

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ENGENHARIA AGRÔNOMICA

OTÁVIO MAGNO TEIXEIRA

**ANÁLISE MOLECULAR DE ESCALDADURA-DAS-
FOLHAS DA CANA-DE-AÇÚCAR: OTIMIZAÇÃO DOS
FATORES ENVOLVIDOS NO EXAME DIAGNÓSTICO**

ARARAS -SP
2025

OTÁVIO MAGNO TEIXEIRA

**ANÁLISE MOLECULAR DE ESCALDADURA-DAS-FOLHAS DA CANA-DE-
AÇÚCAR: OTIMIZAÇÃO DOS FATORES ENVOLVIDOS NO EXAME
DIAGNÓSTICO**

Trabalho Final de Graduação apresentado ao curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Seiiti Urashima

Coorientador: Prof. Dr. Gilberto Rodrigues Liska

Araras-SP
2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Teixeira, Otávio Magno

Análise molecular de escaldadura-das-folhas da cana-de-açúcar: otimização dos fatores envolvidos no exame diagnóstico / Otávio Magno Teixeira -- 2025. 63f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Alfredo Seiiti Urashima

Banca Examinadora: Roberto Giacomini Chapola, Danielle de Oliveira

Bibliografia

1. *Xanthomonas albilineans*. 2. PCR. 3. Diagnose molecular. I. Teixeira, Otávio Magno. II. Título.

Dedico este trabalho à minha família. Aos meus pais, Andréia e Ronaldo, por terem se dedicado incansavelmente para me proporcionar todas as oportunidades que tive. Aos meus irmãos, Lucas, Rafael e Gustavo, pelo apoio incondicional em todos os momentos. E ao meu grande amor, Icaro, que esteve ao meu lado em toda essa trajetória e foi essencial para a sua conclusão.

AGRADECIMENTOS

Meu profundo agradecimento aos meus pais, Ronaldo Magno Teixeira e Andreia Martins Teixeira, pelo amor incondicional, pelo apoio às minhas escolhas e pelo incentivo nos momentos mais difíceis. Sou eternamente grato pelo microscópio de brinquedo que me deram naquele Natal. Naquele dia, vocês não me deram apenas um presente; plantaram a semente de um pesquisador. Agradeço por todos os ensinamentos, pelas broncas necessárias e por todo o esforço que fizeram para me proporcionar as melhores oportunidades. Esta conquista é, em grande medida, também de vocês.

Aos meus irmãos, Lucas, Rafael e Gustavo, pela amizade, pelo companheirismo, pelo amor e pelo apoio incondicional. Vocês foram e continuam sendo peças fundamentais na minha trajetória e na pessoa que me tornei.

Agradeço ao grande amor da minha vida, Ícaro Marques Vendramini, meu companheiro de todos os dias, pelos anos de amizade, cumplicidade, paciência e por toda a ajuda. Meu obrigado por sempre me apoiar e acreditar em mim, sua presença foi fundamental em cada etapa desta jornada.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sou profundamente grato pela excelência do ensino, pela dedicação de seus docentes e por toda a formação acadêmica e humana que aqui construí. Aos meus professores, meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos, pela paciência e pela resiliência. Cada um de vocês foi fundamental para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Em especial agradeço ao meu orientador, Dr. Alfredo Seiiti Urashima por aceitar me orientar, por acreditar e confiar em mim desde o início. Agradeço pela oportunidade única de desenvolver pesquisas em seu laboratório, pela confiança e liberdade concedidas, e pela amizade, paciência e total disposição ao longo desta jornada. Mais do que tudo, sou grato por todo o conhecimento e ensinamento que levo para a minha vida. Se um dia me tornar um décimo do pesquisador e da pessoa que o senhor é, considerarei minha trajetória feliz.

Ao Laboratório de Genética Molecular (LAGEM), meu sincero agradecimento pelo acolhimento e por todo suporte durante esta jornada. Às técnicas Nathalia e Monique, pela paciência e inestimável disposição em me ensinar todos os protocolos e nuances da pesquisa. Em especial à Nathalia Fadel, pela presença constante desde meu primeiro dia, pela amizade, parceria científica, pelas conversas, desabafos e por todo o carinho que tanto me fortaleceu. Aos estagiários, mestrandas que passaram pelo laboratório durante estes três anos e a Renata, pelas risadas, ajuda mútua e pelos momentos de descontração que tornaram esta experiência

tão enriquecedora e significativa.

Agradeço ao Prof. Dr. Gilberto Rodrigues Liska pela parceria, por ter me introduzido à pesquisa científica por meio da minha primeira iniciação, pelos valiosos ensinamentos e por toda a assistência com a parte estatística.

À República Abatedouro, minha segunda família, e a todos os irmãos com quem morei, meus mais sinceros agradecimentos. Obrigado por me aceitarem como um de vocês, pelo acolhimento, pela amizade e pelo companheirismo que me acompanharam durante todos esses anos. Por me ensinarem tanto, nas mais diversas formas, e por contribuírem fundamentalmente para a pessoa que me tornei. Obrigado por me mostrarem o verdadeiro significado de união. Vocês foram, e continuam sendo, peças essenciais tanto na minha formação pessoal quanto profissional.

Por fim, registro meus agradecimentos a todos os amigos que levei desta jornada universitária, pelo apoio constante, pela torcida e pela crença em meu trabalho. Cada um de vocês guarda um lugar muito especial em minha trajetória. Estendo minha gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste grande objetivo.

— Um dia vou desvendar todos os segredos do universo.

Achei graça.

— E o que você vai fazer com esses segredos, Dante?

— Saberei quando chegar a hora — respondeu. — Talvez mudar o mundo.

Benjamin Alire Sáenz

RESUMO

O uso de mudas pré-brotadas (MPBs) tem ganhado adoção visando à redução do volume de material propagativo no plantio de cana-de-açúcar. A sanidade dessas mudas é crucial para o sucesso do método, especialmente contra doenças sistêmicas bacterianas, como o raquitismo-das-soqueiras e a escaldadura-das-folhas. A escaldadura, causada por *Xanthomonas albilineans*, é uma das doenças mais relevantes para a cultura, cuja disseminação ocorre principalmente por meio de materiais de propagação infectados. Diante disso, este trabalho teve como objetivo otimizar o teste de diagnóstico para detecção de *X. albilineans* em MPBs. No primeiro ensaio, cinco pares de *primers*: Ala4/L1, PGBL1/PGBL2, XAF1/XAR1, XaQf/XaQr e XaABCF3/XaABCR3, foram avaliados tanto sob as condições originais descritas pelos autores quanto sob modificações propostas neste estudo. Adicionalmente, foram testadas a sensibilidade em diluições de DNA (*pool* de amostras) e a estabilidade de detecção ao longo do tempo (preservação do DNA). Os testes aconteceram utilizando cultura pura da bactéria e DNA total extraído de cana-de-açúcar. Os resultados demonstraram que o par de *primers* Ala4/L1, sob as modificações implementadas, foi o mais eficaz para o diagnóstico. A utilização de amostras compostas mostrou-se viável, enquanto o armazenamento do DNA a +4°C (refrigeração) foi o método de preservação mais eficiente. Constatou-se ainda que intervalos prolongados entre a extração do DNA e a realização da PCR reduzem a probabilidade de detecção do patógeno. Por fim, observaram-se variações no desempenho da reação entre diferentes termocicladores.

Palavras-chave: *Xanthomonas albilineans*; PCR; mudas pré-brotadas (MPBs); detecção; doença sistêmica.

ABSTRACT

The use of pre-sprouted seedlings (MPB) has been increasingly adopted to reduce the volume of propagative material in sugarcane planting. The health of these seedlings is essential for the success of the method, especially against systemic bacterial diseases such as ratoon stunting disease and leaf scald. Leaf scald, caused by *Xanthomonas albilineans*, is one of the most significant diseases for the crop, and its spread occurs primarily through infected propagation materials. Therefore, this work aimed to optimize the routine diagnostic test for detecting *X. albilineans* in MPBs. In the first assay, five published primer pairs: Ala4/L1, PGBL1/PGBL2, XAF1/XAR1, XaQf/XaQr, and XaABCF3/XaABCR3, were evaluated both under the original conditions described by the authors and under modifications proposed in this study. Additionally, sensitivity in DNA dilutions (sample pool) and detection stability over time (DNA preservation) were evaluated. The tests were performed using pure bacterial culture and total DNA extracted from sugarcane. The results demonstrated that the Ala4/L1 primer pair, with the implemented modifications, was the most effective for diagnosis. The use of composite samples proved viable, while storing DNA at +4°C (refrigeration) was the most efficient preservation method. It was also found that prolonged intervals between DNA extraction and PCR reduce the probability of pathogen detection. Finally, variations in reaction performance were observed between different thermocyclers.

Keyword: *Xanthomonas albilineans*; PCR; pre-sprouted seedlings (MPB); detection; systemic disease.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 CANA-DE-AÇÚCAR.....	17
2.2 ESCALDADURA-DAS-FOLHAS.....	19
2.3 DETECÇÃO DE <i>X. albilineans</i>	21
2.4 AVANÇOS NA DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>X. albilineans</i>	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL.....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. MATERIAL VEGETAL E CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	28
4.1.1 Extração De Seiva De Cana-De-Açúcar.....	28
4.1.2 Diagnose Sorológica.....	28
4.2 DIAGNOSE MOLECULAR.....	29
4.2.1 Extração De DNA.....	29
4.2.2 <i>Primers</i> E Condições De Amplificação.....	30
4.2.3 Eletroforese.....	32
4.3 PARÂMETROS DE SELEÇÃO DE <i>PRIMERS</i>	32
4.3.1 <i>Pré- Screening</i>	32
4.3.2 Sensibilidade, Especificidade E Acurácia.....	33
4.3.3 Sensibilidade Por Diluição Do DNA (<i>Pool</i> De Amostras).....	35
4.3.4 Estabilidade De Detecção E Preservação Do DNA.....	35
4.3.5 Otimização Do Protocolo.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 PRÉ-SCREENING.....	38
5.2 EFICIÊNCIA BASEADA NA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E ACURÁCIA.....	40
5.3 SENSIBILIDADE DOS CONJUNTOS DE <i>PRIMERS</i> USANDO DILUIÇÃO DO DNA.....	46
5.4 ESTABILIDADE DE DETECÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> E AS FORMAS DE PRESERVAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO.....	48
5.5 OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE PCR.....	51
6 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Resultados do *pré-screening* de *primers* descritos na literatura para detecção de *Xanthomonas albilineans* mediante testes de sensibilidade em cultura pura (10^9 UFC/mL) por diluição seriada. 41
- Tabela 2** - Resultado do *pré-screening* de *primers* descritos na literatura para detecção de *Xanthomonas albilineans* mediante testes em DNA total de cana-de-açúcar com sintomas de escaldadura. 41
- Tabela 3** - Comparação da sensibilidade de protocolos de PCR para os *primers* PGBL e Ala4/L1 na detecção de *Xanthomonas albilineans* em amostras de DNA total de cana-de-açúcar infectada, sob diferentes tempos de ciclo e concentração de reagentes. 42
- Tabela 4** - Sensibilidade e especificidade de diferentes *primers* para detecção molecular de *Xanthomonas albilineans*. 44
- Tabela 5** - Comparação dos *primers* XaABC, Ala4/L1 e PGBL nas melhores condições para a detecção de *Xanthomonas albilineans*. 45
- Tabela 6** - Teste de sensibilidade comparativa para desempate dos *primers* PGBL e AL4/L1 na detecção de *Xanthomonas albilineans* em DNA total de cana-de-açúcar infectada. 45
- Tabela 7** - Viabilidade da formação de *pools* de amostras para detecção de *Xanthomonas albilineans*: Avaliação da sensibilidade em diferentes proporções de DNA de cana-doente (10^6 UFC/mL) e cana-sadia. 47
- Tabela 8** - Análise do limite de detecção máximo para o Ala4/L1: Sensibilidade do ensaio após diluições seriadas da amostra composta T1 (1 parte infectada:9 partes sadias) para *Xanthomonas albilineans*. 47
- Tabela 9** - Avaliação da sensibilidade dos *primers* sob diferentes condições de armazenamento: Teste de detecção em amostras de DNA total de cana-de-açúcar, positivadas para *Xanthomonas albilineans*, em função da temperatura e do tempo. 48
- Tabela 10** - Otimização da análise eletroforética para detecção de *Xanthomonas albilineans*: Eliminação de bandas inespecíficas e aprimoramento da resolução do *primer* Ala4/L1 mediante incremento da temperatura de anelamento. 54

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo de análise sorológica para detecção de *Xanthomonas albilineans* em seiva de cana-de-açúcar. (A) Corte e coleta do material vegetal; (B) Adaptação de "teteira" de silicone (3 cm de diâmetro) acoplada ao compressor para extração de seiva; (C) Compressor utilizado para extração por pressão positiva; (D) Extração de seiva de internódios individuais; (E) Adição de conservante (Cloro de Aquil Dimetil Benzil Amônio); (F) Execução do exame sorológico *dot blot*. 29

Figura 2 - Fluxograma do *pré-screening* para seleção de *primers*. O esquema apresenta a avaliação em diluição seriada de cultura pura de *Xanthomonas albilineans* (10⁹ UFC/mL) e DNA total de cana-de-açúcar. 33

Figura 3 - Fluxograma do teste de sensibilidade por diluição de DNA em pool de amostras. (A) Dados diretos obtidos pela diluição progressiva de tecido infectado em tecido sadio; (B) Dados indiretos obtidos pela diluição seriada da amostra T1 (1 parte infectada: 9 partes sadias) em tampão TE. 35

Figura 4 - Fluxograma do teste de preservação de DNA e estabilidade de detecção. Amostras de DNA extraídas foram armazenadas em quatro condições distintas (Freezer -20°C, Geladeira 4°C, Gaveta ~25°C e Ambiente externo ~37°C) e avaliadas nos tempos 0, 15 e 34 dias para monitoramento da capacidade de detecção dos *primers*. 36

Figura 5 - Fluxograma dos testes de otimização do protocolo de PCR. O esquema compreende a avaliação de dezesseis temperaturas de anelamento distintas e a comparação do desempenho em três termocicladores diferentes. 37

Figura 6 - Foto da membrana resultante da análise sorológica para detecção de *Xanthomonas albilineans* em seivas extraídas de colmos de cana-de-açúcar. Os cinco primeiros "poços" da membrana A1-A5 são os controles, os poços A1 a A4 são os controles positivos e o poço A5 é o controle negativo, respectivamente. Em vermelho, sinalizada, as amostras N4 utilizadas para o experimento de pool de amostra. 45

Figura 7 - Análise eletroforética do efeito de diferentes métodos de preservação de amostras e do tempo de armazenamento na detecção de *X. albilineans* via PCR. Os painéis A, B e C correspondem aos resultados com os *primers* Ala4/L1 nos tempos de 1, 15 e 34 dias, respectivamente. Os painéis D, E e F correspondem aos resultados com os *primers* PGBL nos tempos de 1, 15 e 34 dias, respectivamente. 49

Figura 8 - Probabilidade de detecção de *X. albilineans* pelo par de *primers* PGBL ao longo do tempo em diferentes tratamentos: T1) preservação em freezer a -20 °C; T2) preservação em

geladeira a +4 °C; T3) temperatura ambiente (~25 °C); e T4) temperatura elevada (~37 °C). Os pontos representam os valores observados, a linha sólida vermelha a probabilidade predita pelo modelo e a área sobre a linha pontilhada azul o intervalo de confiança de 95%. 50

Figura 9 - Probabilidade de detecção de *X. albilineans* pelo par de *primers* Ala4 / L1 ao longo do tempo em diferentes tratamentos: T1) preservação em freezer a -20 °C; T2) preservação em geladeira a +4 °C; T3) temperatura ambiente (~25 °C); e T4) temperatura elevada (~37 °C). Os pontos representam os valores observados, a linha sólida vermelha a probabilidade predita pelo modelo e a área sobre a linha pontilhada azul o intervalo de confiança de 95%. 51

Figura 10 - Análise eletroforética da amplificação por PCR de *X. albilineans* utilizando o par de *primers* Ala4/L1, em 10 amostras de DNA total positivo para a bactéria e um controle positivo (último poço), sob diferentes temperaturas de anelamento. A) 55 °C, B) 57,6 °C e C) 60 °C. 52

Figura 11 - Análise eletroforética da amplificação por PCR de *Xanthomonas albilineans* utilizando o par de *primers* Ala4/L1, em 10 amostras de DNA total positivo para a bactéria, um controle positivo (penúltimo poço) e um controle negativo (último poço), realizada em diferentes termocicladores: A) C1000 Touch, B) PTC-100, C) PCR System 9700. 53

1 INTRODUÇÃO

Com uma produção de aproximadamente 677 milhões de toneladas na safra 2024/25, o Brasil é o principal produtor de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) do mundo, sendo responsável por 36,15% da produção mundial (CONAB, 2025; FAO, 2025). A área colhida totaliza 8,8 milhões de hectares em todo país (CONAB, 2025). O estado de São Paulo é o seu maior produtor, detendo uma produção estimada de 353,5 milhões de toneladas e respondendo por 4,4 milhões de hectares em área colhida (CONAB, 2025). Segundo Belik, Perosa e Fredo (2013) em áreas onde o setor canavieiro tem grande relevância, a produção e processamento de cana-de-açúcar podem empregar mais da metade da mão de obra agrícola local. Assim, as mudanças no mercado têm um impacto direto na economia regional e há uma forte dependência das usinas de processamento por parte desses municípios. Em pequenas cidades, nas quais o mercado de trabalho é limitado, torna-se muitas vezes quase a opção exclusiva de empregos formais (Defante; Vilpoux; Sauer, 2020). Os benefícios da indústria quando instalada na região estão relacionados à geração de empregos formais, salários mais altos, redução da migração para áreas urbanas, aumento da qualidade de vida, além, da geração de receitas, impostos e repasses de recursos estaduais para esses municípios (Defante et al., 2020; Siqueira; Castro Júnior, 2013).

O impacto econômico da produção de cana-de-açúcar, também está diretamente relacionada à sua versatilidade e à amplitude das cadeias produtivas. A gramínea é aplicada na produção de etanol, açúcar, melaço, bagaço e outros produtos no Brasil e no mundo (Milanez et al., 2015). O etanol é um biocombustível que ganhou força com a elevação dos preços do petróleo e a discussão mundial sobre a diminuição das emissões de gases de efeito estufa (GEE), evitando que, no período de 2003 a março de 2025, 730 milhões de toneladas de CO₂ fossem lançados à atmosfera (UNICA, 2025a). O combustível produzido é uma das principais fontes de energia renovável e proporciona a geração de produtos secundários a partir do processamento da cana, como o bagaço e a palha.

