



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* NA
TERMOTERAPIA E NO PESO DE COLMOS EM TRÊS VARIEDADES DE CANA-
DE-AÇÚCAR

CAROLINE ANDREATO

Araras
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* NA
TERMOTERAPIA E NO PESO DE COLMOS EM TRÊS VARIEDADES DE CANA-
DE-AÇÚCAR**

CAROLINE ANDREATO

ORIENTADOR: PROF. DR. ALFREDO SEITI URASHIMA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO GAZAFFI

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produção
Vegetal e Bioprocessos Associados
como requisito parcial à obtenção do
título de MESTRE EM PRODUÇÃO
VEGETAL E BIOPROCESSOS
ASSOCIADOS

Araras

2020

Andreato, Caroline

Efeito da concentração de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* na termoterapia e no peso de colmos em três variedades de cana-de-açúcar / Caroline Andreato -- 2020.
43f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras
Orientador (a): Alfredo Seiiti Urashima
Banca Examinadora: Catiana Regina Brumatti, Monalisa Sampaio Carneiro
Bibliografia

1. Cana-de-açúcar. 2. Raquitismo-das-soqueiras. 3. Tratamento térmico. I. Andreato, Caroline. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Caroline Andreato, realizada em 26/08/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Alfredo Seiti Urashima (UFSCar)

Profa. Dra. Catiana Regina Brumatti (Raízen)

Profa. Dra. Monalisa Sampaio Carneiro (UFSCar)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Anselmo e Fernanda, por sempre investirem no meu futuro, buscarem o melhor para a minha educação e por me apoiarem em todas e quaisquer circunstâncias, e à minha irmã Julia, por todas as folgas perdidas me ajudando a cortar cana.

À toda minha família que sempre demonstrou orgulho do meu crescimento, especialmente à minha avó, Ofélia, por toda a companhia nas atividades de laboratório aos finais de semana e por acordar cedo para me ajudar no campo! E ao meu avô Fernando (*in memoriam*), que sempre se orgulhou em dizer que a neta iria ser agrônoma.

À Universidade Federal de São Carlos - UFSCar e ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associado - PPGPVBA, pela oportunidade e apoio técnico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste trabalho (N° de Processo: 2017/18469-6).

Ao Prof. Alfredo, não só pela orientação no mestrado mas também por todas as oportunidades que me proporcionou nestes dois anos de crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Rodrigo, por estatisticamente fazer a diferença neste trabalho e sempre estar disposto a fazer mais uma reunião.

Ao Prof. Aranha, por me receber em seu laboratório e à Lilian e à Ana Luiza, por não pouparem esforços em me ajudar e sempre estarem disponíveis para me ensinar.

Ao Laboratório de Genética Molecular (LAGEM), especialmente à Nathalia e à Monique, por todo o acompanhamento, paciência e ajuda diária, além da amizade e dos momentos de descontração. Tudo o que aprendi com vocês não tem preço!

À todos os funcionários de campo do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar pelo apoio e dedicação, especialmente ao João por cuidar tão bem das minhas plantas e ao Cido por sempre estar disposto a ajudar.

Ao Wilson, por toda a ajuda no trabalho pesado de tratamento e plantio e à todos os meus amigos do laboratório, muito obrigada pela parceria, pela sinceridade e pelo apoio em tudo. Obrigada pela amizade dentro e fora do laboratório, eu não vou conseguir substituir vocês com novos amigos! Desejo muito sucesso a todos!

À todos aqueles que de alguma forma me ajudaram a concluir este objetivo e estar onde estou hoje,

Muito obrigada!

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	01
ÍNDICE DE FIGURAS.....	02
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	03
RESUMO.....	04
ABSTRACT.....	05
1 INTRODUÇÃO.....	06
2 OBJETIVOS.....	07
2.1. Objetivos gerais.....	07
2.2. Objetivos específicos.....	07
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	08
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Material Vegetal.....	13
4.2 Diagnoses pré-plantio.....	13
4.3 Obtenção das mudas.....	13
4.4 Tratamentos térmicos.....	14
4.5 Plantio em campo.....	14
4.6 Colheita.....	15
4.7 Peso de colmos.....	15
4.8 Diagnoses pós-colheita.....	16
4.9 Análise estatística do experimento.....	16
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1 Influência dos métodos de detecção e da concentração inicial de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> na eficiência dos tratamentos térmicos.....	18
5.1.1 Análises estatísticas.....	18
5.1.2 Análise epidemiológica.....	21
5.2 Peso de colmos.....	26
6 CONCLUSÃO.....	27
7 LITERATURA CITADA.....	28
APÊNDICE.....	31

ÍNDICE DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Análises de variância para a variável Porcentagem de Plantas Sadias por meio dos métodos de diagnose Dot Blot e PCR.....	18
Tabela 2.	Teste de Tukey para a variável resposta Porcentagem de Plantas Sadias considerando a concentração inicial de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	19
Tabela 3.	Teste de Tukey para a variável resposta Porcentagem de Plantas Sadias considerando o tipo de tratamento submetido.....	19
Tabela 4.	Diferenças de detecção de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> no tratamento não infectado.....	21
Tabela 5.	Diferença de detecção de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> em plantas termicamente tratadas.....	22
Tabela 6.	Resultados de detecção de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> conforme a condição de tratamento térmico submetida.....	22
Tabela 7.	Reação das três variedades comerciais de cana-de-açúcar à termoterapia com 50°C/2h.....	23
Tabela 8.	Reação das três variedades comerciais de cana-de-açúcar à termoterapia com 52°C/30min.....	24
Tabela 9.	Distribuição dos resultados obtidos no Dot Blot por tratamento da variedade RB867515.....	25
Tabela 10.	Distribuição dos resultados obtidos no Dot Blot por tratamento da variedade RB92579.....	25
Tabela 11.	Distribuição dos resultados obtidos no Dot Blot por tratamento da variedade RB966928.....	25
Tabela 12.	Quadro da análise de variância ANOVA considerando todas as variedades e os quatro tratamentos.....	26
Tabela 13.	Teste de Tukey para a variável “Variedade” considerando um Intervalo de 95% de confiança.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Croqui da instalação do experimento em campo.....	15
Figura 2. Correlação entre os resultados obtidos pelos métodos diagnósticos PCR e Dot Blot.....	20

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RSD	Raquitismo das soqueiras
Lxx	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>
PCR	Reação em Cadeira da Polimerase
Conab	Companhia Nacional de Abastecimento
ATR	Açúcar Total Recuperável
RIDESA	Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro
Xa	<i>Xanthomonas albilineas</i>
PPS	Porcentagem de Plantas Sadias
TT	Tratamento térmico

