

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

DISSERTAÇÃO

**Controle Termobioquímico do Raquitismo da
Soqueira em Mudas Pré-Brotadas de Cana-de-
Açúcar**

Lorraine Cristina Henrique Almeida

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**CONTROLE TERMOBIOQUÍMICO DO RAQUITISMO DA SOQUEIRA
EM MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

LORRAINE CRISTINA HENRIQUE ALMEIDA

Sob a orientação da Pesquisadora
Veronica Massena Reis

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do Solo.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central/Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
Com os dados fornecidos pelo(a) Autor(a)

A447c Almeida, Lorraine Cristina Henrique, 1989-
Controle termobioquímico do raquitismo da soqueira em mudas pré-
brotadas de cana-de-açúcar / Lorraine Cristina Henrique Almeida. –
Seropédica, 2020.
32 f. : il.

Orientadora: Veronica Massena Reis.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, 2020.

1. *Saccharum officinarum*. 2. *Saccharum* spp. 3. Tratamento térmico. 4.
Bactérias promotoras de crescimento de plantas. 5. *Lefsonia xyli* subsp. *xyli*. I.
Reis, Veronica Massena, 1961-, orient. II. Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. III. Título.

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

É permitida a cópia parcial ou total desta dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

LORRAINE CRISTINA HENRIQUE ALMEIDA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra** no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18/12/2020.

Veronica Massena Reis. Dr.^a Embrapa Agrobiologia
(Orientadora)

Leandro de Azevedo Santos. Dr. UFRRJ

Jean Luiz Simões. Dr. Embrapa Agrobiologia

Nivaldo Schultz. Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

À memória de minhas avós Jurandyr e Irene.

Aos meus pais Rubens e Rosemary.

À Maria Gabriela meu grande amor.

A toda minha família.

Aos meus amigos, de perto e de longe,
colaboradores.

Aos meus professores que passaram por minha
vida e cumprem o lindo papel de ensinar.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas e sem Ele nada do que foi feito se fez.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À minha orientadora Veronica Massena Reis pela paciência, pelos ensinamentos e pela orientação.

Aos meus pais por todo amor e esforço, por toda dedicação, por acreditarem em mim e me apoiarem em todos os momentos e em todas as minhas decisões.

Aos meus amigos e funcionários da Embrapa Agrobiologia que com toda paciência dividiram comigo os seus conhecimentos. Em especial à minha querida amiga e maior incentivadora Gabriela Alves que sempre se fez presente em todos os momentos e nunca me deixou desistir, ao amigo Ederson pela amizade, consideração e apoio.

Ao time do Laboratório de Gramíneas: Albiane, Thamires, Nathália, Liliandra, Cecília, Lucio e Wilson. Ao meu amigo Cleudson Gabriel pela ajuda com as análises. À pesquisadora Márcia Vidal pelos ensinamentos e apoio.

Ao professor da ESALQ Luís Eduardo Aranha e seu orientado Raphael pelo suporte e apoio.

Às amigas do alojamento feminino da pós graduação por todas as vezes que me incentivaram e me apoiaram nos momentos mais difíceis.

Aos amigos que me apoiaram, torceram por mim e compreenderam minha ausência em muitos momentos.

À minha banca examinadora pela predisposição em avaliar este trabalho.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e aos professores que tive no decorrer de minha graduação, que cumprem a grandiosa e linda missão de ensinar. Aos meus professores do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, à Coordenação do Curso e todos os funcionários, nestes dois anos de mestrado.

À EMBRAPA Agrobiologia e todo corpo de funcionários, pelo acolhimento e toda infraestrutura oferecida durante os anos que permaneci como bolsista de iniciação científica e mestrado.

Muito obrigado a todos vocês!

RESUMO

ALMEIDA, Lorraine Cristina Henrique. **Controle termobioquímico do raquitismo da soqueira em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar**. 2020. 32f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Na cultura da cana-de-açúcar, utiliza-se tratamento térmico para controle de uma importante doença, o raquitismo da soqueira, causado pela bactéria patogênica *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). Para diminuir o inóculo de tal patógeno na produção de mudas pré-brotadas, utiliza-se tratamento térmico dos minitoletes com água a 52°C por 30 min. Todavia, estudos mostraram que tal tratamento apresenta escapes que servem como fonte de inóculo. Dentre os efeitos benéficos das bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPC's), acredita-se que estas podem atuar como supressores de doenças por competir por sítios de colonização, uma vez que tanto bactérias diazotróficas endofíticas como a Lxx podem colonizar vasos do xilema. O objetivo do presente trabalho foi aperfeiçoar o tratamento térmico com a incorporação de um aditivo químico, de forma a reduzir o tempo do tratamento e minimizar perdas de brotação das gemas e juntamente com a inoculação com as BPC's, melhorar a eficiência no controle da Lxx. Para tal, foram realizados experimentos onde se mediu o índice de velocidade de brotação (IVB), a sobrevivência de bactérias diazotróficas pelo Método do Número Mais Provável (NMP), a contribuição da fixação biológica de N₂ pela técnica de redução de acetileno (ARA) e a quantificação do controle da Lxx através da técnica de qPCR usando primers espécie específicos. Os tratamentos avaliados foram: tratamento térmico com água a 52°C por 30"; tratamento térmico em solução de ácido acético 2% a 52°C; tratamento térmico por 10 min em água 52°C + imersão em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente; sem tratamento térmico ou aditivo (controle); todos com e sem inoculação com a mistura de 5 estirpes/espécies de bactérias (*Nitrospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Paraburkholderia tropica* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*). Embora o uso do ácido acético a 2% como aditivo no tratamento térmico não tenha apresentado efeito antimicrobiano sobre a Lxx, este se mostrou promissor como tecnologia de melhoria no estabelecimento da *Paraburkholderia tropica* e *Nitrospirillum amazonense*, aumentando a atividade da nitrogenase e a brotação das gemas. Tais resultados foram obtidos quando os minitoletes foram tratados termicamente por 10 min em banho maria com água a 52°C e posteriormente imersos por 10 min em solução de ácido acético a 2%. A modificação do tratamento térmico tradicional pode ser uma alternativa viável e barata para ambos os microrganismos utilizados, estabelecendo as bactérias benéficas e promovendo o controle parcial da doença.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum*. *Saccharum* spp. Tratamento térmico. Bactérias promotoras de crescimento de plantas. *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

ABSTRACT

ALMEIDA, Lorraine Cristina Henrique. **Controle termobioquímico do raquitismo da soqueira em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar.** 2020. 32p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

The sugar cane cultivation requires the use of heat treatment in pre-sprouted seedlings in order to control the ratoon stunting disease, which is caused by the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* (Lxx). In order to decrease the pathogen inoculum in the pre-sprouted seedling (PSS) production, the small stalks are heat treated in water at a temperature of 52°C for 30 minutes. Nevertheless, studies have shown that this treatment has flaws that works as inoculum sources. Among the beneficial effects of growth-promoting bacteria (GPB), it's believed that they act as disease suppressors due to the competition for the colonization sites, since both the diazotrophic bacteria and the Lxx can colonize xylem vases. Thus, this work aimed to polish the heat treatment incorporating a chemical additive to reduce the time of treatment and minimize the growth loss of buds together with the GPB to increase the efficiency of the Lxx control. To this end, experiments were carried in order to measure the sprout speed rate (SSR), the surviving of diazotrophic bacteria by the most probable number (MPN) technique, the contribution of the biologic nitrogen fixation by the acetylene reduction technique and the Lxx control quantification throughout the qPCR using specific primers. The evaluated treatments were: Heat treatment with water at 52°C for 30'; heat treatment with 2% acetic acid solution; heat treatment in water at 52°C for 10 minutes + immersion in 2% acetic acid solution in ambient temperature; and samples without heat treatment or chemical additive; All of them with and without the inoculation of a mix including five bacteria (*Nitrospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Paraburkholderia tropica* and *Gluconacetobacter diazotrophicus*). Although the 2% acetic acid used as chemical additive in the heat treatment had no antimicrobial effect on the Lxx control, this solution is promising in terms of improving technology in the establishment of *Paraburkholderia tropica* and *Nitrospirillum amazonense*, increasing the nitrogenase activity and the buds' sprouting. These results were obtained when the small stalks suffered the heat treatment with water at 52°C for 10 minutes and immersed in the 2% acetic acid solution. As a result, the change in the traditional heat treatment may be a viable and inexpensive alternative for both microorganisms, establishing the beneficial bacteria and promoting the partial control of the disease.

Keywords: *Saccharum officinarum*. *Saccharum* spp. Thermotherapy. Diazotrophic bacteria. *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Minitoletes de cana-de-açúcar cortados e padronizados..... 8
- Figura 2.** Tratamento térmico de minitoletes de cana-de-açúcar sem aditivos (A) e com aditivos em sacos para autoclave (B)..... 8
- Figura 3.** Esquema do preparo dos minitoletes. 1- material propagativo; 2- minitoletes padronizados; 3A- Tratamento térmico convencional; 3B- Tratamento térmico com ácido acético 2% a 52°C; 3C1- Toletes imersos em água a 52°C por 10 min; 3C2- Toletes imersos em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente por 10 min; 4- inoculação; 5- plantio; 6- NMP; 7- plantio; 8- qPCR..... 10
- Figura 4.** Minitoletes em frascos de vidro fechados com tampa adaptada com válvula para retirada e injeção do ar, contendo 3 minitoletes com pelo menos uma planta com parte aérea armazenados em Fitotron. 11
- Figura 5.** Procedimentos para Análise de Redução de Acetileno. A) Retirada de 10% de ar do volume total do frasco e injeção de 10% do volume total do frasco de Acetileno. B) Injeção das amostras retiradas dos frascos após incubação por 1, 3 e 5h em cromatógrafo de gás. 12
- Figura 6.** Preparo de amostras de tecido vegetal em nitrogênio líquido para extração de DNA. 13
- Figura 7.** Contagem células das cinco estirpes de bactérias diazotróficas pelo método NMP nos minitoletes tratados no experimento 2 nos meios semi-sólidos LGI, JNFb e LGIp-caldo. Controle:sem tratamento térmico e sem inoculação; STT_I: sem tratamento térmico e inoculado; conv: 30 min em água a 52°C; conv_I: 30 min em água a 52°C e inoculado; Ác. Acétiuj: 10 min em ácido acético a 52°C; Ác. Acé_I: 10 min em ácido acético a 52°C e inoculado; 10+10: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente; 10+10_I: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente e inoculado. 18
- Figura 8.** Fragmentos de DNA alvo amplificados por PCR utilizando amostras de DNA genômico da Lxx diluída em série e primers (F/R) desenhados nesse trabalho: A) Lxx12950F1/R1 B) Lxx12950_I, C) Lxx12950_II e D) Lxx12950_III. M: Marcador molecular, 106-101:correspondente as diluições 100, 10⁻¹,10⁻²,10⁻³,10⁻⁴,10⁻⁵,10⁻⁶,10⁻⁷ N° aproximado de cópias amplificadas e B: controle negativo (+/-): falso positivo *Xanthomonas albilineans*..... 22
- Figura 9.** Curvas de amplificação e de Melt. A) Curva de amplificação dos primers Lxx12950_I F/R; B) Curva de Melt dos primers Lxx12950_I F/R..... 23
- Figura 10.** Log do número de células / g de tecido fresco de cana-de-açúcar para os tratamentos: Controle: sem tratamento térmico e sem inoculação; STT_I: sem tratamento térmico e inoculado; conv: 30 min em água a 52°C; conv_I: 30 min em água a 52°C e inoculado; Ác. Acé: 10 min em ácido acético a 52°C; Ác. Acé_I: 10 min em ácido acético a 52°C e inoculado; 10+10: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente; 10+10_I: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente e inoculado..... 24
- Figura 11.** Log de número de células de cana de açúcar tratadas termicamente e inoculadas. Controle:sem tratamento térmico e sem inoculação; STT_I: sem tratamento térmico e inoculado; conv: 30 min em água a 52°C; conv_I: 30 min em água a 52°C e inoculado; Ác. Acé: 10 min em ácido acético a 52°C; Ác. Acé_I: 10 min em ácido acético a 52°C e inoculado; 10+10: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em

temperatura ambiente; 10+10_I: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente e inoculado.24

Figura 12. Análise de Redução de Acetileno em nmoles/g/h aos 18 DAP. Controle: sem tratamento térmico e sem inoculação; STT_I: sem tratamento térmico e inoculado; convencional: 30 min em água a 52°C; conv_I: 30 min em água a 52°C e inoculado; Ác. Acé: 10 min em ácido acético a 52°C; Ác. Acé_I: 10 min em ácido acético a 52°C e inoculado; 10+10: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente; 10+10_I: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente e inoculado.25

Figura 13. Redução de acetileno em cana de açúcar inoculada e tratada termicamente, em nmoles/g/h. Controle: sem tratamento térmico e sem inoculação; sem tratamento térmico inoculado: sem tratamento térmico e inoculado com mistura de 5 estirpes de bactérias diazotróficas; convencional: 30 min em água a 52°C; convencional inoculado: 30 min em água a 52°C e inoculado com mistura de 5 estirpes de bactérias diazotróficas.26

Figura 14. Redução de acetileno em cana de açúcar inoculada e tratada termicamente na presença de ácido acético em nmoles/g/h. Ácido Acético: 10 min em ácido acético a 52°C; Ácido Acético inoculado: 10 min em ácido acético a 52°C e inoculado com mistura de 5 estirpes de bactérias diazotróficas; Água + ácido acético : 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente; Água + ácido acético inoculado: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente e inoculado com mistura de 5 estirpes de bactérias diazotróficas.26

