

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**TEMPERATURA COMO ESTRESSE ABIÓTICO:  
FISIOLOGIA E EXPRESSÃO GÊNICA EM CANA-DE-  
AÇÚCAR**

**AIRAN MIGUEL DOS SANTOS PANTA**

**2019**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**AIRAN MIGUEL DOS SANTOS PANTA**

**TEMPERATURA COMO ESTRESSE ABIÓTICO:  
FISIOLOGIA E EXPRESSÃO GÊNICA EM CANA-DE-  
AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientadora  
Profa. Dra. Renata Silva Mann

SÃO CRISTÓVÃO  
SERGIPE – BRASIL  
2019

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

P197t      Panta, Airan Miguel dos Santos Temperatura como estresse abiótico : fisiologia e expressão gênica em cana-de-açúcar / Airan Miguel dos Santos Panta ; orientadora Renata Silva-Mann. – São Cristóvão, SE, 2019. 69 f. : il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, 2019..

1. Biotecnologia. 2. Cana-de-açúcar. 3. Melhoramento genético vegetal. 4. Fotossíntese. I. Silva-Mann, Renata, orient. II. Título.

CDU 606:633.61

**AIRAN MIGUEL DOS SANTOS PANTA**

**TEMPERATURA COMO ESTRESSE ABIÓTICO:  
FISIOLOGIA E EXPRESSÃO GÊNICA EM CANA-DE-  
AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em dia \_\_\_\_ de mês \_\_\_\_\_ de 2019.

Prof. Dr. Paulo Roberto Gagliardi  
UFS

Profa. Dra. Ana Catarina Lima de Oliveira  
IFS

Profa. Dra. Renata Silva Mann  
UFS  
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO  
SERGIPE – BRASIL

*Aos meus amados pais:  
José Panta Neto e  
Vladira dos Santos Silva  
(in memorian )  
**Dedico***

Não é esse o nosso fim,  
Espera mais um pouco, vamos nos reencontrar!

## AGRADECIMENTOS

Na minha singela opinião, agradecer deve ser algo espontâneo e não uma mera formalidade. Portanto, peço licença ao nobre leitor para que eu possa expressar nessas linhas do trabalho, sem linguagem científica, minha gratidão ilimitada aos que ajudaram a tornar essa investigação possível, de forma material ou imaterial.

Aos meus familiares de “sangue” ou não que, ao longo dos anos, contribuíram para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Auxência de alguns e a presença de outros, uns fisicamente e outros espiritualmente. Luzes que guiam minha mente e meus passos, a todos o meu muito obrigado!

Ao orientador, Profa. Dra. Renata Silva Mann, pela orientação, paciência, dedicação, orientação e até mesmo os “puxões de orelha” despejados em mim desde o início, ainda na graduação, que perdurou até esta fase de pós-graduando, me ajudou bastante, e possibilitou a conclusão desta obra. Ao co-orientador, prof. Dr. Paulo Gagliardi, o qual tenho demasiado apreço, meu agradecimento pelas “horas de paciência” para me explicar cuidadosamente todas as atividades.

Aos professores do curso, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento, alguns de forma mais ativa, outros mais passiva, mas todos têm o meu obrigado.

Aos amigos (não citarei nomes, pois não caberiam neste espaço) formados ao longo desta jornada, agradeço bastante o carinho e a atenção, sempre contribuindo para o meu crescimento. Confesso que de alguns sentirei saudades!

Em especial aos grupos de pesquisa do GENAPLANT/DEA, ECOPOC/DEA, LABMET/DZO, Campus Rural e ao Laboratório Central de Saúde Pública de Sergipe - LACEN/SE, pois sem eles esse trabalho não seria realizado. Muito Obrigado!

A TODOS que de forma direta ou indireta me participaram da minha vida, professores do infantil, fundamental, médio, pre-vestibular, técnicos administrativos da UFS, técnicos da biblioteca, motoristas, profissionais da limpeza, profissionais da segurança, funcionários do restaurante universitário, funcionários do campus rural, a todos o meu muito obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende.”

**João Guimarães Rosa, em Grande Sertão: Veredas.**

À Maria Izabel  
Pessoa com quem amo partilhar a vida,  
Com amor  
OFEREÇO

Só quero o que é meu, eu não quero o de mais ninguém.

Só vou buscar o que Deus me deu, eu não quero roubar o que é seu.

Eles querem que eu acredite em alguma coisa. Eu acredito em mim, tenho fé em mim.

Não tive padrinho pra aliviar minhas costas. Sou escravo da minha própria criação.

Abre a janela, P.E.

## BIOGRAFIA

Airan Miguel dos Santos Panta é Engenheiro Agrônomo formado pela Universidade Federal de Sergipe (UFS). Em nível técnico tem formação em Informática (Desenvolvimento de Softwares) pelo Instituto Federal de Sergipe (IFS).

Atuou voluntariamente como colaborador em projeto de extensão com inclusão sociodigital.

Atuou na área de biotecnologia, em micropropagação vegetal *in vitro* – BIOFABRICA.

.Atua na área agrônômica de frutas (laranja, abacaxi, coco, banana e caju).

Atuação direta em auditoria e fiscalização federal agropecuária, Fiscalização de Bebidas, classificação de Gãos (arroz, feijão, milho e trigo), Legislação de Sementes e mudas, Conhecimento em sistemas Agrícolas Federais (SEI, SISLEGIS, SIPEAGRO, RENASEM).

Estagiou junto a superintendência estadual do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) de junho de 2017 a outubro de 2018.

Possui experiência em assistência técnica junto a produtores de mudas no estado de Sergipe, Pernambuco e Bahia, com viveiros de laranja, palma, caju e ornamentais.

Certificador fitossanitário (CFO/CFOC) credenciado no MAPA para citros, banana, café, uva e batata.

## Sumário

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1 A espécie cana-de-açúcar e a cultivar RB867515 .....	17
2.2 Estresse abiótico e expressão gênica .....	23
2.3 Estresse biótico e <i>Leifsonia xyli</i> .....	25
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>30</b>
<b>4. ARTIGO 1</b> .....	<b>39</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>39</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>4.2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
<b>4.2.1. Produção das mudas de cana-de-açúcar</b> .....	43
<b>4.2.2. Determinação da clorofila a e b</b> .....	44
4.2.3. Fluorescência transiente de clorofila a.....	44
4.2.5. Extração do RNA total.....	45
4.2.6. PCR quantitativa .....	46
4.2.7. Determinação da eficiência de amplificação dos iniciadores .....	46
<b>4.2.5. Análise dos dados</b> .....	47
<b>4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
4.3.1. Clorofila a e b.....	47
4.3.2 Fluorescência da clorofila a .....	49
<b>4.3.3 Expressão gênica em cana</b> .....	<b>52</b>
4.4. Discussão .....	53
4.5. Conclusões .....	54
4.6. Referências Bibliográficas .....	54
<b>5. ARTIGO 2</b> .....	<b>56</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>56</b>
<b>5.1. Introdução</b> .....	<b>58</b>
<b>5.2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>59</b>
5.2.1. COLETA DOS INSETOS .....	59
5.2.2. EXTRAÇÃO DE DNA E OTIMIZAÇÕES .....	60

5.2.3. DETECÇÃO DE <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> NOS INSETOS .....	60
5.2.4 Nested-PCR.....	62
<b>5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
5.3.1. PCR convencional com diferentes primers para detecção de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> em diferentes hospedeiros. ....	63
5.4. Discussão .....	64
5.5. Conclusões .....	64
5.6. Referências Bibliográficas. ....	65
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

	Página
FIGURA 1. Mudanças de cana cultivar RB-867515 produzidas em sistema MPB com 15 dias após plantio (A). Acomodação das mudas de cana com 65 dias após plantio em sistema de temperatura e luminosidade controladas (BOD). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, 2019. Fonte Autor. .....	46
FIGURA 2. Clorofilômetro (Clorofilômetro CFL1030) (a), usado nas medições de clorofila <b>a</b> e <b>b</b> . Fluorímetro portátil (b) (OS-30p) usado para medições de fluorescência. Pinças para adaptação ao escuro (c). Ambos equipamentos utilizados em mudas de cana-de-açúcar submetidas a estresse abiótico. UFS, São Cristóvão-SE, 2019. Fonte Autor.....	47
FIGURA 3. Extração de RNA do tecido foliar de mudas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse abiótico (A). Termociclador Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System. UFS, São Cristóvão-SE, 2019. Fonte Autor....	48
FIGURA 4. Teores de clorofila total (Clo Total), clorofila a (Clo a), clorofila b (Clo b) e a relação clorofila a e b (Relação a/b) para mudas de cana-de-açúcar submetidas a diferentes tempos de exposição e temperaturas. UFS, São Cristóvão-SE, 2019.....	51
FIGURA 5. Expressão gênica para a subunidade ribossomal 18S em cana-de-açúcar cv. RB867515 submetida às temperaturas de 15°C e 40°C em diferentes tempos de avaliação.	52

### ARTIGO 2

	Página
FIGURA 1. Localização do campo de plantas inoculadas com a bactéria <i>Leifsonia xili</i> (Lxx) onde foram coletados insetos-chaves da cultura e submetidos a testes de PCR. UFS, São Cristóvão-SE, 2019. Fonte Autor.	62
FIGURA 1. Amplificações por PCR convencional com primers visando a detecção de <i>Leifsonia xili</i> em insetos. Fragmentos separados em gel de agarose a 1,5%, Ladder de 100 pares de base na primeira coluna da esquerda para direita do gel. 1 - <i>Diatraea flavipennella</i> inseto inteiro, 2 - <i>Diatraea saccharalis</i> inseto inteiro, 3 - <i>Mahanarva fimbriolata</i> cabeça, 4 - <i>Mahanarva fimbriolata</i> corpo, 5 - <i>Mahanarva posticata</i> cabeça, 6 - <i>Mahanarva posticata</i> corpo, 7 - <i>Heterotermestenuis</i> inseto inteiro, 8 - <i>Mahanarva posticata</i> ninfa cabeça; 9 - <i>Mahanarva posticata</i> ninfa corpo. UFS, São Cristóvão-SE, 2019.	66
FIGURA 3. Amplificações por NESTED-PCR, com iniciadores desenhados por Davis et al. (1998), a partir de DNA da PCR convencional e separadas em gel de agarose a 1,5%, Ladder de 100 pares de base na primeira coluna da esquerda para direita do gel, seguido de DNA dos insetos 7, 8 e 9. Itens 1, 2 e 3 PCR convencional usando primer Lx 23 S e Lx 23 F. Itens 4, 5 e 6 usando PCR convencional primer Cxx1 e Cxx2 e PCR convencional. Itens 7, 8 e 9 usando NESTED-PCR e primer Lx 23 S e Lx 23 F. Itens 10, 11 e 12 usando NESTED-PCR e primer Cxx1 e Cxx2. Item 13 apenas água. UFS, São Cristóvão-SE, 2019.	66

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

	Página
TABELA 1. Índice de Clorofila Falker em plantas de cana-de-açúcar ( <i>Sacharum</i> spp.) submetidos a diferentes temperatura e tempos de exposição. .....	50
TABELA 2. Parâmetros fisiológicos (F0 (Fluorescência inicial), FM (Fluorescência máxima) e FV (Fluorescência variável) ( $F_v = F_m - F_0$ ), a partir desses parâmetros foi calculada a eficiência quântica potencial ( $F_v/F_m$ ) do fotossistema II (PSII) em cana-de-açúcar com 65 dias após o plantio, desenvolvida sob três regimes de temperatura e 9 tempos de exposição. UFS, São Cristóvão-SE, 2019.	53

### ARTIGO 2

	Página
TABELA 1. Espécies de insetos coletados em plantio de cana-de-açúcar contaminada com <i>Leifsoniaxili</i> .	62
TABELA 2. Identificação, espécie e parte do inseto utilizada para extração de DNA visando a detecção de <i>Leifsoniaxili</i> .	63

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

cDNA	DNA complementar
<i>Cors</i>	<i>Cold-responsive genes</i> (genes que respondem a baixa temperatura)
CV	Coefficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
RNA	Ácido ribonucléico
RNA <sub>m</sub> /mRNA	RNA mensageiro
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> <i>Real time</i> PCR
SAGE	<i>Serial analysis of gene expression</i> (análise serial da expressão gênica)
SD	Desvio-padrão
Ss	<i>Saccharum</i> sp.
RIDESA	Rede Interuniversitária de Desenvolvimento do Setor Sucroenergético
B.O.D	<i>Biochemical oxygen demand</i>
CV	Coefficiente de variação
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
g	Gramas
h	Horas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
kg	Quilograma
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro

## RESUMO

PANTA, Airan Miguel dos Santos. Temperatura como estresse abiótico: fisiologia e expressão gênica em cana-de-açúcar. São Cristóvão: UFS, 2019. 74p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).

Grande parte dos estados produtores de cana-de-açúcar, estão em regiões de clima seco e com temperaturas elevadas no verão. Isto demonstra a necessidade de se avaliar e desenvolver cultivares que mantenham a produtividade alta. Dentro deste contexto é imprescindível compreender como a cana-de-açúcar se comporta sob estresse abiótico, principalmente de temperatura. De posse desses conhecimentos, poder-se-á estabelecer critérios de seleção de genótipos e delinear estratégias de utilização dessas fontes de tolerância em programas de melhoramento vegetal. Objetivou-se com este estudo avaliar parâmetros fisiológicos e a expressão gênica em cana-de-açúcar cultivar RB86-7515 submetida a temperaturas de 40°C, 28°C e 15°C em diferentes tempos de exposição 0, 4, 8, 12 e 24 horas. Empregado em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. Plantas de cana-de-açúcar foram mantidas em casa de vegetação até atingirem 65 dias de crescimento. Em seguida foram submetidas ao estresse de temperatura em incubadora tipo BOD. Obteve-se dados de clorofila a e b, bem como a relação a/b, clorofila total e fluorescência da clorofila. As medidas da fluorescência da clorofila a foram feitas em folhas localizadas na região mediana da folha. Foram medidos os valores de fluorescência inicial (F<sub>0</sub>) e máxima (F<sub>m</sub>). Com essas variáveis foram estimadas as relações: F<sub>v</sub>/F<sub>o</sub> e a eficiência quântica potencial do fotossistema II (FSII) F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>. Após as medidas de F<sub>o</sub> e F<sub>m</sub>, foi determinada a curva de indução da fotossíntese e análise dos coeficientes de extinção da fluorescência. Para a avaliação da expressão gênica, amostras de tecidos de folhas foram submetidas a extração de RNA e determinação da expressão do gene para a subunidade 18S. Houve diferença entre os tratamentos para as variáveis clorofilas total e a relação clorofila a/b. Para F<sub>0</sub>, F<sub>m</sub>, F<sub>v</sub>, F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>, F<sub>m</sub>/F<sub>0</sub> e F<sub>0</sub>/F<sub>v</sub> as temperaturas influenciaram significativamente nas determinações. Para os resultados da expressão gênica foram testados os genes *M6*, *HSP* (*sHSP18.2*), *PER1* e *18S*. Houve atividade gênica detectável para *18S* a 15°C e 40°C, em alguns tempos.

**Palavras-chave:** RNA, fotossíntese, clorofila, 18S.

---

\* Comitê Orientador: Renata Silva-Mann – UFS (Orientadora), Paulo Roberto Gagliardi (co-orientador) – UFS.

## ABSTRACT

PANTA, Airan Miguel dos Santos. Gene Expression: Abiotic Stress and the Detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* Host Bugs in Sugar Cane. São Cristóvão: UFS, 2017. XXp. (Thesis - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).\*

Most sugar cane producing states are in dry climate regions, with high summer temperatures. This demonstrates the need to evaluate and develop tolerant cultivars that maintain high productivity. Within this context, it is essential to understand how sugar cane behaves under abiotic stress, especially under different temperatures. With this knowledge, it would be possible to establish genotype selection criteria and then outline strategies for using these sources of tolerance in plant breeding programs. The objective of this study was to evaluate the physiological parameters and the gene expression in the sugar cane cultivar RB86-7515 when submitted to temperatures of 40°C, 28°C and 15°C, at different exposure times of 0, 4, 8, 12, and 24 hours. The design used was a completely randomized design with six replications. The sugar cane plants were kept in a greenhouse until they reached 65 days of growth. They were then submitted to temperature stress in a BOD incubator. Chlorophyll a and b data were obtained, as well as the a / b ratio, together with total chlorophyll and chlorophyll efflorescence. The chlorophyll a fluorescence measurements were made on leaves that were located in the median region of the leaf. The initial (F<sub>0</sub>) and the maximum (F<sub>m</sub>) fluorescence values were measured. With these variables, the relationships of F<sub>v</sub> / F<sub>0</sub> and the potential quantum efficiency of photosystem II (FSII) F<sub>v</sub> / F<sub>m</sub> were estimated. After the F<sub>0</sub> and F<sub>m</sub> measurements, the photosynthesis induction curve and the fluorescence extinction coefficient analyses were determined. For the evaluation of the gene expression, the leaf tissue samples were submitted to RNA extraction and the determination of the gene expression for the 18S subunit. There were differences between the treatments for the total chlorophyll variables and the chlorophyll a / b ratio. For F<sub>0</sub>, F<sub>m</sub>, F<sub>v</sub>, F<sub>v</sub> / F<sub>m</sub>, F<sub>m</sub> / F<sub>0</sub>, and F<sub>0</sub> / F<sub>v</sub>, the temperatures significantly influenced the determinations. For the results of the gene expression, the genes M6, HSP (sHSP18.2), PER1, and 18S were tested. There were detectable gene activities for 18S at 15°C and 40°C at some of the times.

Keywords: RNA, photosynthesis, chlorophyll, 18S

---

\* Supervising Committee: Renata Silva-Mann – UFS (advisor), Paulo Roberto Gagliardi (co-advisor) – UFS.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar extremamente importante para o Brasil, quem dos líderes globais na produção de cana com 646,4 milhões de toneladas. É o maior produtor de açúcar e etanol do mundo. No ciclo 2017/2018 foram produzidas 38,6 milhões de toneladas de açúcar, desta produção 27,8 milhões de toneladas foram exportadas— quantias equivalentes a 20% da produção global e 45% da exportação mundial, respectivamente. Para o etanol, a produção foi de 26,1 bilhões de litros (CONAB, 2018).

Os fatores ambientais representam um dos principais fatores limitantes para a produtividade agrícola no mundo inteiro. Esses estresses não só afetam as áreas cultivadas, mas também representam uma barreira significativa para a introdução de espécies cultiváveis em áreas que ainda não são utilizadas para a agricultura (CHERRY, 1994) podendo limitar sua produção e sua qualidade.

A cana-de-açúcar sofre diversas perdas decorrentes de estresses bióticos e abióticos (NANA et al., 2014; TIWARI et al., 2012) ou seja, fatores que promovem uma situação desvantajosa para a planta. No nordeste brasileiro ocorre frequentemente estresse de forma múltipla, déficit hídrico, salinidade, altas temperaturas e excesso de luminosidade; sendo a busca por genótipos que tenham boa produção nestas condições, um grande desafio. Os estresses abióticos podem retardar o crescimento e o desenvolvimento, reduzir a produtividade e, em casos extremos, levar a planta à morte (SHU et al., 2013).