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* NA TERMOTERAPIA E NO PESO DE COLMOS EM TRÊS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR

Autor: CAROLINE ANDREATO

Orientador: Prof. Dr. ALFREDO SEITI URASHIMA

Co-orientador: Prof. Dr. RODRIGO GAZAFFI

RESUMO

O raquitismo-das-soqueiras (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), é considerado atualmente como a principal doença da cana-de-açúcar nos principais países produtores. Sendo o material de propagação a única fonte de inóculo primário, o uso de material de propagação sadio é de suma importância para o sucesso do controle da doença, tornando a diagnose laboratorial indispensável para a verificação da sanidade dos materiais de propagação. O método sorológico é empregado em todo mundo para a diagnose de rotina para o setor produtivo. Outra recomendação para o controle da doença é o tratamento térmico de toletes. No Brasil as termoterapias adotadas são 52°C/30min e 50°C/2h, enquanto que no exterior somente a última é empregada. Cada uma dessas combinações tem características diferentes, 52°C/30min não mostrou efeito deletério na brotação mas uma menor eliminação de Lxx em uma variedade, enquanto o oposto ocorreu em 50°C/2h. De qualquer maneira, a consequência desses escapes para as principais variedades atualmente cultivada não é conhecida. Assim, o objetivo deste trabalho foi compreender o efeito da variedade no resultado da termoterapia e comparar os métodos Dot Blot e PCR para detecção e controle do RSD. Para isso, foram utilizadas 400 plantas de cada uma das variedades RB867515, RB92579 e RB966928 cultivadas conforme delineamento de blocos ao acaso com cinco repetições e quatro condições de tratamento (duas condições de termoterapia, controle infectado e controle não infectado). A colheita foi feita com nove meses de idade em campo e as plantas foram avaliadas pelos métodos de Dot Blot e PCR quanto a presença de Lxx. Os dados desse trabalho mostraram que: a) as variedades respondem de formas diferentes às condições de termoterapia; b) a concentração inicial de Lxx é de suma importância para um controle térmico eficiente; c) o tratamento térmico curto foi eficiente quando a concentração de Lxx era baixa nas variedades RB92579 e RB867515; d) as técnicas de Dot Blot e PCR apresentaram 99% de correspondência, apesar da maior eficácia de detecção do PCR e e) RSD não influenciou no peso de cana planta das variedades RB966928, RB867515 e RB92579, em cana planta de 9 meses de campo.

EFFECT OF *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* TITER ON THERMOTHERAPY AND STALK WEIGHT OF THREE SUGARCANE CULTIVARS

Author: CAROLINE ANDREATO

Adviser: Prof. Dr. ALFREDO SEITI URASHIMA

Co-adviser: Prof. Dr. RODRIGO GAZAFFI

ABSTRACT

Ratoon stunt disease (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), is currently considered the main disease of sugarcane in all major producing countries. Because propagating materials is the sole source of primary inoculum, the use of clean seedcanes is paramount for the success of disease control, making laboratory diagnosis mandatory to verify the phytosanitary conditions of the propagating materials. The serological diagnostic technique is employed all over the world for the routine test by almost all sugarcane producing countries. Other recommendation to RSD control includes heat-treatment of seedpieces. In Brazil, the thermotherapys adopted are 52°C/30min and 50°C/2h, whereas only the second one is employed in other countries. Each combination has different characteristics, 52°C/30min showed no deleterious effect on budding but less elimination of Lxx, while the opposite happened in 50°C/2h. However, the consequences of this failure on sugarcane production is unknown. Thus the objective of this work was to understand the effect of variety on the result of thermotherapy and to compare the Dot Blot and PCR methods for detection and control of the RSD. To that, 400 plants of each of the varieties RB867515, RB92579 and RB966928 were used, cultivated according to a randomized block design with five replications and four treatment conditions (two thermotherapy conditions, infected control and uninfected control). The harvesting was done at nine months of age in the field and the plants were evaluated by Dot Blot and PCR methods for the detection of Lxx. Data of this investigation showed: a) the varieties respond differently to the thermotherapy conditions; b) the initial concentration of Lxx is of paramount importance for efficient thermal control; c) the short heat treatment was efficient when the Lxx concentration was low in the varieties RB92579 and RB867515; d) the Dot Blot and PCR techniques showed 99% correspondence, despite the greater detection efficiency of the PCR and e) RSD did not influence the weight of plant cane of varieties RB966928, RB867515 and RB92579, in cane plant of 9 months in the field.

1 INTRODUÇÃO

Causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp.*xyli* (Lxx), o raquitismo-das-soqueiras é considerado atualmente como a principal doença da cana-de-açúcar nos principais países produtores, devido aos danos que causa à produtividade da cultura e a sua dificuldade de controle, uma vez que sua presença no campo dificilmente é notada. No Brasil não existem muitos dados sobre disseminação e quebra de produção da cana-de-açúcar causada pela doença, embora esta esteja disseminada em todos estados produtores e nas principais variedades.

Um dos principais fatores que contribuem para a alta incidência deste patógeno é sua natureza fastidiosa e a sua dificuldade de detecção, que faz com que a eficácia das medidas de controle adotadas não seja conhecida. Os principais métodos de controle recomendados, tanto no Brasil como no mundo, são o exame diagnóstico dos materiais propagativos e o tratamento térmico dos toletes. No entanto, a condição de termoterapia adotada no país é de 52°C por 30 minutos, por permitir maior quantidade de canas tratadas em um curto espaço de tempo - uma vez que o replantio de mudas é feito anualmente em cerca de 15-20% das áreas - mas que mostrou alta taxa de sobrevivência de Lxx, chamados de “escapes”, enquanto que mundialmente a condição utilizada é de 50°C por 2 horas. A não adoção desta condição pelo setor produtivo brasileiro se dá pela falta de conhecimentos sobre o impacto destes “escapes” na produtividade da cana-de-açúcar.

Outro fato que merece ser investigado é o exame diagnóstico dos materiais propagativos. A tecnologia empregada para essa diagnose de rotina para o setor produtivo é a sorológica, como na maioria dos países, por permitir análises de grande número de amostras a um baixo custo. Assim, é importante que se tenha dados estabelecidos quanto a funcionalidade do método sorológico para controle eficiente da doença e também comparativo com métodos diagnósticos mais precisos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR).

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo compreender qual o efeito da variedade no resultado da termoterapia e comparar os métodos de detecção Dot Blot e PCR.