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Primers desenhados a partir do gene Lxx 12950 para amplificação de fragmento de DNA alvo no genoma da bactéria <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>Xyli</i>	15
Tabela 2. Massa fresca e seca de raízes e parte aérea do genótipo RB867515 incluindo nova metodologia de tratamento com ácido acético 2%.	20
Tabela 3. Índice de velocidade de Brotação e % de brotação do genótipo RB867515 inoculado com 5 estirpes de bactérias diazotróficas e tratado térmica e quimio-termicamente no último experimento.	20
Tabela 4. Valores ANOVA para os testes Tukey, Duncan e Scott Knott para <i>Paraburkholderia tropica</i> (Ppe8T).....	21
Tabela 5. Valores ANOVA para os testes Tukey, Duncan e Scott Knott para <i>Nitrospirillum amazonense</i> (CbAmc).....	21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. A Cana-de-Açúcar	2
2.2. O Raquitismo-da-Soqueira	3
2.3. Inoculação com Bactérias Diazotróficas.....	5
2.4. Inoculação x Tratamento Térmico	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1. Delineamento Experimental	7
3.2. Preparo dos Minitoletes para o Plantio	7
3.3. Preparo de Solução de Ácido Acético à 2%	8
3.4. Preparo do Inoculante	8
3.5. Parâmetros Avaliados	9
3.6. Parâmetros Agronômicos Avaliados	9
3.7. Análise de Redução de Acetileno	10
3.8. Detecção e Quantificação da <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>Xyli</i> (Lxx) em Tecido de Cana-de-açúcar Utilizando PCR convencional e PCR em Tempo Real (qPCR)	12
3.8.1. Experimento	12
3.8.2. Extração de DNA total de tecido de cana-de-açúcar	13
3.8.3. Isolamento de DNA bacteriano.....	14
3.8.4. Desenho de novos primers	14
3.8.5. Ensaio com PCR convencional	15
3.8.6. Ensaio com qPCR	15
3.8.7. Curva padrão	15
3.8.8. Quantificação da população de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>Xyli</i> em tecidos de cana ...	16
3.8.9. Análise estatística dos dados.....	16
3.9. Ensaio qPCR para Quantificar a População de Bactérias Usadas como Inoculante	16
3.9.1. Experimento	16
3.9.2. Extração de DNA total de raízes de cana-de-açúcar.....	17
3.9.3. Ensaio com qPCR e curva padrão.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5. CONCLUSÃO.....	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica para o Brasil, que é seu maior produtor mundial. A criação do Proálcool (Programa Brasileiro do Alcool) em 1975 deu grande impulso à cultura canavieira no Brasil. Com o apoio do governo ocorreu uma rápida expansão das áreas plantadas de cana-de-açúcar para produção de biocombustíveis. No Brasil, o sistema de plantio mais adotado é o convencional com grande quantidade de material propagativo sendo utilizado, em média de 15 a 20 Mg ha⁻¹. Com isso novas tecnologias de produção de mudas foram desenvolvidas e hoje, em pequena parcela dos plantios comerciais faz-se a utilização de mini-gemas crescidas em tubetes, onde se aplica o controle do raquitismo da soqueira pelo uso do tratamento térmico curto.

Apesar dos ganhos fitossanitários, dependendo da variedade há perdas advindas da sensibilidade a alta temperatura (52°C) mesmo adotando o de curta exposição (30 min). Novas alternativas foram testadas adicionando-se substâncias químicas de efeito bactericida com a redução do tempo de exposição das gemas. Uma destas substâncias utilizadas foi o ácido acético, tanto pela sua eficiência na redução de propágulos bacterianos tanto pelo seu baixo custo. A aplicação deste tratamento térmico e químico pode também atuar de forma positiva na introdução de novas bactérias benéficas, como o caso das diazotróficas.

A busca por maior sinergia e aumento dos ganhos na promoção do crescimento direcionou os estudos para a inoculação não apenas com um inóculo simples, mas com um conjunto de estirpes de bactérias com comprovados efeitos promotores de crescimento. A mistura das espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Paraburkholderia tropica*, mostraram que estas bactérias foram responsáveis por cerca de 31% da FBN nas plantas, dependendo da combinação de bactérias usadas.

A hipótese é que a termoterapia com tempo reduzido e com aditivo químico, usando ácido acético a 2% pode favorecer o estabelecimento inicial de bactérias diazotróficas usadas como inoculante de cana-de-açúcar e potencializar o efeito de biocontrole sobre o patógeno causador do raquitismo da soqueira.

O objetivo deste trabalho foi aperfeiçoar o tratamento térmico com a incorporação de um aditivo químico, de forma a reduzir o tempo do tratamento e minimizar perdas de brotação das gemas e juntamente com a inoculação com as BPC's, melhorar a eficiência no controle da Lxx.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica para o Brasil, que é seu maior produtor no mundo, com uma área plantada de 10,2 milhões de hectares e uma safra em 2017/2018 de 29,04 milhões de toneladas de açúcar (CONAB, 2019). Entre os principais estados brasileiros produtores se destacam São Paulo (54%), Minas Gerais (8,4%) e Paraná (8%) com expansão significativa da cultura nos últimos anos nos Estados de Minas Gerais e Goiás.

Pertencente à família *Poaceae*, a cana-de-açúcar atualmente tem suas espécies classificadas como *Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule* (BARBOSA et al., 2002). As espécies *S. spontaneum* e *S. robustum* são selvagens, mais utilizadas em programas de melhoramento para incorporar características como vigor, dureza e resistência à doenças, enquanto *S. officinarum* é mais conhecida por seu alto teor de sacarose. As cultivares mais utilizadas no Brasil são híbridos interespecíficos provenientes de cruzamentos entre as seis espécies.

Os primeiros genótipos a serem utilizados foram os híbridos de *S. officinarum* e *S. barberi*, que posteriormente foram substituídos por canas nobres em decorrência da sua susceptibilidade ao vírus do mosaico. As canas nobres predominaram nos canaviais até o surgimento da epidemia de gomose, causada pela bactéria *Xanthomonas vascularum*. Diversos genótipos passaram a ser utilizados a partir de então, porém também apresentando problemas fitossanitários, o que acabou por impulsionar os programas de melhoramento genético que garantiram o sucesso da cultura no país.

Mas foi em 1975 com a criação do Programa Brasileiro do Álcool Combustível (Proálcool) que a cultura canavieira brasileira teve um grande impulso. Criado com o objetivo de produzir álcool combustível para ser adicionado à gasolina, o programa proporcionou que parte da matéria prima utilizada para a produção de açúcar fosse destinada à produção de biocombustível, uma alternativa menos poluente e mais barata. A crise do açúcar em 1980 e o desenvolvimento de motor automotivo movido à álcool impulsionaram o Proálcool, que em 1981 recebeu apoio do Banco Mundial devido à previsão de subida de preços do petróleo e a busca de investimentos em energias renováveis (NITSCH, 1991).

O aumento na produção de cana entre 1975 e 1985 foi de 120 para 240 milhões de toneladas, e embora tenham ocorrido grandes avanços na produção de etanol nas décadas de 70 e 90, de lá pra cá os ganhos em produtividade e eficiência foram mais discretos (MACEDO; NOGUEIRA, 2004). Nas primeiras décadas após a criação do Proálcool a produção alcooleira cresceu de 600 milhões de L ano⁻¹ (1975-76) para 3,4 bilhões de L ano⁻¹ (1979-80) enquanto na safra de 2017/2018 foram produzidos 27,8659 milhões de m³ de etanol de acordo com a ÚNICA (União da indústria de cana-de-açúcar). Quatro décadas após a criação do Proálcool, o Brasil vive um processo de expansão dos canaviais (que deixaram de se concentrar no Nordeste e São Paulo e expandiram para o cerrado) e investimento em tecnologias para aumento de produtividade e eficiência da cultura. Aumentar a produtividade da cana-de-açúcar requer melhorias na produção da cana-de-açúcar como: desenvolvimento de variedades mais produtivas e resistentes a pragas e doenças, alternativas mais sustentáveis de manejo e fertilidade do solo, além de produção de mudas sadias para renovação de canaviais.

Nesse contexto, o Instituto Agrônomo de Campinas- IAC, com o objetivo de produzir mudas com alto padrão de qualidade fitossanitária, vigor e uniformidade no plantio desenvolveu o sistema de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar (MPB), pois a propagação vegetativa ocorre a partir de material isento de doenças, denominados colmos-sementes,

provenientes de viveiros básicos com idade entre 6 a 10 meses, que são acompanhados tecnicamente em todas as práticas de manejo, sem mistura varietal (LANDELL et al., 2013). Além de muitos outros benefícios, esse sistema também proporciona ganhos econômicos, com redução do volume de colmos no plantio mecanizado, que atualmente é de 20 Mg ha⁻¹ (LANDELL et al., 2013).

Através do sistema MPB é possível se realizar uma seleção, a fim de se eliminar minitoletes com sintomas de pragas e doenças, promover a brotação das gemas e o desenvolvimento do sistema radicular, realizar a repicagem, onde somente as mudas brotadas serão aproveitadas. No sistema MPB é possível produzir mudas prontas para ir a campo em cerca de 60 dias (LANDELL et al., 2013). Uma das vantagens do sistema MPB está no fato dele permitir um maior controle fitossanitário das mudas produzidas, seja pela seleção dos minitoletes ou pelos tratamentos que podem ser empregados como o fúngico e o térmico, que ajudam a prevenir as principais doenças da cana-de-açúcar, como o Raquitismo-da-soqueira.

2.2. O Raquitismo-da-Soqueira

O raquitismo-da-soqueira, causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) é uma das doenças da cana-de-açúcar mais difundidas nas regiões produtoras (DAVIS; BAILEY, 2000), acarretando danos superiores a 30% na produtividade (YOUNG et al., 2006).

Originalmente classificada no gênero *Clavibacter xyli* e recentemente reclassificada como *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* com base na análise de genética de rRNA (EVTUSHENKO et al., 2000), essa bactéria foi confirmada como agente causal do raquitismo da soqueira nos anos 80, devido aos importantes prejuízos causados à cultura canavieira após a revolução verde e o advento da mecanização. Porém, os relatos dos primeiros casos da doença coincidem com a época em que foram desenvolvidos os primeiros híbridos de *Saccharum spontaneum* com *S. officinarum*. Não se sabe ao certo a sua origem e disseminação, mas sabe-se que sua associação com gramíneas é longa devido à proximidade com outro endófito de gramíneas, a *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis*.

Geneticamente, a Lxx é bem uniforme, não apresentando variação genética de DNA no 16S rRNA quando comparados isolados de diferentes países. Isolados australianos apresentaram 100% de identidade de sequência com um isolado brasileiro CTCB07 (BRUMBLEY et al., 2006; MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Características como tamanho reduzido do genoma (CTCB07 2.584.158 pares de base e com um conteúdo de GC de 68%), a perda de genes de vida livre e a presença de poucos genes de patogenicidade sugerem uma longa interação com o hospedeiro, mas não necessariamente como patógeno (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Os genes de patogenicidade presentes sugerem transferência lateral e estão envolvidos na síntese de ácido abscísico, por exemplo, o que causa o nanismo. Fisiologicamente, a Lxx afeta a atividade da invertase ácida em gemas, interferindo nos parâmetros fotossintéticos, além de comprovada interferência na síntese de hormônios como a auxina e o ácido giberélico.

A análise genômica da Lxx sugere que ela é capaz de utilizar diversos açúcares além da glicose como fonte de carbono, possuindo um sistema enzimático capaz de degradar esses açúcares, e essa característica é importante do ponto de vista da interação do patógeno com a cana-de-açúcar e sua colonização no xilema, onde há maior concentração de açúcares. Além disso, apresenta transportadores de metais como manganês e ferro e genes que indicam a utilização de fontes de nitrogênio como nitrito/nitrato encontrados no xilema (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Dessa forma, o meio de cultura utilizado para seu isolamento, o M-SC (TEAKLE; RYAN; 1992) modificado baseia-se em uma fonte de nitrogênio, proveniente basicamente de peptona de soja, uma de ferro quelatizado, na forma de hemina

bovina e uma fonte de carbono na forma de glicose. Torna-se necessária a adição do aminoácido cisteína e de albumina bovina.

A *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é uma actinobactéria Gram-positiva, corineforme, não móvel, aeróbia obrigatória e restrita ao xilema da planta de cana-de-açúcar, que apresenta natureza fastidiosa, pois por ser nutricionalmente exigente, é difícil de isolar, cultivar e detectar. Suas células baciliformes medem de 0,25-0,5 µm por 1-4 µm, com forma reta ou levemente curva e, ocasionalmente, inchada na ponta ou no meio (TEAKLE et al., 1973). As colônias apresentam aspecto circular não pigmentado, com diâmetro variando de 0,1 a 0,3 mm em meio de cultura M-SC (TEAKLE; RYAN 1992). Por esse motivo as técnicas para detecção se restringem à microscopia e testes sorológicos que apresentam algumas desvantagens como habilidade do avaliador e quantidade de amostras.

Um aspecto interessante do comportamento da Lxx está no fato de que, até o momento, o único hospedeiro natural descrito é a cana-de-açúcar e a disseminação do patógeno é feita planta a planta através de implementos de corte. Os sintomas mais comuns são caracterizados devido ao entupimento dos vasos, encurtamento de entrenós e subdesenvolvimento dos colmos rebrotados da touceira depois da colheita. Porém, tais sintomas podem variar de acordo com a idade da planta, a variedade infectada e o tipo de solo onde a cana-de-açúcar está plantada, o que dificulta o diagnóstico visual. Os danos causados pela Lxx podem ser agravados por déficit hídrico, onde a estimativa de perda chega a 60%, e um manejo inadequado do canavial, tais como: não desinfecção dos implementos de corte utilizados, não aquisição de mudas/sementes sadias ou mesmo o uso de matrizes contaminadas para produção de novas mudas.

Uma das formas de controle da infecção pela bactéria causadora da doença é através do tratamento térmico. O binômio tempo x temperatura, apesar de não eliminar completamente o inóculo bacteriano de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, apresenta um certo controle na infecção, o que torna o seu uso comum nesse sentido. Duas combinações são empregadas atualmente no Brasil: 52°C por 30 min (COPERSUCAR, 1989) ou 50°C por 2 h (DAMANN & BENDA, 1983). Dessas, a primeira é a preferencialmente empregada pelas unidades produtoras por apresentar um tempo reduzido e permitir o tratamento de um número maior de toletes.