O estresse biótico, ocasionado por fungos, insetos, bactérias, vírus e plantas indesejáveis, é um dos principais causadores de prejuízos nas lavouras. As doenças da cana-de-açúcar são muito graves porque causam a degenerescência das variedades em cultivo, obrigando a sua substituição periódica de cultivares. Além disso, dentre as doenças de maior importância para a cana-de-açúcar no âmbito mundial, são o raquitismo da soqueira e a escaldadura das folhas (GATTI, 2008). Em estudo com as cultivares mais cultivadas no Estado de São Paulo identificou-se perdas de até 26% no peso médio das plantas doentes (GAGLIARDI, 2009).

O processo de aclimação distingue-se do de adaptação ou tolerância, sendo este último resultado de processos de seleção contínuos por várias gerações de uma espécie vegetal. A aclimação, por sua vez, envolve geralmente o termo resistência que significa uma aptidão dessas plantas para enfrentar ambientes desfavoráveis (TAIZ; ZEIGER, 2004). A tolerância, por sua vez, é um mecanismo que permite à planta manter o seu metabolismo em níveis considerados normais mesmo na presença do agente agressor, sem influências prejudiciais ao desenvolvimento. Neste aspecto, alguns fatores são limitantes para um quadro de

irreversibilidade, tais como: o estágio de desenvolvimento da planta, o genótipo utilizado (WILLADINO; CAMARA, 2010), a duração e a severidade do estresse (CHAVES et al., 2003; GHELFI et al., 2011) e alterações transientes da expressão gênica e produção de compostos específicos durante a exposição do genótipo às condições desfavoráveis.

Desta forma, fazem-se necessários estudos para entender os processos fisiológicos e em nível de expressão gênica da resposta a esses estresses. Essas informações são importantes para o desenvolvimento de novas cultivares de cana-de-açúcar, que apresentem resistência e adaptação aos estresses.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A espécie cana-de-açúcar e a cultivar RB867515

Poaceae evoluiu 70 milhões ano atrás, em um ecossistema caracterizado com clima quente (RELVA, 2001; EDWARDS; SMITH, 2010; OMBERG, 2011), mas tem sucessivamente diversificado para fora da sua zona ecológica de origem, e surgem gramíneas adaptadas a uma ampla gama de regimes climáticos, a partir de florestas tropicais ao congelamento Ártico e ecossistemas antárticos (HARTLEY, 1973; EDWARDS; SMITH, 2010; MAGNUS, 2013).

A família das gramíneas (Poaceae) consiste em aproximadamente 10.000 espécies, e a cana-de-açúcar, que pertencem a tribo Andropogoneae gênero *Saccharum*. A classificação botânica das espécies de cana-de-açúcar mais aceita atualmente contempla: *S. officinarum* (2n=80), *S. spontaneum* (2n=40-128), *S. robustum* (2n= 60-194), *S. sinense* (2n=111 - 120), *S. barberi* (2n=81 - 124) e *S. edule* (2n=74) (BARBOSA, 2000). *S. spontaneum* e *S. robustum* são selvagens; enquanto as outras quatro espécies são domesticadas.

Por meio da hibridização *in situ* de DNA das variedades modernas, determinou-se que cerca de 80% de seus cromossomos são oriundos da espécie *S. officinarum*, 10% de *S. spontaneum* e os 10% restantes compreendem cromossomos recombinantes (D'HONT, 2005; DIAS, 2016). As cultivares utilizadas para plantios comerciais são híbridos interespecíficos resultantes de cruzamentos entre essas espécies (IRVINE, 1999). Em estudos citogenéticos atesta-se a poliploidia e aneuploidia, e apresentam genoma bastante complexo, compreendendo pelo menos 100 cromossomos (GRIVET; ARRUDA, 2001).

A cana-de-açúcar (híbridos do gênero *Saccharum*) é uma cultura comercial de longa duração e alta exigência, cultivada sob diferentes condições agroecológicas. Além de experimentar variações do clima o ano todo, a mudança do clima, agrava ainda mais os efeitos desses estresses abióticos, afetando o crescimento, desenvolvimento, síntese de açúcar, seu

acúmulo e recuperação e disponibilidade da cana para plantio seguinte (SHRIVASTAVA, 2017).

A variedade RB867515 foi lançada pela Universidade Federal de Viçosa em 1997, e foi obtida a partir do cruzamento de variedades RB (UDOP, 2007) em um cruzamento múltiplo parental. O crescimento dessa variedade é rápido com alta produtividade agrícola, esta variedade é rica com curva de maturação semelhante à RB72454. Deve ser plantada em solos de média/baixa fertilidade para ser colhida em meados de safra, ou bem no final para explorar o rápido crescimento. Tolerante a seca, de maneira geral, tem se adaptado muito bem aos solos arenosos do estado de São Paulo e Paraná, onde o florescimento e chochamento ocorrem em menor intensidade e favorece sua maturação (MARQUES; SILVA, 2008).

Segundo um levantamento do Instituto Agrônômico (IAC), os dados do segundo censo nacional de variedades de cana-de-açúcar, feito com 217 usinas e destilarias no Centro-Sul do Brasil apontou que no ano de 2016 a cultivar RB867515, da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (Ridesa), estava em 27% da área colhida de 6,11 milhões hectares.

No Mato Grosso dos 134 mil hectares avaliados, é a região com maior concentração de cultivo da cultivar RB867515, com 49,8% dessa área plantada. No Estado de São Paulo, com 3,58 milhões de hectares apurados, a RB867515 tem a menor concentração, com 22,4% da área. A região de Ribeirão Preto, com 651 mil hectares, é a com a mais baixa concentração dessa variedade entre todas as avaliadas, com 11,5% de cultivo, pouco acima da RB966928, que tem 10,9% da área. Essa área pesquisada corresponde a 76% do total estimado de toda a cultivada – de 8 milhões de hectares –, na maior região produtora mundial de cana, com plantio estimado em 10% do total do país (IAC, 2017).

A variedade RB867515 é indicada para ambientes de médio a baixo potencial de produção, para colheita no meio de safra em diante, tem crescimento rápido com alta produtividade agrícola, apresenta alto teor de sacarose, com curva de maturação semelhante à da RB72454. Ótima brotação das socas, mesmo colhidas sem queima, boa opção para plantio como cana-de-ano. Não deve ser plantada em solos argilosos de boa fertilidade onde pode ocorrer ataque de estrias vermelhas (bactéria *Acidovorax avanae subsp. avenae* (sin: *Pseudomonas rubrilineans*). Pode ocorrer a quebra de palmito em épocas de intensa vegetação, principalmente na periferia dos talhões. Em ambientes de produção muito favoráveis podem ocorrer produtividades agrícolas muito altas e possibilidade de tombamento e atraso na maturação.

## 2.2 Estresse abiótico em cana-de-açúcar

Diversos fatores interferem na produção e maturação da cultura da cana-de-açúcar, sendo os principais a interação edafoclimática, o manejo da cultura e a cultivar escolhida.

Para possibilitar o cultivo de cana em diversas regiões com condições edafoclimáticas distintas, as plantas devem ter uma série de características fisiológicas e morfológicas para aumentar a tolerância a essas tensões abióticas (RAMIRO et al., 2016).

A temperatura é um dos fatores que afeta a eficiência fotossintética da cana-de-açúcar, podendo ser considerada tanto um fator limitante, como também estimulante dos processos fisiológicos da planta (SHEN et al., 2004). A temperatura ideal para as plantas do tipo C4, como é o caso da cana-de-açúcar, alcancem o maior potencial produtivo é de 30°C aproximadamente, 10°C maior do que a temperatura ideal para as plantas C3 (LONG, 1998). Trabalhos realizados por Du et al. (1999) demonstraram que a taxa fotossintética de plantas de cana-de-açúcar desenvolvidas em 10°C tiveram uma redução de 20% quando comparada as plantas desenvolvidas em 30°C.

O estresse promovido por temperaturas elevadas pode ocasionar inúmeras alterações bioquímicas e metabólicas as células incluindo: inativação enzimática em diversas vias metabólicas, redução da atividade fotossintética no cloroplasto e diminuição da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias (VIERLING; NGUYEN, 1990).

O processo fotossintético ocorre nos cloroplastos, organelas responsáveis pela absorção de luz. Neles estão presentes pigmentos responsáveis pela atividade do complexo antena (LARCHER, 2006). As clorofilas **a** (Chl *a*) podem ser encontradas em diversos organismos fotossintéticos, é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica (o primeiro estágio do processo fotossintético), enquanto que os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios. Em plantas superiores, algas verdes e algumas bactérias, são encontradas associadas a elas, as clorofilas **b** (Chl *b*). A relação entre clorofilas **a** e **b** podem variar de acordo com a espécie, idade da planta, luminosidade e estresse bióticos e abióticos. Em geral, esta relação encontra-se em torno de 3:1, podendo chegar a 1:1 (ROCA et al., 2016, TAIZ; ZIEGER, 2004). Diferem-se nos substituintes de carbono C-3. Na clorofila *a*, o anel de porfirina contém um grupo metil (-CH<sub>3</sub>) no C-3 e a clorofila *b* (considerada um pigmento acessório) contém um grupo aldeído (-CHO), que substitui o grupo metil-CH<sub>3</sub>. A estabilidade da clorofila *b* deve-se ao efeito atrativo de elétrons de seu grupo aldeído no C-3 (VON ELBE, 2000). A clorofila *b* é convertida em clorofila *a* através de uma enzima chamada clorofila *a* oxigenase, que catalisa a conversão do grupo metil ao grupo aldeído (XU et al., 2001).

A fotossíntese é um dos processos fisiológicos mais sensíveis ao calor (DEMIREVSKA-KEPOVA et al., 2005) principalmente por causa da sensibilidade da membrana do tilacóide, com redução da produção de clorofila (RISTIC et al., 2007). Em contrapartida, a respiração aumenta acentuadamente com a elevação da temperatura (TAIZ;ZEIGER, 2004). O desvio dos valores de temperatura implica em alterações nos diversos processos metabólicos reduzindo a atividade fotossintética o que resulta, principalmente, em perdas qualitativas e quantitativas do produto final e em casos extremos pode culminar com a morte prematura das plantas (BITA, 2013; PORCH, 2013; SINGH, 2011).

A fluorescência das clorofilas é uma ferramenta importante na determinação de possíveis mudanças nos fotossistemas das plantas (LARCHER, 2006; BERGER et al., 2007; CAMPOSTRINI, 2010; SILVEIRA, 2016). Pesquisas acerca da fotossíntese, fisiologia vegetal, fenotipagem planta, sensoriamento remoto de plantas, e outras áreas de pesquisa estão relacionadas com a fotossíntese (MOYA; CEROVIC,2004; BAKER,2008; MERONI et al. 2009; MURCHIE; LAWSON,2013; GUANTER et al., 2014; KALAJI et al., 2014, 2016, 2017; HUMPLIK et al., 2015; MISHRA et al., 2016).

A fluorescência da clorofila **a** têm sido utilizadas para a avaliação do efeito de fatores ambientais sobre o metabolismo fotossintético, bem como para medir o grau de tolerância das plantas frente aos estresses abióticos (STIRBET; GOVINDJEE, 2011).

A utilização de parâmetros da fluorescência da clorofila tem sido difundida, principalmente no estudo da capacidade fotossintética das plantas. Tal técnica tem permitido maior conhecimento dos processos fotoquímicos e não-fotoquímicos que ocorrem na membrana dos tilacóides, além de possibilitar o estudo de características relacionadas à capacidade de absorção e transferência da energia luminosa na cadeia de transporte de elétrons (KRAUSE; WEIS, 1991).

O teste de fluorescência transiente polifásico (OJIP) reflete a cinética da redução do fotossistema II (PSII), quinona A (QA), plastoquinona (PQ) e demais aceptores intersistemas e do fotossistema I (PSI) (MALASPINA; MODENESI; GIORDANI, 2018).

Para a determinação da fluorescência da clorofila **a** são utilizados aparelhos como o fluorímetro de pulso modulado. O uso deste aparelho permite a compreensão do funcionamento dos fotossistemas, assim como das respostas fisiológicas das plantas, mediante as variações do ambiente (KALAJI; GUO, 2008; DĄBROWSKI et al., 2016). Esta determinação ocorre por meio de um método não destrutivo, que consiste na emissão de um pulso de luz não saturante sobre a superfície da lâmina foliar previamente adaptada ao escuro (BAKER; ROSENQVIST, 2004; LARCHER, 2006; BERGER, et al., 2007; CAMPOSTRINI, 2010; MURCHIE; LAWSON, 2013). Com este teste é possível observar a fluorescência inicial ( $F_0$ ),

que corresponde ao valor inicial de intensidade da fluorescência confiável após início da iluminação actínica, neste momento todos os centros de reação do PSII estão abertos (oxidados) (MALASPINA; MODENESI; GIORDANI, 2018). Em plantas sob estresse os valores de  $F_0$  se mostram aumentados quando comparados a plantas não afetadas, isso foi verificado, por exemplo, em folhas de *Ageratina adenofora* aquecidas por 15 minutos entre 40-50°C (CHEN et al., 2016). O aumento da  $F_0$  corresponde a um possível dano funcional no centro de reação do PSII, sinalizando a perda de energia quando o P680 se encontra oxidado (OLIVEIRA et al., 2002).

A fluorescência máxima ( $F_m = F_p$  na curva *OJIP*) corresponde ao valor máximo de fluorescência obtido mediante a aplicação de um pulso de luz contínuo e representa a perda de energia pelos elétrons para alcançar o primeiro receptor estável (Qa) (KALAJI; GUO, 2008; VIEIRA et al., 2010).

Por meio da diferença entre a  $F_m$  e a  $F_0$  consegue-se estimar a fluorescência variável ( $F_v$ ), a qual é utilizada para obtenção da eficiência quântica do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ). Em geral, a  $F_v/F_m$  relaciona-se com o aproveitamento de energia destinada às reações que ocorrem no PSII, sendo bastante utilizado como indicação para o desempenho fotossintético e podendo atingir valores máximos de 0,85 (SILVA et al., 2010; KALAJI et al., 2014). A maior eficiência do PS II pode ser observada com o incremento no valor de  $F_v/F_m$  (LI et al., 2015; HARZATI et al., 2016). No entanto, valores de  $F_v/F_m$  inferiores a 0,75 podem indicar a ocorrência de algum dano fotoinibitório (GONÇALVES et al., 2010; SILVEIRA et al., 2017).

Em condições tropicais, o estresse provocado pelas altas temperaturas tem merecido destaque, principalmente devido aos efeitos deletérios em processos vitais para o desenvolvimento vegetal e, conseqüentemente, diminuição dos níveis de produtividade (ARAÚJO et al., 1998).

As plantas crescem e se desenvolvem ajustando sua fisiologia às mudanças em seu ambiente. Mudanças no ambiente abiótico ocorrem ao longo dos anos, estações e dias, mas também em minutos e até segundos. Neste ambiente em constante mudança, as plantas podem ajustar sua estrutura e funcionar rapidamente para otimizar o crescimento e a reprodução. As respostas das plantas à seca reiterada (isto é, ciclos repetidos de seca) diferem daquelas para incidências únicas de seca; na verdade, na natureza, as plantas são geralmente expostas a ciclos repetidos de seca que diferem em duração e intensidade.

Existe um interesse crescente em compreender melhor os mecanismos de resposta da planta à seca reiterada devido, pelo menos em parte, à descoberta de alterações epigenômicas que desencadeiam a memória de estresse hídrico em plantas. Além das mudanças epigenômicas, há, no entanto, outros aspectos que devem ser considerados no estudo das respostas das plantas

à seca reiterada: de mudanças em outras abordagens “ômicas” (transcriptômica, proteômica e metabolômica) e a mudanças na estrutura da planta (FLETA SORIANO et al., 2016).

A relativa resiliência da cana-de-açúcar às tensões abióticas parece ser devido a boa capacidade compensatória, fotossíntese C<sub>4</sub>, temperatura ótima para a maioria das atividades fisiológicas (mas para acumulação de açúcar), maior eficiência no uso da água, uso de complementos genéticos de *S.spontaneum* conferindo tolerância a vários estresses abióticos (em variedades reprodutoras) e capacidade de manejo de carbono. Além disso, algumas das intervenções fisiológicas como a indução de resistência à seca, profundidade do sistema radicular, idade, salinidade/alcalinidade rizosféricaetc, também contribuem para sua tolerância ao estresse(ZANDALINAS et al., 2018).

Do ponto de vista fisiológico, estresse é a condição causada por fatores que tendem a alterar um equilíbrio (NILSEN; ORCUTT, 1996). Nesse sentido, o conceito de eu-estresse é atribuído àquela condição de estresse suave e estimulante que ativa o metabolismo celular e incrementa a atividade fisiológica da planta. É um fator positivo que impulsiona o crescimento vegetal. Por outro lado, o dis-estresse é gerado por qualquer condição desfavorável, seja pela intensidade ou duração, que afeta negativamente o metabolismo, crescimento e desenvolvimento vegetal (LICHTENTHALER, 2004).

No entanto, não se sabe se a tolerância ao frio e congelamento evoluído antes, coincidentemente com ou durante a evolução. O que está claro é que Poaceae ocupam temperaturas muito mais frias que outras espécies (EDWARDS; SMITH, 2010), sugerindo uma mudança na adaptação climática em algum momento(MAGNUS, 2013).

O estresse por altas temperaturas afeta negativamente vários caracteres das plantas, com ênfase para os caracteres dias entre a emergência e o florescimento, e dias entre a emergência e a maturação (YILDIRIM; BAHAR, 2010). Em milho, pode provocar a esterilidade das flores durante a antese, afetando o número de grãos por espiga (FAROOQ et al., 2011), pode até provocar a esterilidade completa (NEILSON et al., 2010).

A senescência precoce da folha tem sido considerada como uma expressão da sensibilidade a altas temperaturas, reduzindo a área foliar ativa implicando em redução da fotossíntese e, conseqüentemente, redução da produção de grãos (SOUZA, 1999).

Em qualquer lugar onde as plantas cresçam, existirão diversos fatores de estresses que limitarão, em maior ou menor grau, o seu desenvolvimento. O estresse provoca alterações funcionais e prejudica as condições ótimas para a vida vegetal. Os organismos respondem de forma diferente aos diversos estresses, sendo que muitas vezes seus sintomas podem não ser visíveis de imediato (LARCHER, 2006). Os estresses ambientais podem se dividir em abióticos, cujos fatores edafoclimáticos representam uma grande porção, e estresses bióticos,

causados por organismos “vivos”, como as plantas, através da competição por recursos vitais, alelopatia e parasitismo; os micro-organismos, pela ação dos fungos, bactérias e vírus; animais, através da herbivoria ou pisoteio; e o homem, através da poluição, da compactação do solo, uso de agroquímicos, fogo etc. (LARCHER, 2006).