2.2. Objetivos específicos

As atividades realizadas ao longo deste projeto respondem as seguintes perguntas:

- a. Qual a influência do método diagnóstico para examinar a sanidade do material propagativo depois da termoterapia?
- b. Qual a influência da concentração inicial de Lxx na resposta a termoterapia? O controle térmico é eficiente para eliminar a doença da cultura?
- c. Qual a influência da variedade na resposta a termoterapia?
- d. Qual a influência da variedade e dos tratamentos no peso dos colmos?

3 REVISÃO DA LITERATURA

Destaque da economia brasileira, a cana-de-açúcar é responsável por uma das principais commodities do agronegócio nacional - o açúcar - e vem sendo responsável pelo salto positivo na balança comercial nos últimos anos. Segundo o 4º levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) publicado 2020, a área colhida na safra 2019/20 foi de 8,4 milhões de hectares, uma redução de 1,7% em relação ao ciclo anterior da cultura, com uma produção de 642,7 milhões de toneladas, um aumento de 3,6% em relação a safra passada. A região centro-sul, que concentra sua colheita no período entre abril e dezembro, foi responsável por 589 milhões de toneladas, quase 92% de todo o montando nacional, sendo 415 milhões produzidas somente na região sudeste.

O Estado de São Paulo se manteve como maior produtor nacional, mesmo com uma redução de 2,8% (123,9 mil ha) da área de produção proveniente de fornecedores, tendo sido suportado por condições climáticas muito favoráveis ao desenvolvimento da cultura, com índices pluviométricos satisfatórios e temperaturas ideais. As chuvas ocorridas entre abril e maio e uma condição mais seca no período de maturação e ápice da colheita permitiram um aumento de 2,9% na produção final, chegando a 342,6 milhões de toneladas, com um rendimento médio de 79636 Kg/ha, índice superior a produtividade média encontrada em âmbito nacional, de 76133 Kg/ha, que já era 5,4% maior que a alcançada na safra 2018/19.

A safra 2019/20 teve como objetivo principal a produção de etanol e para isso destinou cerca de 59% de toda a cana-de-açúcar colhida no país, gerando um montante de 34 bilhões de litros, sendo 10,12 bilhões de litros de etanol anidro e 23,89 bilhões de litros de etanol hidratado, um aumento de 5,1% em relação ao ciclo anterior, o que fez com a que a região centro-sul registra-se novo recorde de produção, superando em 4,8% os 30,2 bilhões de litros a safra passada.

Já a produção brasileira de açúcar, que representou 20% de toda a produção global, recebeu aproximadamente 200 milhões de toneladas de cana, gerando 29,8 milhões de toneladas de açúcar (2,6% a mais que a safra passada). Destas, quase 18,5 milhões de toneladas produzidas no Estado de São Paulo. Novamente impulsionada pelas boas condições climáticas e pelos investimentos feitos nas lavouras, principalmente sobre a renovação dos canaviais, houve a melhora da qualidade do ATR, que atingiu 139,3 Kg/t de ATR, contra 138,4 Kg/t obtidos no ciclo passado. Acompanhado pelo aumento do nível das moagens, houve ainda um incremento de 4,2% na quantidade global de produtos

disponíveis, chegando a 89,5 milhões de toneladas de ATR, sendo este o maior resultado médio das últimas oito safras.

Quanto a produção de bioenergia, o uso de biomassa de cana-de-açúcar para a cogeração de energia foi a quarta fonte em importância na matriz elétrica brasileira, com uma geração de 21,5 mil GWh em 2018, correspondendo a 9% da potência outorgada na matriz elétrica nacional e a 82% de toda a bioeletricidade fornecida ao Sistema Interligado Nacional (Unica, 2020).

Economicamente, o Brasil ocupou 45% de todo o mercado de exportação mundial de açúcar em 2020, chegando a 18,9 milhões (redução de 3,8%), gerando uma receita de R\$ 5,8 bilhões, 4,6% menor que na safra anterior, uma vez que houve baixo volume exportado na primeira metade da temporada, resultado na terceira safra consecutiva em queda. Já para o etanol houve um superavit de 238,57 milhões de litros (US\$ 286,06 milhões) no balanço entre as exportações e importações, chegando a um volume de 1,9 bilhão de litros exportados (US\$ 983,52) (Conab, 2020; Fiesp, 2020).

A produtividade da cana-de-açúcar é dependente de diversos fatores que podem ser limitantes, especialmente os relacionados ao manejo e sanidade da cultura, sendo doenças um dos mais importantes. Dentre as inúmeras enfermidades que atacam a cultura, o raquitismo-das-soqueiras (RSD) se destaca (Hoy et al., 1999). As razões para isso se devem ao fato de ocorrer em todos os países produtores, independentemente das variedades, causando danos à produtividade desde o primeiro corte (cana-planta) e aumentando nas colheitas seguintes (o que justifica o nome “raquitismo-das-soqueiras” para a doença). Por exemplo, a queda média de produtividade de sete variedades de cana-de-açúcar com raquitismo-das-soqueira (RSD) em Louisiana (EUA) foi de 14% já em cana-planta, aumentando para 27% no terceiro ano (Grisham, 1991, Grisham et al., 2009), de 20% em cana-planta em oito variedades na África do Sul, tendo chegado a 42% numa variedade suscetível ao longo de três anos (Bailey & Bechet, 1997) e de 11,2% em cana-planta aumentando para 26,3% no ano seguinte na variedade mais importante em Fiji (Johnson & Tyagi, 2010). No Brasil, poucos dados mostraram dano à produtividade em variedades brasileiras, um dos poucos revelou queda variando no primeiro ano de 9 a 14% e de 27 a 44% no terceiro em três variedades diferentes (Matsuoka, 1984). Em variedades atualmente cultivadas, Gagliardi & Camargo (2009) mostraram redução de 1,7 a 26,2% de peso de colmos em três cortes, sem a identificação do dano em cana-planta.

O RSD é causado pela bactéria fastidiosa *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) sendo muitas vezes assintomática e não permitindo a identificação segura da doença em campo. Sendo assim, a maneira mais segura de identificação é por técnicas de diagnose laboratorial da doença (Hoy et al. 1999). Devido a essas características é frequente o uso de mudas aparentemente sadias na instalação de novos canaviais, sendo essa a única fonte de

inóculo primário da doença, já que Lxx não possui vetor e nem outro hospedeiro além da cana-de-açúcar (Hoy et al., 1999). Portanto, o sucesso no controle de RSD depende de uma rigorosa sanidade nos viveiros de multiplicação de mudas que serão empregadas para a formação dos canaviais, depois do RSD se instalar no talhão não se conhece nenhum método de controle da doença, acarretando na diminuição do número de colheitas (safras) (Hoy et al., 1999) e na antecipação da reforma resultando num custo econômico adicional, além da queda na produtividade.