A busca pela diversificação da matriz energética e da sustentabilidade, torna a geração de energia elétrica em termoelétricas, a partir da utilização de biomassa, um destaque entre os produtos renováveis. Em 2024, a produção de bioeletricidade de biomassa da cana-de-açúcar atingiu 21,2 mil GWh, representando quase 4% do consumo de energia elétrica do país e atendendo 31,4 milhões de pessoas. Um fator de importância é a complementaridade com as hidroelétricas, justamente pela coincidência dos períodos de colheita na região centro-sul do

Brasil com a diminuição das chuvas (maio a novembro) na região sudeste, região onde ocorre a maior demanda de energia por ser a mais desenvolvida do país (UNICA, 2025b).

Dada a relevância da cultura, a demanda crescente por produtividade e alto rendimento por hectare, sem o aumento da área plantada, é o atual desafio do setor. A colheita da cana-de-açúcar ocorre em múltiplos ciclos de colheita e rebrota, conhecidos como soqueiras. No entanto, o rendimento de um canavial geralmente diminui à medida que aumenta o número desses ciclos, inerente à cultura semi-perene (Borba; Bazzo, 2009). A baixa produtividade dos canaviais pode ter, como uma de suas origens mais significativas, os danos diretos e indiretos provocados por doenças (Gonzalez, 2023).

A doença fibrovascular escaldadura-das-folhas da cana-de-açúcar, em inglês *Sugarcane Leaf Scald* (LSD), causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, é uma das doenças mais importante para o setor canavieiro no país e um fator significativo na diminuição da produtividade ao longo das colheitas (Davis et al., 1997; Gonzalez, 2023). Estudos recentes indicam que a LSD está amplamente disseminada no Brasil, estando presente em 70,9% das áreas com potencial para se tornarem viveiros no ano de 2022 (Teixeira et al., 2023).

Ao se considerar o dano à produtividade no campo, Rott et al., (1995) constataram na Ilha de Guadalupe, arquipélago francês no Caribe, reduções de 12% a 21% nas variedades B69566 e B69379, respectivamente. No México, mais precisamente em Veracruz, a alta incidência da doença resultou em uma queda de produtividade de 12,01 a 14,56 toneladas por hectare (Huerta-Lara et al., 2003). Para além da redução no volume, os talhões afetados em Louisiana, sul dos EUA, segundo Hoy e Grisham (1994) também apresentaram deterioração da qualidade, com menor quantidade de colmos industrializáveis, menor rendimento industrial e redução no teor de sacarose por hectare.

Os prejuízos causados pela doença no Brasil, na variedade RB966928, foram severos. Em cana-planta, registrou-se uma quebra de massa (peso das touceiras) superior a 50% no primeiro ano, com uma taxa de morte de perfilhos de 40%. Na cana-soca, a redução de produtividade variou de 23% (plantas assintomáticas) a 91% (plantas sintomáticas). O impacto financeiro desses danos foi estimado em R\$ 9.033,26 por hectare para a cana-planta e R\$ 11.120,04 por hectare para a cana-soca (Gonzalez, 2023; Teixeira et al., 2025).

A principal fonte de inóculo primário é a utilização de material de plantio infectado, que mesmo aparentando estar saudável, dissemina a doença quando introduzido em novas áreas. Consequentemente, a escaldadura é frequentemente levada para regiões em processo de renovação de canavial, onde o material infectado assintomático, é erroneamente considerado

sadio e selecionado para plantio (Hoy; Grisham, 1994; Urashima; Zavaglia, 2012). Após o estabelecimento da doença em um campo de produção, sua disseminação é intensificada pelo uso de ferramentas de corte contaminadas, como facões e, principalmente, pela maquinaria de colheita, que atua como um instrumento de propagação em larga escala (Ricaud; Ryan, 1989)

No Brasil, o estabelecimento de novos canaviais ou a reforma de áreas é realizado principalmente por dois métodos. O primeiro consiste no plantio de colmos inteiros ou fracionados, contendo de três a quatro gemas, distribuídos em sulcos de plantio profundos. Tradicionalmente, essa distribuição é mecanizada, porém, há um crescente retorno à distribuição manual por parte de muitas usinas. Essa mudança se deve à redução de danos às gemas durante o manejo, o que conseqüentemente diminui o consumo de colmos por hectare (May; Ramos, 2019).

A segunda metodologia é o uso de mudas-pré-brotadas (MPB), também oriunda da necessidade de redução do volume de material propagativo no plantio. As MPBs oferecem maior vigor, sanidade e uniformidade no plantio, além de reduzirem drasticamente a quantidade de mudas utilizadas para aproximadamente 1 t/ha (Landell et al., 2012; May; Ramos, 2019). Essa técnica baseia-se na seleção de minirrebolos (gemas individualizadas) acondicionados em caixas ou bandejas de brotação e mantidos em casa de vegetação. Após um período de aproximadamente 60 dias, quando as mudas estão devidamente brotadas e aclimatadas, elas são transplantadas para o campo (Landell et al., 2012).

A seleção de material vegetal sadio requer análises laboratoriais capazes de detectar e eliminar mudas ou colmos contaminados, os quais constituem a fonte primária de inóculo. Essa medida é especialmente crítica no manejo de doenças sistêmicas, que demandam estratégias de controle especiais (Landell et al., 2012). Os laboratórios especializados em fitossanidade utilizam duas principais tecnologias para detecção da doença, a sorológica (ex.: Dot-blot), para o plantio convencional, e a molecular (ex.: PCR), em MPB.

Contudo, a metodologia molecular, embora mais avançada, ainda apresenta lacunas críticas que precisam ser elucidadas para garantir sua confiabilidade e eliminar eventuais escapes de detecção. As principais lacunas que fundamentam esta investigação referem-se à ausência de consenso sobre o *primer* ideal para detecção e ao tempo de preservação do DNA, particularmente a janela entre a extração e a reação de PCR. Esses fatores impactam diretamente a sensibilidade e a confiabilidade analítica da detecção molecular de *X. albilineans*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar, uma planta semi-perene cultivada predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, pertence à família Poaceae, tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum*. Sua domesticação pelo homem é atribuída à região de Papua Nova Guiné (Artschwager; Brandes, 1958), e seu genoma é reconhecido como um dos mais complexos entre as plantas cultivadas (Ingelbrecht; Irvine; Mirkov, 1999).

Originária do sudoeste asiático, a cana-de-açúcar tornou-se uma cultura de relevância global, sendo amplamente cultivada na América do Sul, Central e do Norte, Caribe, África, ilhas adjacentes, Sul da Ásia e Ásia Austral (Brumbley et al., 2008). O gênero *Saccharum* compreende seis espécies, duas em estado selvagens, *S. spontaneum* e *S. robustum*, e quatro historicamente cultivadas, *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense* e *S. edule*. As variedades comerciais contemporâneas são híbridos complexos, derivados principalmente do cruzamento entre duas ou mais espécies, conferindo características agrônômicas superiores (Julien; Irvine; Benda, 1989).

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil no início do século XVI, e desde sua introdução, o setor tem vivido momentos históricos decisivos. Em 1933, o governo federal criou o Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA), que por mais de cinco décadas exerceu papel central na regulação do setor. Em 1971, o IAA deu início ao Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-Açúcar (PLANALSUCAR), uma instituição dedicada à pesquisa e desenvolvimento nas áreas agrícola e industrial, que foi fundamental para a criação do Programa Nacional do Alcool (PROÁLCOOL) em 1975. Este programa impulsionou decisivamente a indústria sucroalcooleira nacional, promovendo a produção em larga escala de etanol combustível visando reduzir a dependência de petróleo importado (Cursi et al., 2022).

Entre 2003 e 2009, o Brasil passou pela chamada “revolução flex”, período marcado pelo lançamento do automóvel flex-fuel, capaz de utilizar tanto gasolina quanto etanol, pelo primeiro voo de um avião movido a etanol, pela realização do primeiro leilão de bioenergia e pela introdução do etanol como combustível nas corridas da Fórmula Indy. Esses avanços consolidaram ainda mais o papel estratégico do setor sucroalcooleiro na matriz energética brasileira (Oliveira; Urashima, 2018). Em 2007, as usinas paulistas aderiram ao Protocolo Agroambiental, acordo que buscava antecipar o fim das queimadas na colheita. O compromisso era de adiantar de 2021 para 2014 em áreas planas e de 2031 para 2017 em áreas inclinadas.

Essa iniciativa não somente reforçou o compromisso ambiental do setor, mas também consolidou a colheita mecanizada como prática predominante (UNICA, 2022).

Entre 1975 e 2010 a produtividade brasileira de cana-de-açúcar registrou um crescimento de 66%, mesmo com a complexidade genética da cultura. Esse avanço foi impulsionado tanto pelo desenvolvimento de novas variedades por meio do melhoramento genético quanto pela adoção de práticas agrônômicas mais eficientes (Cursi, 2016; Dal-Bianco et al., 2012).

A cana-de-açúcar pode ser propagada por diferentes métodos, sendo os principais a utilização de colmos, o uso de minirrebolos (gemas individualizadas) para a produção de mudas pré-brotadas (MPB) e técnicas avançadas de cultura de tecidos vegetais, conhecidas como micropropagação (Hasner; Lima; Winter, 2019). A propagação por colmos é a técnica mais tradicional, praticada desde o período colonial, e consiste no plantio de estacas contendo três a quatro nós, dispostas horizontalmente no solo nos sulcos de plantio. Sob condições adequadas, as gemas presentes nessas estacas brotam e dão origem aos colmos primários. Em seguida, as gemas localizadas na base desses colmos primários desenvolvem-se em brotos secundários, que subsequentemente produzem colmos terciários, formando progressivamente uma touceira ou moita de cana-de-açúcar (Julien; Irvine; Benda, 1989).

O plantio utilizando colmos inteiros apresenta algumas desvantagens; a ausência de cobertura adequada com solo pode resultar no deslocamento da porção superior do colmo para fora do sulco de plantio. A brotação ao longo do colmo tende a ser irregular; os brotos localizados na porção superior germinam primeiro, enquanto os da base apresentam desenvolvimento mais lento, resultando em desuniformidade inicial do canavial. Estudos indicam que colmos com três a seis entrenós brotam mais rapidamente em comparação com colmos inteiros (James; Blackburn, 2004). Além desses fatores, a mecanização do plantio exacerbou a ocorrência de falhas. Para compensar essas deficiências e evitar prejuízos expressivos à produtividade, tornou-se necessária a utilização de volumes excessivos de mudas, que frequentemente ultrapassam 20 t/ha (Landell et al., 2012).

Buscando reduzir o volume necessário de material propagativo para a multiplicação de novas variedades, em 2012 o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) implementou o sistema de mudas-pré-brotadas (MPB), que proporcionou uma economia de até 95% em comparação com o método convencional de plantio, além de garantir maior uniformidade (Landell et al., 2012; May; Ramos, 2019). O processo de produção inicia-se com a seleção de minirrebolos (gemas individualizadas), submetidos a tratamentos térmicos, fungicidas e, quando necessário,

a aplicação de promotores de enraizamento. Esses minirrebolos são acondicionados em caixas ou bandejas de brotação e mantidos em casa de vegetação sob condições controladas de temperatura (32°C) e irrigação (8 mm/dia). Em seguida, as mudas passam por um processo de aclimação dividido em duas etapas: uma fase inicial em casa de vegetação e uma fase final a pleno sol. O ciclo completo, da brotação à aclimação, dura aproximadamente 60 dias (Landell et al., 2012).

Em ambos os sistemas de produção, é fundamental que os colmos utilizados como fonte de material propagativo recebam acompanhamento técnico em todas as etapas de manejo, seguindo protocolos específicos para obtenção de mudas livres de doenças e pragas. No sistema de MPB, os minirrebolos são extraídos de colmos-semente provenientes de viveiros básicos com idade entre 6 e 10 meses. Esses viveiros devem realizar exames laboratoriais, obrigatoriamente moleculares, para eliminar touceiras contaminadas antes do plantio (Landell et al., 2012). Adicionalmente, recomenda-se o tratamento por termoterapia em que os colmos são submersos em água quente por um determinado tempo para inativação de proteínas e enzimas bacterianas (Landell et al., 2012). No Brasil, aplicam-se dois binômios tempo-temperatura, 52°C por 30 minutos (Copersucar, 1989) ou 50°C por 2 horas (Damann, Jr., 1983). Embora ambos os protocolos apresentem taxas de escape, o tratamento a 52°C por 30 minutos exibe uma eficácia significativamente inferior (Andreato et al., 2022). Contudo, sua adoção é predominante nas unidades produtoras, justificada pela substantiva redução no tempo total do processo (Benda, 1994).

Os protocolos de termoterapia são amplamente aplicados para o controle de patógenos como carvão e raquitismo-das-soqueiras (James; Blackburn, 2004). Todavia, não existe um protocolo consolidado para eliminar o patógeno causador da escaldadura-das-folhas em colmos de cana-de-açúcar (Dayasena et al., 2024). Segundo Daysena et al. (2024), nem o tratamento com água quente, nem a imersão em água fria, aplicados de forma isolada ou combinada, demonstraram eficácia na eliminação do patógeno. A recomendação proposta pelos autores, imersão em água fria por 36 h, seguida de tratamento com água quente a 54 °C por 50 min, possibilita apenas a redução da transmissão primária da doença.

2.2 ESCALDADURA-DAS-FOLHAS

A escaldadura-das-folhas (LSD), causada pela bactéria gram-negativa *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, constitui uma das principais doenças da cana-de-açúcar. Inicialmente a doença foi registrada no Norte da Austrália em 1911, com evidências de sua

prevalência nas Ilhas Fiji já em 1908, e formalmente descrita na década de 1920 por Wilbrink (Davis et al., 1997). Desde seu registro inicial, a LSD se espalhou por diversas regiões, incluindo o Caribe, a Índia, a América do Norte e países africanos. Ao longo dos anos a presença da doença foi registrada em mais de 66 países, entre os quais se destacam Brasil, Índia e China, alguns dos principais produtores mundiais de cana-de-açúcar (Ricaud; Ryan, 1989; Rott; Davis, 2000). No entanto, infelizmente, há uma escassez de estudos recentes documentando a ocorrência da doença em novos países ou regiões.

A principal forma de disseminação da LSD ocorre através de colmos infectados e pela transmissão via instrumentos de corte (Klett; Rott, 1994), caracterizando uma disseminação primária. Entretanto, outras formas de disseminação já foram registradas pelos mesmos autores, que isolaram a bactéria de gotículas de água (chuva ou orvalho), da superfície de folhas secas, da exsudação das folhas e de raízes e solo rizosférico. Daugrois et al. (2012) propuseram um novo ciclo de infecção, destacando as condições climáticas como um fator relevante no processo de transmissão, principalmente em regiões tropicais, em que há a ocorrência de chuvas torrenciais e furacões capazes de disseminar a bactéria por longas distâncias. O autor associa essas condições a produção de mudas sadias e prevenção da introdução da doença em novas áreas.

Em cultivo, a bactéria caracteriza-se pelo crescimento em meios específicos como Wilbrink ou XAS (Urashima; Zavaglia, 2012), formando colônias amarelas, viscosas, convexas, com bordos lisos e brilhantes. A temperatura ótima para seu desenvolvimento situa-se entre 25°C e 28°C (Tokeshi, 1980). No hospedeiro, o patógeno coloniza preferencialmente os feixes vasculares das folhas e do colmo, frequentemente obstruindo-os parcial ou totalmente com uma substância gomosa. Adicionalmente, o organismo pode invadir células do parênquima adjacente, formando bolsas avermelhadas desses exsudatos (Ricaud; Ryan, 1989).

Birch e Patil (1987), associam a patogenicidade da bactéria à produção da albicidina, uma potente fitotoxina e antibiótico responsável pelos sintomas de escaldadura foliar em cana-de-açúcar. Seu mecanismo de ação envolve a inibição da replicação do DNA proplástido, bloqueando a diferenciação dos cloroplastos. No entanto, a colonização por *X. albilineans* pode ou não manifestar sintomas, devido ao fato de o patógeno apresentar três fases diferentes: latente, crônica e aguda (Rott et al., 1997).

As fases crônica e aguda da doença são sintomáticas e manifestam-se com sintomas distintos. Na fase crônica, observam-se diversos sintomas externos característicos da LSD; as folhas apresentam uma linha branca semelhante a um traço de lápis (com aproximadamente 1

a 2 mm de largura), que se estende da nervura central até a margem, paralelamente às nervuras secundárias. Com o avanço da doença, ocorre o desenvolvimento de necrose a partir da ponta ou margem da folha. Em colmos maduros, as folhas tornam-se necróticas a partir das pontas e surgem brotações laterais em quantidade de moderada a abundante, inicialmente na base do colmo e progredindo para cima. Esses brotos laterais exibem frequentemente as linhas brancas e/ou escaldaduras típicas da doença. Em estágios mais avançados, são relatadas brotações com atrofia e murcha. As folhas adquirem aparência queimada e enrolam-se para dentro, podendo culminar na morte da planta. A fase aguda da LSD ocorre principalmente em variedades suscetíveis, sendo caracterizada pela murcha súbita e morte dos colmos. O surgimento dessa fase está frequentemente associado a períodos de estiagem prolongada (Rott et al., 1997; Tokeshi, 1980).

A fase latente é assintomática, não apresentando nenhum dos sintomas mencionados anteriormente. Essa característica dificulta a distinção entre plantas saudáveis e doentes, além de dificultar a compreensão dos mecanismos de infecção. A ausência de sintomas facilita a disseminação da doença para novas áreas da lavoura, uma vez que colmos infectados, porém assintomáticos, podem ser inadvertidamente transportados devido à falha em detectá-los com métodos de diagnóstico não confiáveis. Portanto, para um controle eficaz, é crucial ir além da identificação visual e empregar métodos de detecção mais precisos (Rott et al., 1997).