O tratamento térmico, porém, consiste em um procedimento, além de oneroso, bastante trabalhoso, demandando um grande gasto energético para o tratamento dos toletes. Tendo em vista o presente exposto, FERNANDES JÚNIOR et al., (2010) realizou um experimento visando aperfeiçoar o tratamento térmico com a incorporação de aditivos ao tratamento 52°C, que possibilitassem uma maior eficiência no controle da Lxx, pouca interferência na brotação e menor tempo de termoterapia. Concluiu que o tratamento térmico mais eficiente para eliminação total do patógeno foi o de 52 °C por 2h, seguido dos tratamentos com os aditivos CH₃COOOH 2% + SDS 1%, HCl 1% e CH₃COOOH 2%, com 81, 80 e 75% de controle respectivamente. O tratamento tradicional de 52 °C por 30 min, somente proporcionou controle de 67% do patógeno apesar de não afetar a brotação, porém apresentando alto índice de escape, tendo a menor taxa de controle de Lxx dentre os cinco tratamentos estudados.

Baseando-se nesse estudo de Fernandes Junior et al., (2010), e tendo em vista a utilização de um produto de fácil aquisição e baixo custo para utilizar como aditivo químico à termoterapia, foi sugerido o uso de solução de ácido acético 2% associado à termoterapia por 10 min a 52°C. O efeito desse tratamento sobre a Lxx porém, ainda não foi testado. Um experimento que resultou em um trabalho de conclusão de curso apontou um efeito positivo do uso de ácido acético 2% no tratamento térmico, quando comparado com outros aditivos químicos, na brotação de mudas pré-brotadas inoculadas com múltiplas bactérias diazotróficas.

2.3. Inoculação com Bactérias Diazotróficas

As bactérias diazotróficas promotoras de crescimento de plantas (BDPCP) são residentes epifíticas ou endofíticas, não patogênicas, que atuam diretamente promovendo o crescimento ou indiretamente como agentes de controle biológico de doenças de plantas. A associação entre bactérias diazotróficas e a cana-de-açúcar pode ser vista em diversos gêneros bacterianos e possui mecanismos que ainda são pouco compreendidos. Entre as bactérias associadas à cana-de-açúcar destacam-se as espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988), *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (GILLIS et al., 1991; BALDANI et al., 1996), *Burkholderia* spp. (REIS et al., 2004; PERIN et al., 2006) reclassificada para o gênero *Paraburkholderia* (OREN e GARRITY, 2015) e *Nitrospirillum amazonense* (LIN et al., 2014)

A busca por uma maior sinergia e aumento dos ganhos na promoção do crescimento direcionou os estudos para a inoculação não apenas com um inóculo simples, mas com um conjunto de estirpes de bactérias com comprovados efeitos promotores de crescimento. A mistura das espécies diazotróficas endofíticas *G. diazotrophicus*, *Nitrospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Paraburkholderia tropica* inoculadas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, crescidas em vaso com solo durante doze meses, mostraram que estas bactérias foram responsáveis por cerca de 31% do N oriundo da fixação biológica de nitrogênio (FBN), dependendo de combinação de bactérias usadas e variedade testada bem como o solo e clima do local de plantio (OLIVEIRA et al., 2002; 2006).

BDPCP podem promover o crescimento das plantas por vias diretas como produção de fitohormônios, FBN, solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, oxidação do enxofre, aumento da permeabilidade das raízes e produção de sideróforos (TAN & ZOU, 2001), e também por mecanismos indiretos como o biocontrole de pragas e doenças. Ao produzirem metabólitos antimicrobianos, algumas rizobactérias através da interação com as raízes das plantas, acabam induzindo resistência a microrganismos patogênicos, a chamada resistência sistêmica induzida (ISR), que também ativa a produção de hormônios que atuam na defesa da planta contra infecções por diversos patógenos vegetais. Além disso, as BDPCP podem induzir a promoção de crescimento através de outros mecanismos, como competição por nutrientes, exclusão de nichos e ocupação dos sítios de infecção (AHEMAD; KIBRET, 2014; SARAF; RAJKUMAR, 2011), sendo este último interessante no biocontrole da *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* pois as bactérias diazotróficas, descritas para a cultura da cana-de-açúcar, poderiam atuar colonizando o interior dos vasos do xilema e competindo por sítios de colonização com as bactérias patogênicas.

Estudos recentes têm sido direcionados a buscar melhor entender os mecanismos de supressão de doenças por BDPCP para diversas culturas de interesse agrônomo devido à necessidade de se reduzir o uso de defensivos agrícolas que oferecerem riscos ao meio ambiente e aos seres vivos. Diversos trabalhos apontam que além de representar uma alternativa mais sustentável, as BDPCP promovem ganhos na produção por aumento de biomassa, resistência a stress hídrico, produção de grãos, etc (BRAGA et al., 2018; CANUTO et al., 2003; DOTTO et al., 2010; SALA et al., 2008). Na cana-de-açúcar em particular, a inoculação com BDPCP pode não só aumentar a produtividade de biomassa, como também antecipar a maturação das plantas (SILVA et al., 2019).

2.4. Inoculação x Tratamento Térmico

Em seu estudo sobre a influência do tratamento térmico no desenvolvimento inicial de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar, DE MARCO et al. (2016) observaram que o tratamento térmico a 52°C por 30 min inibiu o desenvolvimento inicial em duas cultivares de cana-de-açúcar, o que pode ser uma característica prejudicial a adoção do método já conhecido na literatura, sendo dependente da variedade estudada bem como da fonte de onde as gemas foram retiradas. Segundo CHAVES et al. (2015) o inoculante misto promoveu efeito positivo na velocidade de brotação de variedades de cana-de-açúcar, levando a concluir que o efeito inibitório da termoterapia poderia ser mitigado pela inoculação com bactérias diazotróficas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A fim de se avaliar o efeito do tratamento térmico e da adição do componente químico (quimiotérmico) associado à inoculação na brotação inicial de gemas individualizadas de cana-de-açúcar, foram montados dois experimentos. O primeiro comparando os genótipos IACSP95-5000 e RB867515 e o segundo avaliando apenas o genótipo RB867515.

Para o primeiro experimento, que comparava os genótipos IAC955000 e RB867515 foram delineados os seguintes tratamentos:

Tratamentos térmicos:

- T1 - sem tratamento térmico ou aditivo (controle);
- T2- tratamento térmico somente com água a 52°C por 30";
- T3- tratamento térmico em solução de ácido acético 2% a 52°C por 10 min.

Tratamentos de inoculação (TI) com bactérias diazotróficas:

- T1- controle sem inoculação;
- T2- inoculado com a mistura de 5 estirpes (*Nitrospirillum amazonense* (Na), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Hr), *Paraburkholderia tropica* (Pt), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd));
- T3- inoculação com *Nitrospirillum amazonense* (Na).

3.1. Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, 3 (tratamentos térmicos) x 3 inoculações x 4 repetições para o genótipo IACSP95 5000 totalizando 36 caixas. Para o genótipo RB867515, devido à menor quantidade de minitoletes em decorrência da presença de broca observada, diminuiu-se o número de repetições para 3, mantendo-se os fatores, totalizando 27 caixas.

3.2. Preparo dos Minitoletes para o Plantio

Da região mediana das plantas de cana-de-açúcar foram retirados, com auxílio de uma guilhotina, minitoletes individualizados contendo uma gema vegetativa e primórdios radiculares cada um. O material foi padronizado para que tivessem o mesmo tamanho e divididos em grupos de 6 unidades para posterior plantio em caixas.



Figura 1. Minitoletes de cana-de-açúcar cortados e padronizados.

3.3. Preparo de Solução de Ácido Acético à 2%

A solução utilizada como aditivo ao tratamento térmico, foi preparada com a diluição de 200 mL de ácido acético em 10 L de água destilada (solução a 2%). Em seu experimento testando diferentes aditivos ao tratamento térmico, (FERNANDES JÚNIOR et al., 2010) não descreveu como realizou a termoterapia com aditivos químicos. Em virtude disso, no presente trabalho, nos tratamentos térmicos apenas com água, os minitoletes foram submersos em banho-maria diretamente (Figura 2A). Para os tratamentos com ácido acético, os minitoletes foram colocados em sacos plásticos para autoclave contendo em seu interior 5 L da solução em temperatura ambiente e submersos no banho-maria, e o tempo para a termoterapia foi cronometrado a partir do momento em que o mostrador digital marcou 52°C (Figura 2B).

A)



B)



Figura 1. Tratamento térmico de minitoletes de cana-de-açúcar sem aditivos (A) e com aditivos em sacos para autoclave (B).

3.4. Preparo do Inoculante

O inoculante foi preparado pelo laboratório de Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia em meio líquido. Antes da inoculação foi realizada uma contagem de células viáveis de bactérias diazotróficas através do método NMP nos inoculantes utilizados para que se atestasse que estivessem dentro dos padrões exigidos pela legislação que é de no mínimo 10^8 células viáveis mL de inoculante⁻¹ (BALDANI et al., 2014). No experimento 1 a contagem do inoculante para cada estirpe foi de: $1,1 \times 10^9$ cel mL⁻¹ para a *Herbaspirillum*

seropedicae BR11335 e $1,4 \times 10^9$ cel mL⁻¹ para *Herbaspirillum rubrisubalbicans* BR11504, *Nitrospirillum amazonense* BR11145, *Paraburkholderia tropica* BR11366 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* BR11281.

3.5. Parâmetros Avaliados

Durante o desenvolvimento vegetal, realizou-se o acompanhamento do índice de velocidade de brotação (IVB) e avaliação da sobrevivência de bactérias diazotróficas pelo Método do Número Mais Provável (NMP).

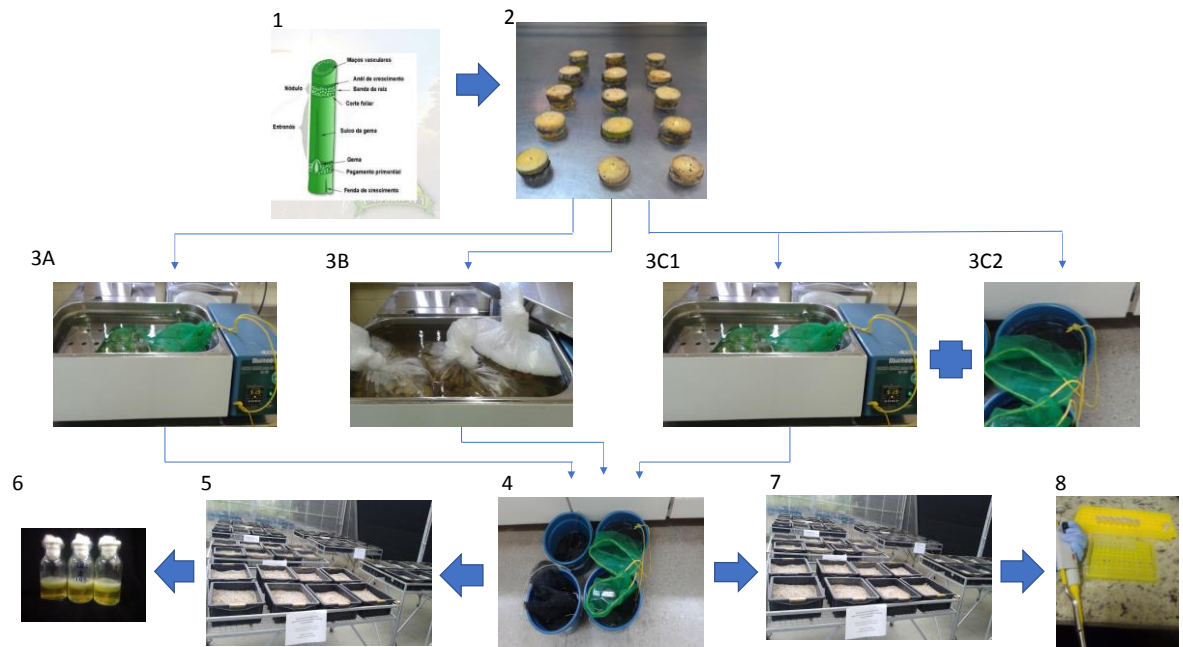
A brotação foi avaliada periodicamente, e, com os valores contabilizados, foi calculado o índice de velocidade de brotação de MAGUIRE (1962), aqui denominado de índice de velocidade de brotação (IVB), conforme a seguinte equação: $IVB = (B1/N1 + B2/N2 + B3/N3 + \dots + B10/N10)$, em que Bn é o número de brotações computadas nas “n” contagens e Nn é o número de dias do plantio das gemas até as “n” contagens.

A sobrevivência de bactérias diazotróficas foi avaliada coletando-se amostras aos 3 e aos 15 dias após o plantio (DAP). Para cada tratamento foi feita uma amostra composta, coletando-se um minitolete de cada repetição e juntando-os na mesma amostra, totalizando 9 amostras. Esse material vegetal foi lavado em água corrente para remover o substrato aderido à superfície. Em seguida, cortados em pedaços, secos em toalha de papel, pesados 10 g e triturados em 90 mL de solução salina por 1 a 2 min. Após repouso por 30 a 60 min, foram feitas diluições seriadas das amostras em solução salina até 10^{-8} , e posteriormente as diluições foram inoculadas em meios semissólidos LGI, JNFB e LGI-P caldo. Em seguida, as culturas foram incubadas a 30°C, por um período de cinco a dez dias, para a avaliação da formação de película característica na superfície do meio, para estimar a população de bactérias de interesse deste experimento pelo método NMP consultando a tabela de McCrady (BALDANI et al., 2014).

3.6. Parâmetros Agronômicos Avaliados

Foram avaliados no dia da coleta: massa fresca de parte aérea, massa fresca de raízes. Posteriormente, o material vegetal foi armazenado em sacos de papel e acondicionados em estufa de circulação forçada, a 65°C até peso constante para determinação de massa seca de parte aérea e raízes.