Em condições de campo, as culturas são submetidas rotineiramente a um número de fatores de estresse abióticos simultaneamente. Em estudos revela-se que a resposta de plantas para uma combinação de diferentes estresses abióticos é único; e não pode ser diretamente extrapolado para simplesmente estudar cada uma das diferentes tensões aplicadas individualmente. Esses estudos também identificaram transcritos, combinações de metabólitos e proteínas, e respostas fisiológicas que são exclusivas para combinações específicas de estresse, destacando importância do estudo da combinação de estresse abiótico em plantas (ZANDALINAS et al., 2018).

## 2.2 Estresse abiótico e expressão gênica

Os primeiros passos para o processo de aclimação é a percepção do estresse e o posterior “disparo” das respostas fisiológicas e moleculares (KNIGHT; KNIGHT, 2001). As respostas fisiológicas, de um modo geral, incluem o fechamento estomático, redução da fotossíntese, redução na absorção de nutrientes, produção de compostos específicos etc. As respostas moleculares, por sua vez, envolvem a alteração de genes específicos, bem como catabolismo e anabolismo de proteínas (GUY, 1990; HOLMBERG; BÜLOW, 1998).

Foi sugerido, portanto, que a indução destas proteínas ocorra por meio da resposta as mudanças específicas, não sendo comum para todos os estresses (VIERLING, 1991). Um grupo particular de proteínas denominado proteínas de choque térmico (*HeatShockProteins- HSPs*) tem merecido destaque, principalmente por constituírem uma resposta comum nos mais distintos organismos, sendo conservada ao longo de toda a escala evolutiva. Dessa maneira, esta resposta pode ser observada, desde arqueobactérias, eubactérias (LINDQUIST; GRAIG 1988), fungos, plantas, animais (VIERLING, 1991) inclusive seres humanos (RIZZO et al., 1998) onde podem estar relacionadas com a resposta do sistema imune.

Algumas espécies quando submetidas ao estresse térmico expressam redução na síntese de proteínas (BLUMENTHAL et al., 1994), afetando a inibição e degradação das mesmas, porém algumas proteínas, HSPs (proteínas de choque térmico), são induzidas, podendo muitas vezes melhorar o seu desempenho quando expostas as altas temperaturas (XU et al., 2011). Os mesmos autores apresentam algumas *HSPs* associadas com tolerância ao calor em trigo. Essas proteínas, juntamente com seus fatores de transcrição de choque térmico (HSFs), estão envolvidas em mecanismos moleculares de tolerância a altas temperaturas, agindo de forma

molecular pela manutenção da homeostase do dobramento de proteínas. Em função dessas propriedades, as proteínas são mantidas intactas, sem modificações em suas estruturas e vias metabólicas.

O termo “moléculas chaperonas” tem sido utilizado para designar um grupo específico de proteínas que interagem com proteínas desnaturadas com objetivos diversos, tais como: facilitar a conformação correta de polipeptídios recém sintetizados, promover a formação e manutenção de conformações protéicas específicas, modular a atividade protéica, facilitar o transporte protéico através das membranas mantendo o substrato na forma desnaturada, prevenir agregação ou desnaturação protéica, além de promover a sua renaturação. Estas últimas funções são particularmente importantes para as células submetidas a altas temperaturas (BOSTON et al., 1996), sendo que muitas evidências sugerem estas funções para as *HSPs*.

Todavia, mesmo em espécies tropicais e subtropicais, a tolerância pode aumentar quando as plantas são previamente aclimatadas, ou seja, expostas por um período determinado a temperaturas (na faixa de 2°C a 15°C), uma vez que esse processo desencadeia mudanças na expressão de genes específicos, os quais promovem alterações metabólicas nas células (GUY, 1990; THOMASHOW, 1998). Entretanto, nestas espécies, os mecanismos moleculares de percepção, sinalização molecular e modificação do metabolismo em resposta ao estresse são pouco estudados. Numerosas linhas de evidências apontam a síntese de *HSPs* como um componente importante na aquisição de termo-tolerância e termo-adaptação (LIN et al., 1984; HUSS; LAROSA et al., 1987; SIVARAMAKRISHNAN et al., 1990).

Outras moléculas sinalizadoras secundárias, tais como o ácido abscísico (ABA) e o etileno, desempenham um importante papel na habilidade de espécies vegetais em tolerar estresses abióticos, incluindo o estresse por baixas temperaturas (SKRIVER; MUNDY, 1990).

Estudos realizados com soja revelaram que existe uma correlação entre a manutenção da fosforilação oxidativa e a presença de *HSPs* entre 15 e 30 kDa, mesmo quando mitocôndrias são submetidas a 42,5°C (CHOU et al., 1989). Em plantas C4 (sorgo, milho e *Urochloapanicoides* L.) a inibição da síntese protéica pelo tratamento com ciclohexamida, durante o choque térmico, promove uma diminuição drástica na eficiência da fotossíntese, sugerindo que a síntese de *HSP* tem um papel de proteção no cloroplasto (CLARKE; CRITCHLEY, 1994).

As vias metabólicas que são essenciais para a aquisição de tolerância ao estresse hídrico levam, invariavelmente, à síntese de metabólitos osmoticamente ativos e proteínas específicas que atuam no controle do fluxo de água, na remoção de radicais livres e renaturação de proteínas (BOLNET; JENSEN, 1996).

### 2.3 Estresse biótico e o genero *Leifsonia xyli*

No caso das doenças, a indução de defesa pela planta durante o contato com o patógeno é dispendiosa, aumentando sua demanda por fotoassimilados, o que provoca alterações no metabolismo primário. Além disso, o patógeno procura manipular o metabolismo dos carboidratos da planta para a sua própria necessidade. Essa retirada de nutrientes pelo patógeno aumenta ainda mais a demanda da planta por assimilados. Outro aspecto importante está relacionado, em alguns casos, ao desenvolvimento de áreas cloróticas e necróticas decorrentes da infecção, com consequente redução de área fotossinteticamente ativa (BERGER; SINHA; ROITSCH, 2007).

Bactérias fitopatogênicas são responsáveis por importantes doenças de cultivos econômicos e podem ser disseminadas por insetos, entre outros agentes. Dois tipos de relação patógeno-vetor podem ser identificados, a associação íntima e a contaminação acidental. Insetos podem disseminar bactérias fitopatogênicas à curta ou longa distâncias, dependendo do tipo de inseto, da associação inseto–fitobactéria e das condições ambientais, em particular o vento (AGRIOS, 2005).

Uma importante bactéria que afeta a cana-de-açúcar é *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), agente causal do raquitismo-da-soqueira (RSD), foi primeiramente descrito em Queensland na Austrália, em 1944. Por muitos anos, acreditou-se que a doença estava associada a um vírus, devido à dificuldade em conseguir isolar o agente causal (MATSUOKA, 1972; JAMES, 1996). É uma bactéria aeróbia, imóvel e gram-positiva, apresentando colônias circulares com margens inteiras, convexas e não-pigmentadas. É extremamente fastidiosa em seus requerimentos nutricionais e o seu isolamento é difícil mesmo em meio seletivo específico (TOKESHI; RAGO, 2005). O número de genes de patogenicidade é baixo se comparado a outras bactérias fitopatogênicas (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

A sintomatologia da RSD ainda não foi claramente compreendida. Em geral, nas touceiras doentes observa-se colmos mais finos e internódios (região entre os nós) curtos, o que causa redução da produtividade (TIWARI et al., 2012). 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).

Em 1989, a doença foi relatada em 61 países (TOKESHI, 1997). Na China, Estados Unidos, África do Sul, Austrália e Brasil foram relatadas redução da biomassa de 60% (LI et al., 2013), 33% (GRISHAM, 1991), 41% (BAILEY;BAILEY, 1995), 37% (YOUNG et al., 2006) e 26% (GAGLIARDI; CAMARGO, 2009), respectivamente. No Brasil, ao ser descrita, já estava disseminada por todas as regiões canavieiras.

Dentre os anos de 1975 a 2005, a doença causou perdas estimadas em mais de dois bilhões de dólares, só no estado de São Paulo (TOKESHI;RAGO, 2005). Em 2015, estudou-se os parâmetros ecofisiológicos das variedades Co 997 e RB 86-7515 inoculadas com Lxx, elas sofreram declínio de 25% e 16%, respectivamente, da taxa fotossintética líquida, quando comparadas as suas respectivas correspondentes não inoculadas. Além disto, a variedade RB 92-579, apresentou redução de 24% do número de perfilhos por metro linear quando inoculada, evidenciando a gravidade e a intensidade dos riscos causados pela doença ao se instalar em um canavial (SILVA, 2015). Pesquisadores consideram o raquitismo da soqueira a mais importante doença da cana-de-açúcar em todo o mundo, responsável por perdas severas na produção e nos atributos de qualidade (TIWARI et al., 2012).

Embora Lxx possa experimentalmente colonizar várias espécies diferentes (GILLASPIE;TEAKLE, 1989), é geralmente aceito que o seu único hospedeiro natural é a cana-de-açúcar. Evidências suportam a possibilidade de que Lxx é um endófito que foi transmitida para variedades comerciais de cana após hibridação interespecífica artificial com um progenitor selvagem, *S.spontaneum* e foi disseminada durante a criação de cana moderna. No Brasil, pesquisas detectaram o patógeno em 23 - 67% dos campos amostradas (PONTE et al., 2010; URASHIMA;MARCHETTI, 2013). Surpreendentemente, no entanto, existe poucos estudos de hospedeiros alternativos naturais de Lxx (MILLS et al., 2001;ZAVAGLIA et al., 2016).

Assim, investigações adicionais sobre vetores alternativos de Lxx são necessários uma vez que podem trazer novos *insights* sobre a biologia deste patógeno que são relevantes para a gestão de RSD.Diferente de outras bactérias restritas ao xilema, como *Xylellafastidiosa* e *Xanthomonasalbilineans*, que possuem uma ampla gama de plantas hospedeiras (YORINORI et al., 2003; TOKESHI; RAGO, 2005).Um estudo relacionado feito com 15 espécies vegetais cultivadas e de 12 espécies de gramíneas coletadas a campo, nos resultados verifica-se a ausência de infecção por Lxx em todos os casos, confirmando que seus hospedeiros muito provavelmente se restringem a espécies do gênero *Saccharum* (ZAVAGLIA, 2016).

Em estudos com 18 espécies de gramíneas da família Poaceae, das quais foram isoladas bactérias sorologicamente e morfológicamente semelhantes a Lxx., apesar da semelhança, concluiu-se que essas bactérias não se tratavam de Lxx (MILLS et al., 2001).

A Clorose Variegada dos Citros (CVC), conhecida como “amarelinho”, é uma doença causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que atinge todas as variedades comerciais de citros. Restrita ao xilema (tecido condutor) da planta. A bactéria é transmitida para a planta por doze espécies de cigarrinhas, que são responsáveis pela disseminação da CVC em todas as regiões citrícolas do país. No cafeeiro, Homópteros (cigarrinhas) que se alimentam do xilema das plantas são vetores responsável por diversas doenças em plantas cultivadas como a requeima, agente causou a bactéria *X. fastidiosa*.

Vários ensaios podem ser realizados para ser determinada a capacidade do inseto em atuar como agente de disseminação e inoculação. Uma das possibilidades é colocar os insetos para se alimentar em plantas doentes por 24 horas; após esse período imobilizar os insetos e analisar os tecidos das plantas onde os insetos se alimentaram e das estruturas do inseto (aparelho bucal, patas, ovos, hemolinfa, fezes, produtos de regurgitação e macerado do aparelho digestivo) pode ser realizada por isolamento e inoculação em hospedeiro suscetível (RAND;CASH, 1920); ELISA (*EnzymeLinkedImmunosorbentAssay*) com algumas restrições (YONCE;CHANG, 1987) e PCR (CHRISTIE et al., 1991; ELAD et al., 1995; HILDEBRAND et al., 2000).

O gênero *Leifsonia* pertence ao filo Actinobacteria, ordem Actinomycetales e a família Microbacteriaceae (EVTUSHENKO et al., 2000); compreende quatorze espécies e duas subespécies, cujas ocorrências foram relatadas em plantas, amostras de solo, líquens e até em amostras de água destilada. A grande maioria das espécies é mesófila, no entanto, algumas são psicrófilas, provenientes de locais com baixas temperaturas como a Antártica e o Himalaia (DAVIS et al., 1984). É uma bactéria aeróbia, imóvel e gram-positiva, apresentando colônias circulares com margens inteiras, convexas e não-pigmentadas. É uma bactéria corineforme, mede 0,25 a 0,5 µm por 1,4 µm e apresenta colônias circulares com margens inteiras, convexas e não-pigmentadas, é extremamente fastidiosa em seus requerimentos nutricionais e o seu isolamento é difícil, mesmo em meio seletivo específico (TOKESHI; RAGO, 2005). O número de genes de patogenicidade é baixo se comparado a outras bactérias fitopatogênicas (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Entre estes estão genes envolvidos na síntese de pectinase, celulase e lisozima. O sequenciamento do genoma de *Lxx* trouxe informações relevantes sobre a presença de um *operon* carotenóide (genes *lctB*, *crtYe*, *crtB*, *crtI* e *crtE*) e uma enzima desaturase (*desA*) que poderiam estar envolvidos na síntese de um análogo ao fitormônio ácido abscísico (ABA) (DIAS, 2016).

A doença causa crescimento retardado das touceiras e colmos menores, tornando o canavial desuniforme. Acredita-se que a bactéria é capaz de secretar um produto com ação similar ao ABA, entretanto, ainda não se conhece a composição desse extrato (CASTRO, 2012). Ele é um inibidor do crescimento em plantas e poderia ser o responsável pelo principal sintoma

da doença, o raquitismo (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

Acreditava-se que a bactéria *Lxx* colonizava apenas internamente os vasos do xilema, mas, além disso, elas foram encontradas em um novo nicho dentro do hospedeiro, o parênquima das células da folha (QUECINE et al., 2016). A bactéria prejudica os processos metabólicos normais envolvidos no crescimento das canas infectadas. As três primeiras fases da planta, exigem elevado atendimento hídrico e térmico a fim de permitir bom desenvolvimento. Entretanto, é no período de restrição hídrica, quando ocorre a maturação e o enriquecimento do colmo com sacarose (SILVA et al., 2012; RODRIGUES, 1995; SILVA et al., 2014a), que os sintomas da doença são potencializados.

Não havendo, até o momento, produtos químicos registrados para seu controle nem cultivares imunes e por ser facilmente transmitida por meios dos equipamentos utilizado no manejo da cana, a desinfestação dos equipamentos 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). Todos os entraves no controle e diagnóstico da doença têm estimulado pesquisadores a buscarem novos métodos que permitam mitigar os problemas e novas formas de classificar os genótipos quanto a tolerância/susceptibilidade ao RDS (GAGLIARDI, 2008; URASHIMA, 2013).

A bactéria *L. xylí* transmitida por estacas ou colmos provenientes de plantas doentes. Este mecanismo de disseminação tem sido eficaz, pois havendo cultivo com material contaminado, a doença será facilmente disseminada.

Quando o produtor precisa realizar a reforma do canavial, as mudas para este plantio, devem estar isentas de raquitismo, pois isso contribuirá decisivamente para a longevidade do futuro canavial. Para se assegurar sobre a ausência de contaminação, o produtor pode utilizar MPB (Muda Pré-Brotada), origem de meristemas com fitossanidade garantida, ou de tratamento térmico. Quando a origem das mudas não for por MPB, o produtor tem a opção de fazer o exame laboratorial deste material para detectar a presença do raquitismo. Ou ainda utilizar o teste para as mudas que serão multiplicadas no sistema MPB, garantindo um material isento da doença (SOCICANA, 2017).

Diagnósticos da doença são baseados na detecção da bactéria por inúmeras técnicas, incluindo a microscopia de contraste de fase (STEINDL, 1976), sorologia (GILLASPIE, 1978) e mais recentemente, um conjunto de métodos moleculares altamente sensíveis têm sido desenvolvidos para a detecção de *L. xylisubsp. xylí*, incluindo a reação em cadeia de polimerase convencional (PCR) (FEGAN et al, 1998; PAN et al, 1998; TAYLOR et al., 2003), nested PCR (FARAHANI et al, 2015.), PCR quantitativa (qPCR) (CARVALHO et al, 2016; PELOSI et al., 2013) e mediadas por ciclo de amplificação isotérmica (LAMP) (GHAI et al., 2014; LIU et al.,

2013). No entanto, estes não parecem ter sido amplamente utilizados para a triagem comercial, embora tenha apresentado uma alta sensibilidade na detecção do patógeno. A comparação de três metodologias de diagnose (microscopia de contraste de fase, *dot-blot* e PCR) para a detecção de Lxxe sua utilização em análises rotineiras, e demonstraram que a técnica de diagnose por PCR é bastante sensível, detectando o nível de  $10^1$  células  $\text{mL}^{-1}$ . A técnica de PCR apresenta muitas vantagens para diagnose porque além de permitir uma rápida e fácil avaliação das amostras, ainda permite uma inspeção visual direta dos produtos amplificados.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J.L.S. de; MARGIS-PINHEIRO, M.; RUMJANEK, N.G. Proteínas de Choque Térmico e Tolerância a Altas Temperaturas em Plantas. **Embrapa-CNPAB. Documentos, 80**. 27p,1998.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.

Bailey, T.C.; Gatrell, A. C. – **Interactive spatial data analysis** 1 ed. New York: Longman Scientific & Technical, v.1, 416 p.1995.

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review Plant Biology**, 59, 89-113, 2008.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 403, p. 1607-1621, 2004.

BARBOSA, M.P.H.; SILVEIRA, L.C.I. Metodologias de seleção, progressos e mudanças no programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar da Universidade Federal de Viçosa. **STAB**, v.18, p.30-32, 2000.

BERGER, S., SINHA, A. K., ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 15-16, p. 4019-4026, 2007.

BLUM, A.; SINMENA, B. Wheat seedendosperm utilization under heat stress and its relation to thermotolerance in the autotrophic plant. **Field Crops Research**, v.37, n.3, p.185-191, 1994.

BOLNET, H., JENSEN, S. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**, 14, p. 89-97, 1996.

BAUER FILHO, O. A. P. **Avaliação do material vegetal residual da colheita mecanizada da cana crua, em diferentes sistemas de preparo de solo**. Jaboticabal, 2000. 50 p. (Trabalho de graduação apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal).

BULOW J, MULLER-LUCKS A, KAI L, BERNHARD F, BEITZ E. Functional characterization of a novel aquaporin from *Dictyostelium discoideum* amoebae implies a unique gating mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v287: p 7487-7494. 2012.

BLOOMBERG. Wood pellet production to rise by multiples through 2020, **lobby group says**, 2010. <http://www.bloomberg.com/news/2010-06-30/wood-pellet-production-to-rise-by-multiples-through-2020-lobby-group-says.html>. June 30 (August 19, 2010).

CAMPOSTRINI, E. **Fluorescência da clorofila A: considerações teóricas e aplicações práticas**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <[http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/CENTRO\\_CCTA\\_1629\\_1112121492.pdf](http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/CENTRO_CCTA_1629_1112121492.pdf)>. Acesso em: 09 set. 2017.

CARVALHO, A. L. S. et al. Production and quality of Mombaça grass forage under different residual heights. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 39, n. 2, p. 143-148, 2017.