Um dado preocupante sobre RSD no Brasil é que a incidência da doença em viveiros de multiplicação de mudas em usinas do Estado de São Paulo - maior produtor nacional e responsável por aproximadamente 50,6% de toda a área colhida na safra - é alta, com valores que variaram de 0,4 a 38,9% entre 2005 e 2007, de 23,6 a 27,1% no período compreendido entre 2009 e 2011 e de 20,5 a 86,7% entre 2013 e 2018 (Urashima et al., 2010; Urashima & Marchetti, 2013; Urashima et al., 2020). Além da alta incidência em viveiros, o único estudo de disseminação da doença em campos comerciais da região centro-sul do Brasil mostrou que, em 2012 e 2013, 10% dos 1.154 talhões estavam doentes, 58% das 50 usinas examinadas tinham pelo menos um talhão contaminado e 9% das novas áreas já foram instaladas com materiais propagativos contaminados com Lxx (Urashima et al., 2017).

A ampla disseminação de Lxx nos canaviais ocorre paralelamente ao aumento da mecanização na cultura, sendo que em 2020, 96,5% de toda a colheita do Estado de São Paulo foi feita de forma mecanizada (Conab, 2020). Durante a colheita, a disseminação da bactéria a partir de uma única planta doente no talhão pode chegar até 12,9m e até 14,4m quando consideradas plantas de talhões diferentes (Hoy et al., 1999). Também se provou em Urashima & Marchetti (2013) e Urashima et al. (2017) que a transmissão de Lxx ocorre independentemente do genótipo, sendo todas as variedades brasileiras suscetíveis a doença, pois altas concentrações da bactéria (10^8 UFC/mL) foram encontradas em todas as variedades.

Sabendo como ocorre a infecção e disseminação do RSD, a eficácia da diagnose laboratorial para detecção de Lxx nos materiais propagativos e do tratamento térmico, que são os métodos de controle de RSD empregados no mundo, ganham grande importância para o sucesso do controle da doença e assegurar a manutenção da produtividade dos canaviais. A diagnose de rotina por meio da metodologia sorológica é utilizada em diversos países ao redor do mundo (Comstock, 2002). O método sorológico é capaz de analisar grande número de amostras ao mesmo tempo, simples de ser feito, fácil transporte até os laboratórios pois emprega seiva dos vasos condutores e tem um custo não proibitivo para o setor produtivo. Além disso, Young (2018) mostrou que houve um incremento de até 14% da produção de cana-de-açúcar nos canaviais da Austrália, depois que práticas de manejo

como a melhoria do teste diagnóstico e um programa de qualidade da cana foram introduzidos no estabelecimento de novas áreas. Dentre as técnicas sorológicas, a RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro), responsável pelas variedades RBs que cobriram 66% das áreas de cultivo na safra 2017/18 no Brasil (Ridesa, 2018) emprega o método “Dot Blot”, que possibilita determinar a concentração de Lxx na amostra de 10^9 até 10^6 UFC/mL através de um gradiente da coloração azul (Urashima et al., 2017). A desvantagem deste método é que ele detecta tanto células bacterianas viáveis quanto células inviáveis por basear-se na especificidade antígeno-anticorpo (Hsu, 2009). Outros métodos também são empregados na detecção de Lxx, como o molecular por PCR, tanto qualitativo quanto quantitativo. Para o PCR qualitativo, vários “primers” específicos capazes de detectar Lxx foram desenvolvidos e com maior precisão que o método sorológico (Pan et al., 1998; Taylor et al., 2003). Precisão ainda maior que o PCR qualitativo pode ser observada quando se utilizou PCR quantitativo (Grisham et al., 2007; Carvalho et al., 2016). No entanto, esses métodos moleculares ainda não são empregados para exame diagnóstico de rotina, pelo custo elevado se comparado com o sorológico, além do fato de não se conhecer a queda de produtividade nas variedades brasileiras em níveis abaixo do detectados pelo Dot Blot (10^6 UFC/mL), o que dificulta a adoção pelo setor produtivo. Um dos poucos estudos realizados no mundo mostrou que todas as cinco concentrações de Lxx examinadas (10^8 UFC/ml e as respectivas 2^a, 5^a, 8^a, 10^a diluições seriadas) causaram danos significativos à produtividade em canas-de-açúcar na Etiópia, com maior dano na maior concentração bacteriana (Zekarias et al., 2012). Não se conhece nenhum estudo semelhante com variedades brasileiras.

Para a outra medida de controle de RSD (termoterapia), a condição mais empregada atualmente no Brasil para as gemas a serem empregadas como materiais de propagação é o binômio 52°C/30min (Sanguino et al., 1988). Essa condição não teve efeito deletério na brotação, mas não eliminou totalmente a população de Lxx (Fernandes Jr et al., 2010). Esse binômio tem a preferência das usinas brasileiras quando comparado a condição utilizada no exterior (50°C/2h, Hoy et al., 1999) por permitir tratar uma quantidade maior de toletes por unidade de tempo, já que o período de imersão em água quente é quatro vezes menor.

Na termoterapia alguns aspectos ainda necessitam serem esclarecidos para otimização do controle de RSD e adoção pelo setor produtivo. Por exemplo, qual a consequência do escape do tratamento 52°C/30min na produção da cana-de-açúcar? Conseqüentemente, não se sabe se existe necessidade de mudança no binômio da termoterapia. Também, sem uma comparação da produtividade resultante das duas condições de termoterapia sobre a produtividade o setor produtivo não vai adotar nenhuma mudança, já que implicaria num número menor de toletes tratados por unidade de tempo. Assim, conhecer o efeito dos dois binômios empregados no tratamento térmico, as

consequências do escape de Lxx no material propagativo e a influência dos níveis da bactéria na quebra de produtividade das variedades de cana-de-açúcar é de suma importância para a manutenção da atividade canavieira e para o aperfeiçoamento das técnicas de controle.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Neste trabalho foram empregadas 1200 plantas das variedades comerciais Ridesa mais plantadas e cultivadas no Estado de São Paulo durante a safra 2019/2020, sendo elas: 400 plantas da variedade RB966928, 400 plantas da variedade RB867515 e 400 plantas da variedade RB92579.

As canas-mãe das três variedades para todos os tratamentos foram coletadas no *campus* da UFSCar-Araras a partir de touceiras com mais de 12 meses de idade.

4.2. Diagnoses pré-plantio

Para garantir as condições do experimento de que as plantas estariam somente sob efeito da Lxx, todos os toletes-mãe passaram por teste sorológico para detecção da escaldadura-das-folhas. Assim, plantas positivas foram eliminadas antes de serem utilizadas para instalação do experimento. Já as plantas negativas para Xa passaram por teste sorológico de Lxx para a classificação dos níveis individuais de bactérias nos colmos e também identificação dos colmos saudáveis.

