Jr KE (1983) Evaluation of commercial heat-treatment methods for control of ratoon stunting disease of sugarcane. *Plant Disease* 67:966-967.
- Damann Jr KE, Benda GTA (1983) Evaluation of commercial heat-treatment methods for control of ratoon stunting disease. *Plant Disease* 67:966-967.
- Davis MJ, Dean JL (1984) Comparison of diagnostic techniques for determining incidence of ratoon stunting disease of sugarcane in Florida. *Plant Disease* 68:896-899.
- Duttamajumder SK (2004) Bacterial diseases of sugarcane in India: a bird's eye view. In: Rao GP, Saumtally AS, Rott P (Eds.) Sugarcane pathology: bacterial and nematode diseases. New Hampshire. Science Publishers pp. 15-50.
- Evtushenko LI, Dorofeeva LV, Subbotin SA, Cole JR, Tiedje (2000) *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:371-380.
- Fegan M, Croft BJ, Teakle DS, Hayward AC, Smith GR (1998) 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* 47:495-504.
- Fernandes Jr AR, Ganem Jr EJ, Marchetti LBL, Urashima AS (2010) Avaliação de diferentes tratamentos térmicos no controle do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar. *Tropical Plant Pathology* 35:116-120.
- Gao S-J, Pan Y-B, Chen R-K, Chen P-H, Zhang H, Xu L-P (2008) 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* 10:334-340.
- Grisham MP (1991) Effect of ratoon stunting disease on yield of sugarcane grown in multiple three year plantings. *Phytopathology* 81:337-340.
- Grisham MP (2004) Ratoon stunting disease. In: Rao GP, Saumtally AS, Rott P (Eds.) Sugarcane pathology: bacterial and nematode diseases. New Hampshire. Science Publishers pp. 77-96.
- Hoy JW, Grisham MP, Damann KE (1999) Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. *Plant Disease* 83:1170-1175.
- Hsu HT (2009) Development of enzyme linked, tissue blot and dot blot immunoassays for plant virus detection. In: Burns R. (Ed.) Plant pathology: techniques and protocols. New York. Humana Press. pp. 15-25.
- Iglesia A, Fonseca D, Diaz M, Nunez O, González R, Pazos V, Peralta EL (2003) Detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Revista Protección Vegetal* 18:23-27.
- Matsuoka S (1984) Benefícios da prática de tratamento térmico de mudas de cana-de-açúcar e eficiência dos métodos existentes no Brasil. *Cadernos Planalsucar* 3:22-24.
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weightplant DNA. *Nucleic Acids Research* 8:4321-4325.

Pan YB, Grisham MP, Burner DM, Damann Jr KE, Wei Q (1998) A Polymerase Chain Reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. *Plant Disease* 82:285-290.

Rao GP, Girad JC, Rott P (2004) Current scenario and future perspectives of sugarcane bacterial diseases. In: Rao GP, Sauntally AS, Rott P (Eds.) *Sugarcane pathology: bacterial and nematode diseases*. New Hampshire. Science Publishers pp. 3-12.

Teakle DS, Smith PM, Steindl DRL (1975) Ratoon stunting disease of sugarcane: Possible correlation of resistance with vascular anatomy. *Phytopathology* 65:138-141.

Tokeshi H (1997) Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). Controle de doenças. In: do Vale FXR & Zambolim L (Eds.). *Controle de doenças de plantas: grandes culturas*. Viçosa. UFV, v.2, pp. 657-673.

Tokeshi H, Rago A (2005) Doenças da cana-de-açúcar. In: Kimati H. et al. (Eds) *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v. 2, pp.185-196.

Viswanathan R (2004) Serodiagnosis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* causing ratoon stunting disease in sugarcane. In: Rao GP, Sauntally AS, Rott P (Eds.) *Sugarcane pathology: bacterial and nematode diseases*. New Hampshire. Science Publishers pp. 155-173.

TPP 261 - Recebido 27 Fevereiro 2011 - Aceito 21 Dezembro 2011
Editor de Seção: Marisa A.S.V. Ferreira