CASTRO, C. P., LORENA V. M. B., GOMES Y. M. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista Patologia Tropical**, v.43, p.331-333, 2008.

CHEN, L.Z.; WANG, W.Q.; LIN, P. Photosynthetic and physiological responses on Kandeliacandel L.Druce seedlings to duration of tidal immersion in artificial seawater. **Environmental and Experimental Botany**, v.54, p.256-266, 2005.

CHOU, C.C.; IQBAL, K.; MIN, Y. G.; GAO, D.W.; DUFFAUT, E. SAT process as a replacement for sulfitation in mill white sugar production. **International Sugar Journal**, v. 108, n. 1289, p. 247-253, 2006.

CHRISTIE, J.R., EDWARDSON R.G. The potyvirus group. Volumes 1-4, Florida **Agricultural Experiment Station**, Monograph 16, 1991.

CLARKE, A. K.; CRITCHLEY, C. Characterisation of chloroplast heat shock proteins in young leaves of C4 monocotyledons. **Physiologia Plantarum**, v. 92, n.1, p. 118-130, 1994.

D'HONT, A. Cytogenetics and Genome Research, **Genome**, v. 109, p. 27-33, 2005.

DA SILVA, P.S.O.; JUNIOR, L.F.G.O.; GONZAGA, M.I.S.; SENA, E.D.O.A.; DOS SANTOS MACIEL, L.B.; FIAES, M.P.; MATTOS, E.C.; CARNELOSSI, M.A.G. Effects of calcium particle films and natural shading on ecophysiological parameters of conilon coffee. **Scientia Horticulturae**, v. 245, p. 171-177, 2019

DĄBROWSKI, P., BACZEWSKA, A. H., PAWLUŚKIEWICZ, B., PAUNOV, M., ALEXANTROV, V., GOLTSEV, V., KALAJI, M. H. Prompt chlorophyll a fluorescence as a rapid tool for diagnostic changes in PSII structure inhibited by salt stress in Perennial ryegrass. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 157, p. 22-31, 2016.

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

DAVIS, M. J.; GILLASPIE JR., A. G.; VIDAVER, A. K.; HARRIS, R. W. *Clavibacter*: A DAVIS, M. J.; PURCEL, A. H.; THOMSON, S. V. Isolation media for the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v.70, p.425-429, 1980.

DEMIREVSKA-KEPOVA, K., HOLZER, R., SIMOVA-STOILOVA, L., FELLER, U. Heat stress effects on ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco binding protein and Rubisco activase in wheat leaves. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 4, p. 521-525, 2005.

DIAS, D. L. S. **Características produtivas e fisiológicas das cultivares Java e Xaraés submetidas ou não à adubação nitrogenada e ao consórcio**. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga. 100p., 2017.

EDWARDS, D. L.; CORMAN, J.; CHILDERS, M.; ELSER, J. J. Sustainability Challenges of Phosphorus and Food: Solutions from Closing the Human Phosphorus Cycle. **BioScience**, v. 61, p. 117-124, 2011.

ELAD, Y. Mycoparasitism. In: KOHMOTO, K.; SINGH, U.S.; SINGH, R P. Pathogenesis and host specificity in Plant Diseases. v.2. (eds). **Elsevier Science**, p.289-307, 1995.

EVTUSHENKO, L. I.; DOROFEEVA, L.V.; SUBBOTIN, S. A.; COLE, J. R.; TIEDIE, J. M. *Leifsoniapoae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsoniaaquatica*(ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacterxyli* Davis *et al.* 1984 with two subspecies as *Leifsoniaxyli*(Davis *et al.* 1984) gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, v. 50, p. 371-380, 2000

FARAHANI, D. L.; SHANER, H. J.; BUCHLEITER, G. W. Predicting and Mapping Herbicide-Soil Partition Coefficients for EPTC, Metribuzin, and Metolachlor on Three Colorado Fields. **Weed Science**, v. 56, n. 1, p. 133–139, 2008.

FAROOQ, M.; FLOWER, K. C.; JABRAN, K.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K. H. M. Crop yield and weed management in rainfed conservation agriculture. **Soil and Tillage Research**, v. 117, p. 172–183, 2011.

FEGAN, M.; CROFT, B. J.; TEAKLE, D. S. et al. Sensitive and specific detection of *Clavibacterxyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. **Plant Pathology**, v.4, n.47, p.495-504, 1998.

FIDELIS, R.R. **Metodologias de seleção para eficiência quanto ao uso e resposta à aplicação do nitrogênio em germoplasma de milho**. 2003. 37 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2003.

FLETA-SORIANO, E.; MUNNÉ-BOSCH, S. Stress memory and the inevitable effects of drought: a physiological perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 143, 2016.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual2010**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2010. 527p.

FOWLER, S.; THOMASHOW, M. F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. **The Plant Cell**, v. 14, n. 8, p. 1675-1690, 2002.

GAGLIARDI, P. R. **Avaliação da resistência à *Leifsoniaxyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-da-soqueira (RSD), em variedades comerciais de cana-de-açúcar**. 2008. 119 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

GAGLIARDI, P. R.; PACE, F. A.; FERREIRA, A. J. Comparação de três métodos de diagnose para a detecção da *Leifsoniaxyli* subsp. *xyli*, agente casual do raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia. 2006, Salvador. **Fitopatologia Brasileira**, p 337.

GAGLIARDI, P. R.; CAMARGO, L. E. A. Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1222-1226, 2009.

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.

GHAI, M., SINGH, V., MARTIN, L. A., MCFARLANE, S. A., ANTWERPEN, T., & RUTHERFORD, R. S. A rapid and visual loop-mediated isothermal amplification assay to detect *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* targeting a transposase gene. **Letters in applied microbiology**, v. 59, n. 6, p. 648-657, 2014.

GILLASPIE, A. G. Ratoon stunting disease of sugarcane: serology. **Phytopathology**, v.68, p.529-532, 1978.

GILLASPIE JR., A. G.; DAVIS, R. E.; WORLEY, J. F. Diagnosis of ratoon stunting disease based on the presence of a specific microorganism. **PlantDiseaseReporter**, v. 57, n. 12, p. 987 - 990, 1973.

GONÇALVES, F. M. **Evapotranspiração e coeficientes de cultivo da cana-de-açúcar irrigada por gotejamento subsuperficial.**, 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

GRISHAM, M. P. Effect of ratoon stunting disease on yield sugarcane grown in multiple three years plantings. **Phytopathology**, v. 81, n 3, p. 337-340, 1991.

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

GRIVET, L., GLASZMANN, J. C., ARRUDA, P. Sequence polymorphism from EST data in sugarcane: a fine analysis of 6-phosphogluconate dehydrogenase genes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. 1-4, 161-167, 2001.

GUANTER, L., ZHANG, Y., JUNG, M., JOINER, J., VOIGT, M., BERRY, J. A., ... & MORAN, M. S. Global and time-resolved monitoring of crop photosynthesis with chlorophyll fluorescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 14, p. E1327-E1333, 2014.

GUY, B.T.; DICKINSON, W.T. & RUDRA, R.P. Hydraulics of sediment-landed sheet flow and the influence of simulated rainfall. **Earth Surface Processes and Landforms.**, v. 15, p.101-118, 1990.

HARRISON, N. A., DAVIS, M. J. Infectivity titrations of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Plant disease**, v.70, n. 6, p. 556-558, 1986.

HARRIS, P.J. & HARTLEY, R.D. Detection of bound ferulic acid in cell walls of Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. **Nature**, v. 259, p. 508-510, 1976.

HAZRATI, S.; TAHMASEBI-SARVESTANE, Z.; MODARRES-SANAVY, S.A.M.; MOKHTASSE-BIDGOLI, A.; NICOLA, S. Effects of water stress and light intensity on chlorophyll fluorescence parameters and pigments of *Aloe vera* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.106, p. 141-148, 2016.

HILDEBRAND, M., DICKLER, E.; GEIDER, K. Occurrence of *Erwinia amylovora* on insects in a fire blight orchard. **Journal of Phytopathology**, v. 148, p. 251–256, 2000.

HUMPLIK, J. F., LAZAR, D., HUSICKOVA, A., AND SPICHAL, L. . Automated phenotyping of plant shoots using imaging methods for analysis of plant stress responses - a review. **Plant Methods**, v. 11, n. 29. P. 97-102,doi: 10.1186/s13007-015-0072-8

IRVINE, J. E. *Saccharum* species as horticultural classes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 186-194, 1999.

KALAJI, H.M., OUKARROUM, A., ALEXANDROV, V., KOUZMANOVA, M., BRESTIC, M., ZIVCAK, M., SAMBORSKA, I.A., CETNER, M.D., ALLAKHVERDIEV, S.I., GOLTSEV, V. Identification on nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements. **Plant Physiology. Biochemistry**, v.37. XXX, p. 1–10, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.029>.

KALAJI, H.M., SCHANSKER, G., BRESTIC, M., BUSSOTTI, F., CALATAYUD, A., FERRONI, L., GOLTSEV, V., GUIDI, L., JAJOO, A., LI, P., LOSCIALE, P., MISHRA, V.K., MISRA, A.N., NEBAUER, S.G., PANCALDI, S., PENELLA, C., POLLASTRINI, M., SURESH, K., TAMBUSSI, E., YANNICCARI, M., ZIVCAK, M., CETNER, M.D., SAMBORSKA, I.A., STIRBET, A., OLSOVSKA, K., KUNDERLIKOVA, K., SHELONZEK, H., RUSINOWSKI, S., BAŁA, W. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. **Photosynthesis Research**, v.132, p. 13–66, 2017.

KALAJI, H.M., BAŁA, W., GEDIGA, K., GOLTSEV, V., SAMBORSKA, I.A., DANKOV, K., KOMPALA, A. Chlorophyll fluorescence as a tool for nutrient status identification in rapeseed plants. **Photosynthesis Research**, v.136, p. 329–343, 2018.

KALAJI, H. M. et al. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. **Photosynthesis research**, v. 122, n. 2, p. 121-158, 2014.

KALAJI, H. M.; GUO, P. Chlorophyll fluorescence: a useful tool in barley plant breeding programs. **Photochemistry Research Progress**, v. 29, p. 439-463, 2008.

VIEIRA, M. C. A.; LIMA, J. F.; BRAGA, N. M. Setor Sucroalcooleiro Brasileiro: Evolução e Perspectivas. **BNDES**, p. 209–245, 2007.

VIEIRA, A. C. P. et al. Proteção da Biotecnologia na Agricultura. **Revista da ABPI**, v. 88, p. 1–21, 2007.

VIEIRA FILHO, J. E. R.; SILVEIRA, J. M. F. J. DA. Mudança tecnológica na agricultura: uma revisão crítica da literatura e o papel das economias de aprendizado. **Revista de Economia e Sociologia Rural** [S.l.]: scielo . , 2012

KNIGHT, H., KNIGHT, M. R. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 6, p. 262-267, 2001.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Biology**, v. 42, n. 1, p. 313-349, 1991.

LI, S.; YANG, W.; YANG, T.; CHEN, Y.; NI, W. Effects of cadmium stress on leaf chlorophyll fluorescence and photosynthesis of *Elsholtzia argyi*—a cadmium accumulating plant. **International Journal of Phytoremediation**, v. 17, p. 85-92, 2015.

LI, Y., LIU, C., ZHANG, J., YANG, H., XU, L., WANG, Q., SACK, L., WUA, X., HOUA, J., HE, N. Variation in leaf chlorophyll concentration from tropical to cold-temperate forests: association with gross primary productivity. **Ecological Indicators**, v. 85, p. 383–389, 2018.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, Nova York, v.148, n.22, p.350-382, 1987., 2004

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, n. 1, p. 631-677, 1988.

LIU, D. L.; KINGSTON, G.; BULL, T. A. A new technique for determining the thermal parameters of phenological development in sugarcane, including suboptimum and supra-optimum temperature regimes. **Agricultural and Forest Meteorology**, v.90, p.119-139, 1998.

MAGER, W. H.; DE KRUIJFF, A. J. Stress-induced transcriptional activation. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 59, n. 3, p. 506-531, 1995.

MALASPINA, P.; MODENESI, P.; GIORDANI, P. Physiological response of two varieties of the lichen *Pseudevernia furfuracea* to atmospheric pollution. **Ecological Indicators**, v. 86, p. 27-34, 2018.

MARQUES, T. A.; DA SILVA, W. H. Crescimento vegetativo e maturação em três cultivares de cana-de-açúcar. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 1, p 77-83, 2008.

MATSUOKA, S. Disseminação e controle do raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica** 1: p245-257, 1975

MATSUOKA, S.. Recuperação da produtividade de variedades de cana-de-açúcar pelo tratamento térmico de toletes. **Brasil Açúcar**. Rio de Janeiro.(v5): p 20-24. 1976

MATSUOKA, S. Incidência e efeito do mosaico na cultura da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. IAA/PLANALSUCAR, Coordenadoria Regional Sul, Araras-SP, Bol. Técnico n° 4. 2ª ed. 35 p. 1978

MATSUOKA, S. O controle do carvão da cana-de-açúcar no Brasil. **Saccharum STAB 2** (v5): p 37-43. 1979

MERONI, M. et al. Assessing Steady-state Fluorescence and PRI from Hyperspectral Proximal Sensing as Early Indicators of Plant Stress: The Case of Ozone Exposure. **Sensors**, v. 8, p. 1740-1754, 2008

MISHRA, A. K.; INES, A. V.; DAS, N. N.; KHEDUN, C. P.; SINGH, V. P.; SIVAKUMAR, B.; HANSEN, J. W. Anatomy of a local-scale drought: application of assimilated remote sensing products, crop model, and statistical methods to an agricultural drought study. **Journal of Hydrology**, v. 526, p. 15-29, 2015.

MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; CAMARGO, L.E.; VAN SLUYS, M.A.; KITAJIMA, J.P.;

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

MOYA, I.; CEROVIC, Z. G. Remote sensing of chlorophyll fluorescence: instrumentation and analysis. In: **Chlorophyll a Fluorescence**. Springer, Dordrecht, 2004. p. 429-445.

MURCHIE, E H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 13, p. 3983-3998, 2013.

DAVIS, M. J. et al. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 107-117, 1984.

NILSEN, E. T. et al. Physiology of plants under stress. Abiotic factors. Physiology of plants under stress. **Abiotic factors**, v 3, p 133-140. 1996.

NOVAES, M. R.; AGUIAR, D. A.; RUDORFF, B. F. T. Análise Espacial de Indicadores Sócio-Econômicos na Compreensão do Manejo da Colheita da Cana-de-Açúcar. In: ENCUESTRO DE GEOGRAFOS DE AMERICA LATINA, p.12. 2009.

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**, v. 82, n.3, p. 285-290, 1998.

PRATES, H.T.; LEITE, R.C.; CRAVEIRO, A.A.; OLIVEIRA, A.B. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against Cattle-tick (*Boophilus microplus*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.9, n.5, p.193-197, 1998.

QUECINE RAMIRO, D. A. et al. Expression of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 in transgenic sugarcane confers drought tolerance. **Plant biotechnology journal**, v. 14, n. 9, p. 1826-1837, 2016.

ROGERS, O. S.; BENDICH, A. J. Extraction of DNA from plant tissues. In: GELVIN, S. B.; SCHILPEROORT, R. A. **Plant molecular biology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 73-83.

SHRIVASTAVA, A. K. et al. Sugarcane Crop: Its Tolerance Towards Abiotic Stresses. In: **Abiotic Stress Management for Resilient Agriculture**. Springer, Singapore, p. 375-397, 2017.

SILVA, A.M.P.; ALMEIDA, J.C.S.; SILVA, R.L.; BONO, J.A.M. Benefícios da fertirrigação com vinhaça na melhoria do solo e à **produtividade da cana-de-açúcar**. **Cadernos de Agroecologia**, v.5, n. 1, p. 1-5, 2010.

SILVA, R. V. M. M. et al. Uso de clorofilometro na avaliação da adubação nitrogenada e potássica no capim Tifton 85. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 3, p.828-839, 2011.

SILVA, F.G., DA, DUTRA, W.F., DUTRA, A.F., DE OLIVEIRA, I.M., FILGUEIRAS, L.M.B., DE MELO, A.S. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of eggplant grown under different irrigation depths. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.19, p. 946–952, 2015.

SILVEIRA, M. P. C. **Avaliação dos parâmetros ecofisiológicos e de crescimento em rosa do deserto sob restrição hídrica associada ao filme de partícula de CaCO<sub>3</sub>**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão. 60p., 2016.

SIMON, J.E.; QUINN, J.; MURRAY, R.G. Basil: a source of essential oils. In: JANICK, J.; SIMON, J.E. (eds.). **Advances in new crops**. Portland: Timber Press, 1990. p.484-489.

SKRIVER, K.; MUNDY, J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. **The Plant Cell**, v. 2, n. 6, p. 503, 1990.

STIRBET, A., GOVINDJE, E. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. **Jornal Photochemical Photobiological Biological** v.104, p. 236–257, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Tradução de SANTARÉM, E.R. et al., 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAYLOR, P. W. J.; PETRASOVITS, L. A.; VELDE, R. van der; 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**, v. 32, n. 3, p. 367-375, 2003.

THOMASHOW, E. J.; GILMOUR, S. J.; STOCKINGER, M. F. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. **Proceedings National Academy of Sciences USA**, v. 94, n. 3, p. 1035-1040, 1997.

GONTIA, N.K.; TIWARI, K.N. Development of crop water stress index of wheat crop for scheduling irrigation using infrared thermometry. **Agricultural Water Management**, v.95, p.1.144-1.152, 2008.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F. (Coord.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, cap. 12, p.141-206, 1980.

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: Ceres, v. 2, p. 185-196, 2005.

UNIÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA – UDOP. A queimada dos canaviais. Disponível em: <[http://www.udop.com.br/versao\\_impressao.php?cod=70682](http://www.udop.com.br/versao_impressao.php?cod=70682)> Acesso em 31julho 2007a.

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

URASHIMA, A. S.; MARCHETTI, L. B. L. Incidence and Severity of *Leifsoniaxyli* subsp. *xyli* Infection of Sugarcane in Sao Paulo State, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 161, n. 7, p. 478-484, 2013.

VIERLING, R. A.; NGUYEN, Henry T. Heat-shock protein synthesis and accumulation in diploid wheat. **Crop science**, v. 30, n. 6, p. 1337-1342, 1990.

VOLK, T., BUGBEE, B. Modeling light and temperature effects on leaf emergence in wheat and barley. **Crop Science**, v. 31, n.5, p. 1218-1224, 1991.

WU Q., YONG-BAO P., DINGGANG Z., MICHAEL P. G., SHIWU G., YACHUN S., JINLONG G., LIPING X., YOUXIONG Q. A Comparative Study of Three Detection Techniques for *Leifsoniaxyli* subsp. *xyli*, the Causal Pathogen of Sugarcane Ratoon Stunting Disease. **BioMed Research International**, Article ID 2786458, 11 pages, 2018.

XIONG, L.M.; ZHOU, Z.G. Magnesium influence on plantuptake of phosphorus in a calcareous soil. **Journal of Plant Nutrition**, v.18, p.1251-1261, 1995.