O método sorológico utilizado para ambas as diagnoses foi do tipo “Dot Blot” (Carneiro, J. B. et al, 2004; Urashima & Grachet, 2012). Neste método amostras de 100 µL de seiva são obtidas do internódio basal e aplicadas em membrana de nitrocelulose, secadas, bloqueadas, lavadas, incubadas em antissoro de coelho e IgG de cabra anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina. Após as lavagens e a revelação é observado um gradiente de tonalidade azul, conforme a concentração de bactéria presente na amostra.

4.3. Obtenção das mudas

Com os níveis de bactéria individuais definidos, as gemas destes toletes foram individualizadas e submetidas aos diferentes tratamentos. Posteriormente, essas gemas foram semeadas em bandejas de 39x28x10 cm contendo substrato, a 2-3 cm de profundidade, e mantidas em casa de vegetação por um período de três meses até serem transplantadas para o campo.

Para garantir o estande final com as 1200 plantas, foi plantada uma quantidade três vezes maior de gemas de todas as variedades e com todos os tratamentos, para que houvesse uma reserva para possíveis replantios.

4.4. Tratamentos térmicos

As gemas individualizadas foram colocadas em sacos de “nylon” vazados, identificados em função das diferentes concentrações de Lxx e submersas em tanques de 2000 litros em temperatura e tempo definido para cada tratamento, sendo estes: 1) 50°C por 2 horas e 2) 52°C por 30 minutos. Depois, resfriados naturalmente e plantadas em bandejas. Os materiais submetidos à essas duas condições de termoterapia foram comparados com os tratamentos testemunhas: infectado e não-infectado.

O controle infectado foi formado por essas mesmas variedades, com diferentes concentrações de Lxx. Enquanto que o controle não-infectado, foi formado por canas onde Lxx não foi detectado por sorologia. Ambos os tratamentos testemunhas, passaram por submersão das gemas em água a temperatura ambiente por duas horas.

4.5. Plantio em campo

Após os três meses em casa de vegetação, no dia 04 de dezembro de 2018, as mudas foram transplantadas manualmente para o campo conforme os tratamentos e delineamento experimental descritos posteriormente. A unidade experimental foi composta por 20 plantas distribuídas em dois sulcos de cinco metros e espaçadas a 0,50m entre planta e 1,4m entre linhas, com profundidade de sulco entre 30 e 35 cm, similar a utilizada para ensaios de produtividade nas etapas finais de experimentação conduzida pelo programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar conduzido pela UFSCar/RIDESA (Matsuoka et al., 1999). O experimento foi instalado na forma de blocos ao acaso, com cinco repetições de cada tratamento: controle infectado, controle não infectado, tratamento térmico curto (52°C/30min) e tratamento térmico longo (50°C/2h).

Para manter o número de plantas na parcela, foi feita a verificação de plantas mortas e sua rápida substituição durante o primeiro mês após o plantio em campo, seja devido ao não pegamento das mudas, soterramento ou submersão das mudas devido acúmulo de água devida a irrigação

A disposição das parcelas com os tratamentos pode ser observada na Figura 1. Para identificação dos colmos principais que seriam utilizados para as análises pós-colheita utilizou-se fitas de cetim de acordo com a variedade e tratamento.

12	RB867515 infectado	24	RB92579 infectado	36	RB867515 50°/2h	48	RB966928 50°/2h	60	RB92579 não-infectado
11	RB966928 50°/2h	23	RB867515 não-infectado	35	RB92579 52°/30min	47	RB966928 infectado	59	RB92579 52°/30min
10	RB867515 não-infectado	22	RB92579 50°/2h	34	RB92579 infectado	46	RB92579 não-infectado	58	RB92579 50°/2h
9	RB92579 não-infectado	21	RB867515 infectado	33	RB867515 52°/30min	45	RB92579 50°/2h	57	RB966928 50°/2h
8	RB966928 infectado	20	RB966928 não-infectado	32	RB966928 52°/30min	44	RB867515 não-infectado	56	RB867515 infectado
7	RB966928 52°/30min	19	RB966928 infectado	31	RB92579 não-infectado	43	RB92579 52°/30min	55	RB92579 infectado
6	RB867515 50°/2h	18	RB867515 52°/30min	30	RB966928 não-infectado	42	RB867515 52°/30min	54	RB867515 50°/2h
5	RB92579 infectado	17	RB92579 não-infectado	29	RB92579 50°/2h	41	RB867515 infectado	53	RB867515 52°/30min
4	RB92579 50°/2h	16	RB867515 50°/2h	28	RB867515 não-infectado	40	RB92579 infectado	52	RB966928 infectado
3	RB966928 não-infectado	15	RB92579 52°/30min	27	RB966928 50°/2h	39	RB966928 não-infectado	51	RB966928 52°/30min
2	RB867515 52°/30min	14	RB966928 52°/30min	26	RB966928 infectado	38	RB867515 50°/2h	50	RB966928 não-infectado
1	RB92579 52°/30min	13	RB966928 50°/2h	25	RB867515 infectado	37	RB966928 52°/30min	49	RB867515 não-infectado

Figura 1: Croqui da instalação do experimento em campo

4.6. Colheita

A retirada dos colmos principais ocorreu do dia 18 de agosto ao dia 06 de setembro de 2019, com as plantas com nove meses de idade, sendo primeiramente retiradas as parcelas do tratamento não infectado, de forma a diminuir as chances de contaminação durante a colheita. A colheita foi feita de forma manual e entre cada corte foi feita a desinfecção dos facões com álcool 100% e fogo.

4.7. Peso de colmos

Esse processo foi realizado pela pesagem manual e de forma individual de cada uma das 20 plantas principais previamente identificadas dentro das parcelas, através de balança portátil, com desinfecção de facões de corte entre plantas e iniciando-se pelas parcelas não infectadas com Lxx. Com isso, duas variáveis foram obtidas: o peso individual das plantas e

o peso total da parcela, o que permitiu a comparação, a partir do peso, do tratamento não infectado com os outros.