2.3 DETECÇÃO DE *X. albilineans*

A LSD pode manifestar-se por meio de uma ampla gama de sintomas ou pela sua ausência total, fase latente. Esse é um dos aspectos mais problemáticos associados a esta doença, algumas cultivares de cana-de-açúcar exibem tolerância ao patógeno, não desenvolvendo sintomas visíveis, ou estes passarem despercebidos (Rott et al., 1997). A falta de sintomas também pode estar associada à baixa densidade populacional, permitindo que a bactéria se multiplique e espalhe de maneira assintomática (Comstock, 1992). Diante desse cenário, a adoção de exames que permitam o plantio de cana-semente sadia constitui a estratégia de controle mais eficaz (Rott et al., 1997).

No que diz respeito à detecção do agente causal, diversas metodologias foram desenvolvidas para maior precisão. Entre os métodos disponíveis incluem-se: o isolamento em meio de cultura Wilbrink (Ricaud; Ryan, 1989) ou em meio semi-seletivo (Davis, 1994); técnicas sorológicas (Comstock, 1992; Rott, 1994); a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Henson; French, 1993; Wang et al., 1999); a nested-PCR (Duarte Dias et al., 2018); a PCR

quantitativa em tempo real (qPCR) (Garces; Gutierrez; Hoy, 2014; Wang et al., 2020); e a amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) (Duarte Dias et al., 2018).

Os meios de cultura seletivo Wilbrink e semi-seletivo XAS baseiam-se no isolamento do patógeno a partir da seiva extraída dos internódios da planta (Davis, 1994; Ricaud; Ryan, 1989). Uma desvantagem dessa técnica é o longo período para a formação de colônias características, de 6 a 8 dias para obtenção de resultados (Rott et al., 1995). De acordo com Urashima; Zavaglia, (2012) o meio XAS apresenta um desempenho superior ao Wilbrink, uma vez que foi possível isolar a bactéria a partir de amostras dos três tipos de sintomas existentes. O meio Wilbrink, por sua vez, não permitiu o crescimento bacteriano em amostras assintomáticas (latentes), e mesmo em plantas sintomáticas, a taxa de detecção não ultrapassou 30%. Apesar do melhor desempenho, a detecção no meio XAS também não foi totalmente satisfatória. Segundo os autores, o sucesso no isolamento variou conforme a posição do internódio no colmo e o tipo de sintoma apresentado pela planta.

A técnicas sorológicas, como ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), TBIA (*Tissue Blot Enzyme Immunoassay*) e DIA (*Dot Immunobinding Assay*), estão baseadas no uso de antissoros monoclonais ou policlonais (Comstock, 1992; Rott, 1994) e podem variar quanto a utilização de tecido ou seiva (Rott, 1994). O exame sorológico *dot-blot* é tipicamente aplicado no Brasil para análise de colmos destinados à propagação pelo sistema de plantio convencional. Neste sistema, que corresponde a 91,9% das áreas reformadas (Braga Jr.; Landell; Xavier, 2020), utilizam-se segmentos de colmos para o plantio oriundo de talhões-matrizes.

Embora o método sorológico *dot-blot* permita selecionar plantas sadias e quantificar a população de *X. albilineans* em colmos infectados, seu limite de detecção requer uma concentração mínima de 10^6 UFC/mL da bactéria (Maidana, 2023). Em algumas situações, o meio de cultura seletivo mostrou-se mais sensível (Wang et al., 1999). Essa sensibilidade pode ser insuficiente para identificar com precisão a bactéria em colmos infectados, porém assintomáticos. Adicionalmente, a alta contaminação por outras bactérias vasculares, a distribuição irregular do patógeno nos tecidos da planta (Davis et al., 1997) e a idade dos colmos dos quais a seiva é extraída (Maidana, 2023), afetam a confiabilidade do exame diagnóstico.

Em canaviais de cana-planta com idade inferior a oito ou nove meses, a realização de exames sorológicos demonstrou ser inadequada para um diagnóstico confiável da LSD, com taxas de sucesso variando de 5% a 80% (Maidana, 2023). Ademais, os exames sorológicos não são indicados para o sistema de MPBs. As mudas são transplantadas para o campo com aproximadamente 60 dias após o plantio (Landell et al., 2012) e não apresentam

desenvolvimento suficiente para fornecer amostras de seiva adequadas, tornando as técnicas moleculares as únicas opções viáveis para as análises nessa fase.

A técnica de PCR baseia-se na síntese enzimática de DNA *in vitro*, conduzida por ciclos térmicos que compreendem três etapas essenciais: desnaturação da dupla fita de DNA, anelamento de *primers* oligonucleotídicos específicos às sequências complementares e extensão desses *primers* por uma DNA polimerase termoestável. A amplificação exponencial do segmento alvo ocorre porque, a partir dos ciclos iniciais, as fitas de DNA recém-sintetizadas passam a funcionar como moldes para a síntese subsequente, repetindo-se o processo por até 50 ciclos (Henson; French, 1993). O protocolo pode ser executado de forma aninhada (nested-PCR), envolvendo uma reação subsequente que utiliza como *template* o produto de amplificação gerado na primeira etapa (Duarte Dias et al., 2018).

A BIO-PCR possui princípio metodológico similar a convencional, diferenciando-se pelo fato de que o material utilizado para a síntese de DNA na BIO-PCR consiste em suspensões de populações viáveis de *X. albilineans* previamente cultivadas em meio de cultura (Wang et al., 1999). Em seu trabalho comparativo, Wang et al., (1999) relataram que a BIO-PCR é 100 vezes mais sensível que a PCR convencional, podendo detectar *X. albilineans* em amostras com 2×10^2 UFC mL⁻¹; todavia a técnica demanda 3 dias para o crescimento da bactéria em meio de cultura. Urashima e Zavaglia (2012) obtiveram resultados satisfatórios com a técnica molecular, utilizando um par de *primers* diferente, os autores detectaram o patógeno em 100% das amostras, inclusive nas assintomáticas.

Buscando uma alternativa ao PCR, a técnica *LAMP* foi desenvolvida visando à redução do tempo de análise e à não dependência de equipamentos termocicladores especializados. Entretanto, os resultados apresentaram uma taxa de detecção de somente 27% para amostras assintomáticas, valor considerado insuficiente para atender aos requisitos de controle sanitário. A técnica baseia-se na síntese de DNA por deslocamento de fita autociclável (Duarte Dias et al., 2018).

A qPCR é uma técnica de elevada sensibilidade, capaz de gerar resultados qualitativos e quantitativos (Garces; Gutierrez; Hoy, 2014). O método baseia-se na utilização de um corante fluorescente que se intercala no DNA, permitindo a monitorização em tempo real do aumento da fluorescência, que é proporcional à quantidade de DNA amplificado em cada ciclo (Higuchi et al., 1993). A qPCR, por sua vez, apresenta maior custo operacional, exige maior pureza do DNA e depende de um termociclador especializado. Em contraste, o PCR convencional é reconhecido como uma técnica de baixo custo e alta sensibilidade, capaz de detectar até 2×10^4

UFC mL⁻¹ e de fornecer resultados rapidamente (Baldi; La Porta, 2020; Wang et al., 1999).

2.4 AVANÇOS NA DETECÇÃO MOLECULAR DE *X. albilineans*

Em eubactérias, os genes de tRNA frequentemente organizam-se em *clusters* tandem, separados por regiões espaçadoras intergênicas (ITS) de comprimento variável; quando comparados permitem a diferenciação desses organismos. Especula-se que as sequências dos genes de tRNA sejam altamente conservadas, enquanto essas regiões espaçadoras evoluem rapidamente, gerando polimorfismos de comprimento que podem ser diagnósticos para espécies ou subespécies (Honeycutt; Sobral; McClelland, 1995).

Em seu trabalho, Pan et al. (1997) testaram alguns pares de *primers* direcionados a ITS localizada entre os genes 16S e 23S do DNA ribossômico. Os autores empregaram combinações que incluíam os *primers* genéricos L1/G1 e o *primer* específico Ala4. A combinação dos *primers* ALA4 (5'-CCC GAC TGG CTC CAC CAC TG-3') e L1 (5'-CAA GGC ATC CAC CGT-3') resultou na amplificação consistente de um fragmento de 360 pb em 71 cepas distintas de *X. albilineans*.

Para superar a ocorrência de bandas inespecíficas oriundas de organismos saprofiticos, Pan et al. (1999) desenvolveram o par de *primers* PGBL1 (5'-CTT TGG GTC TGT AGC TCA GG-3') e PGBL2 (5'-GCC TCA AGG TCA TAT TCA GC-3'). Estes *primers*, direcionados às posições 28-47 e 296-315 de uma sequência-alvo, respectivamente, amplificam um produto específico de 288 pb, melhorando a precisão diagnóstica segundo os autores.

No mesmo ano, em um estudo comparativo de cinco técnicas de identificação, Wang et al. (1999) incluíram a análise molecular com os *primers* XAF1/XAR1, originalmente desenvolvidos por Hatziloukas et al. (1995). O par de *primers* foi capaz de amplificar uma região de aproximadamente 600 pb de um gene codificador de um *putative adenosine triphosphate-binding cassette* (ABC). As sequências dos oligonucleotídeos são: XAF1 (5'-CCT GGT GAT GAC GCT GGG TT-3') e XAR1 (5'-CGA TCA GCG ATG CAC GCA GT-3').

Com o avanço das técnicas moleculares, o advento do PCR em tempo real (qPCR) direcionou o desenvolvimento de *primers* para correlacionar a população bacteriana com a resistência de variedades de cana-de-açúcar. Garces et al. (2014) desenharam o par XaQf (5'-TTT GCG GTG TCG GTA AAG GAG-3') e XaQr (5'-GCG ATG GCA CTA GGT ACA GC-3'), capaz de amplificar um fragmento de 148 pb em PCR convencional, direcionado ao gene *albI* envolvido na biossíntese de albicidina.

Segundo Shi et al., (2021) a sonda TaqMan desenvolvida anteriormente por Garces et al. (2014) apresentava relativa complexidade devido à sua estrutura, que incluía dois

supressores e um repórter, e também por direcionar-se a sequências genômicas duplicadas. Para superar essas limitações, os autores projetaram um novo par de *primers* (XaABCF3: 5'-CGG CCA GAA GCA GAG AAT CC-3' e XaABCR3: 5'-GCG ATC TCG TTG TTG ATG CG-3') direcionado ao gene ABC, que amplifica um fragmento de 123 pb. O desempenho desse sistema foi comparado entre qPCR e a metodologia convencional, e sua eficácia foi discutida em comparação com outros *primers* descritos na literatura.

A qualidade do DNA também é um fator crucial para o sucesso da diagnose molecular. O estudo de Bressan et al. (2014) investigou a influência do armazenamento de amostras na extração de DNA de alta qualidade, destacando o desafio representado por compostos secundários, como fenólicos, taninos, látex e polissacarídeos em espécies tropicais, os quais comprometem a obtenção de ácidos nucleicos livres de contaminantes. Embora diversas técnicas de preservação de tecidos tenham sido descritas, como secagem, uso de gelo seco, nitrogênio líquido, liofilização ou soluções com sílica gel (Bressan et al., 2014), persiste uma lacuna quanto aos efeitos do armazenamento do DNA extraído e da janela temporal para realização da PCR sobre a qualidade do material genético e a confiabilidade da diagnose. Observações de rotina laboratorial indicam que amostras de DNA extraído, utilizadas como controles positivos, podem sofrer degradação ao longo do tempo, resultando na perda de sinal visível em gel de agarose.

De acordo com Tan et al., (2021) a estabilidade do DNA durante o armazenamento é significativamente influenciada por fatores ambientais, que podem ser categorizados em cinco aspectos principais: temperatura, presença de água, radiação UV, oxidação e pH.

Temperaturas mais baixas inibem a atividade enzimática e reduzem o movimento molecular, prolongando a viabilidade do DNA. Notavelmente, o congelamento a temperaturas ultrabaixas (-20 °C, -80 °C ou -196 °C) é uma abordagem comum para o armazenamento de oligonucleotídeos e amostras biológicas (Tan et al., 2021). O pH neutro a levemente alcalino é considerado adequado para preservação, uma vez que inibe a clivagem da ligação N-glicosídica catalisada em meio ácido, via de degradação relevante em armazenamentos prolongados (Bonnet et al., 2009; Burger et al., 1999).

A presença de água, seja no ambiente ou associada à própria amostra, é um fator crítico de degradação. Estudos indicam que a preservação do DNA é favorecida em condições de baixa umidade e no estado seco, reduzindo assim os danos por hidrólise, que provocam alterações na estrutura molecular (Zhang et al., 2017). A radiação UV induz quebras nas fitas, formação de dímeros, reticulação e modificações nas nucleobases, por meio da excitação de elétrons com

energia abaixo do nível de ionização. Já a oxidação, mediada principalmente por espécies reativas de oxigênio, provoca danos à desoxirribose e às bases, resultando em quebras da cadeia e modificações estruturais (Tan et al., 2021; Zhang et al., 2017).

Assim como a seleção de *primers* e a qualidade do *template* de DNA, o equipamento utilizado constitui um fator crítico para o sucesso e a reprodutibilidade das reações de PCR, especialmente em contextos interlaboratoriais. Conforme destacado por Sathyanarayana e Wainman (2024), a introdução do termociclador, um bloco térmico programável que automatiza as mudanças de temperatura inerentes a cada ciclo de amplificação, representou o segundo marco tecnológico fundamental no desenvolvimento da técnica. A eficiência da amplificação é diretamente influenciada pelas especificações técnicas do aparelho, incluindo sua geração (arquitetura), fabricante e propriedades termodinâmicas, como a velocidade de rampagem e a uniformidade de temperatura entre os poços (Schoder et al., 2005).

Estudos com ensaios sensíveis, como a PCR para tuberculose multirresistente, investigaram o impacto da taxa de aquecimento (*ramp rate*) no desempenho. Ao comparar a taxa recomendada pelo fabricante (2,2 °C/s) com uma taxa incorreta comum (4,0 °C/s), os autores observaram que a taxa correta resultou em bandas melhor definidas e menor incidência de resultados indeterminados (Derendinger et al., 2018). A calibração periódica configura-se como uma variável fundamental para a confiabilidade dos resultados. Em testes com reações de RAPD, a repetibilidade intrabloco foi de 88% em termocicladores devidamente calibrados, contra apenas 63% observada em instrumentos sem calibração (Saunders et al., 2001).

Segundo Schoder et al. (2005), a precisão de um termociclador pode ser comprometida por fatores críticos como a temporização prematura, o subaquecimento ou superaquecimento do bloco e a variação espacial na transferência de calor. Por meio de ensaios físicos, os autores diferenciaram equipamentos de alta e baixa precisão. A falta de homogeneidade térmica mostrou-se mais pronunciada durante a etapa de desnaturação, especialmente nos primeiros segundos, fator decisivo em protocolos com tempos de etapa reduzidos. Os desvios de temperatura foram quantificados, variando de 0,5 a 1,5 °C nos aparelhos mais precisos, enquanto nos menos precisos atingiram de 13 a 20 °C (Schoder et al., 2005). A variação de temperatura entre os poços de uma mesma corrida, foi observada na maioria dos equipamentos e posta como uma preocupação central quanto ao desempenho das máquinas (Ho Kim et al., 2008). Entender essas variações intrínsecas a cada modelo de termociclador, torna-se fundamental para a correta adaptação e padronização de protocolos de PCR entre laboratórios.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o par de *primers* mais eficiente para o diagnóstico molecular da *X. albilineans*, agente causal da escaldadura-das-folhas da cana-de-açúcar, e o tempo de preservação do DNA, garantindo a segurança e a viabilidade técnica do diagnóstico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade e a especificidade dos *primers* descritos na literatura para *X. albilineans*.
- Otimizar o protocolo de PCR, se necessário, para maximização da clareza e confiabilidade dos resultados.
- Definir o tempo máximo de armazenamento do DNA total extraído e que proporcione confiabilidade do exame diagnóstico na detecção molecular de *X. albilineans*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL E CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular (LAGEM) da Universidade Federal de São Carlos em Araras-SP. A execução foi estruturada em subprojetos constituídos por testes independentes. A variedade de cana-de-açúcar RB966928 foi selecionada por representar a quarta cultivar mais utilizada nos novos plantios e a segunda mais colhida na região centro-sul do Brasil (RIDESA, 2025). Para a realização dos ensaios o material vegetal foi coletado do campo experimental do LAGEM, procedeu-se à extração de seiva e realização de teste sorológico para determinação da concentração bacteriana. Com exceção das seções 4.3.2 e 4.3.5, que utilizaram amostras aleatórias encaminhadas ao laboratório; de origem, variedade, idade e concentração bacteriana desconhecidas.

4.1.1 Extração De Seiva De Cana-De-Açúcar

Os exames para detecção da doença seguiram a metodologia descrita por Carneiro Jr. et al. (2004) com modificações. A coleta de colmos foi realizada com facão descontaminado com amônia quaternária a 10%. De cada colmo, foram amostrados aproximadamente 15 cm da região basal. A extração da seiva foi conduzida com compressor de ar acoplado a ponteira adaptada, utilizando amostras com corte oblíquo na extremidade realizado por guilhotina. Foram obtidos de 100 a 500 µL de seiva por amostra, adicionando-se duas gotas de Cloreto de Aquil Dimetil Benzil Amônio (1:10) como conservante (Figura 1, página 29).

4.1.2 Diagnose Sorológica

A seiva foi extraída da região basal dos colmos mediante pressão positiva com compressor. As amostras foram subsequentemente aplicadas em membrana de nitrocelulose (poros de 0,45 µm; GE Healthcare, Alemanha) utilizando um dispositivo com 104 poços de 7 mm de diâmetro. Os quatro primeiros poços do lado esquerdo foram destinados aos controles positivos com *X. albilineans* nas concentrações de 10^9 , 10^8 , 10^7 e 10^6 UFC/mL, enquanto o quinto poço recebeu seiva de cana-de-açúcar isenta do patógeno, previamente confirmada como negativa, funcionando como controle negativo (Figura 6, página 45).

Após a secagem da membrana a 80°C por uma hora, os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de leite em pó desnatado a 5% em PBST (900 mL de água deionizada autoclavada + 100 mL de PBS 10x + 1 mL de Tween), seguido por três lavagens de 10 minutos

cada com o mesmo tampão. A membrana foi então incubada com antissoro primário de coelho específico para *X. albilineans* (diluição de 3 μ L de anti-soro em 20 mL de PBST) por uma hora, procedendo-se a novas três lavagens com PBST. Em etapa subsequente, realizou-se a incubação com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (3,8 μ L de IgG em 20 mL de PBS 1x) por duas horas, seguida de idêntico protocolo de três lavagens com PBST.