No segundo experimento, onde avaliou-se somente o genótipo RB867515, algumas alterações foram feitas a fim de se refinar os resultados obtidos. Os parâmetros avaliados permaneceram os mesmos do primeiro experimento, sendo eles: IVB, avaliação da sobrevivência de bactérias diazotróficas pelo Método do Número Mais Provável (NMP) e aspectos agronômicos: massa fresca e seca de parte aérea e raízes. Primeiramente, excluiu-se a inoculação somente com *Nitrospirillum amazonense* (Na), mantendo a inoculação com mistura de 5 estirpes de bactérias diazotróficas: *Nitrospirillum amazonense* (Na), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Hr), *Paraburkholderia tropica* (Pt), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd)). A quantidade de mini-toletes foi aumentada para 12 por caixa. Foi trocado o inoculante líquido pelo turfoso. A avaliação da sobrevivência de bactérias diazotróficas foi realizada aos 2 e aos 28 DAP, utilizando-se amostras simples, onde as repetições foram avaliadas separadamente, dando origem a 24 amostras. Foram feitas diluições seriadas das amostras em solução salina até 10^{-10} . O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 3 tratamentos térmicos x 2 inoculações x 4 repetições totalizando 24 caixas. A contagem do inoculante usado foi de $2,5 \times 10^9$ cel mL⁻¹ para a BR11335 $0,25 \times 10^9$ cel mL⁻¹ para a BR11504; $1,5 \times 10^9$ cel mL⁻¹ para BR11145; $4,5 \times 10^9$ cel mL⁻¹ para BR11366 e $4,5 \times 10^9$ cel mL⁻¹ para BR11281.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 2. Esquema do preparo dos minitoletes. 1- material propagativo; 2- minitoletes padronizados; 3A- Tratamento térmico convencional; 3B- Tratamento térmico com ácido acético 2% a 52°C; 3C1- Toletes imersos em água a 52°C por 10 min; 3C2- Toletes imersos em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente por 10 min; 4- inoculação; 5- plantio; 6- NMP; 7- plantio; 8- qPCR.

3.7. Análise de Redução de Acetileno

Bactérias diazotróficas reduzem acetileno a etileno pois o acetileno inibe a reação de redução do N_2 pela nitrogenase. Esse efeito antagônico permite avaliar de forma indireta a atividade da nitrogenase em bactérias diazotróficas ou em tecidos colonizados por elas (BODDEY et al., 2007). O etileno é facilmente detectado por um cromatógrafo de gás equipado com um ionizador de chama e devido a sua grande sensibilidade é possível detectar concentrações na ordem de nmols.

Para avaliar a atividade da nitrogenase através da análise de redução de acetileno foi preparado um experimento em frascos de vidro em câmara de crescimento com iluminação, irrigação e temperatura controladas (Figura 3).

Os tratamentos térmicos empregados foram:

T1- Sem tratamento térmico;

T2- Tratamento térmico em água por 30min a 52°C;

T3- Tratamento térmico em solução de ácido acético 2% por 10 min a 52°C;

T4- Tratamento térmico em água por 10min a 52°C + imersão em solução de ácido acético 2% por 10min em temperatura ambiente.

Os tratamentos de inoculação (TI) com bactérias diazotróficas foram:

T1- sem inoculação;

T2- inoculado com a mistura de 5 estirpes *Nitrospirillum amazonense* (Na), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Hr), *Paraburkholderia tropica* (Pt), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, 4 tratamentos térmicos x 2 inoculações x 2 repetições para a variedade RB867515 cultivada no campo experimental da Embrapa Agrobiologia.

A metodologia usada foi a descrita por Boddey et al. (2007) com algumas adaptações. Os frascos de vidro foram preenchidos com 800g de areia + vermiculita 1:1 previamente autoclavadas. Em cada frasco foram plantados 3 minitoletes preparados conforme descrito nos itens 3.2, 3.3 e 3.4, exceto para o T4 que foi constituído por 2 etapas: a primeira foi imersa por 10 min no tratamento térmico em banho maria somente com água. A segunda os minitoletes já tratados foram imersos em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente por 10 min.



Figura 3. Minitoletes em frascos de vidro fechados com tampa adaptada com válvula para retirada e injeção do ar, contendo 3 minitoletes com pelo menos uma planta com parte aérea armazenados em Fitotron.

Aos 13 dias após o plantio, quando todos os vasos apresentavam ao menos uma planta com parte aérea brotada, as medições da atividade de redução de acetileno se iniciaram. Em cada frasco foi colocado uma tampa contendo uma válvula para retirada e injeção de ar. Os frascos foram vedados e de seu interior foram retirados com auxílio de uma seringa 10% do volume de ar contido no frasco (A). A mesma quantidade de acetileno foi injetada em cada frasco, que posteriormente foram incubados por 1, 3 e 5h na câmara de crescimento. De cada frasco foram coletadas 2 repetições técnicas de 1ml do conteúdo gasoso para ser analisado no cromatógrafo de gás equipado com um ionizador de chama (B).

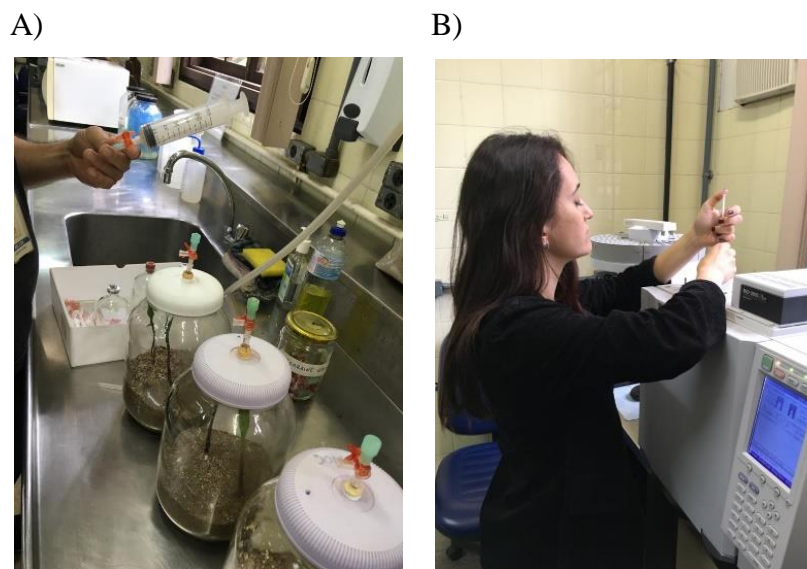


Figura 4. Procedimentos para Análise de Redução de Acetileno. A) Retirada de 10% de ar do volume total do frasco e injeção de 10% do volume total do frasco de Acetileno. B) Injeção das amostras retiradas dos frascos após incubação por 1, 3 e 5h em cromatógrafo de gás.

3.8. Detecção e Quantificação da *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* (Lxx) em Tecido de Cana-de-açúcar Utilizando PCR convencional e PCR em Tempo Real (qPCR)

3.8.1. Experimento

A fim de avaliar quantitativamente a população do patógeno causador do raquitismo-da-soqueira, foi montado um experimento utilizando matrizes de cana-de-açúcar variedade CB49260 infectadas com o patógeno *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*. O experimento foi montado em blocos casualizados: 4 tratamentos térmicos x 2 inoculações x 4 repetições

Os tratamentos térmicos empregados foram:

T1- Sem tratamento térmico;

T2- Tratamento térmico em água por 30min a 52°C;

T3- Tratamento térmico em solução de ácido acético 2% por 10 min a 52° C;

T4- Tratamento térmico em água por 10min a 52°C + imersão em solução de ácido acético 2% por 10 min em temperatura ambiente.

Os tratamentos de inoculação (TI) com bactérias diazotróficas foram:

T1- sem inoculação;

T2- inoculado com a mistura de 5 estirpes (*Nitrospirillum amazonense* (Na), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Hr), *Paraburkholderia tropica* (Pt), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação sendo os minitoletes acomodados em areia + vermiculita 1:1 estéril, contidas em caixas de 10 kg pelo período de 30 dias. Após a brotação e formação das mudas de cana-de-açúcar, foi realizado o transplântio para vasos de 6 kg contendo areia + vermiculita 1:1. A adubação das plantas de cana-de-açúcar foi realizada conforme o Manual de Calagem e Adubação para o Estado do Rio de Janeiro (FREIRE et al.,

2013) para a cultura: Carbonato de cálcio 6 g 10 kg⁻¹, Sulfato de magnésio 4,8 g 10 kg⁻¹, KCl 0,5 g 10 kg⁻¹, Superfosfato simples 2,25 g 10 kg⁻¹ e FTE 0,15 g 10 kg⁻¹.

Para análise da população de *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*, após 52 dias do plantio, foram coletados as folhas mais novas e raízes das plantas. Esses tecidos foram embrulhados em papel alumínio e imediatamente congelados em nitrogênio líquido (-170 °C) e posteriormente armazenadas em super freezer a -80°C.

3.8.2. Extração de DNA total de tecido de cana-de-açúcar

A extração de DNA a partir dos tecidos vegetais foi realizada de acordo com a metodologia CTAB (DOYLE, 1991). Para isso, utilizou-se 0,3 g de tecido vegetal macerado com auxílio de nitrogênio líquido até a obtenção de pó fino. A massa de tecido vegetal foi acomodada em microtubos de 2 mL estéril no qual adicionou-se também 1 mL do tampão CTAB pré-aquecido a 65 °C. Posteriormente, a mistura foi homogeneizada por 30 s em agitador do tipo Vórtex. Em seguida, as amostras foram incubadas por 20 min em banho-maria a 65°C, sendo homogeneizadas a cada 5 min. Depois, as amostras foram acomodadas em bancada, e após atingirem temperatura ambiente, adicionou-se a elas 3 µL de RNase e 3 µL de proteinase K, com homogeneização entre a adição de uma e outra, sendo incubadas em banho-maria a 37 °C por 30 min com homogeneizações a cada 10 minutos. Em seguida foram adicionados 600 µL de Clorofórmio-Álcool Isoamílico 24:1 (CIA) com homogeneização e centrifugação a 13.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para microtubos de 2 mL estéril e repetiu-se a lavagem com 700 µL de CIA. Novamente o sobrenadante foi coletado e transferido para microtubos de 1,5 mL. Ao volume recuperado foi adicionado 70% de Isopropanol. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas manualmente por 10x suavemente e em seguida centrifugadas a 10.000xg por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao pellet formado foi adicionado 500 µL de álcool 70%. Após nova centrifugação a 10.000 x g por 5 min, descartou-se o sobrenadante e o pellet formado foi deixado em capela com fluxo de ar ligado para secagem por 2 h. O pellet (DNA) foi reidratado com 100 µL de solução de reidratação QIAGEN.

O rendimento (ng µL⁻¹) e a pureza (260/280) nm de DNA total isolado foi quantificado por espectrometria de massa utilizando o aparelho NanoDrop1000 (Thermo Scientific, EUA) e por fluorometria por meio do aparelho Qubit®(Invitrogen). Além disso, a integridade e também pureza do DNA total isolado foram analisadas em gel de agarose 0,9 % submetido a eletroforese, após ser corado com solução de brometo de etídeo 1% (v:v), descorado em água destilada e registrado em fotodocumentador.



Figura 5. Preparo de amostras de tecido vegetal em nitrogênio líquido para extração de DNA.

3.8.3. Isolamento de DNA bacteriano

O DNA genômico da *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* foi extraído utilizando-se o Wizard® Genomic DNA Purification kit (PROMEGA, 2010). Foram centrifugados 1mL durante a noite por 2 min a 13000-16000 x g (velocidade máxima da centrífuga) e descartado o sobrenadante. As células foram suspensas em 480 µL 50mM EDTA e adicionados 120 µL de lytic enzyme(s) [lisozima e/ou lisosostafina] e o material foi incubado por 30-60 minutos a 37°C. Após nova centrifugação por 2 min a 13000-16000 x g (velocidade máxima da centrífuga) e removido o sobrenadante, procedeu-se a etapa de Lise celular onde foram adicionados 600 µL de solução de lise nucleica e pipetado suavemente para misturar. Depois de incubado a 80°C por 5 min, foi deixado resfriar até atingir a temperatura ambiente para adicionar 3 µL de solução de RNase e incubar a 37°C por 15-60 min e novamente deixado resfriar até atingir a temperatura ambiente

Para precipitação do DNA e reidratação, transferiu-se o sobrenadante para um tubo limpo contendo 600 µL de mix isopropanol a temperatura ambiente e os “pellet cells” foram centrifugados para decantar o sobrenadante. Adicionou-se 600 µL de mix etanol 70% em temperatura ambiente e submeteu-se a nova centrifugação por 2 min a 13000-16000 x g (velocidade máxima da centrífuga). O etanol foi retirado e os “pellets” foram deixados secar ao ar por 10 a 15 min. Os “pellets” de DNA foram reidratados com 100 µL de solução de reidratação por 1 hora a 65°C ou durante a noite a 4°C.

3.8.4. Desenho de novos primers

O par de primer Lxx12950 F1/R1 foi desenhado para detecção e quantificação da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* (CARVALHO et al., 2016). Esses primers amplificam na PCR a partir do DNA genômico da *Lxx*, o fragmento de DNA alvo de tamanho igual a 106 pb. Eles foram testados nesse estudo conforme condições estabelecidas no trabalho de (CARVALHO et al., 2016) e sob diferentes concentrações na PCR e qPCR. No entanto, os ensaios de PCR e qPCR utilizando esses primers mostraram que eles são específicos, porém possuem baixa sensibilidade e formam ampliações inespecíficas quando submetidos à amplificação de amostras de DNA mais diluídas da *Lxx*. Portanto, decidiu-se desenhar novos primers a partir do mesmo gene Lxx12950, predito único no genoma da *Lxx*, selecionado no trabalho de CARVALHO et al., (2016). O par de primer Lxx12950 F1/R1 (CARVALHO et al., 2016) foi redesenhado de modo que amplificasse e mantivesse a região originalmente de 106 pb do gene Lxx 12950, dando origem ao novo par Lxx12950I F/R. Além desse, foram desenhados mais dois novos pares de primer (Tabela 1). Os novos primers foram desenhados conforme as seguintes recomendações: i- tamanho entre 18 a 25 bases; ii- temperatura de Melting próxima 60 °C; iii- diferença da temperatura de Melting entre primers (*forward* e *reverse*) menor que 2 °C; iv- produto a ser amplificado entre 75 e 150 pb; v- conteúdo CG entre 40 e 60 % e vi- conter de duas a três bases C e/ou G na extremidade OH-3' (GREEN and SAMBROOK, 2019).