XU, Y.; ZHAN, C.; HUANG, B. Heat shockproteins in association with heat tolerance ingrasses. **International Journal ofProteomics**, v.2011, p.1-11, 2011.

YING FU H., SHENG-REN S., JIN-DA W., KASHIF A., HENG-BO W., RU-KAI C.; SAN-JI G. Rapid and Quantitative Detection of *Leifsoniaxyli* subsp. *xyli* in Sugarcane Stalk Juice Using a Real-Time Fluorescent (TaqMan) PCR Assay. **BioMed Research International**, Article ID 2681816, 8 pages. 2016.

ZANDALINAS, S. I. et al. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiologia plantarum**, v. 162, n. 1, p. 2-12, 2018.

ZAVAGLIA, A. C., CIA, M. C., POPIN, R. V., CAMARGO, L. E. A. No alternative hosts of the sugarcane pathogen *Leifsoniaxyli* subsp. *xyli* were identified among grass and non-grass species using novel PCR primers. **Tropical PlantPathology**, v. 41, p. 336-339, 2016.

#### 4. ARTIGO 1

### ESTRESSE TÉRMICO E EXPRESSÃO GÊNICA EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharumofficinarum*)

Periódico submetido (ou a ser submetido): *ScientiaHorticulturae*

#### RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar parâmetros fisiológicos da cultivar de cana-de-açúcar RB867515 submetida a temperaturas de 40°C, 28°C e 15°C em diferentes tempos de exposição (0, 4,8, 12 e 24 horas). O experimento foi estabelecido em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por 65 dias. Em seguida foram submetidas ao estresse de temperatura. Foram feitas as medidas de clorofila **a** e **b**, e estimada a relação **a/b**, e o total de clorofila nas folhas. As medidas da fluorescência da clorofila foram feitas em folhas localizadas na região mediana da folha. Foram medidos os valores de fluorescência inicial (F0) e máxima (Fm). De posse dessas variáveis foram estimadas as relações: Fv/Fo e a eficiência quântica potencial do fotossistema II (FSII) Fv/Fm. Altas temperaturas afetaram a eficiência fotossintética das plantas de cana-de-açúcar. Para a avaliação da expressão gênica RNAm foi extraído usando os mesmos tipos de folhas usadas na avaliação da fotossíntese. As sequências gênicas empregadas foram desenhadas para *Arabidopsisthaliana* L. para os genes *M6*, *HSHP*, *18S*, *PKABA*, *AIB3* e *PER1*. Expressão variável ocorreu para o gene *18S*, e não houve variação detectável para os demais genes.

**Palavras-chave:** OJIP, clorofila, fluorescência, RNA, cDNA

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the physiological parameters of sugarcane cultivar RB867515 submitted to temperatures of 40 ° C, 28 ° C and 15 ° C at different exposure times (0, 4, 8, 12 and 24 hours). The experiment was established in a completely randomized design with six replicates. The plants were kept in a greenhouse for 65 days. Afterwards they were submitted to temperature stress. Measurements of chlorophyll a and b were made, and the a / b ratio and total chlorophyll in the leaves were estimated. Chlorophyll fluorescence measurements were made on leaves located in the median region of the leaf. The initial (F<sub>0</sub>) and maximum (F<sub>m</sub>) fluorescence values were measured. These variables were estimated: F<sub>v</sub> / F<sub>o</sub> and the potential quantum efficiency of photosystem II (FSII) F<sub>v</sub> / F<sub>m</sub>. High temperatures affected the photosynthetic efficiency of sugarcane plants. For the evaluation of gene expression mRNA was extracted using the same types of leaves used in the evaluation of photosynthesis. The gene sequences employed were designed for *Arabidopsis thaliana* L. for the genes M6, HSHP, 18S, PKABA, AIB3 and PER1. Variable expression occurred for the 18S gene, and there was no detectable variation for the other genes.

**Key-words:** OJIP, chlorophyll, fluorescence, RNA, cDNA.

## 4.1. INTRODUÇÃO

Estudos referentes às relações de estresses abióticos e suas interações nos processos fisiológicos são de fundamental importância para a agricultura. O estresse abiótico tem efeitos em diversos processos fisiológicos das plantas, muitos dos quais retêm mecanismos de adaptação e de produção da cultura (CONDE et al., 2018; KOK; BAL, 2018).

A temperatura é um dos fatores que afetam a eficiência fotossintética da cana-de-açúcar, podendo ser considerada tanto um fator limitante, como também estimulante dos processos fisiológicos da planta (SHEN et al., 2004; SATO et al., 2016). A taxa fotossintética de plantas de cana-de-açúcar desenvolvidas em 10°C tiveram uma redução de 20% quando comparada as plantas desenvolvidas em 30°C (DE MELO; SAGE, 2017). As taxas fotossintéticas do milho em seis temperaturas contribuíram para aumentar as ataxas fotosintéticas a partir de 15°C até a temperatura de 35°C, e a partir desta, houve redução (MASSAD et al., 2007). Muitos desses efeitos refletem mecanismos de resistência das plantas ao ambiente. O ajustamento osmótico é o mecanismo fisiológico mais importante para capacitar as plantas a resistirem aos estresses abióticos (SINGH et al., 2018).

A fotossíntese é um dos processos fisiológicos mais sensíveis ao calor, principalmente por causa da sensibilidade da membrana do tilacóide e da redução da produção de clorofila (RISTIC et al., 2007). Nessas condições há aumento da respiração e com conseqüente redução do ciclo, área foliar, estatura de plantas e produção.

As altas temperaturas também promovem a diminuição da estabilidade das membranas celulares, com isso, há modificação da composição e suas estruturas, podendo levar a perda de íons, inibição da fotossíntese e aumento da respiração. A excessiva fluidez de lipídeos da membrana faz com que as mesmas percam a sua função de manutenção da homeostase celular (COSSANI; REYNOLDS, 2012).

A compreensão e avaliação de mecanismos bioquímicos e fisiológicos em nível celular, molecular e morfológico, junto com os métodos tradicionais de seleção, constituem alternativas para seleção de genótipos tolerantes ao estresse de calor (SOUZA et al., 2011).

Genes de referência são necessários em experimentos que envolvem comparação da expressão do gene alvo devido à variação nos fatores como estresse (biótico ou abiótico), estágio de desenvolvimento e tratamento. A análise da expressão de genes alvo envolve a preparação de RNA mensageiro (mRNA), síntese de cDNA, seguido por PCR em tempo real. Cada uma dessas etapas é propensa a variação na preparação da amostra, quantificação, manuseio dentre outros fatores (PFAFFL, 2004; GUEÑIN et al., 2009). Para superar essa variação, níveis de RNAm são normalizados para referenciar o nível de transcrito do gene na reação após transcrição reversa em cDNA (BUSTIN, 2002). Como existem muitas avaliações

crítica do que define um gene de referência adequado e, como esses genes seriam completamente verificados é importante avaliar a expressão em genótipos (DUNDAS;LING, 2012; KOZERA;RAPACZ, 2013; ROCHA et al., 2015; CHAPMAN;WALDENSTRO, 2015).

A expressão do gene de referência é esperada ser afetada na condição promovida durante o experimento. Portanto, o desafio para qualquer análise de expressão envolve a identificação de um gene de referência adequado para essa condição. Qualquer gene que tenha expressão estável na condição dada pode ser usado como um gene de referência. Alguns exemplos de genes de referência são *HKG* que são genes constitutivos necessários para a manutenção de funções celulares básicas, como celular divisão, crescimento e desenvolvimento, apoptose e processos fisiológicos tais como glicólise, metabolismo etc. *HKG* mais amplamente e tradicionalmente usados atuam como controle interno inclui gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), fator de alongamento-1a (*EF-1 a*), poliubiquitina (*UBQ*), actina (*ACT*),  $\alpha$ -tubulina (*TUB*),  $\beta$ -tubulina (*TUB*), e a subunidade ribossomal 18S, dentre outros (KOZERA;RAPACZ, 2013).

Para a análise de expressão de qualquer gene sob uma nova condição de tratamento, o procedimento é iniciar identificando o gene de referência apropriado, que exibe expressão estável, para esse tratamento. Os níveis de expressão genes-alvo seriam imprecisos e perfis transcricionais alterados seriam exibidos após a normalização se a o gene de referência escolhido é instável (LØVDAL;LILLO, 2009; PETRICCIONE et al., 2015).

A seleção de um gene estável como referência é um passo extremamente crítico porque descuidada a seleção pode levar a resultados enganosos. Interpretação falsa pode surgir da falsa seleção (GUTIERREZ et al., 2008; GUEÑIN et al., 2009).

Estes genes podem ser analisados empregando uma variação da técnica PCR, que é o real-time PCR, capaz de quantificar os produtos de PCR a cada ciclo pela utilização de substâncias fluorogênicas que são ligadas às moléculas de ácido nucléico e o conjunto é monitorado em tempo real, como o próprio nome da metodologia sugere.

Visto a demasiada importância da cultura frente aos estresses causados por variações bruscas de temperatura, estudos que abordem as respostas fisiológicas e moleculares da cana-de-açúcar em diferentes temperaturas de desenvolvimento são necessários para um melhor conhecimento sobre a influência destes fatores. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as variações fisiológicas, por meio da absorção de  $\text{CO}_2$  / área / tempo, e verificar a alteração na expressão gênica durante esta avaliação, da cultivar RB867515 de cana de açúcar.

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1. Produção das mudas de cana-de-açúcar

As mudas foram propagadas a partir de canavial estabelecido no Campus Rural da Universidade Federal de Sergipe, empregando a cultivar RB867515, com bom aspecto fitossanitário. O material de propagação foi obtido adotando o sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas (IAC, 2012), em viveiro com sombrite 50% e irrigação diária. O substrato utilizado foi o comercial Plantmax® e pó-de-coco tratados na proporção de 1:1 de volume.

Aos 15 dias de plantadas (DAP) as mudas foram transplantadas em tubetes de volume de 53 cm<sup>3</sup>. Com 40 DAP as plantas foram podadas e colocadas para aclimação em sol pleno e irrigação diária.

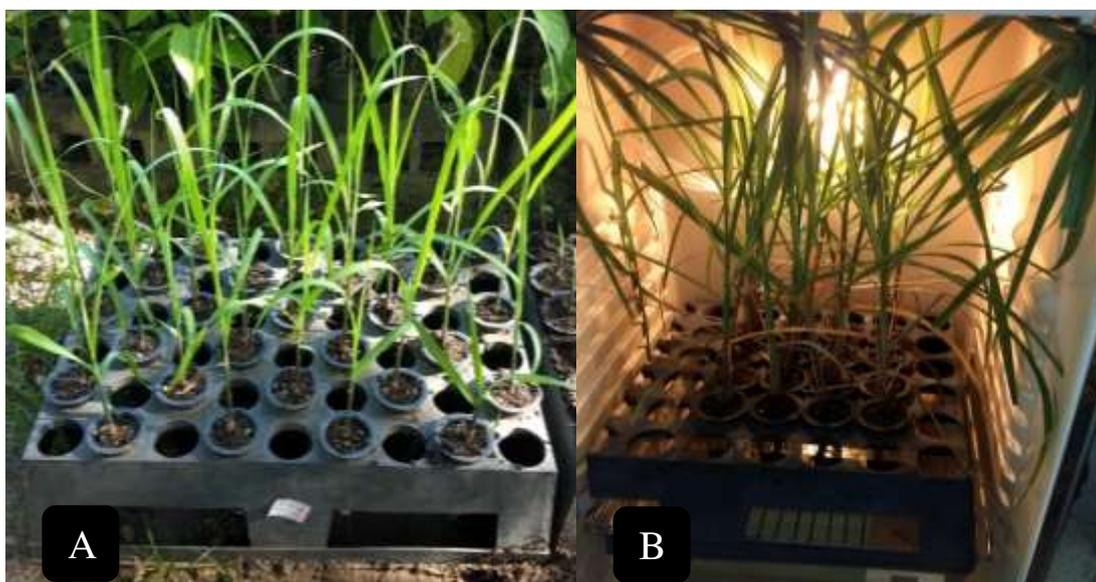


FIGURA 1. Mudanças de cana-de-açúcar cv. RB867515 produzidas em sistema MPB com 15 dias após plantio (A). Acomodação das mudas aos 65 após plantio em sistema de temperatura e luminosidade controladas (B). UFS, São Cristóvão-SE, 2019. Fonte Autor.

As plantas com 65 DAP foram colocadas em câmara climatizada tipo BOD, com controle constante de temperatura, irradiância (densidade de fluxo de luminoso  $3.000 \text{ lm m}^{-2} \text{ s}^{-1} = 60.000 \text{ Lux}$ ) e fotoperíodo de 12 horas (nível de energia luminosa próximo a um dia de janeiro em Sergipe).

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), tendo para cada tratamento seis repetições, e a parcela experimental constituída de um tubete contendo

uma única planta. As mudas foram submetidas a três regimes de temperatura baixa (15°C); média (28°C) e alta (40°C) durante cinco períodos (0; 4;8; 12 e 24 horas).

#### 4.2.2. Determinação da clorofila a e b

Para avaliação dos índices de clorofila **a** e **b** foi utilizado um clorofilômetro (Modelo ClorofiLOG CFL1030) (FALKER, 2008). A determinação do índice de clorofila total foi obtida por meio da soma dos índices de clorofila **a** e **b**, bem como a razão **a/b**(BARBIERI JÚNIOR et al., 2012; BRITO et al., 2011; KRENCHINSKI et al., 2018; OLIVOTO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2017; SIQUEIRA-SILVA et al., 2018). Na ocasião, foi escolhida a segunda folha, localizada do topo para a base dos perfilhos, que estivesse totalmente expandida (lígula visível), sendo a leitura realizada no terço médio de cada folha.

#### 4.2.3. Fluorescência transiente de clorofila a

As medições da clorofila **a** foram realizadas com um fluorímetro portátil modelo OS-30p (Opti-Sciences Inc., EUA) para avaliar os efeitos de tratamentos no funcionamento de fotossistemas e a cadeia de transporte de elétrons. As medições foram realizadas nas mesmas folhas da análise anterior, adaptadas ao escuro por 30 minutos.

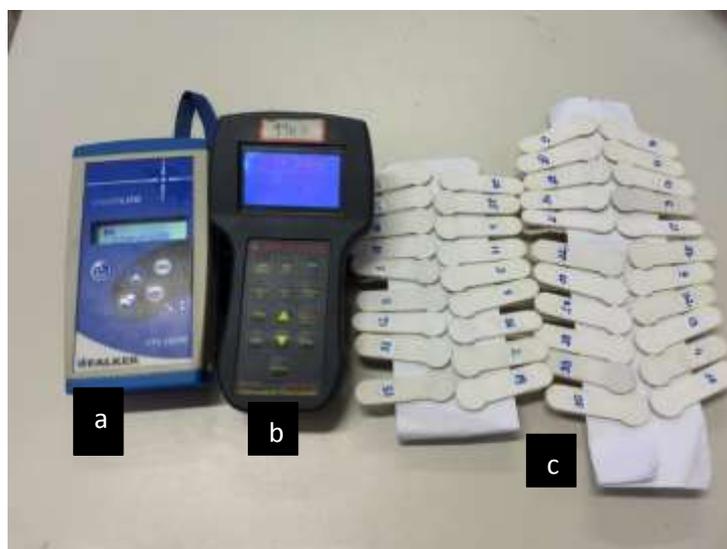


FIGURA 2. Clorofilômetro (ClorofiLOG CFL1030) (a), usado nas medições de clorofila **a** e **b**. Fluorímetro portátil (b) (OS-30p) usado para medições de fluorescência. Pinças para adaptação ao escuro (c). Ambos equipamentos utilizados em mudas de cana-de-açúcar submetidas a estresse abiótico. UFS, São Cristóvão-SE, 2019. Fonte Autor.

Os estados transientes de fluorescência da clorofila foram produzidos pela emissão de luz actínica ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ ), na intensidade de  $3.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (fótons) por 1 segundo.

Airradiação foi aplicada homogeneamente em área foliar com 4 mm de diâmetro (DINIS et al., 2016).

A cinética rápida da emissão de fluorescência desde a fluorescência inicial até ao máximo ( $F_o$  para  $F_m$ ) foi medida pelos passos do OJIP:  $O \cong F_o$  (50  $\mu$ s), J (2 ms), I (30 ms),  $P \cong F_m$  e, também os valores de tempo para fluorescência máxima t ( $F_m$ ) e a área acima da curva OJIP (A).

#### 4.2.5. Extração do RNA total

Durante o experimento foram recolhidas amostras de tecido foliar usando um furador de papel. Foram acondicionadas em microtubosrosqueáveis, etiquetados e transferidos imediatamente para nitrogênio líquido, sendo armazenadas em freezer a  $-80^\circ\text{C}$  até o momento de sua utilização para extração do RNA total.

Para a extração de RNA os tecidos foliares (0,3 g) foram macerados em almofariz com auxílio de pistilo e em seguida transferidos para um microtubo. A extração foi realizada empregando kit comercial NucleoSpin® RNA de acordo com as recomendações e especificações do fabricante.

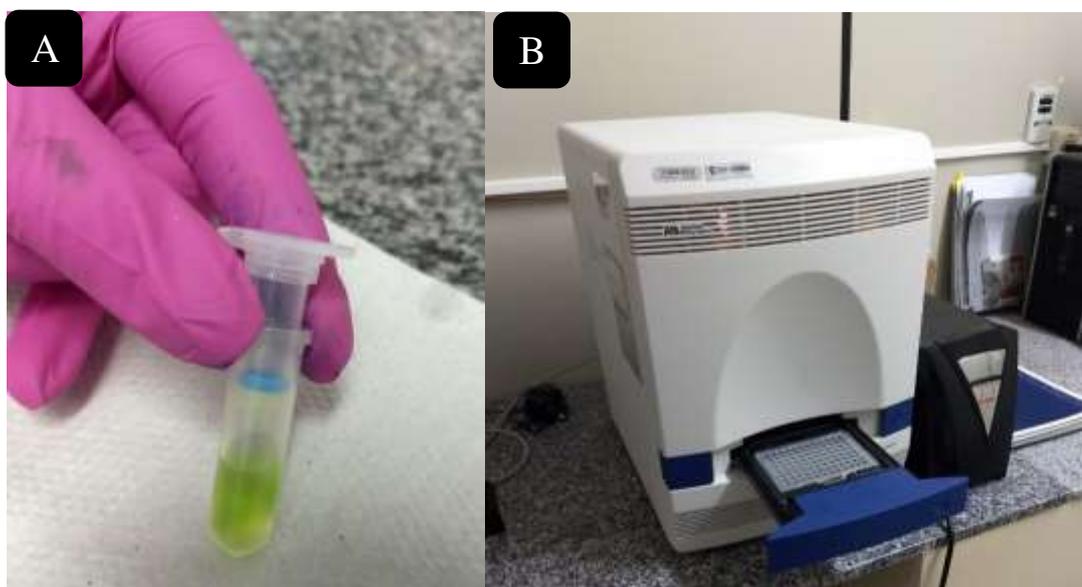


FIGURA 3. Extração de RNA do tecido foliar de mudas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse abiótico (A). Termociclador Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System. UFS, São Cristóvão-SE, 2019. Fonte Autor.