A revelação foi conduzida no escuro, com agitação constante por uma hora, utilizando solução contendo 0,02 g de Fast blue, 100 mL de cloreto de magnésio 1 M e 20 mL de solução reveladora de Trizma base (24 g de TRIZMA base + 1000 mL de água deionizada autoclavada) por membrana. Para melhorar a legibilidade, impurezas do extrato foram removidas com algodão embebido em solução de hipoclorito (evitando-se a área dos controles). A leitura dos resultados foi realizada após secagem completa à temperatura ambiente, utilizando os controles positivos e negativo como referências para interpretação.



Figura 1 - Processo de análise sorológica para detecção de *Xanthomonas albilineans* em seiva de cana-de-açúcar. (A) Corte e coleta do material vegetal; (B) Adaptação de "teteira" de silicone (3 cm de diâmetro) acoplada ao compressor para extração de seiva; (C) Compressor utilizado para extração por pressão positiva; (D) Extração de seiva de internódios individuais; (E) Adição de conservante (Cloreto de Aquil Dimetil Benzil Amônio); (F) Execução do exame sorológico *dot blot*.

4.2 DIAGNOSE MOLECULAR

4.2.1 Extração De DNA

A extração de DNA total de cana-de-açúcar, citros, triticales, brócolis e tomate foi realizada conforme o protocolo adaptado de Murray e Thompson (1980) com tampão CTAB. O tecido vegetal amostrado foi proveniente exclusivamente da parte aérea das plantas. Para a

cana-de-açúcar, o material foi extraído do colmo. Para as demais espécies, a extração foi realizada a partir de amostras foliares, abrangendo as estruturas da lâmina foliar, do pecíolo e das nervuras centrais.

Amostras de 1 mL foram homogenizadas em microtubos de 2 mL com 1.400 µL de tampão de extração [NaCl 0,7 M, CTAB 1%, Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM e 2-mercaptoetanol 1%] e incubadas a 65°C por 2 horas. Após centrifugação a 8.000 rpm por 5 minutos (Centrifuge 5415 D), 800 µL do sobrenadante foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e submetidos à purificação com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguida de centrifugação a 12.800 rpm por 5 minutos. Do sobrenadante (600 µL), o DNA foi precipitado com 420 µL de isopropanol e mantido a -20°C por 1 hora. Após centrifugação a 12.800 rpm por 20 minutos a 4°C (Centrifuge Jouan BR4i), o *pellet* foi lavado com 800 µL de etanol 70%, centrifugado novamente e seco em concentrador por 10 min. O DNA foi ressuspensão em 50 µL de TE 1x e mantido *overnight* no escuro para completa dissolução.

4.2.2 *Primers E Condições De Amplificação*

Para os ensaios de avaliação dos cinco pares de *primers* para *X. albilineans*, foram empregadas tanto as condições de amplificação originais, conforme descritas pelos respectivos autores, quanto adaptações dos protocolos. Os *primers* utilizados foram:

- ALA4 (5'-CCC GAC TGG CTC CAC CAC TG-3') e L1 (5'-CAA GGC ATC CAC CGT-3') (Pan; Grisham; Burner, 1997), utilizando da ciclagem a 95°C por 5min, 30 ciclos de 94°C por 1s, 55°C por 1s, e 72°C por 30s, e extensão final de 72°C por 2min. O volume final de reação foi de 25-µL contendo 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.2 mM de cada dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 1 µM de cada *primer*, 0.625 unidade de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 360pb;
- PGBL1 (5'-CTT TGG GTC TGT AGC TCA GG-3') e PGBL2 (5'-GCC TCA AGG TCA TAT TCA GC-3') (Pan et al., 1999), utilizando da ciclagem a 95°C por 5min, 30 ciclos de 94°C por 1s, 55°C por 1s, e 72°C por 30s, e extensão final de 72°C por 5min. O volume final de reação foi de 25-µL contendo 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.2 mM de cada dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 1 µM de cada *primer*, 0.625 unidade de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 288pb;
- XAF1 (5'-CCT GGT GAT GAC GCT GGG TT-3') e XAR1 (5'-CGA TCA GCG ATG CAC GCA GT-3') (Wang et al., 1999), sob o seguinte perfil de ciclagem: 30 ciclos divididos em três blocos - 10 ciclos de 94°C por 45s, 65°C por 1min e 72°C por 1min;

10 ciclos com extensão de 2min a 72°C; e 10 ciclos com extensão de 3min a 72°C; finalizando com extensão única a 72°C por 10min. O volume final de reação foi de 25- μ L contendo 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.2 mM de cada dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 1 μ M de cada *primer*, 0.625 unidade de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 600pb;

- XaQf (5'-TTT GCG GTG TCG GTA AAG GAG-3') e XaQr (5'-GCG ATG GCA CTA GGT ACA GC-3') (Garces; Gutierrez; Hoy, 2014), utilizando da ciclagem a 94°C por 4min, 31 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, e 65°C por 3min, e extensão final de 65°C por 3min. O volume final de reação foi de 25- μ L contendo 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.625 mM de cada dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 10 μ M de cada *primer*, 0.625 unidade de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 148pb;
- XaABCF3(5'-CGG CCA GAA GCA GAG AAT CC-3') e XaABCR3 (5'-GCG ATC TCG TTG TTG ATG CG-3') (Shi et al., 2021), utilizando da ciclagem a 94°C por 1min, 35 ciclos de 94°C por 30s, 57°C por 30s, e 72°C por 30s, e extensão final de 72°C por 5min. O volume final de reação foi de 25- μ L contendo 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.625 mM de cada dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 10 μ M de cada *primer*, 0.625 unidade de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 123pb;

Foram conduzidos testes comparativos para avaliar a sensibilidade das adaptações descritas a seguir para os *primers* Ala4/L1 e PGBL, variando os protocolos de corrida e as concentrações de reagentes. Foram realizadas duas adaptações para o Ala4: uma, previamente descrita na literatura por Dayasena, Thushari e Wijesuriya (2019), e outra, desenvolvida pelo LAGEM. Para o PGBL, seguiu-se o mesmo procedimento, sendo a adaptação utilizada a encontrada na literatura de Pan et al., (1999). Os ensaios foram realizados em delineamento único, com oito repetições, considerando cada amostra como uma unidade experimental. As condições de amplificação adaptadas utilizadas foram:

- ALA4 (5'-CCC GAC TGG CTC CAC CAC TG-3') e L1 (5'-CAA GGC ATC CAC CGT-3') (Dayasena; Thushari; Wijesuriya, 2019), utilizando da ciclagem a 95°C por 5min, 30 ciclos de 94°C por 1s, 59,5°C por 1s, e 72°C por 30s, e extensão final de 72°C por 2min. O volume final de reação foi de 25- μ L contendo 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.2 mM de cada dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 1 μ M de cada *primer*, 0.625 unidade de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 360pb;

- ALA4 (5'-CCC GAC TGG CTC CAC CAC TG-3') e L1 (5'-CAA GGC ATC CAC CGT-3') (adaptação LAGEM), utilizando da ciclagem a 95°C por 5min, 30 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, e 72°C por 30s, e extensão final de 72°C por 5min. O volume final de reação foi de 25- μ L contendo 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.2 mM de cada dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 1 μ M de cada primer, 0.625 unidade de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 360pb;
- PGBL1 (5'-CTT TGG GTC TGT AGC TCA GG-3') e PGBL2 (5'-GCC TCA AGG TCA TAT TCA GC-3') (Pan et al., 1999), utilizando da ciclagem a 95°C por 5min, 40 ciclos de 94°C por 1s, 55°C por 1s, e 72°C por 30s, e extensão final de 72°C por 5min. O volume final de reação foi de 25- μ L contendo 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.2 mM de cada dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 1 μ M de cada *primer*, 2,5 unidades de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 288pb;
- PGBL1 (5'-CTT TGG GTC TGT AGC TCA GG-3') e PGBL2 (5'-GCC TCA AGG TCA TAT TCA GC-3') (adaptação LAGEM), utilizando da ciclagem a 95°C por 5min, 30 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, e 72°C por 30s, e extensão final de 72°C por 5min. O volume final de reação foi de 25- μ L contendo 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.2 mM de cada dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 1 μ M de cada *primer*, 0.625 unidade de Taq DNA. Tamanho esperado do fragmento: 288pb.

4.2.3 Eletroforese

Para a análise eletroforética, adicionou-se 2,5 μ L de tampão de carregamento aos produtos da reação, que foram subsequentemente aplicados em gel de agarose a 2% preparado em tampão TBE 0,5X (*Life Technologies model 250*). As corridas eletroforéticas foram conduzidas mantendo-se uma voltagem constante de 80 Volts, com duração aproximada de 52 minutos a 1 hora. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de luz ultravioleta (*Transilluminador L Pix Loccus*) para avaliação.

4.3 PARÂMETROS DE SELEÇÃO DE PRIMERS

4.3.1 Pré- Screening

Inicialmente, foi realizado um *pré-screening* para selecionar os *primers* mais adequados para os ensaios subsequentes (Figura 2, página 33). Foram avaliados cinco pares de *primers* (PGBL1/PGBL2, Ala4/L1, XAF1/XAR, XaABCF3/XaABCR3 e XaQf/XaQr) utilizando duas fontes de DNA: cultura pura de *X. albilineans* (ID ScXa01-01), sem prévia extração de DNA,

e DNA total extraído de 20 amostras de cana-de-açúcar (com 10^6 UFC/mL, dot-blot). A cultura bacteriana, previamente quantificada em 10^9 UFC/mL por *dot-blot* (dados não apresentados), foi submetida a diluições seriadas, variando de 10^9 UFC/mL a $0,01$ UFC/ μ L, para a avaliação da sensibilidade dos *primers*. Após a amplificação por PCR, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

Os resultados obtidos estão sumarizados nas Tabelas 1 e 2 (página 41). Os dados foram analisados mediante cálculo de proporções simples, considerando que a identificação de 100% das amostras infectadas é essencial para o controle da doença, que se baseia no princípio da exclusão (Oliveira; Urashima, 2018).

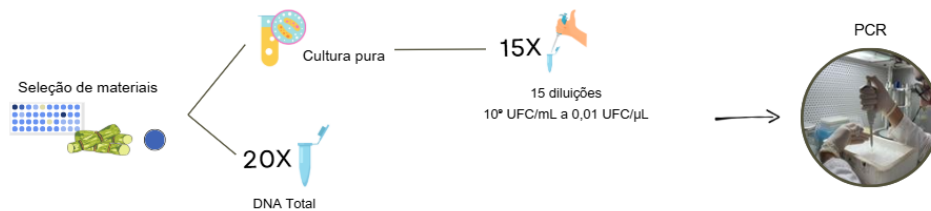


Figura 2 - Fluxograma do *pré-screening* para seleção de *primers*. O esquema apresenta a avaliação em diluição seriada de cultura pura de *Xanthomonas albilineans* (10^9 UFC/mL) e DNA total de cana-de-açúcar.

4.3.2 Sensibilidade, Especificidade E Acurácia

A seleção do conjunto de *primers* e da condição de amplificação ideais para a detecção de *X. albilineans* incluiu a avaliação de três parâmetros: sensibilidade, especificidade e acurácia (Tabela 3 e 4, páginas 42 e 43) (Oliveira; Urashima, 2018). O delineamento adotado foi o de grupos independentes, onde cada *primer* foi testado contra um mesmo painel de amostras.

A sensibilidade, definida como a capacidade de detectar o patógeno em amostras infectadas (Equação 1), foi avaliada utilizando 4 amostras de cultura pura (ID: ScXa04), em concentrações de 10^9 , 10^8 , 10^7 e 10^6 UFC/mL (*dot-blot*, resultados não apresentados), e 6 amostras de DNA total de cana-de-açúcar (ID: ScXa05) de origem, variedade, idade e concentração bacteriana desconhecidas. Para análise de sensibilidade, foram utilizadas as fórmulas:

$$\text{Razão FP} = \frac{FP \times 100}{VP + FP} \quad (1)$$

$$\text{Razão FN} = \frac{FN \times 100}{VN + FN} \quad (2)$$

$$\text{Sensibilidade relativa (\%)} = \frac{VP \times 100}{VP + FN} \quad (3)$$

Onde:

VP (Verdadeiro Positivo): amostras corretamente identificadas como positivas;

VN (Verdadeiro Negativo): amostras corretamente identificadas como negativas;

FP (Falso Positivo): amostras negativas incorretamente identificadas como positivas;

FN (Falso Negativo): amostras positivas incorretamente identificadas como negativas.

A especificidade (Equação 4), correspondente à capacidade de identificar corretamente amostras não infectadas, foi determinada pela reação com DNA de outros microrganismos e outras culturas, incluindo: 1 DNA de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, 1 DNA de *Xanthomonas sp.*, 1 DNA de *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, 2 DNAs de citros com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, 1 DNA de triticales com *Pyricularia oryzae*, 1 DNA de citros não detectável, 2 DNAs de brócolis e 1 DNA de tomate (descrição Tabela 4, página 44). A equação para a análise de especificidade é:

$$\text{Especificidade relativa (\%)} = \frac{VN \times 100}{VN + FP} \quad (4)$$

A acurácia foi calculada com base na relação entre os resultados de sensibilidade e especificidade (Equação 4), a partir das equações a seguir:

$$\text{Acurácia relativa} = \frac{(VP + VN) \times 100}{(VP + VN + FP + FN)} \quad (5)$$

Todos os DNAs foram submetidos à amplificação por PCR em termociclador. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador UV.

O critério para o desempate entre *primers* com desempenho equivalente foi definido por meio de um teste de sensibilidade adicional, utilizando aproximadamente 222 amostras de cana-de-açúcar infectadas (Tabela 6, página 45). O experimento foi estruturado em duas etapas: um teste de diluição de DNA em *pool* de amostras (item 4.3.3) e uma avaliação da estabilidade de

detecção e preservação do DNA (item 4.3.4).

4.3.3 Sensibilidade Por Diluição Do DNA (*Pool De Amostras*)

Para o teste de diluição em *pool* (Figura 3), foram utilizadas amostras sadias, não detectáveis pelo exame sorológico, e dois rebolos com 10^6 UFC/mL de *X. albilineans* (confirmado por *dot-blot*, Figura 6, página 45) como constituinte doente. O delineamento consistiu em um arranjo fatorial 9×2 , com nove proporções, variando de 1 parte infectada para 9 partes sadias até 9 partes infectadas para 1 parte sadia, mantendo uma massa total constante por amostra. Os tratamentos foram testados para os dois melhores *primers* selecionados no item 4.3.2., totalizando 18 combinações tratamento-*primer* (Tabela 7, página 47). O experimento foi conduzido em duplicata, com oito repetições biológicas independentes ($n=8$). Os resultados foram ainda avaliados por meio do cálculo de proporções simples, empregando-se o princípio da exclusão (Oliveira; Urashima, 2018).

Adicionalmente, dados secundários foram obtidos mediante a diluição do DNA de menor concentração (amostra T1: 1 parte infectada para 9 partes sadias) em tampão TE, resultando em cinco tratamentos (Tabela 8, página 47). Este ensaio também foi realizado em duplicata, com oito réplicas por tratamento. Após a amplificação por PCR com o *primer* de melhor desempenho, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

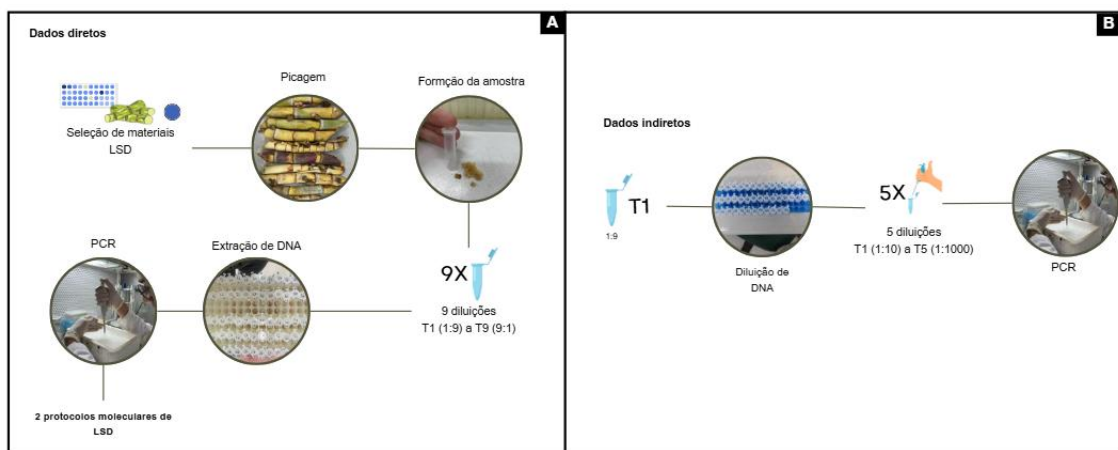


Figura 3 - Fluxograma do teste de sensibilidade por diluição de DNA em pool de amostras. (A) Dados diretos obtidos pela diluição progressiva de tecido infectado em tecido sadio; (B) Dados indiretos obtidos pela diluição seriada da amostra T1 (1 parte infectada: 9 partes sadias) em tampão TE.

4.3.4 Estabilidade De Detecção E Preservação Do DNA

Os testes de estabilidade de detecção e preservação do DNA iniciaram com 80 amostras de tecido contendo 10^6 UFC/mL de *X. albilineans*, previamente diagnosticadas por *dot-blot*.

Esta avaliação, em conjunto com os resultados do item 4.3.3, serviu como critério para o desempate final. O delineamento estatístico adotado foi um fatorial 4 x 3 x 2 com medidas repetidas no fator tempo, as amostras positivas foram distribuídas nos quatro tratamentos de preservação e, subsequentemente, avaliadas nos tempos 0, 15 e 34 dias com os dois pares de *primers*.

