

ANÁLISES MOLECULARES DE BACTÉRIAS E FUNGO EM CANA-DE-AÇÚCAR

VIRGÍNIA C. **CARVALHO**¹, HAIKO E. **SAWAZAKI**², CASSIARA R. N.C.B. **GONÇALVES**³, MARINA, M.M. **SENGER**¹, LUIZ A. N. DE **SÁ**⁴, RENATO F. A. **VEIGA**⁵, MAILA Q. **ALCÂNTARA**⁶, CARLOS A. **COLOMBO**⁵

RE10144

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas do Brasil, que é o maior produtor mundial de açúcar e álcool. A cultura da cana-de-açúcar é extremamente vulnerável a doenças devido ao sistema de propagação por toletes facilitar a disseminação dos patógenos, uma vez que os colmos mesmo infectados podem não apresentar sintomas. A propagação dessas doenças em monoculturas em grandes áreas facilita as epidemias, sendo importante para o plantio de mudas sadias, métodos para a detecção precoce de doenças. Dentre as doenças mais importantes em cana-de-açúcar, são conhecidas as causadas por bactérias como a *Leifsonia xyli* subsp.xyli, agente causal do Raquitismo-da-soqueira ou “ratoon stunting disease” (RSD) e a *Xanthomonas albilineans*, responsável pela Escaldadura das folhas ou “sugarcane leaf scald” (Ashby); por fungo como o do carvão (*Ustilago scitaminea*) que é uma doença considerada em todos os programas de melhoramento genético, com longo período de latência. Foram utilizadas como amostras folhas de plântulas de cana-açúcar desenvolvidas de cultura de tecido com cerca de 2 meses de transplante. Foram utilizados iniciadores de literatura para raquitismo e escaldadura ou desenvolvido pelo laboratório para carvão. Os fragmentos amplificados de cada doença foram clonados e a identidade confirmada por BLAST. O DNA dos controles positivos das reações foi obtido de clones dos fragmentos amplificados de plantas infectadas. Os iniciadores desenvolvidos para carvão mostraram especificidade em amostras de folhas de plântulas de cana-de-açúcar. A detecção de infecção confirma a eficácia da metodologia em plântulas com 2 meses de transplante, assim como o uso de clones como controle positivo, a maior facilidade para diagnóstico de infecção em plântulas de cana-de-açúcar,

1 BOLSISTA CNPq: Graduação em CiênciasBiológicas, PUC-Campinas, Campinas-SP,

✉ vi.camposcarvalho@gmail.com

2 ORIENTADOR: Pesquisador, IAC, Campinas-SP

3. Colaborador: Pesquisador, CTC, Piracicaba, SP

4. Colaborador: Pesquisador, EMBRAPA Jaguariúna, SP

5, Colaborador: Pesquisador, IAC, Campinas, SP

6. Colaborador: Bolsista CNPq

ABSTRACT

One of the main crops in Brazil is the sugarcane, being the country the largest producer in the area of sugar and alcohol. The cultivation of sugarcane is extremely vulnerable to diseases such as propagation by cuttings, which facilitates the spread of pathogens, since even the stems infected may show no symptoms. The spread of these diseases in monoculture in large areas facilitates epidemics, being important for the planting of healthy seedlings, methods for early detection of diseases. Among the most important diseases in cane sugar, are those caused by bacteria such as *Leifsonia subsp.xyli xyli*, causal agent of ratoon stunting disease (or ratoon stunting disease RSD) and *Xanthomonas albilineans*, responsible for scald leaves or "sugarcane leaf scald" (Ashby); or by fungi (*Ustilago scitaminea*) for rust disease (charcoal) which is considered in all breeding programs, with long latency period. The samples were leaves from seedlings of sugarcane tissue culture with about 2 months of transplanting. The primers were from literature for ratoon and scald or developed by laboratory for charcoal. The amplified fragments from each disease were cloned and the identity confirmed by BLAST. The positives controls for PCR reaction were obtained from cloned products from infected seedling. The primers developed showed specificity for charcoal in leaves of sugarcane plants. The detection of infection confirmed the effectiveness of the methodology for two months seedling, and the use of clones as positive control, the facility of infection diagnosis in seedlings of sugarcane,