A qualidade dos transcritos obtidos foi avaliada por meio da razão do espectro de absorvância da amostra utilizando um espectrofotômetro de microplacas (Epoch) e o software Gen5™ para análise dos dados. Para isto empregou-se 1  $\mu$ l de cada amostra. Obteve-se o espectro (220-750 nm) além de outras informações como concentração de RNA e as razões das absorvâncias 260/280 e 260/230.

O RNA total foi extraído de cada amostra e, em seguida, transcrito reversamente para amostras de cDNA. Utilizou-se um conjunto de DNase isenta de RNase para eliminar a contaminação por DNA nas amostras.

A síntese foi realizada a 25°C por 5 minutos para o anelamento, 42°C por 60 minutos para amplificar e a inativação da enzima foi concluída a 70°C por 15 minutos. Todas as amostras de cDNA foram diluídas com água isenta de RNase antes de serem usadas como template na análise RT-qPCR.

#### 4.2.6. PCR quantitativa

As reações de PCR quantitativa foram realizadas num sistema de detecção de PCR em tempo real no aparelho AppliedBiosystems® 7500 Real-Time PCR System, utilizando Power SYBR® Green PCR Master Mix para detectar a síntese de cadeia dupla de cDNA.

As reações foram realizadas num volume de 20 uL contendo 5 uL de cDNA de 40 uM/uL, 12,5 uL SYBR Green, 6,5 uL de água e 0,5U de cada primer (*forward* e *reverse*). Todas as amostras foram analisadas em triplicatas técnicas.

Os primers empregados foram os obtidos a partir de sequências de *Arabidopsis thaliana* L. e são *M6*, *HSHP*, *18S*, *PKABA*, *AIB3* e *PER1*. Os procedimentos de PCR foram os seguintes: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, temperatura indicada para o primer por 60 segundos, 72°C por 10 segundos, e as curvas de fusão foram realizadas imediatamente após o término da RT-qPCR e fluorescência medida a partir de 65 a 99°C.

#### 4.2.7. Determinação da eficiência de amplificação dos iniciadores

A eficiência de amplificação para os seis primers utilizados foi estimada por meio de reações de qPCR contendo cDNA submetido a diluições seriadas de 4 vezes (1:10). Sendo preparadas 3 replicatas para cada uma das cinco diluições das amostras de cDNA. Os CT's obtidos para cada gene foram submetidos à regressão linear, sendo calculados os coeficientes de correlação entre os pontos e a reta plotada para validação da regressão.

O gene de referência pesquisados neste trabalho com suas características de amplificação e expressão em *Saccharum officinarum*, foi o gene *18SrRNA* a designação SCFRRE06 18S referente a região ribossomal do RNA, sequência F/R CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA e ACACTTCACCGGACCATTCAA.

#### 4.2.5. Análise dos dados

Em ambos as avaliações, fisiológicas e moleculares, a normalidade dos dados foi avaliada pelo Teste de Shapiro-Wilk. A análise de variância dos efeitos dos tratamentos, o teste de comparação de médias de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) e a análise de regressão foi realizada com o programa Sisvar (FERREIRA et al., 2013).

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1. Clorofila a e b

Os índices de clorofila totais das mudas cana-de-açúcar foram influenciados ( $p \leq 0,05$ ) pela interação entre os tempos de exposição e temperatura. Para a clorofila **a**, baixas temperaturas gerou valores de 27,1; altas temperaturas valores de 24,99 e temperaturas médias resultaram em valores de 25,99. Resultados semelhantes foram observados para clorofila **b** e clorofilas totais. Para a relação de clorofila **a/b** obtiveram-se valores maiores para temperaturas médias e altas e menores valores para temperaturas baixas 3,38; 3,44 e 3,22 respectivamente.

TABELA 1. Índice de Clorofila Falker em plantas de cana-de-açúcar (*Sacharum spp.*) submetidos a diferentes temperatura e tempos de exposição. Clorofila a (Clo a), Clorofila b (Clo b), Clorofila total ( Clo TOTAL) e Relação da Clorofila a/b ( Clo a/b).

Variável	Clorofila			
	Clo a	Clo b	Clo TOTAL	Clo a/b
Tempo (horas) (n= 18) (TE)	*	*	*	**
0	25,36 b	6,68 c	34,44 ab	3,15 c
4	27,62 a	8,36 a	35,45 a	3,34 bc
8	26,02 ab	7,80 ab	33,82 abc	3,39 bc
12	24,81 b	7,32 cb	32,31 bc	3,51 a
24	24,99 b	7,34 c	32,20 c	3,40 ab
Temperatura (n=54) (T°C)	*	*	*	**
Baixa (15°C)	27,01 a	6,34 c	31,74 a	3,22 b
Média (28°C)	25,99 a	7,74 b	33,73 b	3,38 ab
Alta (40°C)	24,99 b	8,43 a	31,74 c	3,44 a
TE x T°C	ns	*	**	ns
CV (%)	6,75	12,99	6,94	9,78

Índice de clorofila a (Cl a); clorofila **b** índice (Cl b); clorofila total, índice (Total cl); relação entre Cl a e Cl b (relação Chla/b). Valores seguidos pelas mesmas letras na coluna não diferem pelo teste de Tukey. Nível de significância: \*\* ( $p \leq 0,01$ ), \* ( $p \leq 0,05$ ), ns (não significante).

Os teores de clorofila **a**, **b**, total e a relação **a/b** foram influenciados ( $p \leq 0,05$ ) por diferentes tempos de exposição. Para as temperaturas, apenas as os teores de clorofila **b**, Totale

**a/b** foram influenciados ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 1). Houve interação entre tempo de exposição e temperatura para as variáveis clorofila **b** e clorofila total. Para clorofila **a**, o tempo de 4 horas de exposição foi superior, a temperatura baixa e a média promoveu os maiores resultados (27,01 e 25,99) a quantidade de clorofila foi inferior em temperaturas altas (24,99) (FIGURA 4).

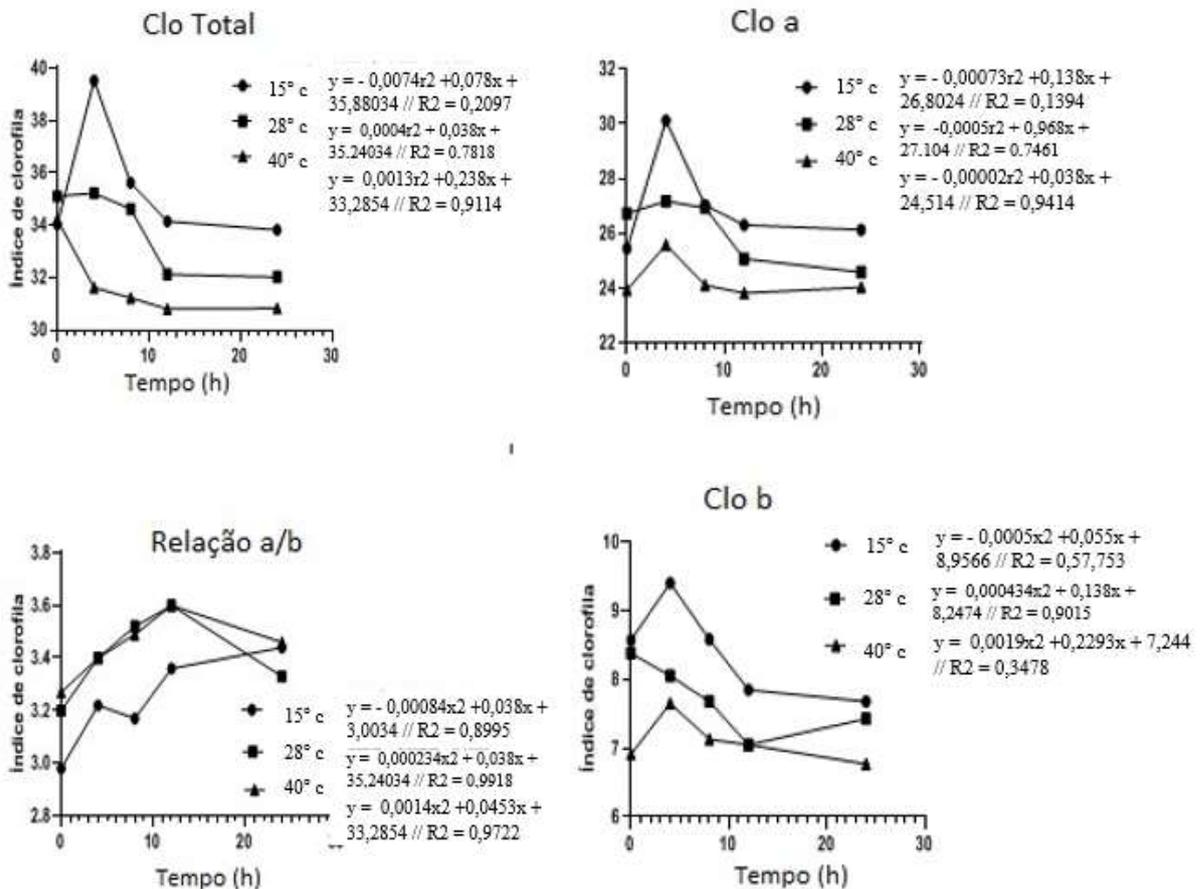


FIGURA 4. Teores de clorofila total (Clo Total), clorofila a (Clo a), clorofila b (Clo b) e a relação clorofila a e b (Relação a/b) para mudas de cana-de-açúcar submetidas a diferentes tempos de exposição e temperaturas. UFS, São Cristóvão-SE, 2019.

Para clorofila **b**, a partir de 4 horas de exposição (8,36) ocorreu influenciado positivamente nos valores quando comparados a primeira hora de exposição (6,68). As temperaturas foram proporcionais as quantidades de clorofila, ou seja, a medida que se elevou temperatura (15°C, 28°C e 40°C) houve aumentada quantidade de clorofila (6,34; 7,74; 8,43). Para clorofila total houve diferença entre os tempos de exposição, sendo que para o tempo de 4 horas (35,45), se obteve os melhores resultados. Após esse tempo houve decréscimo. As temperaturas foram inversamente proporcionais as quantidades de clorofila. A relação de clorofila **a/b** foi influenciada pelos tempos de exposição. A partir de 12 horas os valores aumentaram (3,51 e 3,40). No entanto, nas temperaturas médias e altas (3,38 e 3,44) foram superiores as temperaturas baixas (3,22). A clorofila **a**, **b**, conteúdo total e a relação **a/b** foram alterados,

mostrando que as plantas evitaram danos ao fotossistema II, limitando a quantidade de energia absorvida.

Resultados semelhantes foram encontrados por outros pesquisadores em *Physalis peruviana* L. (DEVECI; CELIK, 2016), (DEVECI et al., 2017; BAHADUR et al., 2009; ADEJUMO et al., 2018; FARIAS et al., 2019).

#### 4.3.2 Fluorescência da clorofila a

A temperatura é um dos fatores que afeta a eficiência fotossintética da cana-de-açúcar, podendo ser considerada tanto um fator limitante, como também estimulante dos processos fisiológicos da planta (SHEN et al., 2004).

A fluorescência transiente da clorofila exibe o transiente OJIP, que foi normalizado entre os passos O e P e expressa como fluorescência variável relativa (Figura 1), subir durante o primeiro segundo de iluminação depois de escurecer a adaptação.

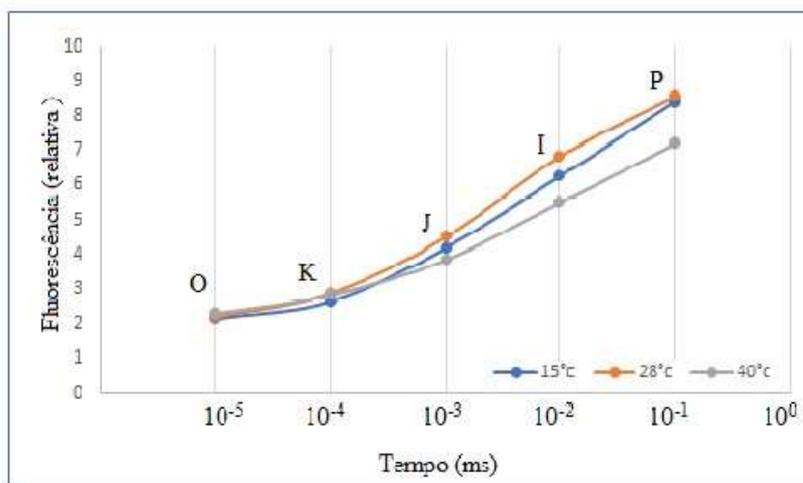


FIGURA 5. Curvas típicas de fluorescência de clorofila transiente na cana de açúcar exposta a três temperaturas diferentes: baixas (15 °C diurna); temperaturas médias (28 °C) e temperaturas altas (40 °C) e a indicação dos passos O, K, J, I e P. No eixo temporal (logarítmico) pontos inicial e final das medições, bem como pontos de tempo de fluorescência medições [F50µs(FO), F100µs(FK), F300µs(FP), F2ms (FJ), F30ms (FI)]. Estas curvas são mostradas em uma escala de tempo logarítmica (unidades arbitrárias) e em uma escala de tempo linear (milisegundos). O, K, J, I, P são marcados na figura, em que: O é para a origem (a fluorescência mínima FO); K para a fluorescência a 0,3 ms (FK), J e I são os níveis de fluorescência para os intermediários em 2 ms e 30 ms (FJ e FEU) e P é para o pico (FP).

O passo marcante é em 2 ms, chamado de J-step, quando a temperatura baixa e média (15°C e 28°C) crescem em proporções semelhantes; enquanto a temperatura alta (40°C) ocasiona uma redução deste ponto. A fluorescência sobe para o J-step fornece informações sobre eventos de rotatividade únicas das principais reações de fotoquímica, principalmente redução de

QA. Essa situação torna-se constante nas demais medições. Todas as curvas da fluorescência variável relativa (WOP) apresentaram uma forma OJIP típica, com uma fluorescência variável máxima, indicando que as amostras se apresentavam fotossinteticamente ativas (STRASSER et al., 2004; YUSUF et al., 2010). De forma geral observa-se (Tabela 2) que a eficiência fotossintética das plantas de cana-de-açúcar foi bastante afetada pela variação da temperatura (baixa, média e alta).

A fluorescência da clorofila é uma ferramenta que nos permite avaliar o comportamento do sistema fotossintético de plantas em situação de estresse e sem a necessidade de destruir a amostra (KALAJI et al., 2014; GOTTARDINI et al., 2014). Os resultados obtidos para  $F_v/F_m$  de plantas de cana-de-açúcar, corroboram com as encontradas na literatura para plantas, porque apresentam valores que variam de 0,70 a 0,85 quando estabelecido sob condições ótimas (LEE et al., 2016).

Uma redução gradual de  $F_v/F_m$  foi observada com a elevação das temperaturas aplicadas. Outros autores obtiveram respostas semelhantes estudando plantas submetidas a estresses abióticos (OUKARROUM et al., 2007; KALAJI et al., 2011; WANG et al., 2012; BRESTIC E ZIVCAK, 2014; MEHTA et al., 2010; ZIVCAK et al., 2014a, 2014b; CHEN et al., 2015). A eficiência quântica máxima de PSII ( $F_v/F_m$ ) foi diferente (Tabela 2), este parâmetro foi o único que apresentou significância entre os tempos de exposição. Para os efeitos das temperaturas, todas as variáveis foram significativas ( $p \leq 0,05$ ).

TABELA 2. Parâmetros fisiológicos (F0 (Fluorescência inicial), FM (Fluorescência máxima) e FV (Fluorescência variável) ( $Fv = Fm - F0$ ), a partir desses parâmetros foi calculada a eficiência quântica potencial (Fv/Fm) do fotossistema II, relação da Fluorescência variável com Fluorescência inicial (FV/F0) e a relação Fluorescência inicial com Fluorescência máxima (F0/FM) em cana-de-açúcar com 65 dias após o plantio. UFS, São Cristóvão-SE, 2019.

Variável	Fluorescência da clorofila a					
	F0	FM	FV	FV/FM	FV/F0	F0/FM
Tempo (horas) (n= 18)(TE)	ns	**	ns	**	**	**
0	217,72	849,31 a	630,33	0,74 a	2,90 a	0,35 b
4	230,92	808,50 ab	559,56	0,69 b	2,44 b	0,42 a
8	218,67	797,70 ab	578,64	0,72 ab	2,65 ab	0,39 ab
12	230,87	813,10 ab	582,23	0,71 ab	2,55 ab	0,42 b
24	216,84	778,91 b	577,11	0,74 a	2,67 ab	0,39 ab
Temperatura (n=54)(T°C)	*	**	**	**	**	**
Baixa (15°C)	217,28 b	840,61 a	613,19 a	0,73 a	2,87 a	0,35 b
Média (28°C)	222,09 ab	858,87 a	646,71 a	0,74 a	2,88 a	0,35 b
Alta (40°C)	229,61 a	721,16 b	493,16 b	0,67 b	2,16 b	0,48 a
TE x T°C	Ns	ns	ns	*	ns	ns
CV (%)	9,07	8,78	12,00	5,65	12,77	16,59

Unidade de medida utilizada é de elétrons quantum-1. Significa seguido pelas mesmas letras na coluna não diferem pelo teste de Tukey. Nível de significância: \*\* ( $p \leq 0,01$ ), \* ( $p \leq 0,05$ ), ns (não significante).

As plantas mais afetadas pelos regimes de temperatura foram as plantas submetidas a temperaturas altas. A fluorescência inicial em temperaturas baixas e altas diferiram 217,28 e 229,61, e a temperatura média manteve-se em 222,09. A Fluorescência máxima foi reduzida na temperatura alta 721,16 e manteve-se semelhante nas outras duas temperaturas, 840,61 e 858,87. O mesmo comportamento foi observado para fluorescência variável com valores de 613,19; 646,71 e 493,16, baixa, média e alta, respectivamente.

Os tilacoides são relatados como o principal local de dano induzido pelo frio no cloroplasto, uma vez que suas membranas perdem a capacidade de transporte de elétrons e fotofosforilação em condições de queda de temperatura, possivelmente, devido a alteração ou reorganização de componentes como polipeptídeos de membrana (BERTAMINI et al., 2007).

Neste tratamento a eficiência quântica potencial do fotossistema II (FV/FM) foi de 0,67, enquanto que a Fv/Fm dos tratamentos com Tmédia e Tbaixa foram de 0,74 e 0,73, respectivamente. Esta variável foi a única que teve resultado significativo para a interação da temperatura *versus* tempo de exposição (TE x T°C).

A redução da Fv/Fm pode estar associada ao excesso de elétrons devido ao fato de que baixas temperaturas reduzem a eficiência das enzimas do Ciclo de Calvin, reduzindo o consumo dos produtos fotoquímicos, gerando um excesso de elétrons. O primeiro dano gerado por esse

excesso de elétrons é a perda da estabilidade e a desestruturação físico-química das biomembranas dos tilacóides, afetando o fotossistema II. Após afetar a integridade funcional das membranas do cloroplasto e das mitocôndrias, os processos como a fotossíntese e a respiração também podem ser prejudicados, uma vez que dependem da atividade de transporte de elétrons e enzimas associados à membrana (MAMEDOV et al., 1993; HAVAUX, 1993). Portanto, a fotossíntese da cana-de-açúcar em altas temperaturas pode ter sido limitada principalmente pela redução da atividade bioquímica que, conseqüentemente, causou nessas plantas um dano fotoquímico.