4.8. Diagnoses pós-colheita

No laboratório, os materiais passaram por análise de sanidade em relação ao RSD. As plantas foram submetidas novamente a diagnose individual de Lxx, realizada primeiramente por sorologia (método Dot Blot). Os colmos com resultado negativo foram submetidos a diagnose molecular pelo método de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), onde utilizou-se o DNA total extraído do tecido do internódio basal pelo método CTAB, que se mostrou o mais adequado por Urashima & Zavaglia (2012) e os primers específicos para Lxx: CxxITSf#5 e CxxITSr#5 (Fegan et al., 1998) em um volume de 25 µL contendo 1X buffer de amplificação, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM-dNTPs, 0,25 µM primer, 50 ng de DNA total e 0,5 unidades de Taq polymerase, com condições de amplificação propostas por Taylor et al. (2003) e adaptadas por de Oliveira & Urashima (2018) com 5 minutos a 96°C, seguida de 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e finalizando com 72°C por 10 minutos. Foi utilizado o termociclador Gene Amp PCR System 9700 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O produto da PCR foi separado em gel de agarose 2% com buffer de 0,5x EDTA. Por fim, imerso em brometo de etídio, visualizado em luz ultra violeta e fotografado. O marcador de tamanho de DNA utilizado foi o ladder de 100 pares de bases (Sinapse Inc, Flórida, EUA).

Ao final, com os dados obtidos nos testes sorológico e molecular foi possível obter duas variáveis de resposta, sendo elas:

I) Nível de contaminação individual das plantas da parcela: considerada como a medida absoluta do nível de RSD na parcela, pois todas as plantas foram amostradas, permitindo identificar individualmente o nível de contaminação;

II) Número de plantas sadias nas parcelas: a partir da variável "I" foi possível codificar como "0" e "1" as plantas consideradas como não infectadas e infectadas, permitindo a quantificação do número de escapes dos tratamentos térmicos;

III) Porcentagem de plantas sadias, obtido a partir do número de plantas sadias;

4.9. Análise estatística do experimento

O experimento foi estruturado de acordo com o delineamento de blocos ao acaso com cinco repetições. Os tratamentos foram arrançados em um esquema fatorial 4x3, isto é, quatro situações de RSD e três variedades, conforme descrito nos itens anteriores. As variáveis do experimento foram a) quantificação de plantas sadias e com isso a variável resposta para análise foi porcentagem de plantas sadias (PPS), calculadas a partir dos

resultados dos métodos Dot Blot e PCR individualmente e b) peso médio do colmo principal de cada parcela.

Para as variáveis peso médio do colmo principal e porcentagem de plantas sadias (Dot Blot e PCR) foram realizadas análises de variância e testes de médias (Tukey), ambos com nível de significância de 5%. Especificamente, para a variável PPS foi incluída a covariável concentração inicial de Lxx, pois a eficiência do tratamento térmico pode ser influenciada em função da quantidade inicial de doença. A comparação entre os métodos de diagnose Dot Blot e PCR foi realizada por meio do coeficiente de correlação de Pearson. Neste caso, comparou-se a porcentagem de plantas sadias de cada parcela para cada método de diagnose. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software R versão 3.6.1 (www.r-project.org).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Influência dos métodos de detecção e da concentração inicial de Lxx na eficiência dos tratamentos térmicos.

5.1.1. Análises estatísticas

O quadro da análise de variância ANOVA pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Análises de variância para a variável resposta Porcentagem de Plantas Sadias por meio dos métodos de diagnose Dot Blot e PCR

FV	GL	Diagnose por Dot Blot			Diagnose por PCR		
		QM	F	Pvalor	QM	F	Pvalor
Bloco	4	0,089	2,375	0,067	0,095	2,505	0,057
Lxx.inicial	3	0,388	10,310 *	<0,001	0,385	10,215 *	<0,001
Tratamento (T)	2	1,180	31,359 *	<0,001	1,239	32,823 *	<0,001
Variedade (V)	2	0,024	0,641	0,532	0,019	0,501	0,609
TxV	6	0,006	0,165	0,985	0,009	0,242	0,960
Resíduo	42	0,038			0,038		

Dot Blot: CV = 22,98%, média geral = 0,8442

PCR: CV = 23,22%, média geral = 0,8367

As fontes de variação para controle local (bloco) e variedades não foram significativas, ao nível de significância de 5%, assim como também não houve interação significativa entre tratamentos e variedades. Para considerações práticas a não significância de blocos indicou que as condições experimentais foram similares em todo o experimento. Ao considerar que variedades foi um fator não significativo, as variedades apresentaram-se de maneira semelhante em relação as variáveis PPS. A interação indicou que não houve resposta diferencial entre variedades e as diferentes condições de tratamentos. Por outro lado, a concentração inicial de Lxx foi importante para PPS. Ao aplicar o teste de Tukey (5%) verifica-se que parcelas com concentrações mais elevadas de Lxx (N2 e N3) não diferiram entre si para PPS, assim como não houve diferença entre N4 e N0, mas a comparação entre concentração elevada e reduzida indicaram diferenças estatísticas. Nota-se que os resultados são similares para os dois métodos de diagnose (Tabela 2).

Isso pode ter acontecido pois, apesar das mudas terem sido feitas a partir de gemas de uma única planta-mãe com concentração inicial de Lxx conhecida, Torquesi et al. (2019) mostraram que existem diferentes concentrações de Lxx ao longo do colmo, uma vez que

nos internódios basais foram detectados maiores níveis de Lxx que nos internódios medianos e do ponteiro. Assim, a cana-planta pode não apresentar a mesma concentração inicial de Lxx que a cana-mãe, dependendo da posição do colmo em que foi retirada a gema para formação da muda.

Tabela 2: Teste de Tukey para a variável resposta Porcentagem de Plantas Sadias considerando a concentração inicial de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Concentração de Lxx	Média (Dot Blot)	Média (PCR)
N0	0,98 A	0,98 A
N4	0,90 A	0,89 A
N3	0,68 B	0,67 B
N2	0,45 B	0,45 B

Letras iguais não apresentam diferença significativa

Para fonte de variação tratamento houve a efeito significativo, para ambos os métodos de diagnose. As diferenças foram identificadas com teste de médias (Tabela 3), em que os dois tratamentos térmicos curto e longo, não diferiram estatisticamente entre si. O tratamento plantas sadias ou não infectadas também não diferiu dos dois métodos de controle, mas as plantas infectadas, em que não passaram por tratamento térmico diferiu estatisticamente dos três outros casos, indicando assim que o tratamento térmico foi efetivo no controle de Lxx. Tanto a dificuldade de detecção de Lxx quanto a similaridade estatística dos dois tratamentos térmicos podem ser explicadas pela idade das plantas testadas, assim como ocorreu em Urashima & Grachet (2012), onde não foi possível identificar Lxx em cana-planta de 9 meses de idade por PCR ou Dot Blot, sendo possível neste último somente com modificações na técnica.

Tabela 3: Teste de Tukey para variável resposta Porcentagem de Plantas Sadias considerando o tipo de tratamento submetido.