Os tratamentos consistiram em: T1) preservação em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; T2) preservação em geladeira a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$; T3) temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$); e T4) temperatura elevada ($\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$). As amostras congeladas foram descongeladas no gelo no dia da análise por PCR. As amostras mantidas em temperatura ambiente foram armazenadas dentro do laboratório em sala climatizada, enquanto as submetidas à temperatura elevada foram posicionadas externamente, expostas à radiação solar, chuva e variações naturais de temperatura e umidade. Segundo dados da Estação Meteorológica Automática do campus, localizada em Araras - SP (Lat. $22^{\circ} 18' \text{ S}$; Long. $47^{\circ} 23' \text{ O}$; Alt. 690 m), as temperaturas variaram entre $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O experimento foi conduzido em duplicata, com dez repetições biológicas por tratamento ($n=10$), considerando cada amostra como uma unidade experimental. Para a avaliação da estabilidade de detecção e preservação do DNA, utilizou-se proporções simples e a Regressão Logística Binomial, com exponenciação dos coeficientes para obtenção da Razão de Chances (Odds Ratio - OR) das variáveis independentes (Silveira; Mattos; Saes, 2016).

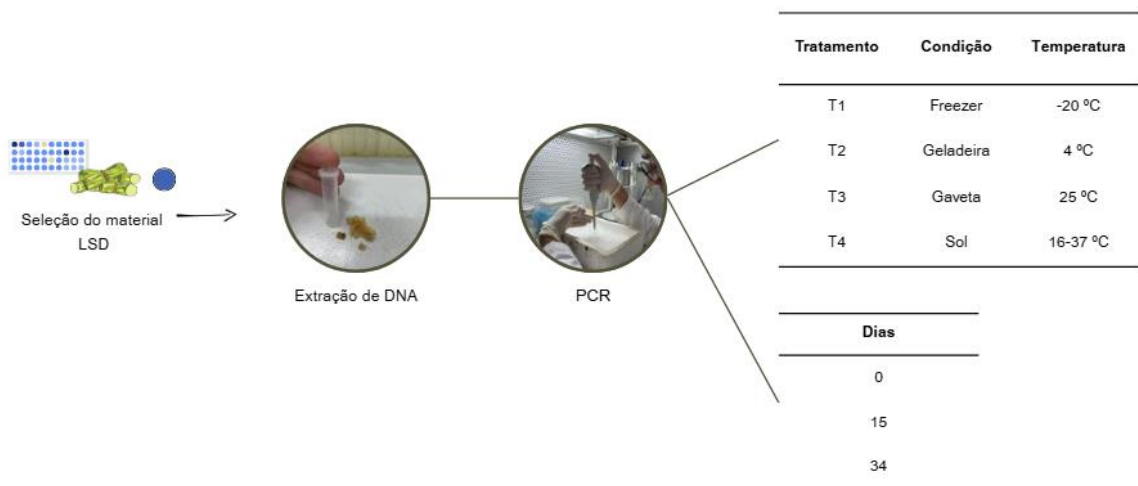


Figura 4 - Fluxograma do teste de preservação de DNA e estabilidade de detecção. Amostras de DNA extraídas foram armazenadas em quatro condições distintas (Freezer -20°C , Geladeira 4°C , Gaveta $\sim 25^{\circ}\text{C}$ e Ambiente externo $\sim 37^{\circ}\text{C}$) e avaliadas nos tempos 0, 15 e 34 dias para monitoramento da capacidade de detecção dos *primers*.

As análises estatísticas e confecção de gráficos foram realizadas com a linguagem de programação R (R Core Team, 2025). Os modelos de regressão logística foram ajustados por

meio da função `glm()` do pacote `base stats`. A partir dos modelos, as probabilidades previstas e intervalos de confiança foram calculados com as funções `exp()` e `predict()`. A validação gráfica dos resíduos foi realizada com a função `hnp()` do pacote `hnp`. A visualização final dos dados e das curvas de predição, produzidas com as funções `plot()` e `data.frame()`, e a customização tipográfica dos gráficos foi conduzida com `loadfonts()` e `windowsFonts()` do pacote `extrafont`.

4.3.5 Otimização Do Protocolo

Após a seleção do *primer* de melhor desempenho, novas adaptações do protocolo foram testadas. Os experimentos foram conduzidos no termociclador C1000 Touch, que permite a configuração de gradiente de temperatura. Foram conduzidos quatro testes distintos, abrangendo de 3 a 6 temperaturas de anelamento por ensaio, totalizando a avaliação de 16 condições diferentes, conforme detalhado na Tabela 10 (página 54). Os ensaios foram realizados de forma simples (um ensaio por teste) com dez repetições por tratamento (temperatura), analisando-se a sensibilidade e a redução visual de bandas inespecíficas. A análise dos dados foi realizada por meio do cálculo de proporções simples, com base no princípio da exclusão, conforme metodologia adotada em itens anteriores (Oliveira; Urashima, 2018).

Em seguida, procedeu-se com um teste para avaliar o desempenho em diferentes termocicladores do laboratório: A) C1000 Touch, B) PTC-100, C) PCR System 9700. O ensaio único foi conduzido com dez repetições ($n=10$), considerando cada amostra como uma unidade experimental. A análise dos dados também foi conduzida por meio de proporções simples. Após a amplificação por PCR com o *primer* selecionado, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

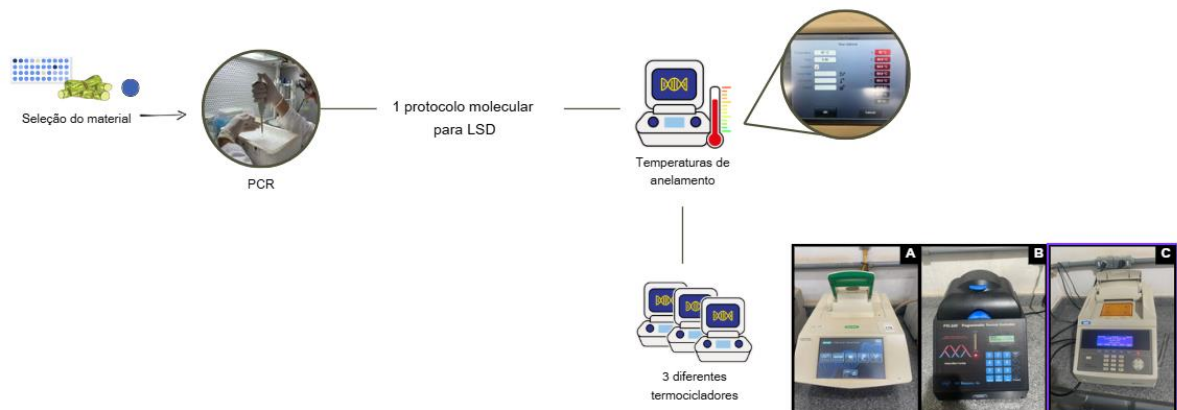


Figura 5 - Fluxograma dos testes de otimização do protocolo de PCR. O esquema compreende a avaliação de dezesseis temperaturas de anelamento distintas e a comparação do desempenho em três termocicladores diferentes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRÉ-SCREENING

A Tabela 1 (página 41) apresenta os resultados do *pré-screening* com os cinco *primers* testados. Os *primers* PGBL1/PGBL2 e Ala4/L1 detectaram até 10^7 UFC/mL, embora o Ala4/L1 não tenha detectado a concentração inicial de 10^9 UFC/mL, possivelmente devido à inibição por excesso de população bacteriana ou de DNA (Gibbs, 1990). O *primer* Xaf1/Xar1 detectou até 10^5 UFC/mL. O XaABCF3/XaABCR3 apresentou o melhor desempenho, detectando até 10^2 UFC/mL, enquanto o XaQf/XaQr foi o menos sensível, detectando apenas 10^8 UFC/mL.

Conforme reportado na literatura, os limites de detecção dos *primers* variam significativamente entre protocolos. Pan, Grisham e Burner (1997) estabeleceram que o par Ala4/L1 detecta entre 0-50 UFC/mL (0-5 UFC/100uL) tanto em seiva quanto em tecidos foliares, e até 50 UFC/mL (5 UFC/100uL) em cultura pura. Para o PGBL, Pan et al. (1999) determinaram um limite de 40 UFC/mL (4 UFC/100uL) por reação em cultura pura, sem testes em tecidos totais. Wang et al. (1999) relataram que o par Xaf1/Xar1 requer 2×10^4 UFC/mL de *X. albilineans*. Os *primers* XaABCF3/XaABCR3 e XaQf/XaQr, originalmente desenhados para qPCR, possuem limites de detecção de 10^4 UFC/mL a 10^3 UFC/mL em protocolos convencionais avaliados, sendo esperada maior sensibilidade em suas aplicações *real-time* (Garces; Gutierrez; Hoy, 2014; Shi et al., 2021).

A utilização do mesmo alvo genético ou dos mesmos *primers* em diferentes protocolos de PCR não assegura a concordância entre os resultados obtidos. O emprego de diferentes preparações comerciais de DNA polimerases e compostos reacionais, assim como o tempo dedicado ao ajuste das condições experimentais, constituem fatores de variação tão cruciais quanto o próprio DNA-alvo. O uso de preparações universais de *master mix*, ao restringir as possibilidades de otimização, pode comprometer a sensibilidade do ensaio. Adicionalmente, a quantidade total de DNA na preparação do *template*, incluindo DNA patogênico e do hospedeiro, varia substancialmente entre amostras na rotina clínica, acrescentando complexidade à padronização metodológica (Bastien; Procop; Reischl, 2008).

Utilizando DNA total extraído de 20 colmos com sintomas de LSD, o cenário apresentado é totalmente distinto. Os *primers* PGBL1/PGBL2, Xaf1/Xar1 e XaQf/XaQr não detectaram o patógeno em nenhuma amostra. Em contraste, os *primers* Ala4/L1 e XaABCF3/XaABCR3 detectaram o patógeno em 65% e 95% das amostras, respectivamente. A discrepância pode estar associada à presença de inibidores de PCR nas amostras de DNA

totais (Wang et al., 1999) ou do baixo valor populacional do patógeno (Davis, 1994) e as diferentes reações dos *primers* frente aos fatores. Em seu trabalho, Wang et al. (1999) contornaram esse problema submetendo as amostras de seiva de cana-de-açúcar a um tratamento térmico (fervura por 10 minutos) para destruir os inibidores, preferindo este método à diluição, que poderia reduzir a concentração do patógeno abaixo do limite de detecção.

Durante a revisão bibliográfica identificaram-se variações significativas nos protocolos de PCR para alguns dos *primers* testados. A otimização das condições de reação de PCR envolve ajustes precisos em parâmetros como temperatura de anelamento e concentrações de MgCl₂, Taq DNA polimerase e *primers*. Este processo, que pode demandar de três a seis meses, tem como objetivo simultaneamente maximizar a sensibilidade e a especificidade da reação. A sensibilidade do ensaio para um determinado microrganismo em uma amostra biológica depende fundamentalmente de três elementos: as condições físico-químicas da reação, a concentração e natureza do DNA-alvo e os *primers* selecionados. A otimização desses parâmetros representa uma fonte significativa de variação interlaboratorial (Bastien; Procop; Reischl, 2008).

Pan et al. (1999) propuseram o *primer* PGBL e, no mesmo trabalho, otimizaram o protocolo mediante o aumento da concentração de *Taq DNA polymerase* de 0,625 para 2,5 unidades por reação, a extensão dos tempos de desnaturação e anelamento de 1 para 10 segundos, e o incremento de 30 para 40 ciclos. De modo similar, Dayasena, Thushari e Wijesuriya (2019) elevaram a temperatura de anelamento do *primer* Ala4 de 55 para 59,5 °C visando otimizar a reação. A Tabela 3 compara a sensibilidade desses e de outros protocolos modificados na detecção de *X. albilineans* em amostras de DNA total extraído de cana-de-açúcar infectada. Os resultados indicam que, tanto para o *primer* PGBL1/PGBL2 quanto para o Ala4/L1, a adaptação do protocolo do LAGEM com extensão do tempo de desnaturação e anelamento para 30 segundos demonstrou a maior eficiência, alcançando taxas de detecção de 87,5% e 100%, respectivamente.

Os dados de Fernandes (2005) corroboram os resultados obtidos, uma vez que em sua adaptação para a identificação de *Tritrichomonas foetus* a duplicação ou triplicação do tempo de cada etapa do ciclo (desnaturação, anelamento e extensão) em relação ao protocolo padrão resultou em melhor desempenho, com a triplicação sendo ligeiramente superior. Esta modificação permite uma ligação mais eficiente dos *primers* ao DNA molde, particularmente quando a concentração do *template* é baixa, assegurando o início robusto da amplificação e produzindo bandas mais bem definidas. No entanto, essa abordagem apresenta compromissos

significativos, incluindo maior tempo de ocupação do termociclador, redução na rapidez da obtenção de resultados e aumento do risco de amplificações inespecíficas, conforme documentado por (Persing, 1993 apud Fernandes, 2005).

5.2 EFICIÊNCIA BASEADA NA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E ACURÁCIA

Com base nos resultados anteriores, os *primers* selecionados para os testes de sensibilidade e especificidade subsequentes (Tabelas 4 e 5, páginas 44 e 45) foram XaABCF3/XaABCR3 e as adaptações obtidas para Ala4/L1 e PGBL1/PGBL2. Na análise de sensibilidade utilizando amostras de cana-doente, o *primer* XaABCF3/XaABCR3 detectou 7 verdadeiros positivos, mas apresentou 3 falsos negativos. Os *primers* Ala4/L1 e PGBL1/PGBL2 demonstraram menor sensibilidade, registrando 5 verdadeiros positivos e 5 falsos negativos cada.

Quanto à especificidade, o desempenho do XaABCF3/XaABCR3 foi inferior, produzindo 9 falsos positivos e apenas 1 verdadeiro negativo. Em contraste, os *primers* Ala4/L1 e PGBL1/PGBL2 mostraram especificidade ideal, com 10 verdadeiros negativos e nenhum falso positivo. Os falsos positivos do XaABC incluíram reações cruzadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, *Xanthomonas sp.*, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Pyricularia oryzae* e DNA total de citros, brócolis e tomate.

Os trabalhos originais de desenvolvimento dos *primers* Ala4/L1 e PGBL1/PGBL2 confirmam a alta especificidade observada. O par Ala4/L1 detectou 71 das cepas de *X. albilineans* testadas, abrangendo os sorovares I, II e III, sem apresentar amplificação para bactérias saprofíticas na mesma região de banda (Pan; Grisham; Burner, 1997). O *primer* PGBL1/PGBL2 apresentou resultados positivos para 61 das 71 cepas de *X. albilineans*, igualmente sem produtos de amplificação para bactérias saprofíticas de cana (Pan et al., 1999). A principal discordância reside no *primer* XaABCF3/XaABCR3, que em sua validação original detectou todas as 43 cepas de *X. albilineans* testadas e não amplificou nenhuma das 16 cepas de outras bactérias avaliadas, outras *Xanthomonas sp.*, *Acidovorax spp.* e *Leifsonia sp.* (Shi et al., 2021).

Tabela 3 - Comparação da sensibilidade de protocolos de PCR para os *primers* PGBL e Ala4/L1 na detecção de *Xanthomonas albilineans* em amostras de DNA total de cana-de-açúcar infectada, sob diferentes tempos de ciclo e concentração de reagentes.

<i>Primer</i>	<i>Condição</i>	<i>Deteção</i>
PGBL1 / PGBL2 ¹	95°C - 5 min 30 ciclos 1 s - 94°C 1 s - 55°C 30s - 72°C Final: 72° - 5 min	50%
PGBL1 / PGBL2**	95°C - 5 min 40 ciclos 1 s - 94°C 1 s - 55°C 30s - 72°C Final: 72° - 5 min	50%
PGBL1 / PGBL2	95°C - 5 min 30 ciclos 30 s - 94°C 30 s - 55°C 30s - 72°C Final: 72° - 5 min	87,5%
Ala4 / L1 ²	95°C - 5 min 30 ciclos 1 s - 94°C 1 s - 55°C 30 s - 72°C Final: 72° - 2 min	87,5%
Ala4 / L1 ³	95°C - 5 min 30 ciclos 1 s - 94°C 1 s - 59,5°C 30 s - 72°C Final: 72° - 2 min	75%
Ala4 / L1	95°C - 5 min 30 ciclos 30 s - 94°C 30 s - 55°C 30s - 72°C Final: 72° - 5 min	100%

**Aumento da Taq DNA polymerase, de 0.625 unidade para 2.5 unidade por reação.

- (1) Pan et al (1999)
- (2) Pan; Grisham; Burner (1997)
- (3) Dayasena, Thushari e Wijesuriya (2019)

A discrepância na especificidade do *primer* XaABCF3/XaABCR3 em relação à literatura permanece indeterminada. As hipóteses incluem variações entre termocicladores, particularmente quanto à precisão da temperatura de anelamento e à taxa de *hamp-up*. A especificidade da ligação do *primer* é influenciada por múltiplos fatores, como seu comprimento, temperatura de anelamento, concentração de magnésio e formação de estruturas secundárias no *template*. O desenvolvimento de um método de detecção por PCR requer a inclusão de controles adequados, incluindo amostras negativas, positivas, reações com *primer* único e diluições seriadas. A baixa especificidade pode ser corrigida mediante elevação da temperatura de anelamento ou redução das concentrações iniciais de *template* ou *primers* (Henson; French, 1993).

A acurácia diagnóstica, que integra sensibilidade e especificidade, foi de 75% para os *primers* Ala4/L1 e PGBL, enquanto o *primer* XaABC apresentou acurácia inferior de 40%, devido principalmente à sua baixa especificidade. Para desempatar os *primers* com desempenho equivalente, realizou-se um teste adicional (Tabela 6, página 45) de sensibilidade com cerca de 222 amostras de cana-de-açúcar infectadas. O experimento foi estruturado em duas fases: um teste de diluição de DNA em *pool* com 142 amostras de concentração variada, e uma avaliação da estabilidade de detecção e preservação do DNA utilizando 80 amostras padronizadas. O *primer* Ala4/L1, adaptado às condições do LAGEM, demonstrou superioridade, detectando 88,93% do total de amostras.

Tabela 4 - Sensibilidade e especificidade de diferentes *primers* para detecção molecular de *Xanthomonas albilineans*.