O rendimento quântico de energia dissipada na antena do PSII, relacionada a processos não fotoquímicos (calor) é dado por  $F_0/F_M$ . Sob estresse um dos mecanismos utilizados pelas plantas é a dissipação do excesso de energia absorvida que não poderá ser armazenada ou transportada a partir do PSII. O acionamento de mecanismos pode ser resultado de uma série de danos, como às estruturas do PSII ou, por exemplo, na membrana dos tilacóides submetidas ao efeito de hidrocarbonetos (KRESLAVSKI et al., 2017)

O excesso de calor, além de induzir perdas quantitativas e qualitativas na produção, encurta a duração do ciclo, reduz a área foliar, a estatura e a percentagem de fecundação das flores, acelera o período de enchimento e a senescência, além de diminuir o peso médio dos grãos. A fotossíntese é um dos processos fisiológicos mais sensíveis ao calor (DEMIREVSKA-KEPOVA et al., 2005), principalmente por causa da sensibilidade da membrana do tilacóide, com redução da produção de clorofila (RISTIC et al., 2007).

Na presença de temperaturas elevadas, as plantas desenvolvem reações defensivas como a ativação de vários genes responsáveis pela síntese de um conjunto de substâncias, entre elas as peroxidases, enzimas que favorecem a oxidação das células produzindo radicais livres que agem nas membranas celulares e proteínas causando danos ou morte celular (ESSEMINE et al., 2010).

### **4.3.3 Expressão gênica em cana**

Os resultados do RNA total para a relação  $A_{260}/A_{280\text{nm}}$  das amostras variou entre 2,09 e 2,33. São consideradas amostras de boa qualidade quando as leituras de  $260/280$  apresentam relações de 1,8 a 2,0. Relações abaixo destes valores indicam contaminantes na amostra como proteínas ou tiocianato de guanidina. As amostras analisadas encontravam-se dentro desses valores.

Neste estudo os genes *M6*, *HSP (sHSP18.2)*, *PER1e 18S* foram avaliados. Houve atividade gênica detectável para *18S* a 15°C e 40°C, em alguns tempos, para os demais tratamentos que não estão apresentados na Figura 5, não houve expressão detectável.

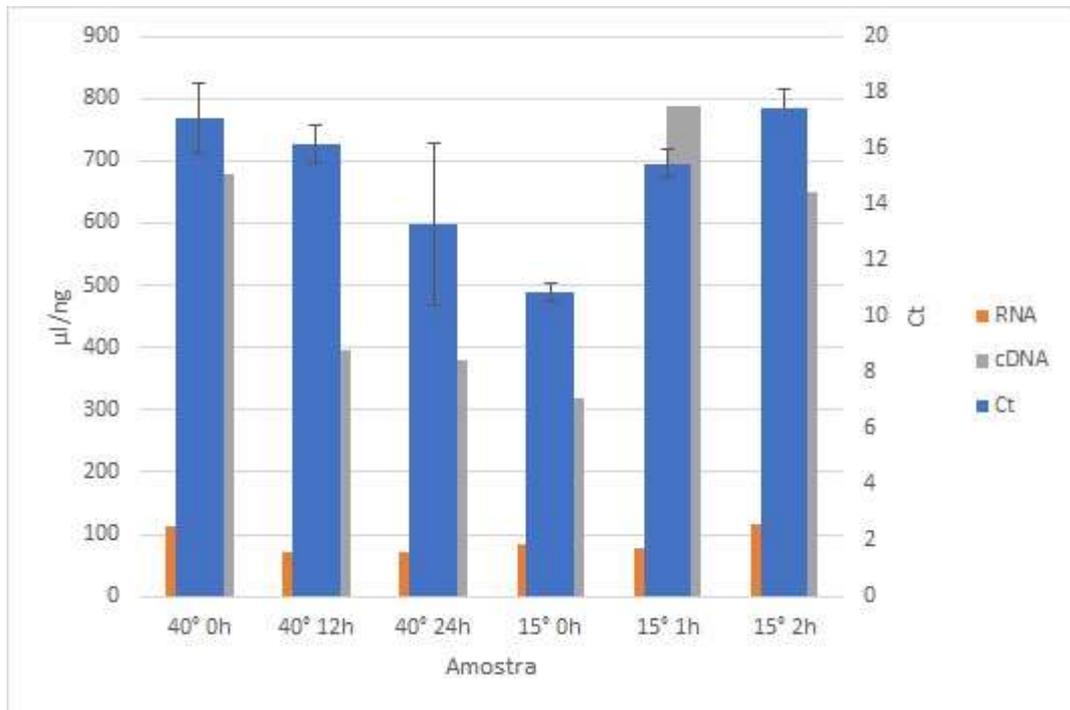


FIGURA 5. Expressão gênica para a subunidade ribossomal/18S em cana-de-açúcar cv. RB867515 submetida às temperaturas de 15°C e 40°C em diferentes tempos de avaliação.

#### 4.4. Discussão

A variação nos genes de referência depende do biótipo e condições abióticas onde o organismo se desenvolve (THELLIN et al., 1999). Nas plantas, a tolerância à seca foi mostrada ser um abiótico extremamente complexo, condição caracterizada por interações associadas com manutenção celular, produção e degradação de proteínas e mudanças no metabolismo, como revisado (SHANKER et al., 2014).

Um estudo sobre genes de referência candidatos para cana-de-açúcar com base em sua expressão estável em estádios de desenvolvimento e/ou estresse abióticos, indicaram como novos genes de referência candidatos, APRT, PRR, 18SrRNA, eEF-1a, eIF-4a, UBQ, CAC, TIPS-41 e CUL, e dentre estes encontra-se a subunidade *18S*.

Ao se comparar os dados de clorofila a, b e total é possível se relacionar a expressão diferencial da subunidade *18S* com os teores. Este gene tem sido descrito como útil para uso como referência em cultivares de cana-de-açúcar em outros estudos, independente da cultivar avaliada. Este gene é um dos mais abundantes expressos em pesquisas (LING et al., 2014).

Neste estudo foi empregada somente uma cultivar de cana-de-açúcar e teve como objetivo revelar quais genes de referência empregar em amostras experimentais com diferentes

tratamentos de temperatura. No entanto, é importante ressaltar da necessidade de testar esta expressão com diferentes cultivares em combinação com outros genes de referência e também analisar a expressão em diferentes tecidos da planta. É também importante ratificar o potencial da técnica qRT-PCR para precisa e confiável análise da expressão gênica em cana-de-açúcar.

#### 4.5. Conclusões

Conclui-se que altas temperaturas (40°C) afetam a eficiência fotossintética das plantas de cana-de-açúcar.

Para a avaliação da expressão gênica RNAm as sequências gênicas empregadas para a subunidade ribossomal 18S desenhadas para *Arabidopsis thaliana* L. pode ser utilizada na avaliação do estresse por temperatura em cana de açúcar.

#### 4.6. Referências Bibliográficas

DE MELO, P. M.; SAGE, R. F. Comparative photosynthetic responses in upland and lowland sugarcane cultivars grown in cool and warm conditions. **Brazilian Journal of Botany**, v. 40, n. 4, p. 829-839, 2017.

ECHER, F. R.; OOSTERHUIS, D. M.; LOKA, D. ROSOLEM, C.A. High night temperatures during the foral bud and flowering stages increase the abscission of reproductive structures in cotton. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 200, n.3, p.191-198. 2014.

LOKA, D. A.; OOSTERHUIS, D. M. Effect of high night temperatures on cotton respiration, ATP levels and carbohydrate content. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, p. 258-263, 2010.

LIU, Z.; YUAN, Y. L.; LIU, S. Q.; YU, X. N.; RAO, L. Q. Screening for high-temperature tolerant cotton cultivars by testing in vitro pollen germination, pollen tube growth and boll retention. **Journal Integrated Plant Biology**, v. 48, n. 6, p. 706–714, 2006.

LING H., WU Q., GUO J., XU L.; QUE, Y. Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative RT-PCR. **PLoS ONE** 9 e97469, 2014.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, p. 23–39, 2002.

CHAPMAN, J. R.; WALDENSTRO, M. J. With reference to reference genes: a systematic review of endogenous controls in gene expression studies. **PLoS One** 10 e0141853, 2015.

DUNDAS, J.; LING, M. Reference genes for measuring mRNA expression. **Theory Bioscience**, v. 131, p. 215–223, 2012.

GUTIERREZ, L.; MAURIAT, M.; GUE NIN, S.; PELLOUX, J.; LEFEBVRE, J. F., LOUVET R.; RUSTERUCCI, C.; MORITZ, T.; GUERINEAU, F., BELLINI, C.; VAN WUYTSWINKEL, O. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 6, p. 609–618, 2008.

KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Jornal of Applied Genetics**,v. 54, p. 391–406, 2013.

LØVDAL, T.; LILLO, C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. **AnalyticalBiochemistry**,v. 387, p. 238–242, 2009.

PFAFFL MW 2004 Quantification strategies in real-time PCR; in A-Z of Quantitative PCR (eds) **SA Bustin** (International University LINE: LA JOLLA, CA, USA) pp 87–112.

ROCHA A. J.; MONTEIRO-JÚNIOR, J. E., FREIRE, J. E. C.; SOUSA, A. J. S.; FONTELES, C. S. R. Real Time PCR: the use of reference genes and essential rules required to obtain normalisation data reliable to quantitative gene expression. **Journal of Molecular Biology Research**,v. 5, v. 45–55, 2015.

SINGH, A., SENGAR, K., SHARMA, M. K., SENGAR, R. S., & GARG, S. K. Proline metabolism as sensors of abiotic stress in sugarcane. **In** Biotechnology to Enhance Sugarcane Productivity and Stress Tolerance (p. 265-284). CRC Press.

**5. ARTIGO 2****DETECÇÃO DE HOSPEDEIROS DE *Leifsonia xyli* SUBSP. *xyli* AGENTE CAUSAL DO RAQUITISMO DA SOQUEIRA EM CANA DE AÇÚCAR****Periódico submetido (ou a ser submetido): Tropical Plant Pathology****RESUMO**

*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) é uma bactéria endófito que coloniza os vasos do xilema de cana-de-açúcar, agente causal do raquitismo-da-soqueira (RSD). É geralmente aceito que a cana-de-açúcar é o único hospedeiro natural de Lxx. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a presença de Lxx em insetos associados aos canaviais. Em uma área experimental cultivada com 4 variedades de cana e inoculadas artificialmente com a Lxx, coletou-se 25 indivíduos de cinco espécies de insetos chave da cultura em diferentes épocas do ano. Empregou-se a PCR específico em ácidos nucleicos extraídos de diferentes partes dos insetos (cabeça, abdome ou corpo inteiro) usando dois pares de primers. Não foi possível a detecção de Lxx nos insetos estudados, confirmando que a gama de hospedeiros da bactéria é restrita a *Saccharum* spp.

**Palavras-chave:** *Saccharum*, Insetos, *Leifsonia xyli*

**ABSTRACT****CAUSAL AGENT OF RATOON STUNTING DISEASE IN SUGAR CANE AND DETECTION OF HOSTS**

*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) is an endophyte bacteria that colonizes the vessels of sugarcane xylem, the causative agent of rickets (RSD). It is generally accepted that sugar cane is the only natural host of Lxx. Thus, the objective of this work was to investigate the presence of Lxx in insects associated with sugarcane fields. In an experimental area cultivated with 4 sugarcane varieties and artificially inoculated with Lxx, 25 individuals from five key insect species of the crop were collected at different times of the year. Specific PCR was performed on nucleic acids extracted from different parts of the insects (head, abdomen or whole body) using two pairs of primers. It was not possible to detect Lxx in the insects studied, confirming that the host range of the bacteria is restricted to *Saccharum* spp.

**Key-words:** *Saccharum*, Insects, *Leifsonia xyli*

## 5.1. Introdução

O gênero *Leifsonia* compreende catorze espécies e subespécies isolados a partir de ambientes muito diversos tais como lagoa antártica (REDDY et al. 2003), o solo dos Himalaias (REDDY et al., 2008), líquens (AN et al., 2009), rizosfera solo (MADHAIYAN et al., 2010) e galhas de nemátodos (EVTUSHENKO et al., 2000). *Leifsonia xyli* é a única espécie patogênicas do gênero descrito até agora, e compreende duas subespécies: *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis*, um agente patogênico da grama bermuda (*Cynodon Dactylis*) e *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), que causa a doença do raquitismo (RSD) na cana-de-açúcar (DAVIS et al., 1984). A cana-de-açúcar é geralmente aceita como o seu único hospedeiro natural (ZAVAGLIA et al., 2016).

Lxx pode ser facilmente encontrada em todo o mundo, onde a cana-de-açúcar é cultivada comercialmente. No Brasil, pesquisas recentes detectaram o patógeno em 23-67% dos campos amostradas (PONTE et al., 2010; URASHIMA; MARCHETTI, 2013). Surpreendentemente, no entanto, existe poucos estudos de hospedeiros alternativos naturais de Lxx (MILLS et al., 2001; ZAVAGLIA et al., 2016).

Diferente de outras bactérias restritas ao xilema, como *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas albilineans*, que possuem uma ampla gama de plantas hospedeiras (YORINORI et al., 2003; TOKESHI; RAGO, 2005), até o momento não há relatos de hospedeiros alternativos para Lxx (TIWARI et al., 2012), muito embora também não haja nenhum estudo sistemático conduzido neste sentido. Em *Xylella* as cigarrinhas são insetos que podem adquirir a bactéria ao alimentar-se em plantas infectadas, sendo capaz de transmiti-la para uma planta saudável após um prazo que varia entre 1 e 2 horas. Os insetos adultos conseguem transmitir por todo o restante da vida, e as ninfas apenas até o próximo instar de desenvolvimento.

O diagnóstico da doença é baseado na detecção da bactéria por inúmeras técnicas, incluindo a microscopia de contraste de fase (STEINDL, 1976), sorologia (GILLASPIE, 1978) ou métodos moleculares que são altamente sensíveis e têm sido desenvolvidos para a detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, incluindo a reação em cadeia de polimerase convencional (PCR) (FEGAN et al, 1998; PAN et al, 1998; TAYLOR et al., 2003) e Nested PCR (FARAHANI et al, 2015.).

Investigações adicionais de hospedeiros alternativos de Lxx são importantes para que se conheça melhor sua biologia e da sua dispersão nos canaviais. O objetivo do trabalho foi de investigar se a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* pode ter como hospedeiros insetos chave dos canaviais.

## 5.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1. COLETA DOS INSETOS

Os insetos foram obtidos em diferentes épocas do ano de 2018 (Tabela 1), em um plantio experimental de cana, implantado no Campus Rural da UFS (lat. 10°55'26''S, long. 37°11'57''O).



FIGURA 1. Localização do campo de plantas inoculadas com a bactéria *Leifsonia xili* (Lxx) onde foram coletados insetos chaves da cultura e submetidos a testes de PCR. UFS, São Cristóvão-SE, 2019. Fonte Autor.

A área corresponde a 1.500 m<sup>2</sup> e contém mais de 100 plantas distribuídas em 4 variedades: Co 997, RB867515, RB 92 579 e RB 95 1541. Essas plantas foram inoculadas artificialmente, através do corte das plantas utilizando-se instrumento previamente imerso na suspensão de inóculo de Lxx.

Os insetos coletados foram identificados e imediatamente armazenados em nitrogênio líquido (TABELA 1).

TABELA 1. Espécies de insetos coletados em plantio de cana-de-açúcar contaminada com *Leifsonia xili*.

Espécie	Nome comum	Família	Época do ano
<i>Diatraea flavipennella</i>	Broca da cana-de-açúcar	Lepidoptera: Crambidae	Verão / Inverno
<i>Diatraea saccharalis</i>	Broca da cana-de-açúcar	Lepidoptera: Crambidae	Verão
<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Cigarrinha-das-raízes	Hemiptera: Cercopidae	Verão / Inverno
<i>Mahanarva posticata</i>	Cigarrinha-das-pastagens	Hemiptera: Cercopidae	Verão / Inverno
<i>Heterotermestenuis</i>	Cupins em cana-de-açúcar	Isoptera: Rhinotermitidae	Verão

### 5.2.2. EXTRAÇÃO DE DNA E OTIMIZAÇÕES

Os insetos foram mantidos em nitrogênio líquido até a utilização nas análises. Em seguida foram macerados em almofariz com auxílio de um pistilo. Posteriormente, o DNA foi extraído de acordo com Carvalho (2012). O método foi basicamente desenvolvido para extração de micoplasmas de insetos (VEGA et al., 1993). Foram utilizadas as seguintes partes do inseto para extração do DNA: cabeça, corpo e inseto inteiro, quando este apresentava muito pouca biomassa.

Inicialmente as amostras foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas com auxílio de pistilo de ponta cônica. Grupos de cinco insetos ou um único inseto foram macerados em 400  $\mu$ L de tampão de extração (Tris 100 mM; EDTA 50 mM; NaCl 500 mM, pH 8,0), adicionado de 2 mL de b-mercaptoetanol e SDS na concentração final de 1%, seguido de centrifugação a 2.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e aquecido por cinco minutos a 65°C. Ácidos nucleicos foram extraídos com clorofórmio/álcool-isoamílico/fenol saturado com TE. A seguir, o DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado por 30 minutos a -80°C, seguido de lavagem com etanol 70%. Depois de seco, o DNA foi ressuscitado em 100  $\mu$ L de SSC 6X (cloreto de sódio 0,9 M; citrato de sódio 0,09 M, pH 7,0).

### 5.2.3. DETECÇÃO DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* NOS INSETOS

Os DNAs extraídos de amostras dos insetos foram utilizados para amplificação de sequências genômicas, utilizando os seguintes pares de primers:

LX23SF (ACCTCCTTTCTAAGGAGC), LX23SR(TGAATTGATCGGCTCACC) e Cxx1 (CCGAAGTGAGCAGATTGACC), Cxx2 (ACCCTGTGTTGTTTCAACG).

As amostras foram identificadas de acordo com a espécie do inseto e a parte do corpo amostrada para a análise (TABELA 2)

TABELA 2. Identificação, espécie e parte do inseto utilizada para extração de DNA visando a detecção de *Leifsonia xyli*.