Tratamento	Média (Dot Blot)	Média (PCR)
Térmico Longo	0,99 A	0,98 A
Não infectado	0,98 A	0,97 A
Térmico Curto	0,94 A	0,94 A
Infectado	0,46 B	0,45 B

Letras minúsculas referem-se a média obtida a partir do teste de Dot Blot e letras maiúsculas a média obtida por PCR. Letras iguais na coluna representam médias iguais.

A natureza fastidiosa da Lxx dificulta sua identificação e faz com que sua detecção segura seja possível somente por técnicas realizadas em laboratório. Para simular o que acontece na realidade, em que a idade média das plantas submetidas ao tratamento térmico pode ser de dez meses (Nogueira, 2006), as plantas deste experimento foram colhidas com 9 meses de idade em campo, disponibilizando um tempo para a realização dos testes de sanidade individuais de todas as plantas antes das mesmas sejam tratadas para o plantio. A

identificação de Lxx por técnicas sorológicas e moleculares já foi possível em trabalhos anteriores a partir de cana-planta dessa idade (Carvalho et al., 2016, Urashima et al., 2017). Uma comparação entre os testes de Dot Blot e PCR permitiu identificar que a correlação entre os dois métodos foi de 99%, altamente significativa ($p\text{valor} < 0,001$). Esta associação pode ser observada na Figura 2. De maneira geral, dentre as 60 parcelas, 37 apresentaram PPS de 100% para os dois métodos (em roxo) e cinco parcelas houve a 0% de PPS para ambos os métodos (em azul). Para os demais casos, houve a identificação intermediária de PPS, mas predominantemente com resultados próximos entre métodos. Destaca-se que apenas um único ponto apresentou resultados distintos entre métodos, isto é, para PCR foi identificado 50% de PPS e para Dot Blot foi de 65% de PPS. Esta diferença pode ser observada em apenas um caso nas parcelas 1 e 7 da termoterapia curta, 16 e 22 da termoterapia longa, 21 e 34 do controle infectado e 39 do controle não-infectado. Outros três casos puderam ser observados na parcela 41 do controle infectado.

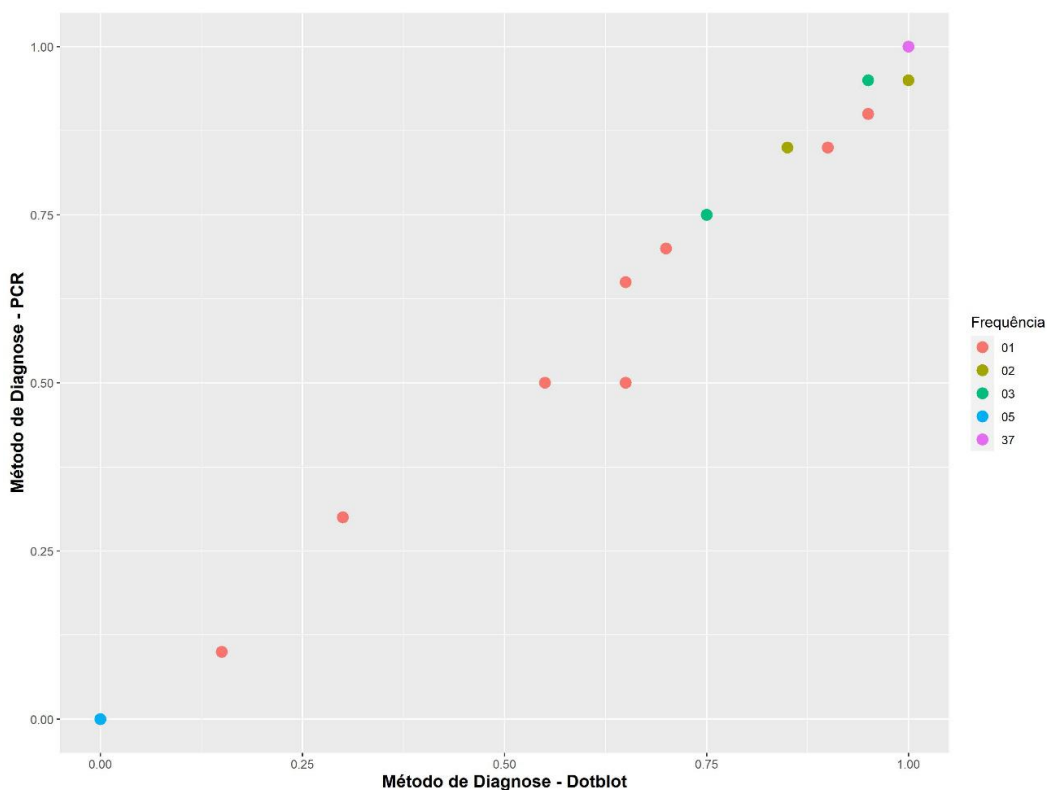


Figura 2: Correlação entre os resultados obtidos pelos métodos diagnósticos PCR e Dot Blot para a variável Porcentagem de Plantas Sadias (%).

Cada ponto corresponde a uma parcela que foi avaliada pelos dois métodos para a variável resposta Porcentagem de Plantas Sadias. A escala de cores indica a frequência de parcelas com combinação de valores de plantas sadias para ambos os métodos.

5.1.2. Análise epidemiológica

Apesar das correlações estatísticas observadas e da não diferenciação significativa entre as técnicas, as variedades e os tratamentos, do ponto de vista epidemiológico a presença de um único indivíduo doente dentro do ambiente de produção ameaça todo o controle do RSD e pode trazer consequências a produtividade final da cultura. A identificação correta do número de plantas doentes dentro de um talhão se faz importante uma vez que mudas contaminadas são os inóculos primários da doença, que assim como observado por Comstock et al. (1996) e por Hoy et al. (1999) podiam se disseminar por mais de 12m dentro de um talhão, dependendo da suscetibilidade da variedade, além de causar perdas que variam de 5 a 30% da produtividade e infectar até 100% do canavial (Tokeshi & Rago, 2005).

A Tabela 4 indica situações em que houveram falhas na detecção de Lxx pela técnica de Dot Blot quando comparada com a detecção pela técnica de PCR no tratamento não infectado das três variedades. Do total inicial de 300 plantas não infectadas obtidas pela diagnose sorológica, 7 plantas já apresentavam a bactéria em seu interior, porém em uma concentração menor que 10^6 UFC/mL, concentração limite de detecção do teste Dot Blot como demonstrada por Leaman et al. (1991), sendo que após um ano de cultivo em campo um destes escapes ainda só pode ser identificado através da técnica de PCR.