Amostra	Hospedeiro	Patógeno	ID	XaABC	Ala4/L1	PGBL
1	Cana-de-açúcar	<i>Xanthomonas albilineans</i>	ScXa04-01	-	-	-
2		<i>X. albilineans</i>	ScXa04-02	-	-	-
3		<i>X. albilineans</i>	ScXa04-03	+	-	-
4		<i>X. albilineans</i>	ScXa04-04	-	-	-
5		<i>X. albilineans</i>	ScXa05-01	+	+	+
6		<i>X. albilineans</i>	ScXa05-02	+	+	+
7		<i>X. albilineans</i>	ScXa05-03	+	+	+
8		<i>X. albilineans</i>	ScXa05-04	+	+	+
9		<i>X. albilineans</i>	ScXa05-05	+	+	+
10		<i>X. albilineans</i>	ScXa05-06	+	-	-
11		<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	LxAr01-01	+	-	-
12		<i>Xanthomonas</i> sp.	ScFe01-01	+	-	-
13		<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	ScEv04-01	+	-	-
14	Citros	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	CiCc01-01	-	-	-
15	Citros	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	CiCc01-02	+	-	-
16	Triticale	<i>Pyricularia oryzae</i>	TtPp01-01	+	-	-
17	Citros	-		+	-	-
18	Brócolis	-		+	-	-
19	Brócolis	-		+	-	-
20	Tomate	-		+	-	-

Tabela 5 - Comparação dos *primers* XaABC, Ala4/L1 e PGBL nas melhores condições para a detecção de *Xanthomonas albilineans*.

<i>Primer</i>	Condição de amplificação do DNA	VP	FP	FN	VN	Sensibilidade relativa SE (%)	Especificidade relativa SP (%)	Acurácia (%)
PGBL1 / PGBL2	Adaptado*	5	0	5	10	50	100	75
Ala4 / L1	Adaptado**	5	0	5	10	50	100	75
XaABCF3 / XaABCR3	Shi et al., 2021	7	9	3	1	70	10	40

*Condição de amplificação recomendada por Pan et al (1999) com a extensão das etapas de desnaturação e anelamento para 30 segundos;

** Condição de amplificação recomendada por Pan, Grisham e Burner (1997) com o aumento da temperatura de anelamento para 60°C e a extensão das etapas de desnaturação e anelamento para 30 segundos;

Tabela 6 - Teste de sensibilidade comparativa para desempate dos *primers* PGBL e AL4/L1 na detecção de *Xanthomonas albilineans* em DNA total de cana-de-açúcar infectada.

<i>Primer</i>	Condição	Detecção	
PGBL1/PGBL2	Adaptado*	194/223	86,99%
Ala4/L1	Adaptado**	217/222	88,93%

*Condição de amplificação recomendada por Pan et al (1999) com a extensão das etapas de desnaturação e anelamento para 30 segundos;

** Condição de amplificação recomendada por Pan, Grisham e Burner (1997) com o aumento da temperatura de anelamento para 60°C e a extensão das etapas de desnaturação e anelamento para 30 segundos;

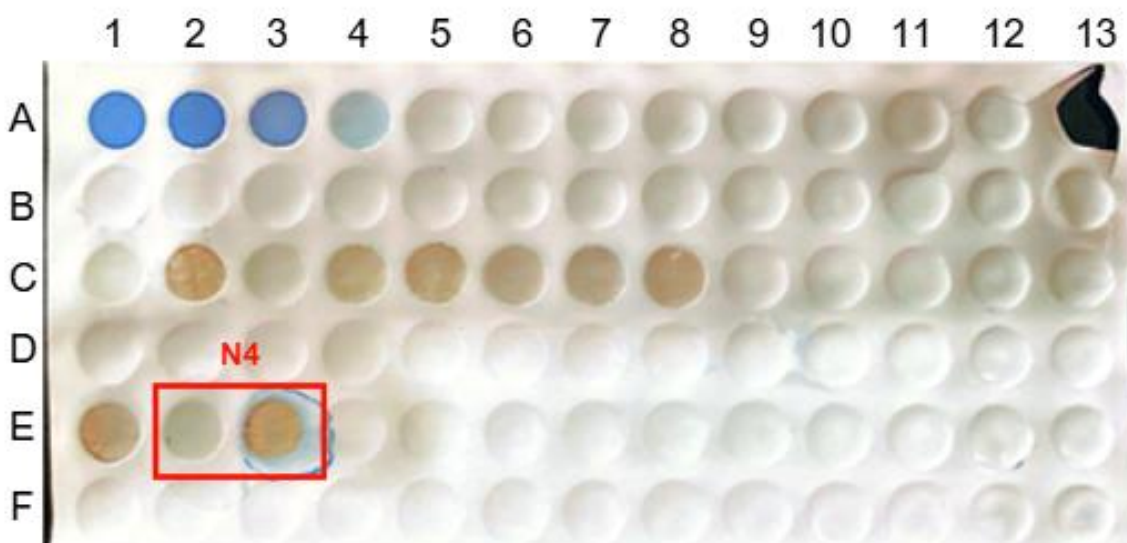


Figura 6 - Foto da membrana resultante da análise sorológica para detecção de *Xanthomonas albilineans* em seivas extraídas de colmos de cana-de-açúcar. Os cinco primeiros “poços” da membrana A1-A5 são os controles, os poços A1 a A4 são os controles positivos e o poço A5 é o controle negativo, respectivamente. Em vermelho, sinalizada, as amostras N4 utilizadas para o experimento de pool de amostra.

5.3 SENSIBILIDADE DOS CONJUNTOS DE *PRIMERS* USANDO DILUIÇÃO DO DNA

No teste de diluição de DNA em *pool*, utilizaram-se amostras consideradas sadias (não detectáveis) e dois toletes com 10^6 UFC/mL de *X. albilineans* (confirmado por *dot-blot*; Figura 6, página 45) como constituinte doente. As proporções foram preparadas variando de 1 parte infectada (0,08 g) para 9 partes sadias (0,72 g) até 9 partes infectadas (0,72 g) para 1 parte sadia (0,08 g), mantendo uma massa total constante de aproximadamente 0,8 g por amostra. Os resultados da Tabela 7 (página 47) demonstram que o *primer* Ala4/L1 apresentou maior consistência na detecção de *X. albilineans* em todas as diluições testadas (100%), enquanto o PGBL exibiu variações significativas em sua eficiência de detecção. Esta inconsistência do *primer* PGBL corrobora observações previamente registradas na rotina diagnóstica do LAGEM.

Para além, da avaliação da sensibilidade do exame diagnóstico, a constituição de amostras compostas demonstrou ser uma estratégia viável para a análise molecular, reduzindo custos de extração e tornando o diagnóstico acessível ao setor produtivo. Notavelmente, mesmo nas amostras mais diluídas (T1), a matriz manteve níveis representativos de inibidores de PCR e polissacarídeos característicos do tecido completo de cana-de-açúcar (Wang et al., 1999). Esta condição confere maior confiabilidade ao teste, uma vez que a detecção de 100% obtida com o *primer* Ala4/L1 em amostras T1 valida sua eficácia em condições reais, simulando desafios encontrados em amostras da rotina laboratorial.

Também foram obtidos dados secundários para o *primer* Ala4/L1, mediante a diluição do DNA de menor concentração (amostra T1: 1 parte infectada para 9 partes sadias) em tampão TE. O *primer* demonstrou sensibilidade notável, detectando *X. albilineans* em 31% das réplicas mesmo na diluição 1:1000 (uma parte da amostra T1 para 1000 partes de TE).

Tabela 7 - Viabilidade da formação de *pools* de amostras para detecção de *Xanthomonas albilineans*: Avaliação da sensibilidade em diferentes proporções de DNA de cana-doente (10^6 UFC/mL) e cana-sadia.

Tratamento	Concentração	Composição da amostra		Detecção	
		Doente (g)	Sadio (g)	Ala4/L1	PGBL
T1	1:9	0,08	0,72	100%	93,8%
T2	2:8	0,16	0,64	100%	100%
T3	3:7	0,24	0,56	100%	100%
T4	4:6	0,32	0,48	100%	100%
T5	5:5	0,4	0,4	100%	100%
T6	6:4	0,48	0,32	100%	100%
T7	7:3	0,56	0,24	100%	93,8%
T8	8:2	0,64	0,16	100%	100%
T9	9:1	0,72	0,08	100%	93,8%

Para ambos os conjuntos de primers, as condições de amplificação foram adaptadas a partir do protocolo estabelecido pelo LAGEM, com a extensão das etapas de desnaturação e anelamento para 30 segundos. Para o par Ala4/L1, também foi realizado um ajuste na temperatura de anelamento, que foi elevada para 60 °C.

Tabela 8 - Análise do limite de detecção máximo para o Ala4/L1: Sensibilidade do ensaio após diluições seriadas da amostra composta T1 (1 parte infectada:9 partes sadias) para *Xanthomonas albilineans*.

Tratamento	Concentração	Detecção
T1	1:10	87,5%
T2	1:50	50%
T3	1:75	50%
T4	1:100	43,8%
T5	1:1000	31,2%

Condição de amplificação recomendada por Pan, Grisham e Burner (1997) com o aumento da temperatura de anelamento para 60°C e a extensão das etapas de desnaturação e anelamento para 30 segundos;

5.4 ESTABILIDADE DE DETECÇÃO DOS *PRIMERS* E AS FORMAS DE PRESERVAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

Os testes de estabilidade de detecção e preservação do DNA iniciaram com 80 amostras de tecido contendo 10^6 UFC/mL de *X. albilineans* (*dot-blot*, dados não apresentados). Na avaliação inicial, o *primer* PGBL detectou 67,5% (54/80) das amostras, enquanto o Ala4/L1 apresentou sensibilidade significativamente superior, com 93,75% (75/80) de detecção. As amostras positivas foram distribuídas em quatro tratamentos de preservação e reavaliadas nos tempos 0, 15 e 34 dias. Conforme apresentado na Tabela 9 (página 48), ambos os *primers* exibiram redução progressiva na capacidade de detecção ao longo do tempo. No entanto, a magnitude da perda de sensibilidade foi notavelmente menor para o Ala4/L1, que demonstrou maior estabilidade e capacidade de manter a detecção em comparação com o PGBL.

A análise de regressão logística binomial confirma que o tempo de armazenamento afeta diferencialmente os dois *primers*. Para o PGBL, o efeito do tempo foi estatisticamente significativo nos tratamentos T1 ($p=0,00173$), T2 ($p=0,001394$) e T3 ($p=0,00116$), mas não no T4 ($p=1$). Em contraste, o Ala4/L1 mostrou significância estatística em todos os tratamentos: T1 ($p=0,002288$), T2 ($p=0,029281$), T3 ($p=0,014151$) e T4 ($p=0,000292$). Estes resultados indicam que, embora ambos os *primers* sejam afetados pelo tempo de armazenamento, o Ala4/L1 demonstra um perfil durante a degradação mais consistente entre os diferentes tratamentos de preservação. A Figura 7 (página 49) torna claro o efeito prático dos diferentes tratamentos de preservação na detectabilidade do DNA ao longo do tempo.

Tabela 9 - Avaliação da sensibilidade dos *primers* sob diferentes condições de armazenamento: Teste de detecção em amostras de DNA total de cana-de-açúcar, positivadas para *Xanthomonas albilineans*, em função da temperatura e do tempo.

<i>Primer</i>	Condição de Armazenamento	Dia 0 (Controle)	Dia 15	Dia 34
Ala4 / L1	-20 °C	100%	81,2%	50%
	+4 °C	100%	90%	75%
	Temperatura Ambiente (~25 °C)	100%	83,3%	66,7%
	Temperatura Elevada (~37 °C)	100%	82,4%	31,2%
PGBL1 / PGBL2	-20 °C	100%	50%	8,33%
	+4 °C	100%	64,3%	7,14%
	Temperatura Ambiente (~25 °C)	100%	42,9%	7,14%
	Temperatura Elevada (~37 °C)	100%	50%	0%

Para ambos os conjuntos de *primers*, as condições de amplificação foram adaptadas a partir do protocolo estabelecido pelo LAGEM, com a extensão das etapas de desnaturação e anelamento para 30 segundos. Para o par Ala4/L1, também foi realizado um ajuste na temperatura de anelamento, que foi elevada para 60 °C.

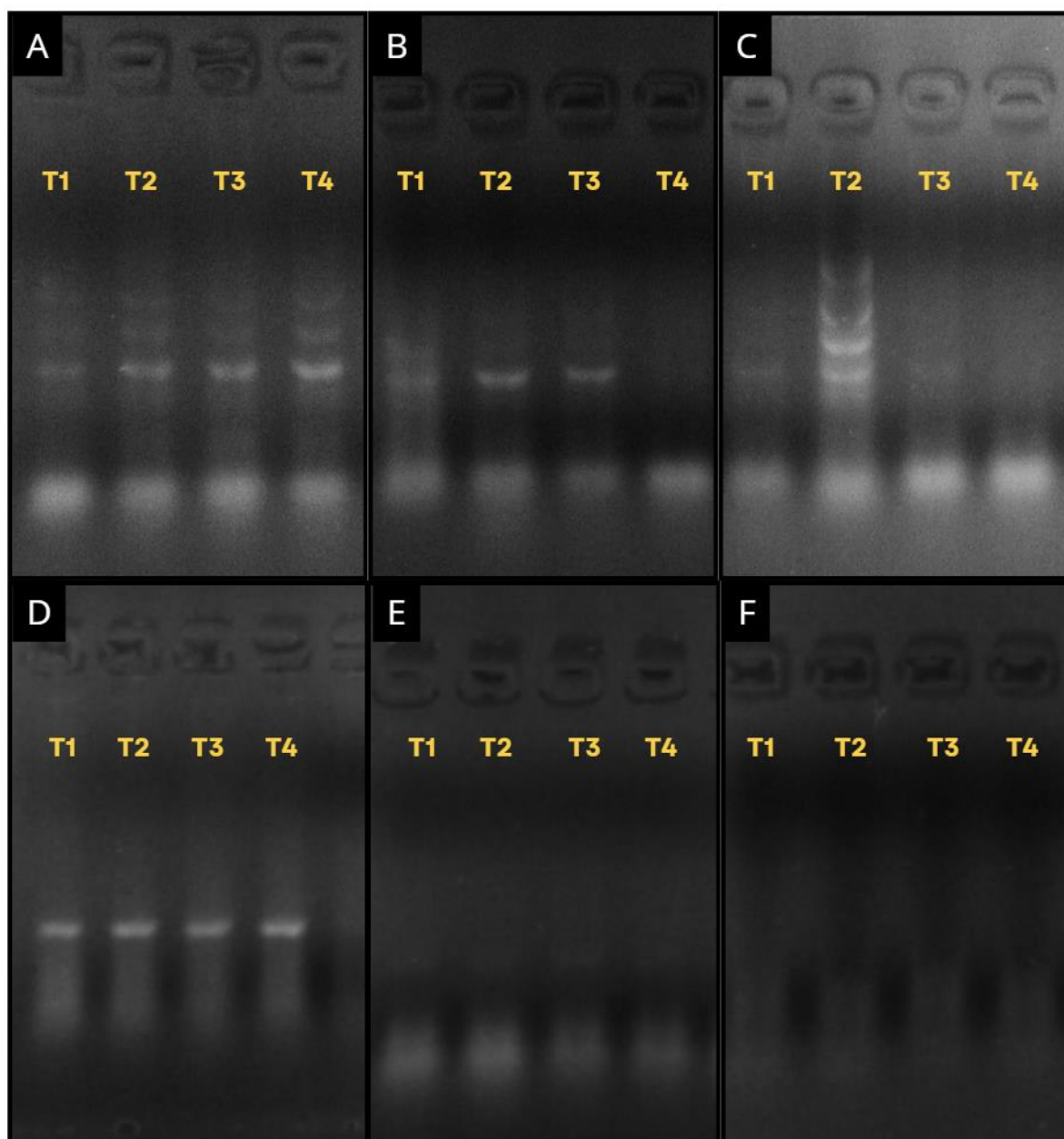


Figura 7 - Análise eletroforética do efeito de diferentes métodos de preservação de amostras e do tempo de armazenamento na detecção de *X. albilineans* via PCR. Os painéis A, B e C correspondem aos resultados com os *primers* Ala4/L1 nos tempos de 1, 15 e 34 dias, respectivamente. Os painéis D, E e F correspondem aos resultados com os *primers* PGBL nos tempos de 1, 15 e 34 dias, respectivamente.

A transformação dos coeficientes da regressão logística em Razões de Chances (Odds Ratio - OR) revela o impacto diferencial do tempo de armazenamento na detectabilidade dos *primers*. Para o PGBL, observou-se uma redução diária nas chances de detecção de 16,51% (T1), 9,87% (T2), 17,40% (T3) e 83,67% (T4). Em contraste, o Ala4/L1 apresentou menor sensibilidade ao tempo de armazenamento, com reduções diárias de 10,16% (T1), 8,30% (T2),

8,01% (T3) e 14,68% (T4). As Figuras 8 e 9 (páginas 50 e 51) ilustram o comportamento temporal dos tratamentos e a probabilidade de detecção predita pelo modelo de regressão logística. A trajetória predita pelo modelo corrobora quantitativamente as reduções percentuais previamente calculadas, evidenciando visualmente a superior estabilidade do *primer* Ala4/L1 na detecção de *X. albilineans* em condições de armazenamento prolongado.

Os dados de Baoutina et al. (2019) reforçam os resultados observados, indicando que o DNA em solução tamponada pode sofrer degradação mesmo quando armazenado a -20°C ou -80°C , enquanto mantém maior estabilidade a 4°C . Adicionalmente, evidências demonstram que o congelamento lento é mais prejudicial à integridade do DNA que o congelamento rápido. A degradação acentuada nos tratamentos T3 e T4 reflete o efeito catalisador das temperaturas elevadas sobre a atividade enzimática e o movimento molecular (Tan et al., 2021). No T4, particularmente, as altas variações ambientais e a possível exposição à radiação UV externa induziram quebras nas fitas de DNA, formação de dímeros, reticulação e modificações nas nucleobases, conforme documentado por Tan et al. (2021).