Tabela 1. Primers desenhados a partir do gene Lxx 12950 para amplificação de fragmento de DNA alvo no genoma da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*

Primers	Sequência (5'-3')	Amplicon	Referência
Lxx 12950 F1	GCACATCGATCTGGAAAAAAGG	106 pb	CARVALHO et al. (2016)
Lxx 12950 R1	CCGCAGTCTCACGCATAACC		
Lxx 12950I F	ACCTCGCTTTCGCACATCG	106 pb	
Lxx 12950I R	GCATACCGTACACAGTGAGG		
Lxx 12950II F	TTCGAGCAGACCCAACTCG	156 pb	Este estudo
Lxx 12950II R	CTCCGTATACAGGCTCAGG		
Lxx 12950III F	CGCTCAAATCCTGGCGAC	151 pb	
Lxx 12950III R	CCCCGCTTCATAGAACGG		

3.8.5. Ensaio com PCR convencional

Utilizando esses novos primers desenhados para a Lxx o mix para PCR foi preparado adicionando: 3,0 µL de Buffer 5x; 1,2 µL MgCl₂ 25 mM; 0,25 µL dNTP 10 mM; 0,25 µL de cada primer (F/R) 10 µM; 0,075 µL de *Taq Polimerase* 5 U; 2 µL das amostras do DNA alvo diluído em série, com fator de diluição igual a 10; e adicionando água ultra pura para o volume final de 15 µL. As condições de reação foram de *desnaturação* a 95 °C por 5 min (*desnaturação* de 95 °C por 45 s, *anelamento* de 60 °C por 30 s, *extensão* por 72 °C por 1 min) x 35 ciclos e *extensão final* de 72°C por 5 min.

3.8.6. Ensaio com qPCR

Os ensaios com qPCR foram realizados no equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) e utilizando o corante de fluorescência Sybr Green do kit comercial GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA). O mix para qPCR consistiu em 7,5 µl de SYBR Green; 0,25 µL de cada primer (F/R), 0,1 µL Cxr, 5 µL da amostra de DNA e água ultra pura para o volume final de 15 µL. As condições da reação consistiram em: 95 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 20 s e 60 °C por 1 min.

3.8.7. Curva padrão

Para construção da curva padrão foram utilizados na qPCR os primers desenhados nesse trabalho. Para tal, a amostra de DNA genômico da *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* foi padronizado para a concentração inicial de ~10 ng µL⁻¹ a qual foi diluída em série de 10⁻¹ até 10⁻⁶, com fator diluição igual a 10. A curva foi plotada com 5 µL de cada amostra diluída. O número de cópias de DNA alvo correspondente a massa de DNA genômico de cada diluição (ponto da curva) foi determinado a partir do tamanho do genoma da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* igual a 2.584.158 bp (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004) a constante de Avogadro (6,023 x 10²³) e o peso molecular de cada base de DNA (660 Da bp⁻¹). Dessa forma, a curva padrão foi plotada usando log₁₀ 10⁷ a 10¹ cópias de DNA alvo correspondente ao valor Ct fornecido pela qPCR.

As eficiências de amplificação dos primers foram determinadas pela Equação 1. Onde *E* corresponde a eficiência de amplificação (%) em função *S* que representa o valor de inclinação da curva padrão gerada. O valor de *E* é determinado conforme a Equação 1 a seguir:

$$\text{Equação 1} \quad E = 10^{-\left(\frac{1}{S}\right)} - 1 \quad (1)$$

3.8.8. Quantificação da população de *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* em tecidos de cana

Os ensaios de qPCR utilizando as amostras de DNA total isoladas de tecidos de cana-de-açúcar foram realizados em triplicatas técnicas para as quatro repetições biológicas. As amostras de DNA foram inicialmente padronizadas para $\sim 10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ utilizando espectrometria de massa e posteriormente conferidas por fluorometria. Para os ensaios de qPCR foram adicionados 5 μL de cada amostra ao mix elaborado conforme o subitem anterior. Ensaios com qPCR. As condições da qPCR também foram iguais as citadas no item anterior.

Considerando que no genoma da *Lxx* tenha apenas um trecho do DNA alvo amplificado na qPCR, o número de cópias de fragmento alvo total amplificados pela técnica, com o auxílio dos primers desenhados nesse trabalho, corresponde ao número de células de *Lxx* presentes nas amostras de DNA. No entanto, as amostras de DNA total isoladas dos tecidos de cana-de-açúcar que foram utilizadas na qPCR passaram por diluições. Portanto, para estimar o número de células de *Lxx* por grama de tecido fresco foi utilizada a Equação 2 a seguir, que corrige o efeito de diluição nas amostras.

$$\text{Equação 2} \quad \text{N}^\circ \text{ de células} = (A \times B \times C) / (D \times E) \quad (2)$$

Onde, A é a quantidade de fragmentos alvo ou células obtidas por meio do valor Ct na qPCR; B é a concentração de DNA genômico isolado em $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$; C é o volume no qual o DNA extraído foi reidratado em μL ; D é a massa de DNA total empregada na qPCR em ng; e E é a massa de tecido vegetal utilizada para extração de DNA em g.

3.8.9. Análise estatística dos dados

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com 4 repetições. Para a análise dos dados foram feitas avaliações da homogeneidade das variâncias dos erros pelo Teste de Bartlett e da normalidade pelo Teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos à análise de variância, com a aplicação do teste F e posteriormente submetidos ao teste de médias de Scott-Knott e Tukey ($\leq 0,05$), utilizando o programa estatístico R[®] Studio versão 1.2.5033.

3.9. Ensaio qPCR para Quantificar a População de Bactérias Usadas como Inoculante

3.9.1. Experimento

Um terceiro experimento foi montado em casa-de-vegetação com o genótipo RB867515 a fim de obter material para ensaio em qPCR para avaliar quantitativamente a população de BPC. O experimento foi montado em blocos casualizados: 4 tratamentos térmicos x 2 inoculações x 4 repetições, totalizando 32 parcelas.

Os tratamentos térmicos empregados foram:

T1- Sem tratamento térmico;

T2- Tratamento térmico em água por 30min a 52°C (convencional);

T3- Tratamento térmico em solução de ácido acético 2% por 10 min a 52°C;

T4- Tratamento térmico em água por 10min a 52°C + imersão em solução de ácido acético 2% por 10 min em temperatura ambiente.

Os tratamentos de inoculação (TI) com bactérias diazotróficas foram:

T1- sem inoculação;

T2- inoculado com a Mistura de 5 estirpes (*Nitrospirillum amazonense* (Na), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Hr), *Paraburkholderia tropica* (Pt), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd).

Os parâmetros avaliados permaneceram os mesmos do primeiro experimento, sendo eles: IVB, avaliação da sobrevivência de bactérias diazotróficas pelo Método do Número Mais Provável (NMP) e aspectos agrônômicos: massa fresca e seca de parte aérea e raiz.

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação sendo os minitoletes acomodados em areia + vermiculita 1:1 estéril contidas em caixas de 10 kg pelo período de 30 dias. No total foram colocadas 12 minitoletes por caixa e as brotações foram acompanhadas diariamente. Ao final do experimento as plantas foram medidas, pesadas e de cada parcela foi separada 1 planta para retirada de amostras de raiz e parte aérea armazenadas em nitrogênio líquido para posterior extração de DNA para análise de qPCR.

3.9.2. Extração de DNA total de raízes de cana-de-açúcar

A extração de DNA das raízes de cana-de-açúcar seguiu a mesma metodologia CTAB (DOYLE, 1991) descrita para extração de DNA de parte aérea. Porém, para esse ensaio, devido a algumas amostras apresentarem pouca quantidade de material vegetal, utilizou-se 0,250 g de tecido vegetal macerado com auxílio de nitrogênio líquido até a obtenção de pó fino. A massa de tecido vegetal foi acomodada em microtubos de 2 mL estéril no qual adicionou-se também 850 µL do tampão CTAB pré-aquecido a 65 °C. Posteriormente, a mistura foi homogeneizada por 30 s em agitador do tipo Vórtex. Em seguida, as amostras foram incubadas por 20 min em banho-maria a 65°C, sendo homogeneizadas a cada 5 min. Depois, as amostras foram acomodadas em bancada, e após atingirem temperatura ambiente, adicionou-se a elas 2 µL de RNase e 2 µL de proteinase K, com homogeneização entre a adição de uma e outra, sendo incubadas em banho-maria a 37 °C por 30 min com homogeneizações a cada 10 min. Em seguida foram adicionados 750 µL de Clorofórmio-Álcool Isoamílico 24:1 (CIA) com homogeneização e centrifugação a 13.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para micro tubos de 2 mL estéril e procedeu-se uma etapa de clareamento com adição 750 µL de Fenol Clorofórmio álcool isoamílico. Repetiu-se a lavagem com 500 µL de CIA. Novamente o sobrenadante foi coletado e transferido para microtubos de 1,5 mL. Ao volume recuperado foi adicionado 500 µL de Álcool absoluto. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas manualmente por 10x suavemente e em seguida centrifugadas a 10.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao pellet formado foi adicionado 500 µL de álcool 70%. Após nova centrifugação a 10.000 x g por 5 min, descartou-se o sobrenadante e o pellet formado foi deixado em capela com fluxo de ar ligado para secagem por 2 h. O pellet (DNA) foi reidratado com 100 µL de solução de reidratação QIAGEN.

O rendimento (ng µL⁻¹) e a pureza (260/280 nm) de DNA total isolado foram quantificados por espectrometria de massa utilizando o aparelho NanoDrop1000 (Thermo Scientific, EUA).

3.9.3. Ensaio com qPCR e curva padrão

O ensaio com qPCR foi realizado conforme o descrito para detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* supra citado nesse trabalho. Os primers utilizados foram desenhados conforme descrito por (SILVA, 2017) bem como a extração do DNA genômico das 5 bactérias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando a inoculação com mistura de 5 estirpes de bactérias diazotróficas aos 2 e 28 DAP no genótipo RB867515, obtiveram-se os resultados que mostraram uma interação positiva entre a inoculação com mistura de bactérias diazotróficas e os tratamentos térmicos e quimiotérmicos empregados nesse estudo para o meio LGIP-caldo, semisseletivo para *Paraburkholderia tropica* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Figura 6). Tanto no tratamento térmico convencional quanto no tratamento quimiotérmico houve aumento do número de células viáveis por grama de tecido vegetal. Por outro lado, houve um efeito negativo dos tratamentos utilizados no crescimento populacional de bactérias diazotróficas no meio semisseletivo JNFb onde crescem bactérias do gênero *Herbaspirillum* spp.

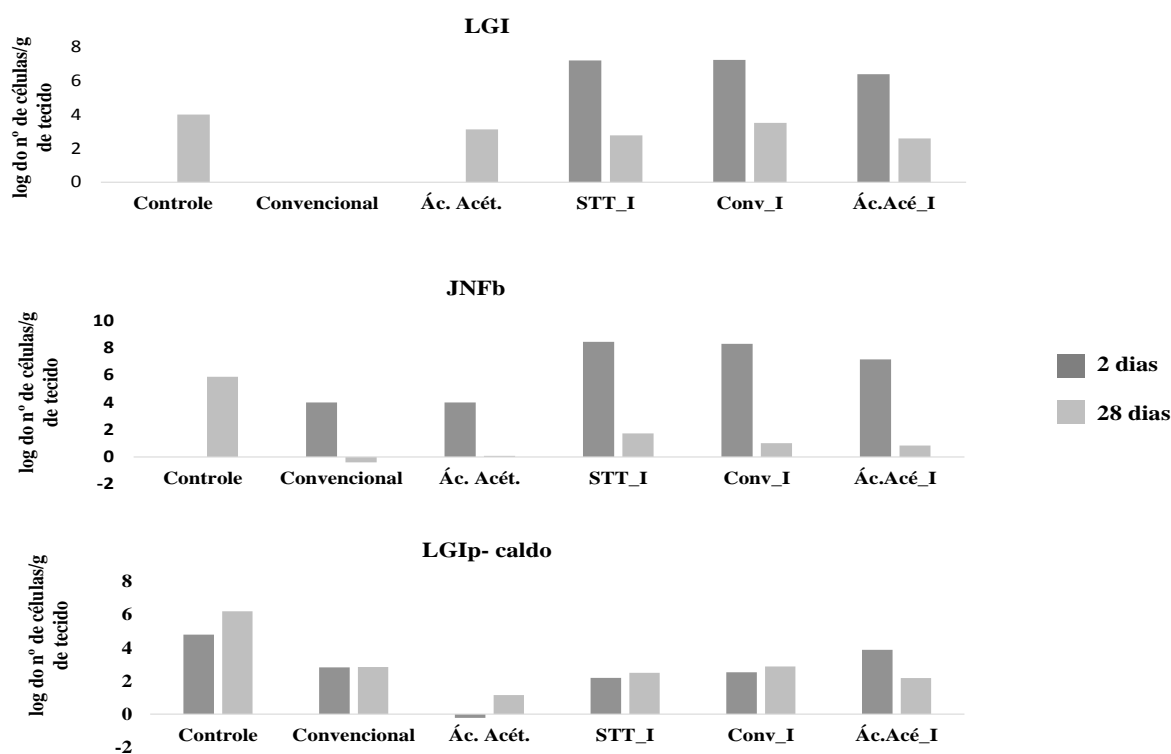


Figura 6. Contagem de células das cinco estirpes de bactérias diazotróficas pelo método NMP nos minitoletes tratados no experimento 2 nos meios semissólidos LGI, JNFb e LGIp- caldo. Controle: sem tratamento térmico e sem inoculação; STT_I: sem tratamento térmico e inoculado; conv: 30 min em água a 52°C; conv_I: 30 min em água a 52°C e inoculado; Ác. Acétiuj: 10 min em ácido acético a 52°C; Ác. Acé_I: 10 min em ácido acético a 52°C e inoculado; 10+10: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente; 10+10_I: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente e inoculado.