Identificação	Espécie	Parte do inseto
1	<i>Diatraea flavipennella</i>	Inteiro
2	<i>Diatraea saccharalis</i>	Inteiro
3	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Cabeça

4	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Corpo
5	<i>Mahanarva posticata</i>	Cabeça
6	<i>Mahanarva posticata</i>	Corpo
7	<i>Heterotermestenuis</i>	Inteiro
8	<i>Mahanarva posticata</i> – fase ninfa	Cabeça
9	<i>Mahanarva posticata</i> – fase ninfa	Corpo

O preparo de 25- $\mu$ l mix para a reação de PCR convencional foi realizado e os ensaios das reações de PCR-específico foram realizados conforme trabalhos descritos por Pan et al. (1998). Foram adicionados 2  $\mu$  L do DNA do inseto, em microtubos contendo tampão de amplificação (1X), 200  $\mu$  M de cada dNTP, 0,2  $\mu$  M dos primers LX23SF (5' ACCTCCTTTCTAAGGAGC-3' ) e LX23SR (5' -TGAATTGATCGGCTCACC-3' ), desenhados a partir da região 23S do RNA ribossômico, e 1 U de Taq DNA polimerase. A reação foi realizada em termociclador PTC 100 (MJ Research, EUA) utilizando os seguintes ciclos: um ciclo inicial a 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, hibridização a 57 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1,5 minutos, e um ciclo final de extensão a 72 °C por 3 minutos. O produto amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 0,5X (tris-base 50 mM, ácido bórico 50 mM e EDTA 1 mM - pH 8,5) por 3 horas a 5 V/cm. O gel foi corado e fotografado em fotodocumentador ImageMaster R VDS (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, EUA) sob luz UV. Os tamanhos dos fragmentos gerados foram estimados com base em comparações com marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Promega Corporation, Madison, WI, EUA).

TABELA 3. Reação de PCR utilizada para detecção de *Leifsonia xyli* em insetos. UFS, São Cristóvão-SE, 2019.

Componentes do PCR	Volume
H <sub>2</sub> O	13,95 $\mu$ l
Tampão da enzima 10x	2 $\mu$ l (1x)
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2 $\mu$ l (3,0 mM)
dNTPs (1,25 mM)	4 $\mu$ l (200 mM)
Primer R (25 pmoles/mL)	0,4 $\mu$ l (10 pmoles)
Primer F (25 pmoles/mL)	0,4 $\mu$ l (10 pmoles)
Taq (5 U/mL)	0,25 $\mu$ l (1,25 U)
DNA do inseto	2 $\mu$ l
Volume final	25 $\mu$ l

Para amplificação do DNA foi utilizado o termociclador PTJ-100-60 (MJ Research, Inc. Watertown, MA, EUA). Na amplificação do DNA de *Lxx* com os diferentes primers também

foram utilizados diferentes programas de amplificação. Para os primers Cxx1 (CCGAAGTGAGCAGATTGACC), Cxx2 (ACCCTGTGTTGTTTTCAACG), as amostras foram inicialmente submetidas à denaturação inicial de 95°C por um minuto, seguido de 35 ciclos com denaturações à mesma temperatura por 30 segundos, anelamento a 55°C e 61°C (internos) por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguido de extensão final de três minutos a 72°C.

#### **5.2.4 Nested-PCR**

Na Nested-PCR os iniciadores utilizados na primeira rodada de amplificação foram substituídos por outros de igual sequência tal forma que o DNA amplificado na PCR convencional se torna o alvo para o segundo par de primers, aumentando a sensibilidade e especificidade da PCR.

As condições de amplificação foram a mesma da reação de PCR: aquecimento inicial à 96° C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação inicial à 94°C por 30s, anelamento à 58° por 30s e extensão à 72°C por 35s; e uma extensão final à 72°C/10 min. Dez microlitros da reação de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE, com tensão elétrica de 80 Volts, por 40min. O produto da PCR foi visualizados em translaminador UV (Loccus) e fotodocumentado. Os tamanhos dos fragmentos gerados foram estimados com base em comparações com marcador molecular 100 pb DNA Ladder.

### 5.3. RESULTADOSE DISCUSSÃO

#### 5.3.1. PCR convencional com diferentes primers para detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em diferentes hospedeiros.

Dentre as amostras trabalhadas não houve amplificações. Para as amostras 7, 8 e 9 houve amplificações parciais, posteriormente com o mesmo DNA da análise anterior realizou-se uma NESTED-PCR.



FIGURA 1. Amplificações por PCR convencional com primers visando a detecção de *Leifsonia xyli* em insetos. Fragmentos separados em gel de agarose a 1,5%, Ladder de 100 pares de base na primeira coluna da esquerda para direita do gel. 1 - *Diatraea flavipennella* inseto inteiro, 2 - *Diatraea saccharalis* inseto inteiro, 3 - *Mahanarva fimbriolata* cabeça, 4 - *Mahanarva fimbriolata* corpo, 5 - *Mahanarva posticata* cabeça, 6 - *Mahanarva posticata* corpo, 7 - *Heterotermestenuis* inseto inteiro, 8 - *Mahanarva posticata* ninfa cabeça; 9 - *Mahanarva posticata* ninfa corpo. UFS, São Cristóvão-SE, 2019.

Na segunda reação, de NESTED-PCR não foram visualizadas amplificações.



FIGURA 2. Amplificações por NESTED-PCR, com iniciadores desenhados por Davis et al. (1998), a partir de DNA da PCR convencional e separadas em gel de agarose a 1,5%, Ladder de 100 pares de base na primeira coluna da esquerda para direita do gel, seguido de DNA dos insetos 7, 8 e 9. Itens 1, 2 e 3 PCR convencional usando primer Lx 23 S e Lx 23 F. Itens 4, 5 e 6 usando PCR convencional primer Cxx1 e Cxx2 e PCR convencional. Itens 7, 8 e 9 usando NESTED-PCR e primer Lx 23 S e Lx 23 F. Itens 10, 11 e 12 usando NESTED-PCR e primer Cxx1 e Cxx2. Item 13 apenas água. UFS, São Cristóvão-SE, 2019.

Técnicas baseadas em microscopia e sorologia não possuem sensibilidade suficiente para detectar Lxx quando presente em baixo título nos tecidos vegetais (LÓPEZ et al., 2009). Nestes casos, portanto, faz-se necessário o uso da PCR. A conservação da sequência do gene alvo constitui importante critério de identificação.

Genes usados na detecção de Lxx por PCR incluem genes envolvidos na patogenicidade, regiões anônimas do genoma e genes ribossomais (ROTT; DAVIS, 2004). Os mais comumente usados são primers desenhados a partir da região espaçadora transcrita intergênica (ITS) entre os genes 16S e 23S rRNA do operon rRNA bacteriano (ASTUA-MONGE, 1995; DAVIS et al., 1998; FEGAN et al., 1998; PAN 1998; PAN; GRISHAM; WEI, 2001; TAYLOR, 2004).

Analisando os resultados da PCR convencional, não foi identificado a presença de Lxx nos tratamentos (cabeça do inseto, corpo e corpo completo), gerando resultados negativos.

#### 5.4. Discussão

A PCR com todos os pares de iniciadores não resultou em ampliações em nenhuma das amostras dos insetos colhidas em canaviais inoculados com a bactéria, o que indica que eles não são hospedeiros naturais de Lxx.

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 revelando quão disseminada está a doença e a dificuldade de controle efetivo do problema.

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

Assim, para fins práticos, esta conclusão é importante, uma vez que minimiza a possibilidade de qualquer uma das espécies de insetos, que estão intimamente ligadas as plantações de cana-de-açúcar ser um hospedeiro da doença. Por outro lado, o fato de que a cana é o único hospedeiro natural de Lxx é intrigante. Uma possível explicação para isto é que o nicho ecológico restrito de Lxx relaciona-se com o número surpreendentemente elevado de genes não funcionais encontrados no seu genoma (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

#### 5.5. Conclusões

Os insetos *Diatraea flavipennella* (Boca da cana), *Diatraea saccharalis* (Broca gigante da cana), *Mahanarva fimbriolata* (cigarrinha das pastagens), *Mahanarva posticata* (cigarrinha das raízes), *Heterotermestenuis* (cupim da cana), encontrados em canaviais não são hospedeiros de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

## 5.6. Referências Bibliográficas.

- CARVALHO, G., da SILVAT., MUNHOZ A. T., MONTEIRO-VITORELLO C. B., AZEVEDO R. A., MELOTTO H., CAMARGO L. E. A.. Desenvolvimento de um qPCR para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e quantificação dos efeitos do tratamento de calor de estacas de cana-de-açúcar no LXX. *CortarProt* 80:51 - 55
- DAVIS, M. J. Taxonomy of plant-pathogenic coryneform bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.115-140, 1986.
- DAVIS, M. J.; G., G. J. A.; HARRIS, R. W.; LAWSON, R. H. Ratoon stunting disease of sugarcane: isolation of the causal bacterium. **Science**, v. 210, n. 4476, p. 1365 - 1367, 1980.
- DAVIS, M. J.; GILLASPIE JR., A. G.; VIDAVER, A. K.; HARRIS, R. W. *Clavibacter*: A new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov.: subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. nov.; pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermuda grass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 107 - 117, 1984.
- DAVIS, M. J.; PURCEL, A. H.; THOMSON, S. V. Isolation media for the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v.70, p.425-429, 1980.
- DIAS, V.D. **Detecção com técnicas moleculares de *Leifsonia xyli* e *Xanthomonas albilineans* em cana-de-açúcar**. 109pgs. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, 2016.
- EVTUSHENKO, L. I.; DOROFEEVA, L.V.; SUBBOTIN, S. A.; COLE, J. R.; TIEDIE, J. M. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis *et al.* 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis *et al.* 1984) gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, v. 50, p. 371-380, 2000.
- FARAHANI, AS, TAGHAVI, SM, AND TAHER-KHANI, K. Comparison of conventional, nested and real-time PCR for the detection of the causal agent of double soca in Iran. **Journal of Plant Pathology**, n.2, 2015.
- FEGAN, M., SMITH, GR, AND BRUMBLEY, SM. Development of PCR based markers for the detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in fibrovascular fluid from infected cane plants. **Australasian Plant Pathology**, n.32, p.367-375, 2003.
- FEGAN, C. B. J., TEAKLE, D. S., HAYWARD, A. C., SMITH, G. R. Sensitivity and specificity of a detection assay for *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, agent causing the disease of sugarcane, with an assay based on the reaction in the polymerase chain reaction. **Plant Pathology**, v. 47, p. 495 - 504, 1998.
- GAGLIARDI, P. R. **Avaliação da resistência à *Leifsonia xyli*, agente causal do raquitismo-da-soqueira (RSD), em variedades comerciais de cana-de-açúcar**. 2008. 119 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- GAGLIARDI, P. R.; CAMARGO, L. E. A. Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1222-1226, 2009.
- GAGLIARDI, P. R.; PACE, F. A.; FERREIRA, A. J. Comparação de três métodos de diagnose para a detecção da *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-da-soqueira da cana-de-

- açúcar. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia. 2006, Salvador. **Fitopatologia Brasileira**.p 337.
- GAGLIARDI, P.R.; CAMARGO, L. E. A resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao raquitismo da soqueira. **Ciência Rural**, v. 39, p. 14-18, 2009.
- 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**, v. 57, n. 12, p. 987 - 990, 1973.
- LÓPEZ, M. M., LLOP, P., OLMOS, A., MARCO-NOALES, E., CAMBRA, M., AND BERTOLINI, E. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plantpathogenic bacteria and viruses? **Current Issues in Molecular Biology**. 11:13-46, 2009.
- MADHAIYAN, H., POONGUZHALI, S., LEE, J. S., SENTHILKUMAR, M., LEE, K. C., SUNDARAM, S. *Leifsonia soli* sp. nov., a yellow-pigmented actinobacterium isolated from teak rhizosphere soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 60: 1322 - 1327
- MARCHETTI, A. S., URASHIMA, L. B. L. incidência e gravidade de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* Infecção de cana de açúcar no Estado de São Paulo, Brasil. **Jornal Phytopathol** v. 161, p. 478 – 484, 2013.
- MILLS, G., LEAMAN, T. M., TAGHAVI, S. M., SHACKEL, L., DOMINIAK, B. C., TAYLOR, P. W. J., FEGAN, M., TEAKLE, D. S. *Leifsonia xyli*- como as bactérias são endófitos de gramíneas no leste da Austrália. **Australas Planta Pathol**, p. 0: 145 – 151, 2001.
- MONTEIRO-VITORELLO, C. B., CAMARGO, L. E. A., VAN SLUYS, M. A., KITAJIMA, J. P., TRUFFI, D., AMARAL, A. M., HARAKAVA, R., OLIVEIRA, J. C. F., MADEIRA, D., OLIVEIRA, M. C., MIYAKI, C., TAKITA, M. A., SILVA, A. C. R., FURLAN, L. R., CARRARO, D. M., CAMAROTTE, L., ALMEIDA, N. F., CARRER, H., COUTINHO, L. L., EL-DORRY, H. A., FERRO, M. I. T., GAGLIARDI, P. R., GIGLIOTI, E., GOLDMAN, M. H. S., GOLDMAN, G. H., KIMURA, E. T., FERRO, E. S., KURAMAE, E. E., LEMOS, E. G. M., LEMOS, M. V. F., MAURO, S. M. Z., MACHADO, M. A., MARINO, C. L., MENCK, C. F., NUNES, L. R., OLIVEIRA, R. C., PEREIRA, G. G., SIQUEIRA, W. A. A., SOUZA, T. S. A. I. SM, ZANCA AS, SIMPSON AJG, BRUMBLEY SM, ALMADA JC. Sequência do genoma do patógeno cana gram-positiva *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v17, p827 – 836, 2004.
- PAN, Y. B.; GRISHAM, M. P.; BURNER D. M. et al. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *calvibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of ratoon stunting disease. **Plant Disease**, v.3, n.82, p.285- 290, 1998.
- PAN-Y. B., GRISHAM, M. P., WEI, Q. Diagnóstico por PCR de folha cana escaldadura e doenças soca nanismo. **The Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**. v. 24, p. 607 – 608, 2001.
- PONTE, C. E.; SILVEIRA, S. F.; CARNEIRO, J. D. B.; JR LIMA, R. M. P. Incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em áreas de Multiplicação de cana-de-açúcar não Espírito Santo, sul da Bahia e oeste de Minas Gerais. **Summa Phytopathol**, v. 36, p 313 – 321, 2010.
- REDDY, G. S. N.; PRABAGARAN, S. R.; SHIVAJI, S. *Leifsonia pindariensis* sp. nov., isolado da geleira Pindari dos Himalaias indianos, ea descrição e emenda do gênero *Leifsonia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 58, p. 2229 – 2344, 2008.

REDDY, G. S. N.; PRAKASH, J. S. S.; SRINIVAS, R.; MATSUMOTO, G. I.; SHIVAJI, S. *Leifsonia rubra* sp. nov. and *Leifsonia aurea* sp. nov., psychrophiles from a pond in Antarctica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p 977 – 984, 2003.

TAYLOR, P. W. J.; FEGAN, M.; TEAKLE, D. S. *Leifsonia xyli* - como as bactérias são endófitos de gramíneas no leste da Austrália. **Australasian Plant Pathology**, v. 30, p. 145 – 15, 2001.

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 the detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in fibrovascular fluid from infected cane plants. **Australasian Plant Pathology**, v.32, p.367-375, 2013.

TGER, M. A. T.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; AZEVEDO, R. A.; MELOTTO, H.; CAMARGO, L. E. A. Desenvolvimento de um qPCR para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e quantificação dos efeitos do tratamento de calor de estacas de cana-de-açúcar no LXX. **Crop Protection**, v. 80, p.51-53, 2016.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F. (Coord.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v.2, cap. 12, p.141-206.

UM, S. Y.; XIAO, T.; YOKOTA, A. *Leifsonia lichenia* sp. nov., isolado de líquen no Japão. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 55, p.: 339 – 343, 2009.

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

URASHIMA, A. S.; MARCHETTI, L. B. L. Incidence and Severity of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* Infection of Sugarcane in Sao Paulo State, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 161, n. 7, p. 478-484, 2013.

ZAVAGLIA, A. C., CIA, M. C., POPIN, R. V., CAMARGO, L. E. A. No alternative hosts of the sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* were identified among grass and non-grass species using novel PCR primers. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, p. 336-339, 2016.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos presentes nesse trabalho são de grande valia para ciência que se dedica ao estudo da cana-de-açúcar, pois contém informações de caráter fisiológico e genético além de uma contribuição inovadora direcionada a principal doença presente na cana.

A atual situação ambiental do planeta é bastante complexa, com a alta instabilidade térmica, diversos biomas estão sendo ameaçados, inúmeras espécies estão tentando coevoluir com a situação ambiental, as espécies que não conseguem acompanhar, simplesmente desaparecem. Dentre as espécies cultivadas, com ampla adaptação temos a cana-de-açúcar que é demasiadamente valiosa para economia mundial, estando entre as 20 espécies mais importantes no mundo. Esta Poaceae é muito importante para o Brasil, pois é fonte de renda para milhares de brasileiros, movimentando ativamente o agronegócio e o PIB Brasileiro.

No Capítulo 1 podemos compreender um pouco mais da biologia, extremamente complexa, que envolve os organismos quando são expostos a mudanças climáticas do tipo temperatura, essas mudanças provocaram alterações fisiológicas e alterações gênicas e nos indicam como é o comportamento da planta para enfrentar tal mudança. Alterações de pigmentos fotossintetizantes, alterações na absorção dessa energia e na eficiência desses processos são informações que nos possibilita adaptar o manejo da espécie frente a tais situações. A comprovação que as temperaturas elevadas (40°C) ainda são um grande problema para o desenvolvimento vegetal e que, ao contrário de alguns estudos, as temperaturas baixas (15°C) não foram intensamente prejudiciais plantas. Tal informação pode possibilitar a implantação da cultura em ambientes com essa característica climática. Entender como o “*on* e *Off*” dos genes ligados aos vegetais funciona pode, no futuro, ser um marcador importante para caracterização de uma adaptação do vegetal ao local.

A presença de doenças nos canaviais é extremamente danosa, ainda mais se essa doença não tiver controle, ou seja um produto para o tratamento. A possibilidade de um possível vetor ou até mesmo hospedeiro parcial é algo de grande temor entre os produtores de cana, visto que essa é a única espécie prejudicada. Dentre as técnicas para diagnose da *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, a técnica de PCR, que é sensível e eficiente, detectando essa bactéria nos colmos possibilita um maior controle da bactéria nos materiais que serão propagados nos canaviais.

No Capítulo 2, nosso estudo pode comprovar que as principais espécies de insetos associados aos canaviais não fazem parte da gama de hospedeiro da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Assim poderemos nos dedicar com maior ênfase aos estudos da biologia comportamental desta espécie. A implantação de um sistema de diagnose com tais características contribuirá para evitar perdas decorrentes da distribuição e aumento da concentração da bactéria nos canaviais comerciais, prejudicando todo o setor sucroalcooleiro brasileiro.

Como trabalhos futuros podemos indicar a implantação de um sistema de diagnose molecular utilizando PCR para o raquitismo-da-soqueira (RSD), que poderá ser utilizado como ferramenta adicional nos programas de melhoramento genético da cana na seleção de variedades com tolerância, além de auxiliar os produtores que na detecção do patógeno em seus canaviais.

Outro ponto extremamente importante é o isolamento da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* Para estudos sobre sua biologia e seu comportamento. Este organismo é de hábito complexo e de muita laborosa adaptação as condições laboratoriais. Isso contribuirá para encontrar um controle para esta doença.