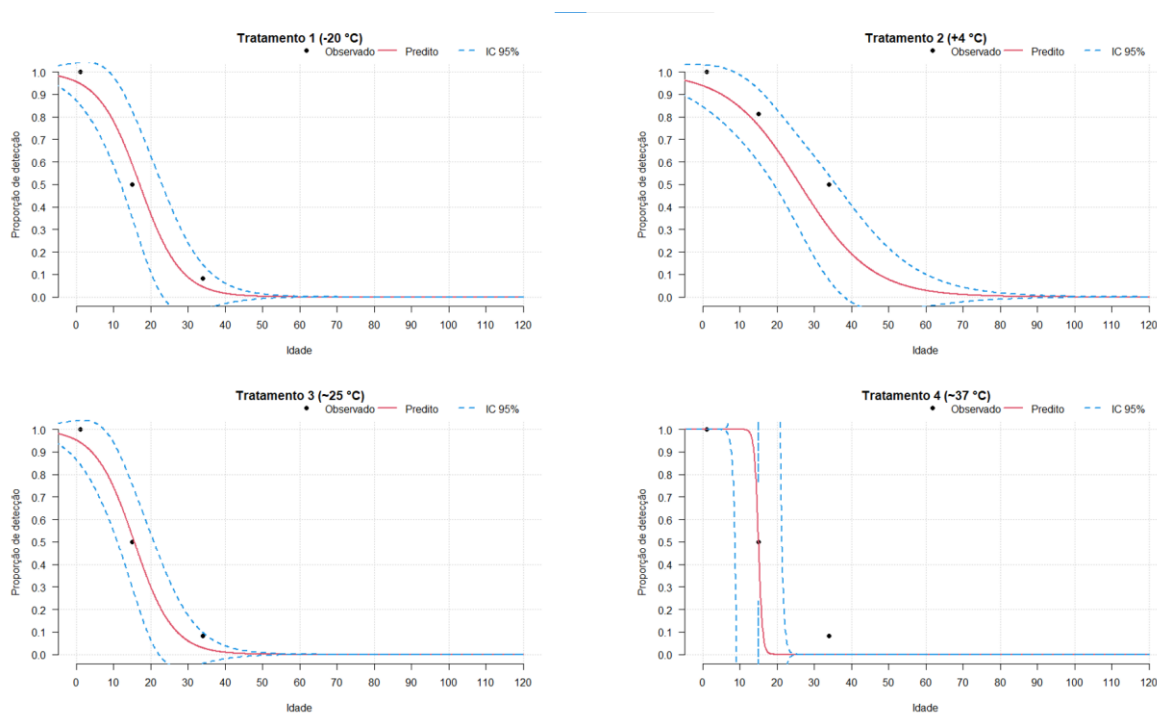


Figura 8 - Probabilidade de detecção de *X. albilineans* pelo par de *primers* PGBL ao longo do tempo em diferentes tratamentos: T1) preservação em freezer a -20°C ; T2) preservação em geladeira a $+4^{\circ}\text{C}$; T3) temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$); e T4) temperatura elevada ($\sim 37^{\circ}\text{C}$). Os pontos representam os valores observados, a linha sólida vermelha a probabilidade predita pelo modelo e a área sobre a linha pontilhada azul o intervalo de confiança de 95%.

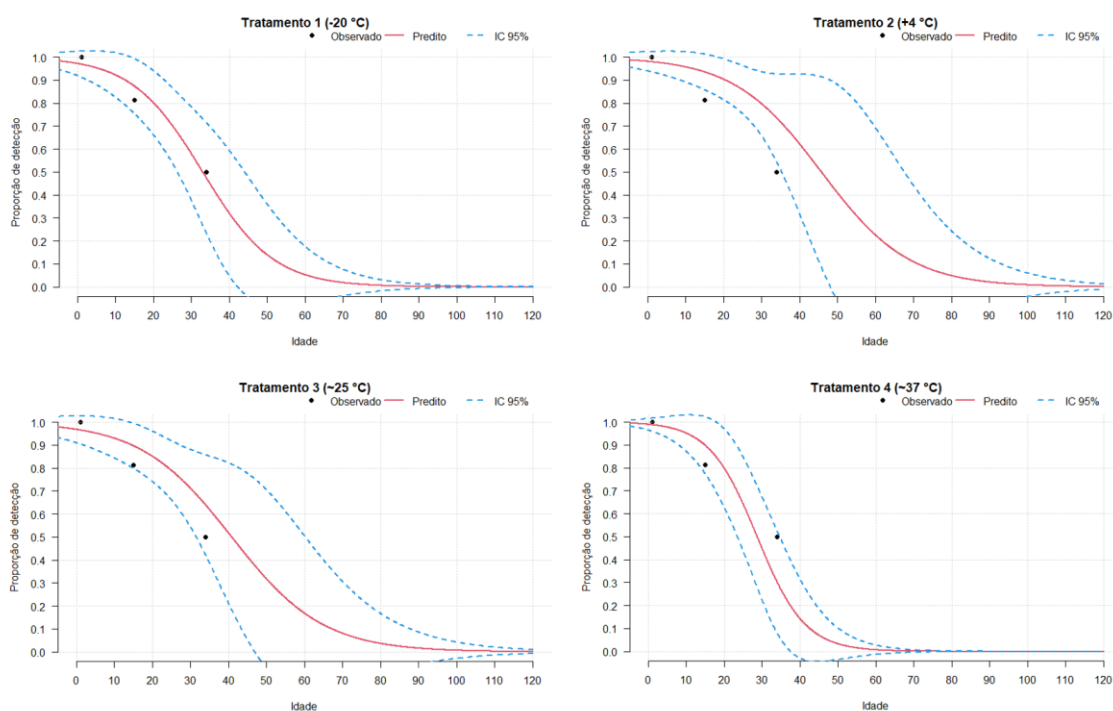


Figura 9 - Probabilidade de detecção de *X. albilineans* pelo par de *primers* Ala4 / L1 ao longo do tempo em diferentes tratamentos: T1) preservação em freezer a -20 °C; T2) preservação em geladeira a +4 °C; T3) temperatura ambiente (~25 °C); e T4) temperatura elevada (~37 °C). Os pontos representam os valores observados, a linha sólida vermelha a probabilidade prevista pelo modelo e a área sobre a linha pontilhada azul o intervalo de confiança de 95%.

5.5 OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE PCR

Apesar do seu desempenho superior, o par de *primers* Ala4/L1 apresenta oportunidades de melhoria, particularmente quanto à formação de bandas inespecíficas, conforme previamente descrito por Pan; Grisham; Burner, (1997). A amplificação de fundo compromete a interpretação dos resultados ao gerar produtos inespecíficos e reduz a eficiência da reação ao consumir reagentes essenciais, conforme demonstrado por Henson e French (1993). Na experiência prática do LAGEM, embora não comprometessem o diagnóstico, essas bandas causavam dificuldades na interpretação e emissão de laudos.

Com o objetivo de eliminar essas bandas e aprimorar a resolução da amplificação, foram realizados testes de otimização da temperatura de anelamento, cujos resultados são apresentados na Tabela 10 (página 54). Esta abordagem visa suprimir a amplificação não específica, que pode ser acentuada pela realização das reações em temperatura ambiente ou pela falta de pré-aquecimento do termociclador (Pan; Grisham; Burner, 1997).

Conforme demonstrado na Figura 10 (página 52), o incremento da temperatura de anelamento resultou em ganhos significativos na clareza dos resultados. Temperaturas mais

elevadas promoveram uma redução progressiva das bandas inespecíficas, sendo que 60°C eliminou completamente esses artefatos enquanto manteve 100% da detecção. Estes resultados se alinham com os obtidos por Dayasena, Thushari e Wijesuriya (2019), que reportaram otimização do protocolo mediante elevação da temperatura para 59,5°C. Em seu trabalho, Oliveira e Urashima (2018) também observou ganhos na acurácia de *primers* adaptados para a detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* por meio do aumento de 1°C na temperatura de anelamento.

O aumento da temperatura de anelamento reduz a probabilidade de ligação inespecífica dos *primers* sem comprometer a eficiência da iniciação correta da amplificação. Contudo, temperaturas excessivamente elevadas impedem a hibridização mesmo em sítios complementares, resultando na ausência de produtos de PCR. A determinação da temperatura ótima é estabelecida empiricamente mediante análise do perfil de bandas em gel de agarose, que indica a condição que maximiza a especificidade sem prejudicar o rendimento da reação (Gibbs, 1990).

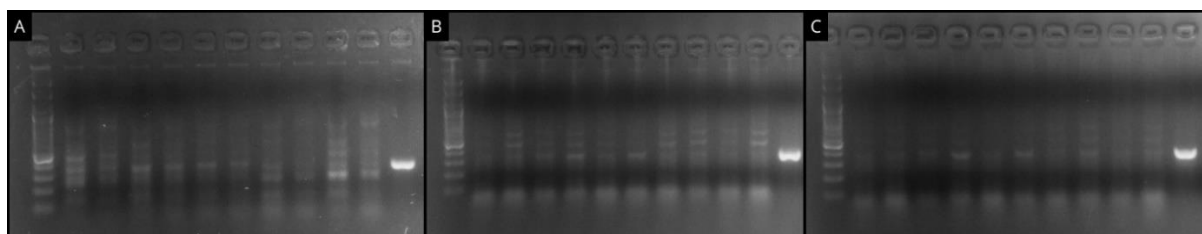


Figura 10 - Análise eletroforética da amplificação por PCR de *X. albilineans* utilizando o par de primers Ala4/L1, em 10 amostras de DNA total positivo para a bactéria e um controle positivo (último poço), sob diferentes temperaturas de anelamento. A) 55 °C, B) 57,6 °C e C) 60 °C.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foram observadas variações nos resultados entre os diferentes termocicladores utilizados (Figura 11, página 53). Nota-se uma nítida diferença na qualidade dos produtos de PCR, com o termociclador PTC-100 gerando bandas mais definidas e intensas em comparação com os demais equipamentos. Essas discrepâncias podem ser atribuídas a fatores como calibração e taxa de aquecimento (*ramp-up*), destacando a necessidade de validação específica por parte de cada laboratório (Ho Kim et al., 2008).

Em seu estudo, Ho Kim et al. (2008) analisaram os perfis térmicos de 19 termocicladores de oito modelos comerciais distintos, constatando que os equipamentos apresentaram desvios significativos dos protocolos estabelecidos. Adicionalmente, a maioria dos instrumentos testados exibiu irregularidades térmicas acentuadas, incluindo sub e superestimação das temperaturas programadas, o que afetou substancialmente os resultados de

PCR *multiplex* sensível a variações térmicas. Variações significativas entre os poços de reação também foram observadas na maior parte dos equipamentos analisados.

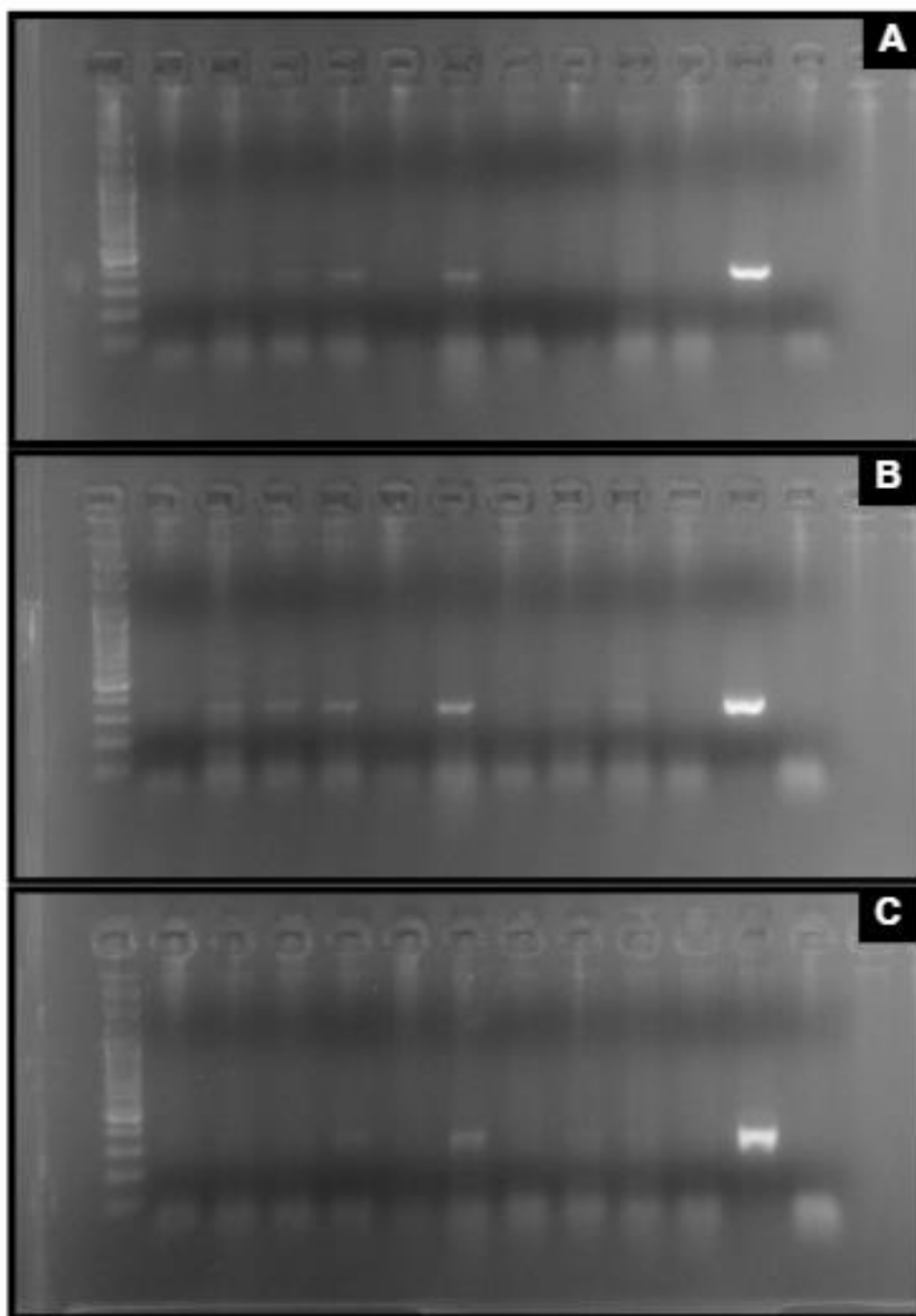


Figura 11 - Análise eletroforética da amplificação por PCR de *Xanthomonas albilineans* utilizando o par de primers Ala4/L1, em 10 amostras de DNA total positivo para a bactéria, um controle positivo (penúltimo poço) e um controle negativo (último poço), realizada em diferentes termocicladores: A) C1000 Touch, B) PTC-100, C) PCR System 9700.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- O par de *primers* Ala4/L1, nas condições de temperatura de anelamento de 60°C e tempos de desnaturação e anelamento estendidos para 30 segundos, apresenta o melhor desempenho para o diagnóstico de *X. albilineans*.
- O armazenamento de DNA a +4 °C foi o mais eficaz na preservação da detectabilidade do patógeno. A sensibilidade à degradação do DNA variou entre os *primers*. A regressão logística confirmou que períodos maiores entre extração e PCR reduzem significativamente a probabilidade de detecção.

REFERÊNCIAS

- ANDREATO, C.; GAZAFFI, R.; OLIVEIRA, M. M. A.; CAMARGO, L. E. A.; URASHIMA, A. S. Effect of thermotherapy, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* titres, sugarcane genotype and diagnostic techniques on ratoon stunt control in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 3, p. 1676–1687, 1 set. 2022. <https://doi.org/10.1111/jam.15671>
- ARTSCHWAGER, E.; BRANDES, E. W. **Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): origin, classification characteristics, and descriptions of representative clones.** [S.l.: S.n.]. 1958.
- BALDI, P.; LA PORTA, N. **Molecular Approaches for Low-Cost Point-of-Care Pathogen Detection in Agriculture and Forestry.** Em *Frontiers in Plant Science*. V. 11, 28 out 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.570862>
- BAOUTINA, A.; BHAT, S.; PARTIS, L.; EMSLIE, K. R. Storage Stability of Solutions of DNA Standards. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 19, p. 12268–12274, 1 out. 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02334>
- BASTIEN, P.; PROCOP, G. W.; REISCHL, U. Quantitative Real-Time PCR Is Not More Sensitive than “Conventional” PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 6, p. 1897–1900, jun. 2008. <https://doi.org/10.1128/JCM.02258-07>
- BELIK, W.; PEROSA, B.; FREDO, C. E. Dinâmica econômica e emprego nas regiões canavieiras no estado de São Paulo. São Paulo, 2013. In: Anais do 37o Encontro Anual da ANPOCS, São Paulo, p. 1–30. Disponível em: <https://www.anpocs.com/index.php/papers-37-encontro/st/st13?format=html> Acesso em: 26 abr. 2023.
- BENDA, G. Serial hot-water treatment for sugarcane disease control. In: RAO, G.; GILLASPIE Jr, A.; UPADHYAYA, P.; BERGAMIN FILHO, A.; AGNIHOTRI, V.; CHEN, C. (Orgs.), *Current trends in sugarcane pathology* (p. 297–310). International Books and Periodicals Supply Service, 1994. p. 297–310.
- BIRCH, R. G.; PATIL, S. S. Correlation between albicidin production and chlorosis induction by *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 30, n. 2, p. 199–206, mar. 1987. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(87\)90033-6](https://doi.org/10.1016/0885-5765(87)90033-6)
- BONNET, J.; COLOTTE, M.; COUDY, D.; COUALLIER, V.; PORTIER, J.; MORIN, B.; TUFFET, S. Chain and conformation stability of solid-state DNA: Implications for room temperature storage. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 5, p. 1531–1546, 7 dez. 2009. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1060>
- BORBA, M. M. Z.; BAZZO, A. M. Estudo econômico de ciclo produtivo da cana-de-açúcar para reforma de canavial, em área de fornecedor no Estado de São Paulo. In: 47º Congresso da SOBER - Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2009. P. 1–21.
- BRAGA Jr.; R. L. C.; LANDELL, M. G. A.; XAVIER, M. A. MPB se consolida como importante ferramenta para produtores de cana. **RPA news cana e indústria**. 2020.

BRESSAN, E. A.; ROSSI, M. L.; GERALD, L. T.; FIGUEIRA, A. **Extraction of high-quality DNA from ethanol-preserved tropical plant tissues.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/7/268>

BRUMBLEY, S. M.; SNYMAN, S. J.; GNANASAMBANDAM, A., JOYCE, P.; HERMANN, S. R.; DA SILVA, J. A. G.; MCQUALTER, R. B.; WANG, M.; EGAN, B. T.; PATERSON, A. H.; ALBERT, H. H.; MOORE, P. H. Sugarcane. *In: Compendium of Transgenic Crop Plants.* [S.l.]: Wiley, 2008. p. 1–58.
<https://doi.org/10.1002/9781405181099.k0701>

BURGER, J.; HUMMEL, S.; HERRMANN, B.; HENKE, W. DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. **Electrophoresis**, v. 20, n. 8, p. 1722–1728, 1 jan. 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19990101\)20:8<1722::AID-ELPS1722>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19990101)20:8<1722::AID-ELPS1722>3.0.CO;2-4)

CARNEIRO Jr, J. B.; SILVEIRA, S. F. da; SOUZA FILHO, G. A. de; OLIVARES, F. L.; GIGLIOTTI, É. A. Especificidade de anti-soro policlonal à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 614–619, dez. 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000600003>

COMSTOCK, J. C. Detection of the Sugarcane Leaf Scald Pathogen, *Xanthomonas albilineans*, Using Tissue Blot Immunoassay, ELISA, and Isolation Techniques. **Plant Disease**, v. 76, n. 10, p. 1033, 1992. <https://doi.org/10.1094/PD-76-1033>

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar- SAFRA 2024/25.** Brasília: [S.n.]. 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/conab/pt-br/atuacao/informacoes-agropecuarias/safras/safra-de-cana-de-acucar/arquivos-boletins/4o-levantamento-safra-2024-25/boletim-cana-de-acucar-4o-levantamento-2024-25>. Acesso em: 1 nov. 2025.