INTRODUÇÃO

Originária do sudeste da Ásia, cultivada há muitos anos, a exploração canavieira iniciou-se com a espécie *S. officinarum*. Com o desenvolvimento de várias doenças e de tecnologia mais avançada, foi inevitável a criação de novas variedades obtidas pelo cruzamento da *S. officinarum* com as outras quatro espécies do gênero *Saccharum* e, depois através de retrocruzamentos com as ascendentes. A cultura da cana-de-açúcar é extremamente vulnerável a doenças como propagação por toletes, que facilita a disseminação dos patógenos, uma vez que os colmos mesmo infectados podem não apresentar sintomas. A propagação dessas doenças em monoculturas em grandes áreas facilita as epidemias, contaminação na colheita pelos instrumentos de corte, sendo importante para o plantio de mudas saudáveis, métodos para a detecção precoce de doenças. Dentre as doenças mais importantes em cana-de-açúcar, são conhecidas as causadas por bactérias como a *Leifsonia xyli* subsp.*xyli*, agente causal do Raquitismo-da-soqueira ou "ratoon stunting disease" (RSD) e a *Xanthomonas albilineans*, responsável pela Escaldadura das folhas ou "sugarcane leaf scald" (Ashby), o carvão causado pelo fungo (*Ustilago scitaminea*). Como prevenção a

doenças, o instituto agrônômico possui o setor de quarentena de mudas, que necessitam ser certificadas como livres de fungos, vírus e bactérias. Com relação a bactérias, a diagnose do raquitismo pelo exame do avermelhamento dos feixes vasculares do tecido nodal não é precisa, pois fatores externos ou stress resultam nas mesmas características (Fegan et al., 1998). Os sintomas de escaldadura de riscas cloróticas foliares com ou sem necrose, descoloração avermelhada de feixes vasculares nos nódulos do colmo, na forma latente, não aparecem (Wang et al, 1999), o que torna a detecção visual de bactérias não confiável. A metodologia mais fácil para infecção por fungos é o visual, porém, geralmente é longo o período de latência antes do aparecimento dos sintomas. O carvão (*Ustilago scitaminea*) parasita tecidos meristemáticos do hospedeiro, originando o chicote. Este causa uma alteração na morfologia do colmo, e no caso do carvão se apresenta afiliada e recoberta com uma massa negra de teliósporo do fungo. (Rago, 2005). A presença dos chicotes permite a diagnose segura da doença. (TOKESHI;RAGO,2005).

MATERIAL E METODOS

Foram utilizadas amostras (folhas) de plântulas de cana-açúcar desenvolvidas de cultura de tecido com cerca de 2 meses de transplante em casa-de-vegetação no Quarentenário do instituto ou folhas infectadas (ou DNA) de cana-de-açúcar fornecidas pelo Centro de Tecnologia Canaveira de Piracicaba. A extração de DNA foi feita com o método CTAB de Doyle & Doyle (1990) modificado. Foram utilizados os iniciadores Cxx1 e Cxx2 de Pan, Y-B et al. (1998) para raquitismo, Xalb2-F3 e Xalb2-R3 de Davis, M.J. et al. (1998) para escaldadura e os desenvolvidos pelo laboratório (Senso: 5'-AACACGGTTGCATCGGTTGGGTC-3' e Antisenso: 5'-GCTTCTTGCTCATCCTCACCACCAA-3') para carvão que amplificam a região do gene RNA ribossomal 28S. Para controle negativo utilizou-se água livre de Dnases. Os fragmentos amplificados de cada doença foram clonados em PGEm-T e a identidade das sequências confirmadas por BLAST. O DNA dos controles positivos das reações foi obtido de clones dos fragmentos amplificados de plantas infectadas. Análises de PCR em Tempo Real foram desenvolvidas no aparelho 7500 Fast Real Time PCR System e os iniciadores desenvolvidos pelo Primer Express2.0 (Applied Biosystems).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram observadas as ampliações esperadas de amostras de plântulas de cana-de-açúcar de 440 pb para o PCR de escaldadura (Figura 1), 438 pb para o raquitismo