Tendo em vista aperfeiçoar o tratamento térmico com uso de ácido acético como aditivo químico para controle da Lxx, foi realizado um ajuste na metodologia, pois resultados preliminares apontavam um efeito negativo do ácido acético nas brotações, que poderia estar sendo provocado pelo fato das gemas estarem sendo “cozidas” na solução de ácido acético 2%. Neste novo tratamento, os minitoletes de cana-de-açúcar passaram a ser imersos por 10 min em banho-maria somente com água e posteriormente imersos por 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente. Dessa forma, foram avaliados novamente os

parâmetros agronômicos quando aplicados os dois tipos de tratamento com ácido acético, a fim de se obter um comparativo entre eles, e o que se observa é o que demonstra a Tabela 2.

Foi observado que os tratamentos com ácido acético diminuem a biomassa de parte aérea, entretanto, no tratamento onde os minitoletes são tratados em banho-maria com água e posteriormente imersos em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente esse impacto é menor, tanto para minitoletes inoculados quanto para não inoculados. Isso se comprova quando cruzamos com os dados do IVB, que evidenciam que o aditivo químico não prejudica a brotação, apesar de atrasá-la em alguns dias em relação aos outros tratamentos e ao controle, e que a inoculação favorece o percentual de gemas brotadas e o IVB (Tabela 3).

No ensaio qPCR para quantificação das populações de bactérias utilizadas como inoculante não foi possível detectar a presença de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (HCC103). As outras 4 bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar foram detectadas pela técnica, com destaque para a *Paraburkholderia tropica* e *Nitrospirillum amazonense* e suas quantificações em cada tratamento utilizado estão demonstradas nas Tabelas 5 e 6 a seguir.

Para a bactéria *Paraburkholderia tropica* (Ppe8^T) os resultados mostram que há influência da adição de ácido acético 2% ao tratamento térmico para o aumento da população de tal estirpe quando inoculada nos minitoletes de cana-de-açúcar. Embora não haja homogeneidade nos dados, pode-se observar que há diferença significativa quando há adição de ácido acético ao tratamento térmico e inoculação com BPC (Tabela 4). Da mesma maneira a inoculação com *Nitrospirillum amazonense* (CbAmc) não é afetada pelo tratamento térmico e a adição de ácido acético não reduz a população dessa estirpe, pelo contrário, parece estimular o seu crescimento (Tabela 5).

Tabela 2. Massa fresca e seca de raízes e parte aérea do genótipo RB867515 incluindo nova metodologia de tratamento com ácido acético 2%.

Tratamentos	MFR	MFPA	MSR	MSPA
Sem tratamento térmico inoculado	224,37 a	41,39 a	47,65 a	8,94 a
Controle	203,85 a	40,02 ab	42,25 a	7,34 ab
Convencional inoculado	228,35 a	31,22 ab	46,59 a	6,47 ab
10" água + 10" ácido acético	222,32 a	32,92 ab	44,55 a	6,45 ab
Convencional	212,81 a	32,57 ab	42,41 a	7,43 ab
10" ácido acético inoculado	204,95 a	26,91 b	40,52 a	5,47 b
10" água+10" ácido acético inoculado	217,90 a	30,70 b	42,94 a	6,01 ab
10" ácido acético	199,93 a	26,51 b	40,35 a	5,08 b
CV (%)	11,01	19,75	11,91	19,49

Tabela 3. Índice de velocidade de Brotação e % de brotação do genótipo RB867515 inoculado com 5 estirpes de bactérias diazotróficas e tratado térmica e quimio-termicamente no último experimento.

Tratamentos	IVB	% de Brotação
Sem tratamento térmico inoculado	32,50 a	100
Controle	28,75ab	88,89
Convencional inoculado	25,30 ab	77,78
10" água + 10" ácido acético	24,54 ab	88,89
Convencional	30,83 a	88,89
10" ácido acético inoculado	24,26 ab	86,67
10" água+10" ácido acético inoculado	26,09 ab	93,33
10" ácido acético	20,41 b	91,11
CV (%)	14,88	

Tabela 4. Valores ANOVA para os testes Tukey, Duncan e Scott Knott para *Paraburkholderia tropica* (Ppe8T).

<i>Paraburkholderia tropica</i> (Ppe8 ^T)					
Tratamentos	Log do nº de células	Tukey	Duncan	Scott Knott	
10" ácido acético inoculado	11.0586	a	a	A	
10" água+10"ácido acético inoculado	6.2900	a	a	A	
Sem tratamento térmico inoculado	10.352	ab	ab	A	
Convencional inoculado	5.8424	ab	ac	A	
Convencional	2.7861	ab	bc	B	
10" água + 10"ácido acético	0.0000	b	c	B	
10' ácido acético	0.0000	b	bc	B	
Controle	0.0000	b	bc	B	

Tabela 5. Valores ANOVA para os testes Tukey, Duncan e Scott Knott para *Nitrospirillum amazonense* (CbAmc).

<i>Nitrospirillum amazonense</i> (CbAmc)					
Tratamentos	Log do nº de células	Tukey	Duncan	Scott knott	
Sem tratamento térmico inoculado	114.507	a	a	A	
10" água+10"ácido acético inoculado	112.955	a	a	A	
10" ácido acético inoculado	111.515	a	a	A	
Controle	88.037	ab	ab	A	
Convencional inoculado	69.449	ac	ac	A	
Convencional	34.687	ac	bcd	B	
10" água + 10"ácido acético	21.290	bc	cd	B	
10' ácido acético	0.0000	c	d	B	

Com a finalidade de identificar e quantificar o agente causal do raquitismo-da-soqueira em plantas matrizes para produção de mudas pré-brotadas, foi desenvolvido um teste de PCR em tempo real (qPCR), onde a visualização de um fragmento de tamanho específico do DNA alvo permite identificar a presença e a quantidade de células do patógeno na amostra. O material vegetal foi preparado e padronizado conforme descrito por (CARVALHO et al., 2016) em seu trabalho para desenvolver uma especificação de protocolo de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para Lxx para avaliar a eficácia desta prática. Os primers descritos nesse trabalho foram utilizados, porém devido à sua baixa sensibilidade apresentada neste ensaio, foram desenvolvidos novos pares de primers espécie-específicos, que foram submetidos à testes de sensibilidade para escolha do que mais se adequasse a este ensaio.

As imagens obtidas da reação de PCR em gel de agarose através de fotodocumentador (Figura 1) mostram as bandas formadas quando utilizados os diferentes primers. Desta maneira, levando-se em consideração a maior sensibilidade nas menores diluições, foi escolhido o primer Lxx12950_I F/R desenhado para este ensaio com sensibilidade de detecção de até 10^{-5} que é equivalente a $\log 10^1$ número de cópias do fragmento alvo.

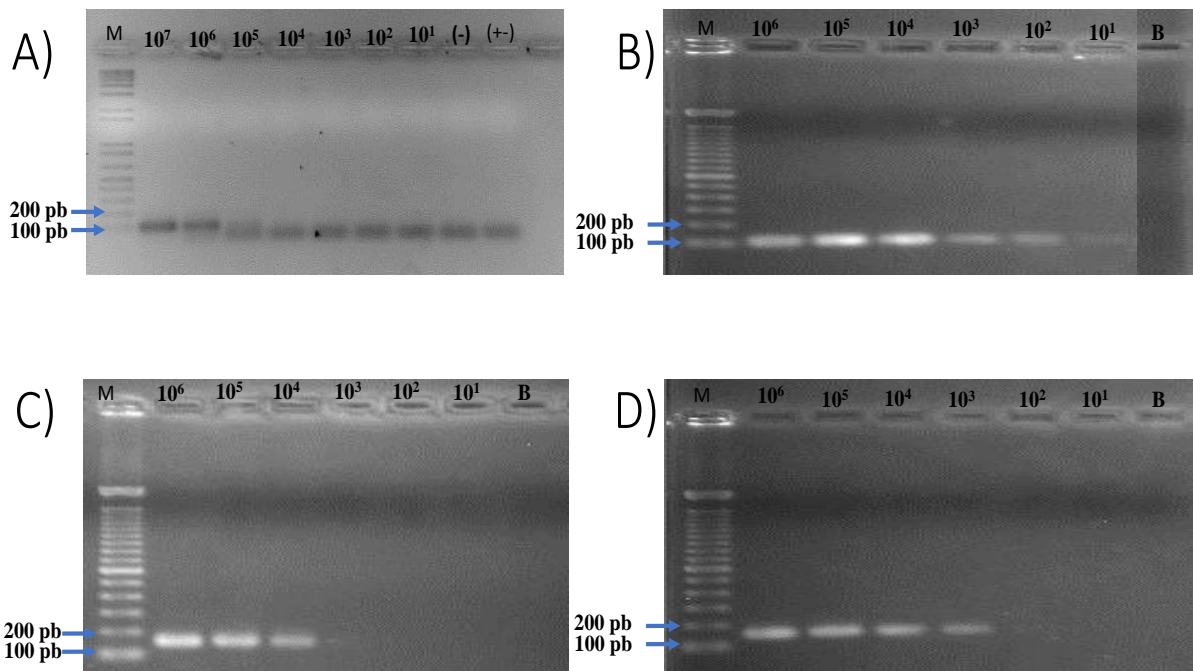


Figura 7. Fragmentos de DNA alvo amplificados por PCR utilizando amostras de DNA genômico da Lxx diluída em série e primers (F/R) desenhados nesse trabalho: A) Lxx12950F1/R1 B) Lxx12950_I, C) Lxx12950_II e D) Lxx12950_III. M: Marcador molecular, 106-101:correspondente as diluições 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹, 10⁰ N° aproximado de cópias amplificadas e B: controle negativo (+/-): falso positivo *Xanthomonas albilineans*.

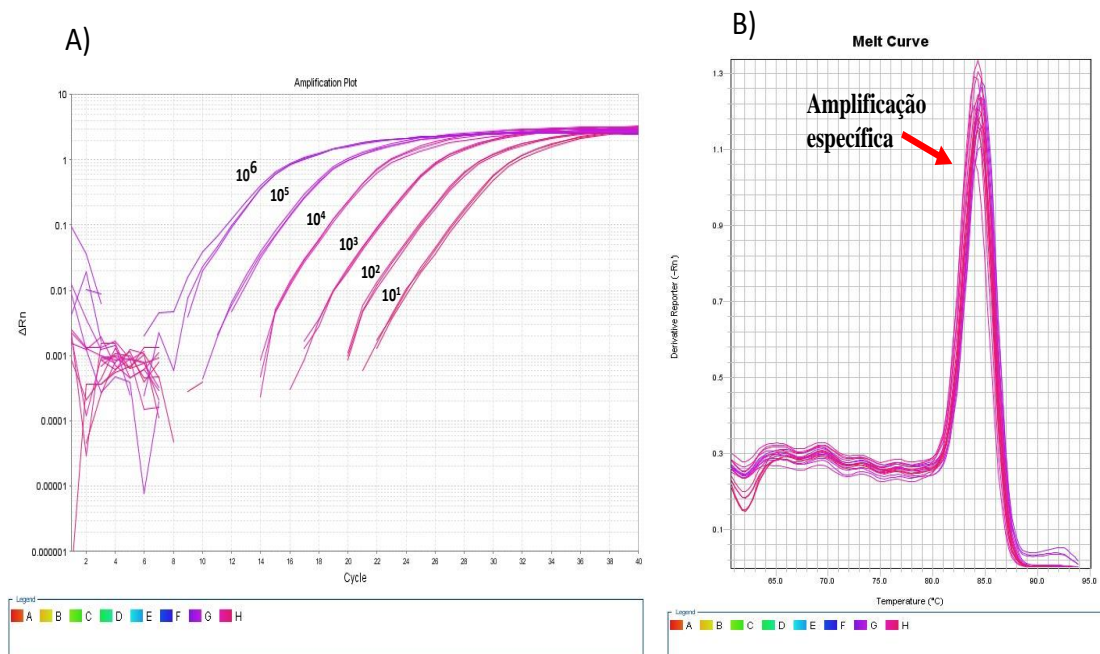


Figura 8. Curvas de amplificação e de Melt. A) Curva de amplificação dos primers Lxx12950_I F/R; B) Curva de Melt dos primers Lxx12950_I F/R.

Os dados obtidos dos ensaios com o primer Lxx12950_I (Figura 6) mostraram que dentre os tratamentos utilizados, o tratamento convencional (30 min em água a 52°C) apesar de apresentar redução no número de células de Lxx por grama de tecido fresco de cana-de-açúcar, apresenta escape, não eliminando totalmente o patógeno. Dentre os tratamentos quimiotérmicos propostos por este experimento, o tratamento onde os minitoletes são imersos em banho maria por 10 min a 52°C e posteriormente imersos em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente por 10 min com e sem inoculação é o que apresenta uma taxa de controle do patógeno próxima ao tratamento convencional.

Os dados obtidos pela análise de variância mostram que a inoculação com mais de 10^9 células. mL^{-1} de cada um dos componentes do inoculante antes da diluição provocou o aumento na população do patógeno em plantas não tratadas termicamente enquanto que o tratamento térmico convencional (30 min a 52°C) sem inoculação com bactérias diazotróficas promoveu a redução na população de Lxx.

Os tratamentos quimiotérmicos desenvolvidos para esse experimento não diferiram estatisticamente entre si no controle do patógeno causador do raquitismo-da-soqueira.