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 (Série Melhoramento)**, v. 25, 1989.

CURSI, D. E. **Análise comparativa de diferentes métodos de seleção em fases iniciais do melhoramento da cana-de-açúcar.** Piracicaba: Universidade de São Paulo, 20 out. 2016. <https://doi.org/10.11606/D.11.2016.tde-01082016-190114>

CURSI, D. E.; HOFFMANN, H. P.; BARBOSA, G. V. S.; BRESSIANI, J. A.; GAZAFFI, R.; CHAPOLA, R. G.; FERNANDES JUNIOR, A. R.; BALSALOBRE, T. W. A.; DINIZ, C. A.; SANTOS, J. M.; CARNEIRO, M. S. History and Current Status of Sugarcane Breeding, Germplasm Development and Molecular Genetics in Brazil. **Sugar Tech**, v. 24, n. 1, p. 112–133, 16 fev. 2022. <https://doi.org/10.1007/s12355-021-00951-1>

DAL-BIANCO, M.; CARNEIRO, M. S.; HOTTA, C. T.; CHAPOLA, R. G.; HOFFMANN, H. P.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA, G. M. Sugarcane improvement: how far can we go? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 265–270, abr. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.09.002>

DAMANN, Jr., K. E. Evaluation of Commercial Heat-Treatment Methods for Control of

Ratoon Stunting Disease of Sugarcane. **Plant Disease**, v. 67, n. 9, p. 966, 1983.
<https://doi.org/10.1094/PD-67-966>

DAUGROIS, J. H.; BOISNE-NOC, R.; CHAMPOISEAU, P.; ROTT, P. Functional Plant Science and Biotechnology The Revisited Infection Cycle of *Xanthomonas albilineans*, the Causal Agent of Leaf Scald of Sugarcane. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 6, p. 91–97, 2012.

DAVIS, M. J. Evaluation of Selective Media and Immunoassays for Detection of *Xanthomonas albilineans*, Causal Agent of Sugarcane Leaf Scald Disease. **Plant Disease**, v. 78, n. 1, p. 78, 1994. <https://doi.org/10.1094/PD-78-0078>

DAVIS, M. J.; ROTT, P.; WARMUTH, C. J.; CHATENET, M.; BAUDIN, P. Intraspecific Genomic Variation Within *Xanthomonas albilineans*, the Sugarcane Leaf Scald Pathogen. **Phytopathology**®, v. 87, n. 3, p. 316–324, mar. 1997.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.3.316>

DAYASENA, Y. A. P. K.; THUSHARI, A. N. W. S.; WIJESURIYA, A. **Optimisation Of Pcr Protocol For Detection Of Sugarcane Leaf Scald Bacteria And Identification Of The Leaf Scald Diseases Bacterial Strain In Sri Lanka**. 2019.

DAYASENA, Y. A. P. K., ARIYAWANSHA, B. D. S. K., WIJESURIYA, A., ABEYRATHNE, K. H. D., VISWANATHAN, R. Eliminating leaf scald disease in sugarcane: efficacy of hot water and cold soak treatments. **Indian Phytopathology**, v. 77, n. 3, p. 793–799, 13 set. 2024.

DEFANTE, L. R.; VILPOUX, O. F.; SAUER, L. Importance of the sugarcane industry in the formal employment in the state of Mato Grosso do Sul during the period of 2008 to 2014. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 58, n. 4, 2020. <https://doi.org/10.1590/1806-9479.2020.193496>

DERENDINGER, B., de VOS, M., NATHAVITHARANA, R. R., DOLBY, T., SIMPSON, J. A., VAN HELDEN, P. D., WARREN, R. M., THERON, G. Widespread use of incorrect PCR ramp rate negatively impacts multidrug-resistant tuberculosis diagnosis (MTBDRplus). **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3206, 16 fev. 2018.

DUARTE DIAS, V.; FERNANDEZ, E.; CUNHA, M. G.; PIERETTI, I.; HINCAPIE, M.; ROUMAGNAC, P.; COMSTOCK, J. C.; ROTT, P. Comparison of loop-mediated isothermal amplification, polymerase chain reaction, and selective isolation assays for detection of *Xanthomonas albilineans* from sugarcane. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 4, p. 351–359, 1 ago. 2018. <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0216-2>

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATIONS OF THE UNITED NATIONS. (2025, agosto 26). **FAO STAT. DATABASE**. Disponível em:
<https://www.fao.org/faostat/en/#data> Acesso em: 25 ago. 2025.

FERNANDES, P. R. **CONSTRUÇÃO DE PRIMERS E OTIMIZAÇÃO DE ENSAIOS DE PCR E DE NESTED-PCR PARA A DETECÇÃO ESPECÍFICA DE *Tritrichomonas foetus***. In: UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS ESCOLA DE VETERINÁRIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL. 2005.

GARCES, F. F.; GUTIERREZ, A.; HOY, J. W. Detection and quantification of *Xanthomonas albilineans* by qPCR and potential characterization of sugarcane resistance to leaf scald. **Plant Disease** v. 98, n. 1, p. 121–126, 2014. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-13-0431-RE>

GIBBS, R. A. **PERSPECTIVE: ANALYTICAL BIOTECHNOLOGY DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction.** *In: Anal. Chem.* v. 62. 1990. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> Acesso em: 12 nov 2025.

GONZALEZ, C. E. B. **EFEITO DA ESCALDADURA-DAS-FOLHAS EM UM CAMPO COMERCIAL DE CANA- DE -AÇÚCAR NO BRASIL E REAÇÃO DE VARIEDADES.** *In: PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS.* 2023.

HASNER, C.; LIMA, A. A. de; WINTER, E. Technology advances in sugarcane propagation: A patent citation study. **World Patent Information**, v. 56, p. 9–16, mar. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.wpi.2018.09.001>

HENSON, J. M.; FRENCH, R. C. **THE POLYMERASE CHAIN REACTION AND PLANT DISEASE DIAGNOSIS DIAGNOSIS.** *In: Annu. Rev. Phytopathol.* v. 31. 1993. <https://doi.org/0066-4286/93/0901-0081502.00>

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. **Nature Biotechnology**, v. 11, n. 9, p. 1026–1030, 1 set. 1993. <https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026>

HO KIM, Y.; YANG, I.; BAE, Y.-S.; PARK, S.-R. Performance Evaluation of Thermal Cyclers for PCR in a Rapid Cycling Condition. **BioTechniques**, v. 44, n. 4, p. 495–505, 16 abr. 2008. <https://doi.org/10.2144/000112705>

HONEYCUTT, R. J.; SOBRAL, B. W. S.; MCCLELLAND, M. tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology**, v. 141, n. 12, p. 3229–3239, 1 dez. 1995. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-12-3229>

HOY, J. W.; GRISHAM, M. P. Sugarcane Leaf Scald Distribution, Symptomatology, and Effect on Yield in Louisiana. **Plant Disease**, v. 78, n. 11, p. 1083, 1994. <https://doi.org/10.1094/PD-78-1083>

HUERTA-LARA, M.; ORTEGA-ARENAS, L. D.; LANDEROS-SÁNCHEZ, C.; FUCIKOVSKY-ZAK, L.; GARCÍA-MARÍN, M. **RESPUESTA DE 10 VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR A LA ESCALDADURA DE LA HOJA [*Xanthomonas albilineans* (ASHBY) DOWSON], EN LA REGIÓN CENTRAL COSTERA DE VERACRUZ.** 2003. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30237508> Acesso em: 29 out 2025.

INGELBRECHT, I. L.; IRVINE, J. E.; MIRKOV, T. E. Posttranscriptional Gene Silencing in Transgenic Sugarcane. Dissection of Homology-Dependent Virus Resistance in a Monocot That Has a Complex Polyploid Genome1. **Plant Physiology**, v. 119, n. 4, p. 1187–1198, 1 abr. 1999. <https://doi.org/10.1104/pp.119.4.1187>

JAMES, G.; BLACKBURN, F. **Sugarcane**. Blackwell Science. 2004. Disponível em: <http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Cultures/Sugarcane.pdf> Acesso em: 29 out 2025.

JULIEN, M. H. R.; IRVINE, J. E.; BENDA, G. T. A. Sugarcane anatomy, morphology and physiology. *In*: RICAUD, C.; EGAN, B. T. A.; GILLASPIE, G.; HUGHES C. G. (Orgs.), **Diseases of Sugarcane: Major Diseases**. 1. ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1989. p. 1–20.

KLETT, P.; ROTT, P. Inoculum Sources for the Spread of Leaf Scald Disease of Sugarcane Caused by *Xanthomonas albilineans* in Guadeloupe. **Journal of Phytopathology**, v. 142, n. 4, p. 283–291, 17 dez. 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1994.tb00024.x>

LANDELL, M. G. de A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIRO, P.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A. dos; DINARDO-MIRANDA, L. L.; SCARPARI, M. S.; GARCIA, J. C.; BIDÓIA, M. A.; SILVA, D. N. da; MENDONÇA, J. R. de; KANTHACK, R. A. D.; CAMPOS, M. F. de; BRANCALÃO, 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 v. 109. 2012. Disponível em: www.iac.sp.gov.br Acesso em: 29 out 2025.

MAIDANA, L. B. C. **INFLUÊNCIA DA IDADE DA CANA-DE-AÇÚCAR NA DETECÇÃO SOROLÓGICA DE *Xanthomonas albilineans* E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE VARIEDADES À ESCALDADURA**. *In*: PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS. 2023.

MAY, A.; RAMOS, N. P. Uso de gemas individualizadas de cana-de-açúcar para a produção de mudas. **Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, p. 18, maio 2019.

MILANEZ, A. Y.; NYKO, D.; VALENTE, M. S.; SOUSA, L. C.; CHARLES, A. B.; JESUS, D. F.; WATANABE, M. D. B.; CHAGAS, M. F.; REZENDE, M. C. A. F.; CAVALETT, O.; JUNQUEIRA, T. L.; GOUVÊIA, V. L. R. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar-uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. **BNDES Setorial**, v. 41, p. [237]-294, mar. 2015. <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/4283>

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, p. 4321–4326, 1980. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>

OLIVEIRA, D. de; URASHIMA, A. S. Detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 3, p. 223–228, 1 set. 2018. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/180882>

PAN, Y.-B.; GRISHAM, M. P.; BURNER, D. M. A Polymerase Chain Reaction Protocol for the Detection of *Xanthomonas albilineans*, the Causal Agent of Sugarcane Leaf Scald Disease. **Plant Disease**, v. 81, n. 2, p. 189–194, fev. 1997. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.2.189>

PAN, Y.-B.; GRISHAM, M. P.; BURNER, D. M.; LEGENDRE, B. L.; WEI, Q. Development of Polymerase Chain Reaction Primers Highly Specific for *Xanthomonas*

albilineans, the Causal Bacterium of Sugarcane Leaf Scald Disease. **Plant Disease**, 83, n. 3, p. 218–222, mar. 1999. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.3.218>

R CORE TEAM. R: **A Language and Environment for Statistical Computing (4.5.1)**. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing, 1 maio 2025.

RICAUD, C.; RYAN, C. C. Leaf scald. *In*: RICAUD, C.; EGAN, B. T.; GILLASPIE, A. G.; HUGHES C. G. (Orgs.), **Diseases of Sugarcane**. 2. ed. [S.l.]: Elsevier, 1989. p. 39–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-42797-7.50007-7>

RIDESA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucreenergético. **CENSO VARIETAL 2024**. RIDESA. Disponível em: <<https://www.ridesaufscar.com.br/censo>>. Acesso em: 9 nov. 2025.

ROTT, P. Population Dynamics of *Xanthomonas albilineans* in Sugarcane Plants as Determined with an Antibiotic-Resistant Mutant. **Plant Disease**, v. 78, n. 3, p. 241, 1994. <https://doi.org/10.1094/PD-78-0241>

ROTT, P.; MOHAMED, I. S.; KLETT, P.; SOUPA, D.; de SAINT-ALBIN, A.; FELDMANN, P.; LETOURMY, P. Resistance to Leaf Scald Disease Is Associated with Limited Colonization of Sugarcane and Wild Relatives by *Xanthomonas albilineans*. **Phytopathology**®, v. 87, n. 12, p. 1202–1213, dez. 1997. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.12.1202>

ROTT, P.; SOUPA, D.; BRUNET, Y.; FELDMANN, P.; LETOURMY, P. Leaf scald (*Xanthomonas albilineans*) incidence and its effect on yield in seven sugarcane cultivars in Guadeloupe. **Plant Pathology**, v. 44, n. 6, p. 1075–1084, 5 dez. 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02667.x>

ROTT, P.; DAVIS, M. J. Leaf scald. *In*: COMSTOCK, J. C.; SAUMTALLY, A. S.; ROTT, P.; BAILEY, R. A.; BORBA, J. Croft (Orgs.), **A Guide to Sugarcane Diseases**. [S.l.]: Quae, 2000. p. 344.

SATHYANARAYANA, Shivaprasad H.; WAINMAN, Lauren M. Laboratory approaches in molecular pathology: the polymerase chain reaction. *In*: **Diagnostic Molecular Pathology**. [S.l.]: Elsevier, 2024. p. 13–25.

SAUNDERS, G. C., DUKES, J., PARKES, H. C., CORNETT, J. H. Interlaboratory Study on Thermal Cycler Performance in Controlled PCR and Random Amplified Polymorphic DNA Analyses. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 47–55, 1 jan. 2001.

SCHODER, D., SCHMALWIESER, A., SCHAUBERGER, G., HOORFAR, J., KUHN, M., WAGNER, M. Novel Approach for Assessing Performance of PCR Cyclers Used for Diagnostic Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2724–2728, jun. 2005.

SHI, Y.; ZHAO, J. Y.; ZHOU, J. R.; NTAMBO, M. S.; XU, P. Y.; ROTT, P. C.; GAO, S. J. Molecular Detection and Quantification of *Xanthomonas albilineans* in Juice from Symptomless Sugarcane Stalks Using a Real-Time Quantitative PCR Assay. **Plant Disease**, v. 105, n. 11, p. 3451–3458, 1 nov. 2021. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-21-0468-RE>

SILVEIRA, R. L. F. da; MATTOS, F. L.; SAES, M. S. M. The Reaction of Coffee Futures Price Volatility to Crop Reports. **Emerging Markets Finance and Trade**, v. 53, n. 10, p. 2361–2376, 2016. <https://doi.org/10.1080/1540496X.2016.1205976>

SIQUEIRA, P. H. de L.; CASTRO JÚNIOR, L. G. de. Determinantes da localização da agroindústria canavieira nos municípios de Minas Gerais. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 51, n. 2, p. 309–330, jun. 2013. <https://doi.org/10.1590/S0103-20032013000200006>

TAN, X.; GE, L.; ZHANG, T.; LU, Z. Preservation of DNA for data storage. **Russian Chemical Reviews**, v. 90, n. 2, p. 280–291, 1 mar. 2021. <https://doi.org/10.1070/rcr4994>

TEIXEIRA, O. M.; SILVA, M. F. Da; CORAINI, N. F.; URASHIMA, A. S. INCIDÊNCIA DO RAQUITISMO-DAS-SOQUEIRAS E DE ESCALDADURA-DAS-FOLHAS EM POTENCIAIS VIVEIROS DE CANA-DE-AÇÚCAR. *In*: ANAIS - 3o Simpósio de Propagação de Plantas e Produção de Mud. Campinas: 2023.

TEIXEIRA, O. M.; BORTOLETTO, L. F.; GONZALEZ, C. E. B.; CORAINI, N. F.; FERNANDES JÚNIOR, A. R.; LISKA, G. R.; URASHIMA, A. S. Economic impact of leaf scald disease in a commercial sugarcane field in Brazil. *In*: ANAIS - 54º Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Lavras, MG: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2025. p. 92.

TOKESHI, H. DOENÇAS DA CANA-DE-AÇÚCAR. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. F. A (Orgs.), **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 3. ed. [S.l.]: Agronômica Ceres, 1980. v. 2 p. 201.

UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Protocolo Agroambiental “Etanol Verde” completa 15 anos**. 2022. Disponível em: <<https://unica.com.br/noticias/iniciativa-etanol-verde-completa-15-anos/>>. Acesso em: 1 nov. 2025.

UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Etanol: combustível do presente e futuro da mobilidade sustentável**. Setor Sucroenergético. Disponível em: <<https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/etanol/>>. Acesso em: 31 out. 2025a.

UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar. (2025b, março). **Geração para a Rede e Capacidade Instalada - Março de 2025**. Bioeletricidade em Números. Disponível em: <<http://www.canaonline.com.br/conteudo/boletim-unica-bioeletricidade-em-numeros.html>>. Acesso em: 1 nov. 2025b.

URASHIMA, A. S.; ZAVAGLIA, A. C. Comparação de dois métodos diagnósticos de escaaldadura-das-folhas (*Xanthomonas albilineans*) da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 2, p. 155–158, jun. 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052012000200009>

WANG, Z.K.; COMSTOCK, J. C.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N.W. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathology**, v. 48, n. 2, p. 245–252, 4 abr. 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00332.x>

WANG, H. bo; XIAO, N. yan; WANG, Y. jun; GUO, J. long; ZHANG, J. sen. Establishment

of a qualitative PCR assay for the detection of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson in sugarcane. **Crop Protection**, v. 130, 1 abr. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105053>

ZHANG, M.; OLDENHOF, H.; SYDYKOV, B.; BIGALK, J.; SIEME, H.; WOLKERS, W. F. Freeze-drying of mammalian cells using trehalose: Preservation of DNA integrity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06542-z>