(Figura 2) e 511pb para o carvão (Figura 3). Pela literatura o par de iniciadores específicos relatados para carvão (1996), segundo dados de Cassiara RNC Bueno (tese doutorado, Piracicaba, 2010), detectaram carvão em tecido meristemático, sendo um método destrutivo das amostras. O desenvolvimento de iniciadores mais específicos para tecido foliar foi necessário para permitir maior facilidade de análise pois é não destrutivo.

Em todas as reações o uso de clones como controle positivo foi efetivo, indicando a maior facilidade para análise de diagnóstico de infecção em plântulas de cana-de-açúcar. Esta metodologia poderá auxiliar o diagnóstico em laboratórios que não tenham a infraestrutura de manutenção da planta infectada. Os iniciadores desenvolvidos para detecção de carvão mostraram-se eficientes para as amostras de folhas de plantas infectadas, não detectando plantas sadias. Segundo Cassiara R.N.C.Bueno (2010) o uso destes iniciadores em plantas assintomáticas foi eficaz muito antes do aparecimento do sintoma do chicote.

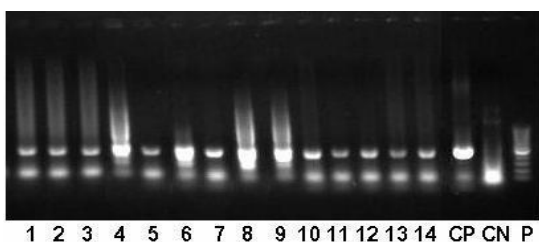


Figura 1. Amplificação de plantas de cana-de-açúcar (1 a 14) infectadas com escaudadura; CP: controle positivo; CN: controle negativo; P: padrão de 100p b(Fermentas)

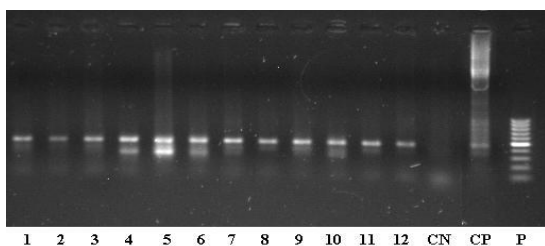


Figura 2. Amplificação de plantas de cana-de-açúcar (1 a 12) infectadas com raquitismo; CN: controle negativo; CP: controle positivo; P: padrão de 100pb (Fermentas)

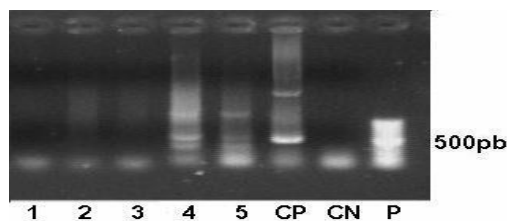


Figura 3. Amplificação de plantas de cana-de-açúcar: sadias (1 a 3); infectadas com carvão (4 e 5); CP: controle positivo; CN: controle negativo; P:padrão de 100pb (Fermentas)

TABELA 1: Sequências dos primers desenhados para o ensaio de PCR em tempo Real

| Primer | Seq | Tamanho | Tm | Amp. comprim. |
|---------------|------------------------|---------|----|---------------|
| Senso Carv | CTATTTGAGGCCCGCAAT | 19 | 59 | 61pb |
| Antis 1 Carv | TCCGCCAGCTCTTTCGTAATAA | 22 | 60 | 61pb |
| Antis 2 Carv | TCCGCCAGCTCTTTCGTAA | 19 | 58 | 61pb |
| Senso Raq 1 | CGCCGGATCTGAGACAGTACT | 21 | 58 | 61pb |
| Antis Raq 1 | ATGAGCTGACCGGCTGAGA | 19 | 58 | 61pb |
| Senso Raq 2 F | GCCCGGATCTGAGACACTA | 20 | 60 | 62pb |
| Antis Raq 2 R | ATGAGCTGACCGGCTGAGA | 19 | 58 | 62pb |