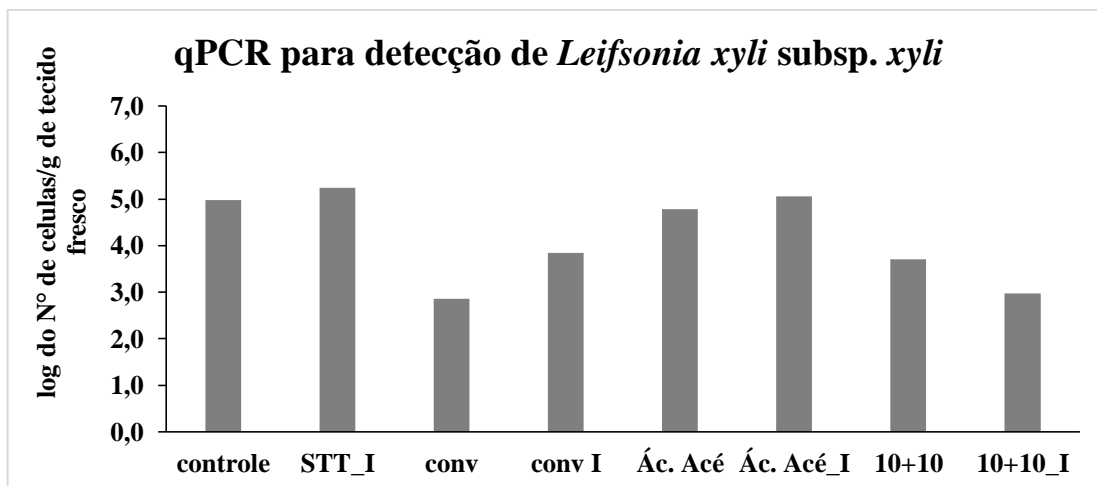


Figura 9. Log do número de células / g de tecido fresco de cana-de-açúcar para os tratamentos: Controle: sem tratamento térmico e sem inoculação; STT_I: sem tratamento térmico e inoculado; conv: 30 min em água a 52°C; conv_I: 30 min em água a 52°C e inoculado; Ác. Acé: 10 min em ácido acético a 52°C; Ác. Acé_I: 10 min em ácido acético a 52°C e inoculado; 10+10: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente; 10+10_I: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente e inoculado.

No gráfico Boxplot observa-se a maior contagem de células de Lxx no tratamento STT_I, que se diferiu significativamente do tratamento convencional onde há o menor número de células do patógeno, não sendo os demais tratamentos discriminados pela análise.

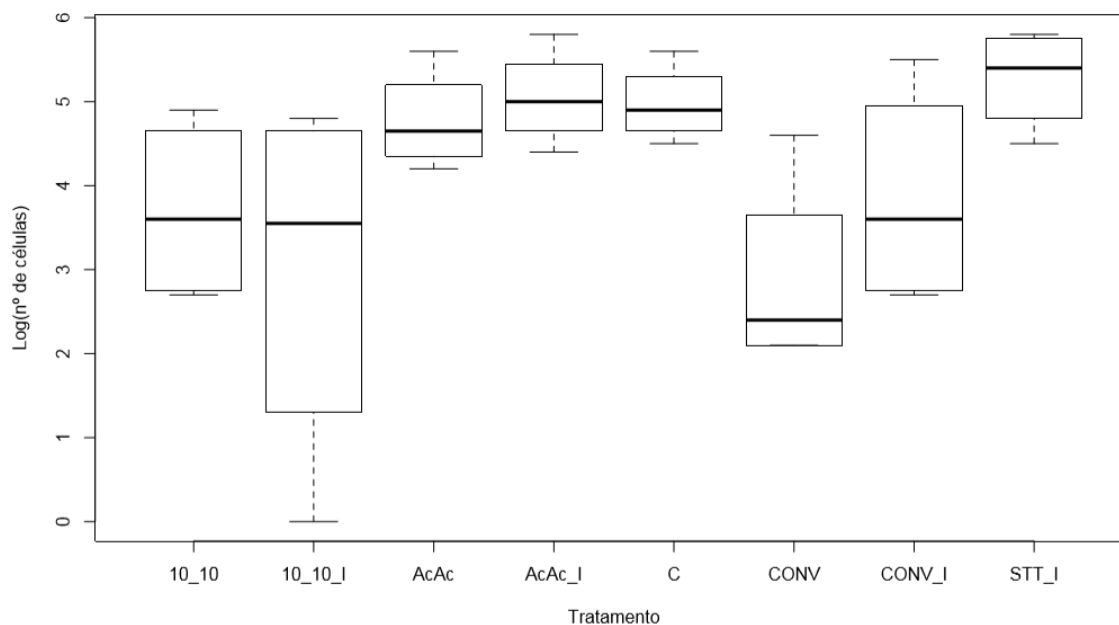


Figura 10. Log de número de células de cana de açúcar tratadas termicamente e inoculadas. Controle: sem tratamento térmico e sem inoculação; STT_I: sem tratamento térmico e inoculado; conv: 30 min em água a 52°C; conv_I: 30 min em água a 52°C e inoculado; Ác. Acé: 10 min em ácido acético a 52°C; Ác. Acé_I: 10 min em ácido acético a 52°C e inoculado; 10+10: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente; 10+10_I: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente e inoculado.

Os experimentos com Análise de redução de acetileno (ARA) indicaram variação da atividade da nitrogenase entre os tratamentos empregados. Foi indicado que a atividade máxima da nitrogenase ocorreu no tratamento onde os minitoletes foram imersos por 10 min no tratamento térmico em banho maria somente com água e posteriormente foram imersos em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente por 10 min, tanto para o tratamento inoculado quanto para o que não recebeu inoculação. As análises foram feitas dos 15 aos 21 DAP, porém foi aos 18 DAP que a atividade da nitrogenase tendeu a ser maior para tal tratamento.

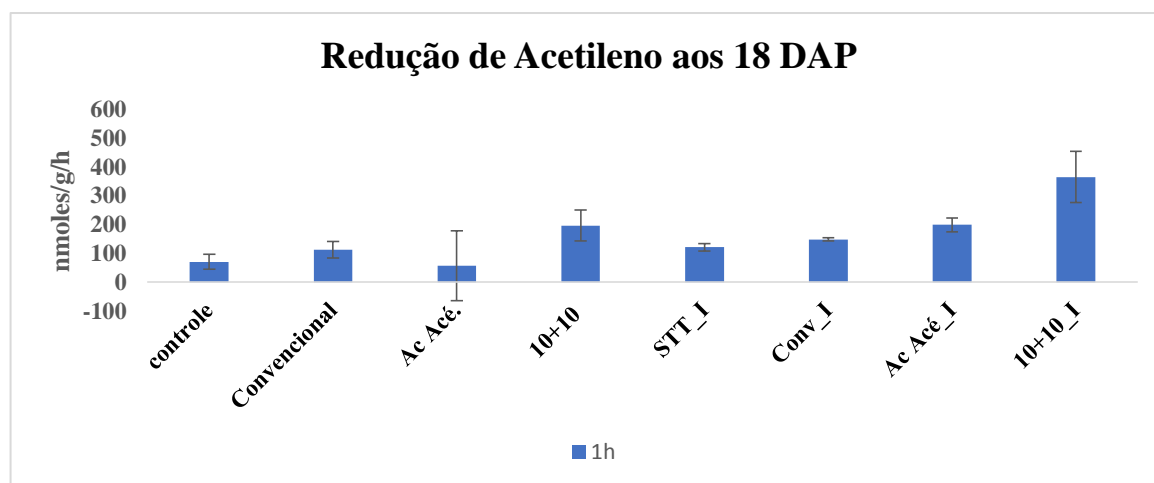


Figura 11. Análise de Redução de Acetileno em nmoles/g/h aos 18 DAP. Controle: sem tratamento térmico e sem inoculação; STT_I: sem tratamento térmico e inoculado; convencional: 30 min em água a 52°C; conv_I: 30 min em água a 52°C e inoculado; Ác. Acé: 10 min em ácido acético a 52°C; Ác. Acé_I: 10 min em ácido acético a 52°C e inoculado; 10+10: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente; 10+10_I: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente e inoculado.

Observando-se separadamente cada tratamento nos intervalos de incubação do acetileno, fica claro que o tratamento térmico em si, sem a adição de ácido acético não favorece o aumento na atividade da nitrogenase, pois nos ensaios onde os minitoletes receberam tratamento térmico convencional (30 min em água a 52°C) as concentrações de etileno em muito se parecem com as obtidas no controle, e quando inoculados também se assemelham ao aos que foram inoculados e não receberam tratamento térmico aos 18 DAP.

Com a adição de ácido acético ao tratamento térmico, há diferença da máxima atividade da nitrogenase em função do tempo. Enquanto sem inoculação ela ocorre aos 15 DAP, com inoculação ela varia de 18 a 21 DAP. Importante ressaltar que o tratamento térmico por 10 min em água e imersão posterior em solução de ácido acético 2% por 10 min dobra a concentração de etileno no tratamento inoculado quando comparado ao convencional.

O método de controle do raquitismo- da-soqueira na produção de mudas pré-brotadas atualmente se restringe ao uso da termoterapia no preparo dos minitoletes. Tal tratamento, porém apresenta escapes que servem como fonte de inóculo do patógeno. O desenvolvimento de um novo protocolo de preparo dos minitoletes para MPB pode ser eficazmente utilizado, visando não somente o controle do patógeno, como também o estabelecimento de BPCP's.

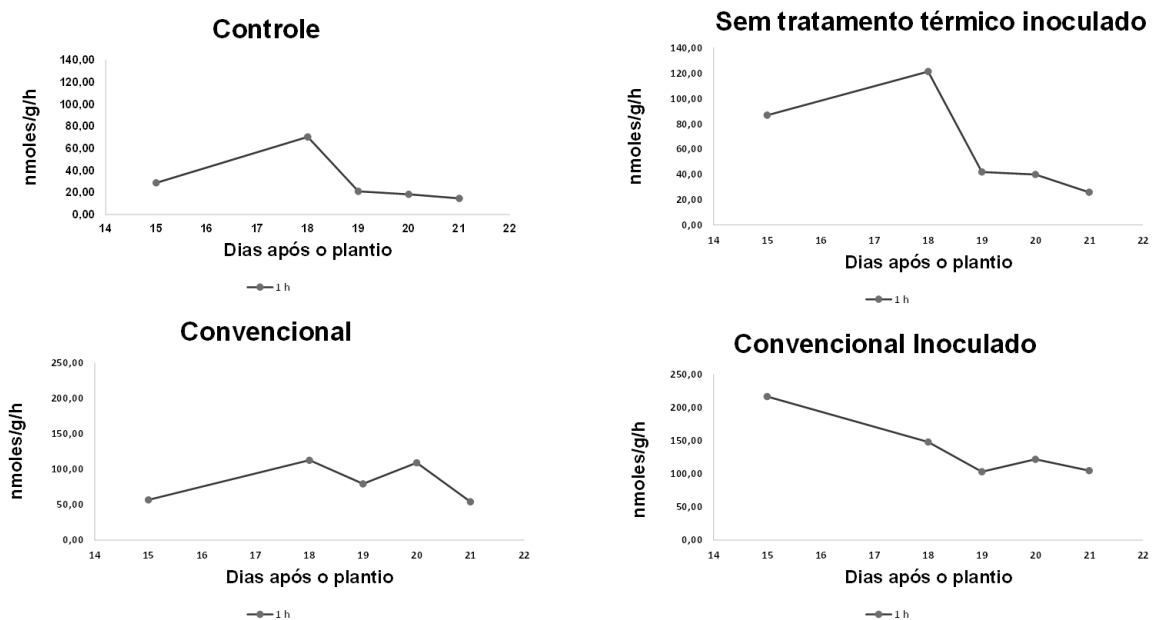


Figura 12. Redução de acetileno em cana de açúcar inoculada e tratada termicamente, em nmoles/g/h. Controle: sem tratamento térmico e sem inoculação; sem tratamento térmico inoculado: sem tratamento térmico e inoculado com mistura de 5 estirpes de bactérias diazotróficas; convencional: 30 min em água a 52°C; convencional inoculado: 30 min em água a 52°C e inoculado com mistura de 5 estirpes de bactérias diazotróficas.

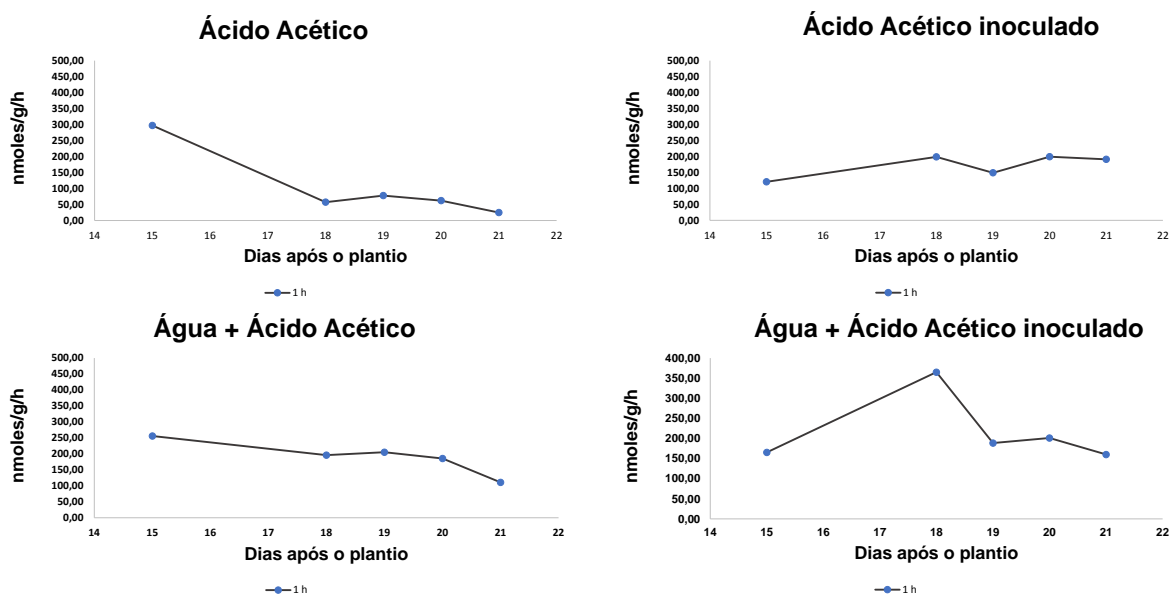


Figura 13. Redução de acetileno em cana de açúcar inoculada e tratada termicamente na presença de ácido acético em nmoles/g/h. Ácido Acético: 10 min em ácido acético a 52°C; Ácido Acético inoculado: 10 min em ácido acético a 52°C e inoculado com mistura de 5 estirpes de bactérias diazotróficas; Água + ácido acetico : 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente; Água + ácido acético inoculado: 10 min em água a 52°C e 10 min em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente e inoculado com mistura de 5 estirpes de bactérias diazotróficas.