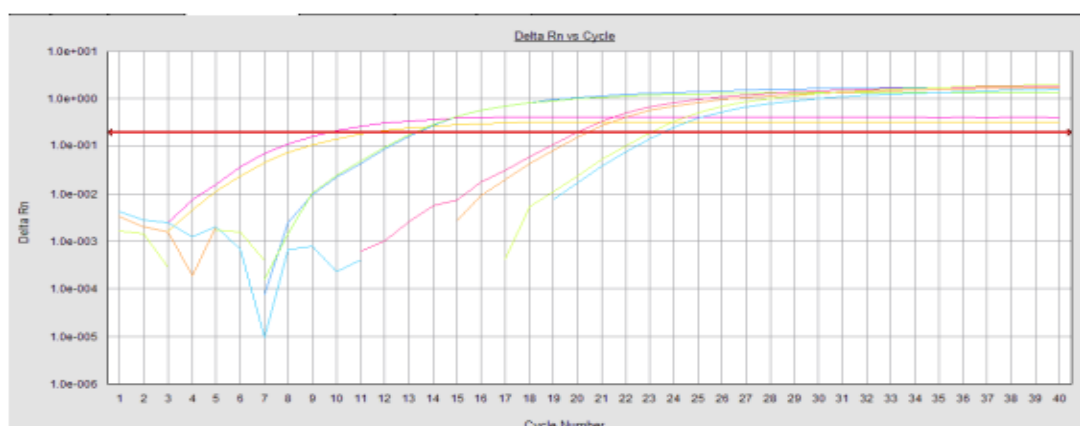


Figura 4. Análises de PCR em Tempo Real para raquitismo.

Análises em PCR de Tempo real utilizando o primer Raq1 (Tabela 1) desenvolvido para raquitismo. As reações SYBR Green e condições foram otimizadas para um volume de 15,0 µl com 7,5 µl do SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e 10 a 100ng de DNAs (Figura 4).

CONCLUSÃO

A detecção de infecção confirmou a eficácia da metodologia em plântulas com 2 meses de transplante, assim como o uso de clones como controle positivo, a maior facilidade para diagnóstico de infecção em plântulas de cana-de-açúcar, Os iniciadores desenvolvidos para carvão mostraram especificidade para determinação do carvão em amostras de folhas de plantas de cana-de-açúcar .

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BUENO, C.R.N.C. Infecção por *Sporisorium scitamineum* em cana-de-açúcar: influência de variáveis ambientais e desenvolvimento de método para diagnose precoce. **Tese Doutorado**, Piracicaba, 2010. 67p.

- CHATENET, M.; DELAGE, C.; RIPOLLES, M. Detection of *Sugarcane yellow leaf virus* in Quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. **Plant Disease**, 85(11):1177-1180, 2001.
- DAVIS, M. J.; RORR, P.; ASTUA-MONGE, G. 1998.. Nested, multiplex PCR for detection of both *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and *Xanthomonas albilineans* in sugarcane. In: Cong. Plant Pathology, ISPP, Edinburgh, Aug., 1998. **Offered papers abstract**, v. 3, 3.3.4. 1998,
- 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**, 47:495-504, 1998.
- PAN, Y.-B.; GRISHAM, M.P. & BURNER, D.M. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease**, 81(2):189-194, 1997.
- RAGO, A. M. - Variabilidade patogênica de *puccinia melanocephala* e *ustilago scitaminea* no estado de São Paulo – 2005, Disponível em: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde.../AlejandroRago.pdf Acesso em: 05/07/2010 às 13:30
- 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**: Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Ceres, 2005. V. 2, cap 21, p. 185-196
- WANG, Z.K; COMSTOCK, J.C.; HATZILOUKAS, E. & SCHAAD, N.W. Comparison of PCR, Bio-PCR, DIA, ELISA and isolation of semi selective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathology**, 48:245-252, 1999.