Este trabalho desenvolveu um novo protocolo para produção de MPB's, diferente do descrito por LANDELL et al. (2012), onde além do tratamento térmico utilizou-se ácido acético 2% como aditivo químico para controle da Lxx baseando-se no que foi proposto e testado por (FERNANDES JÚNIOR et al., 2010). Tal tratamento foi utilizado levando-se em consideração a natureza antisséptica do ácido acético e por se tratar de um produto de baixo custo e fácil aquisição.

Embora o uso do ácido acético 2%, como aditivo no tratamento térmico de minitoletes para produção de mudas pré-brotadas não tenha apresentado efeito de erradicação sobre a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, foi possível alcançar resultados satisfatórios quando os minitoletes foram tratados termicamente por 10 min em banho maria com água a 52°C e posteriormente imersos por 10 minutos em solução de ácido acético 2% em temperatura ambiente e inoculado com BPCP's, levando-se em consideração o tratamento convencional que, segundo o ensaio realizado por FERNANDES JÚNIOR et al., (2010), teve uma taxa de controle da Lxx em torno de 67% e confirmado por CARVALHO et al., (2016) que apresenta escapes. No presente estudo, foi possível obter a diminuição do número de células de Lxx presentes na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar (expressos em log do nº de células por grama de tecido fresco) de 5,0 no controle para 3,0 no tratamento supra citado quando associado à inoculação com mistura de BPCP's.

Esse tratamento mostrou-se promissor como tecnologia de melhoria no estabelecimento de algumas BPCP's utilizadas como inoculante para cana-de-açúcar como a *Paraburkholderia tropica* e *Nitrospirillum amazonense*, aumentando a atividade da nitrogenase, o percentual de brotação de MPB's e produção de biomassa de parte aérea, levando a concluir que tais bactérias utilizem o ácido acético como fonte de carbono. No caso da RB867515, segundo dados de experimentação desenvolvida por REIS et al., (2009) foi observado que é uma variedade responsiva à inoculação, pelo menos para ganho de biomassa e havendo um tratamento que potencialize este ganho, há um impacto positivo na produtividade da cultura.

Ao avaliar a detecção de Lxx se constata que o uso em conjunto das 5 estirpes de BPCP's proporciona um melhor desempenho ao tratamento com ácido acético mencionado, pois tendo este tratamento um efeito de melhoria no estabelecimento das BPCP's e aumento na população de alguns importantes gêneros, estas estando em maior quantidade, passam a competir por nutrientes, espaço e oxigênio com o patógeno, suprimindo sua colonização e os efeitos negativos da doença conforme também observado por CARNEIRO JR et al., (2004) e SOUZA et al., (2011). Estes resultados ficam evidenciados quando comparamos com o controle onde há o maior número de células do patógeno ou com o tratamento convencional inoculado, onde, não havendo um favorecimento do aumento da população de BPCP's pelo ácido acético, não se obtém a diminuição esperada do título de Lxx tal como quando se associa inoculação e uso de tratamento térmico com posterior imersão no ácido acético 2%.

Por fim, com a análise de redução de acetileno (ARA) confirma-se que o ácido acético 2% favoreceu o aumento das bactérias diazotróficas atingindo valores de até 400 nmoles de $C_2H_4/g/h$, quase o dobro dos tratamentos sem uso deste aditivo e que mesmo após 18 DAP a atividade da nitrogenase mostrou-se alta. Como a metodologia de avaliação da redução de acetileno neste trabalho foi modificada, sendo realizada em ambiente fechado e com a planta *in vivo*, torna-se difícil comparar com outros trabalhos que foram realizados conforme a metodologia descrita por BODDEY et al., (2007) onde em culturas como o arroz inundado, a atividade da nitrogenase em bactérias nativas isoladas da rizosfera dessas plantas apresenta picos de 10 a 20 nmoles de $C_2H_4/g/h$ aos 8 dias de crescimento em meio JMV para a estirpe de *Paraburkholderia tropica* (Ppe8T) (RODRIGUES et al., 2006). No entanto, tomando como base as taxas obtidas no controle que estiveram em torno de 60 nmoles de $C_2H_4/g/h$ pode-se concluir que as taxas obtidas com adição de ácido acético 2% foram elevadas.

5. CONCLUSÃO

A modificação do tratamento térmico convencional pela incorporação do ácido acético 2% é uma alternativa viável e barata a ser adotada na produção de MPB, estabelecendo as bactérias benéficas e promovendo o controle da doença tal como o tratamento que é empregado atualmente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>>.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V.L.D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and soil**, v. 384, n. 1/2, p. 413-431, 2014.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SAMPAIO, M. J. A. M.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 8693, 1986.
- BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Localization of *Herbaspirillum* spp and *Burkholderia* sp. in rice root system. In: **International Symposium on Microbiol Ecology**, v. 7, 133 p. 1995.
- BARBOSA, G. V. S.; CRUZ, M. M.; SOARES, L.; ROCHA, A. M. C.; RIBEIRO, C. A. G.; SOUSA, A. J. R.; FERREIRA, J. L. C.; BARRETO, E. J. S.; SILVA, W. C. M.; SANTOS, A. V. P. A brief report on sugarcane breeding program in Alagoas, Brazil. **Cropp Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 613-616, 2002.
- BODDEY, L. H.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. A Avaliação da Fixação Biológica de N₂ Associada a Leguminosas e Não-Leguminosas Utilizando a Técnica da Redução do Acetileno: História, Teoria e Prática. **EMBRAPA - Documentos 245**, p. 43, 2007.
- BRAGA, G. M.; CHAGAS, L. F. B.; AMARAL, L. R. O.; MILLER, L. O.; CHAGAS, A. F. Efficiency of inoculation by bacillus subtilis on soybean biomass and productivity. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 13, n. 4, p. 9-14, 2018.
- BRUMBLEY, S. M.; PETRASOVITS, L. A.; HERMANN, S. R.; YOUNG, A. J.; CROFT, B. J. Recent advances in the molecular biology of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, n. 6, p. 681-689, 2006.
- CANUTO, E. D. L.; SALLES, J. F.; OLIVEIRA, A. L. M.; PERIN, L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, v. 37, n. 3, p. 67-72, 2003.
- CARNEIRO JR, J. B.; SILVEIRA, S. F. da; SOUZA FILHO, G. A. de; OLIVARES, F. L.; GIGLIOTI, É. A. Especificidade de anti-soro policlonal à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 614-619, 2004.
- CARVALHO, G.; DA SILVA, T. G. E. R.; MUNHOZ, A. T.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; AZEVEDO, R. A.; MELOTTO, M.; CAMARGO, L. E. A. Development of a qPCR for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and quantification of the effects of heat treatment of sugarcane cuttings on Lxx. **Cropp Protection**, v. 80, p. 51-55, 2016.

- CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.
- CHAVES, V. A.; SANTOS, S. G.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; REIS, V. M. Desenvolvimento inicial de duas variedades de Cana-de-Açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 6, 2015.
- COPERSUCAR. Binômio tempo x temperatura no controle do raquitismo da soqueira (RSD) da cana-de-açúcar, pelo processo de termoterapia em gemas isoladas. **Cadernos COPERSUCAR**, v. 25, 1989.
- DAMANN JR., K. E.; BENDA, G. T. A. Evaluation of commercial heat-treatment methods for control of ratoon stunting disease of sugarcane. **Plant Disease** v. 67, p. 966-967, 1983.
- DAVIS, M. J.; BAILEY, R. A. Ratoon stunting. In: ROTT, P.; BAILEY, R. A.; COMSTOCK, J. C.; CROFT, B. J.; SAUMTALLY, A. S. (Ed.). **A guide to sugarcane diseases**. Montpellier: CIRAD; ISSCT, 2000, p. 49-54.
- DE MARCO, E.; MATOSO E. S.; SCHAFER, J. T.; OSTERKAMP, W. F.; SILVA S. D. dos A. Influência do tratamento térmico no desenvolvimento inicial de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. **Revista da Jornada da Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp**, p. 641-655, 2016.
- DOTTO, A. P.; LANA, M. C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 3, p. 376-382, 2010.
- DOYLE, J. DNA Protocols for Plants. **Molecular Techniques in Taxonomy**, p. 283-293, 1991.
- EVTUSHENKO, L. I.; DOROFEEVA, L. V.; SUBBOTIN, S. A.; COLE, J. R.; TIEDJE, J. M. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of "*Corynebacterium aquaticum*" Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 371-380, 2000.
- FERNANDES JÚNIOR, A. R.; GANEM JÚNIOR, E. de J.; MARCHETTI, L. B. L.; URASHIMA, A. S. Avaliação de diferentes tratamentos térmicos no controle do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 1, p. 060-064, 2010.
- FREIRE, L. R.; BALEIRO, F. de C.; ZONTA, E.; ANJOS, L. H. C.; PEREIRA, M.; LIMA, E.; GUERRA, J. G. M.; FERREIRA, M. B. C.; LEAL, M. A. de A.; CAMPOS, D. V. B.; POLIDORO, J. C. **Manual de calagem e adubação do Estado do Rio de Janeiro**. [S.l: s.n.], 2013.
- GILLIS, M.; DOBEREINER, L.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between (*Pseudomonas rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) *autrophicum*. In: POLSINELLI, M., MATERASSI, R., AND VICENZI, M. Eds. **Nitrogen fixation**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 292-294, 1991.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor**

Protocols, v. 2019, n. 6, p. 436-456, 2019.

LANDELL, M. G. A. CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A.; DINARDO-MIRANDA, L. L.; SCARPARI, M. S.; GARCIA, J. C.; BIDÓIA, M. A. P.; SILVA, D. N.; MENDONÇA, J. R.; KANTHACK, R. A. D.; CAMPOS, M. F.; BRANCALIÃO, S. R.; PETRI, R. H.; MIGUEL, P. E. M. Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. In: **Documentos IAC**, v. 109, 16 p., 2013.

LIN, S. Y.; HAMEED, A.; SHEN, F. T.; LIU, Y. C.; HSU, Y. H.; SHAHINA, M.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense*. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 1149-1162, 2014.

MACEDO, I. C.; NOGUEIRA, L. A. H. Avaliação da Expansão da Produção de Etanol no Brasil (Assessment of ethanol production expansion in Brazil). p. 71, 2004.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.

MATOSO, E. S.; AVANCINI, A. R.; REIS, V. M.; SILVA, S. D. D. A. Maturação e produtividade de cana-de-açúcar com o uso de bactérias diazotróficas. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 28, n. 4, p. 1689-1699, 2019.

MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E. A.; 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, D. 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. G.; 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 Interactions**, v. 17, n. 8, p. 827-836, 2004.

NITSCH, M. O programa de biocombustíveis proalcool no contexto da estratégia energética brasileira. **Brazilian Journal of Political Economy**. [S.l: s.n.], 1991.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, p. 23 - 32, 2006.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂ –fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, p. 205 - 215, 2002.

OREN, A.; GARRITY, G. M. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** n. 66. p. 7-8, 2016.

PROMEGA, C. Wizard Genomic DNA Purification Kit Quick Protocol, FB022. **Wizard**, p. 1123-1126, 2010.

REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; PEREIRA, W.; SILVA, M. F.; HIPÓLITO, G.; OLIVEIRA, R. P.; MORAES, R. F.; LEITE, J. M.; SCHULTZ, N.; BAPTISTA, R. B. Eficiência agronômica do inoculante de cana-de-açúcar aplicado em três ensaios conduzidos no Estado do Rio de Janeiro durante o primeiro ano de cultivo. **Boletim de Pesquisa - CNPAB**, p. 1–22, 2009.

REIS, V. M.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOLGEL, J.; STROFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

RODRIGUES, L. da S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 275-284, 2006.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; DE FREITAS, J. G.; DA SILVEIRA, A. P. D. Novas bactérias diazotróficas endofíticas na cultura do trigo em interação com a adubação nitrogenada, no campo. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1099-1106, 2008.

SARAF, M.; RAJKUMAR, S. Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems. **Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems**, n. June 2016, 2011.

SILVA, C. G. N. da. Uso da Técnica de PCR em Tempo Real para Quantificação de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Tecidos de Cana-de-açúcar. v. 1, p. 98, 2017.

SOUZA, S. R. de; DAROS, E.; FRAGOSO, R. B.; RUARO, L. Efeito de bactérias diazotróficas nos componentes de produção de cana-de-açúcar infectadas pelo raquitismo das soqueiras. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 4, p. 21-27, 2011.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 448-459, 2001.

TEAKLE, D. S.; RYAN, C. C. The effect of high temperature on the sugar cane ratoon stunting disease bacterium, *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, in vitro and in vivo. **Sugar Cane**, v. 6, p. 5-6, 1992.

TEAKLE, D. S.; SMITH, P. M.; STEINDL, D. R. L. Association of a small corynebacterium with theratoon stunting disease of sugarcane. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 24, p. 869-874, 1973.

YOUNG, A. J.; PETRASOVITS, L. A.; CROFT, B. J.; GILLINGS, M.; BRUMBLEY, S. M. Genetic uniformity of international isolates of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane (*Saccharum* interspecific hybrids). **Australian Plant Pathology**, v. 35, p. 503-511, 2006.