Tabela 4: Diferenças de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* no tratamento não-infectado

Variedade	Total inicial de plantas	Lxx inicial	Total de não infectadas	Detectado somente por PCR	Detectadas por Dot Blot e PCR		
					N4	N3	N2
RB92579	100	N0	100	0	0	0	N0
RB867515	100	N0	100	0	0	0	N0
RB966928	100	N0	93	1	6	0	N0

Ambas as metodologias de diagnose permitiram escapes de falsos negativos para Lxx, porém a análise dos dados brutos mostrou que em um total de 600 plantas tratadas termicamente 23 delas continuaram positivas para Lxx, sendo que vinte destes casos foram possíveis de detectar por Dot Blot e se fosse considerada somente esta metodologia de detecção, três plantas seriam falso negativas para Lxx e portando, consideradas como não infectadas e aptas para o uso como mudas no plantio de novas áreas, sendo essa uma importante fonte - senão a principal - de disseminação de doença para os novos campos (Hoy et al., 1999). A Tabela 5 apresenta o número de escapes do tratamento térmico identificados por cada uma das técnicas de diagnose.

Tabela 5: Diferença de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em plantas termicamente tratadas

Total de plantas tratadas	Sadio para os dois testes	Lxx detectada somente por PCR	Lxx detectada por Dot Blot e PCR		
			N4	N3	N2
600	577	3	10	9	1

Em relação aos tratamentos térmicos, corroborando com os dados observados por Dias et al. (2019) e Carvalho et al. (2016), a análise da eficiência das termoterapias mostrou que nenhuma condição de tratamento térmico foi capaz de eliminar completamente a Lxx de todas as variedades, porém ambas foram capazes de diminuir a concentração do patógeno dentro das plantas. Na Tabela 6 observa-se que quando utilizado o método de detecção molecular (PCR) o número de escapes de ambos os tratamentos é maior.

Tabela 6: Resultados de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* conforme a condição de tratamento térmico submetida

TT	Lxx inicial	Total	Total de Infectados	Detectável somente por PCR	Detectável por Dot Blot e PCR			%Plantas sadias	
					N4	N3	N2	PCR	Dot Blot
Longo	N2	20	17	0	3	0	0	85%	85%
Longo	N3	120	118	2	0	0	0	98%	100%
Longo	N4	160	160	0	0	0	0	100%	100%
Curto	N2	20	19	0	1	0	0	0,95	0,95
Curto	N3	40	32	0	1	7	0	0,8	0,8
Curto	N4	240	231	1	5	2	1	0,96	0,97

De forma mais detalhada, quando utilizado o binômio 50°C/2 h (Tabela 7) houve escape da bactéria em apenas uma das parcelas do experimento, na variedade RB867515 (destaque em vermelho), reforçando que as variedades se comportam de formas diferentes em relação a termoterapia. Ainda assim, houve redução da concentração de Lxx de 10⁸ UFC/mL (N2) para 10⁶ UFC/mL (N4). Em todas as outras parcelas a concentração da bactéria reduziu à um nível não detectável pela técnica de Dot Blot.

Tabela 7: Reação das três variedades comerciais de cana-de-açúcar à termoterapia de 50°C/ 2h

Variedade	TT	Ci	Cf
RB867515	50°C/2 h	N3	N0
RB867515	50°C/2 h	N3	N0
RB867515	50°C/2 h	N4	N0
RB867515	50°C/2 h	N2	N4
RB867515	50°C/2 h	N4	N0
RB92579	50°C/2 h	N4	N0
RB92579	50°C/2 h	N3	N0
RB92579	50°C/2 h	N3	N0
RB92579	50°C/2 h	N4	N0
RB92579	50°C/2 h	N4	N0
RB966928	50°C/2 h	N3	N0
RB966928	50°C/2 h	N4	N0
RB966928	50°C/2 h	N3	N0
RB966928	50°C/2 h	N4	N0
RB966928	50°C/2 h	N4	N0

Ci= concentração inicial do patógeno Lxx antes da termoterapia e plantio nas bandejas; Cf= concentração final do patógeno Lxx, depois da colheita das plantas; N1=10⁹ UFC/mL de Lxx; N2=10⁸ UFC/mL de Lxx; N3=10⁷ UFC/mL de Lxx e N4=10⁶ UFC/mL de Lxx. Em vermelho destaque da parcela em que houve redução de um nível da concentração de Lxx pelo tratamento térmico.

Já no binômio 52°C/30 min houveram escapes em quatro situações: duas reduções de concentrações da bactéria: na variedade RB867515 de 10⁸ UFC/mL (N2) para 10⁷ UFC/mL (N3) e na variedade RB92579 de 10⁷ UFC/mL (N3) para 10⁶ UFC/mL (N4) - situações destacadas em vermelho - e duas situações em que a termoterapia não teve efeito algum na concentração inicial da bactéria, ambas na variedade RB966928 - destacadas em verde (Tabela 8), mostrando que tal variedade é mais suscetível ao RSD. Em todas as outras parcelas não destacadas houve redução da concentração de Lxx a um nível indetectável pelo Dot Blot.

Tabela 8: Reação das três variedades comerciais de cana-de-açúcar à termoterapia de 52°C/30 minutos

Variedade	TT	Ci	Cf
RB867515	52°C/30 min	N4	N0
RB867515	52°C/30 min	N2	N3
RB867515	52°C/30 min	N4	N0
RB867515	52°C/30 min	N4	N0
RB867515	52°C/30 min	N4	N0
RB92579	52°C/30 min	N4	N0
RB92579	52°C/30 min	N3	N4
RB92579	52°C/30 min	N4	N0
RB92579	52°C/30 min	N4	N0
RB92579	52°C/30 min	N4	N0
RB966928	52°C/30 min	N4	N0
RB966928	52°C/30 min	N3	N3
RB966928	52°C/30 min	N4	N0
RB966928	52°C/30 min	N4	N0
RB966928	52°C/30 min	N4	N4

Ci= concentração inicial do patógeno Lxx antes da termoterapia e plantio nas bandejas; Cf= concentração final do patógeno Lxx, depois da colheita das plantas; N1=10⁹ UFC/mL de Lxx; N2=10⁸ UFC/mL de Lxx; N3=10⁷ UFC/mL de Lxx e N4=10⁶ UFC/mL de Lxx. Em vermelho destaque das parcelas em que houve redução de um nível da concentração de Lxx pelo tratamento térmico. Em verde destaque das parcelas em que o tratamento térmico não teve influência alguma na concentração do patógeno.

De modo geral, a condição de tratamento térmico longo mostrou-se eficiente para eliminação de Lxx nas variedades RB966928 e RB92579, porém permitiu um escape na variedade RB867515 quando esta estava em menor concentração, diferindo dos resultados obtidos por Fernandes Jr et al. (2010) na variedade CB49-260, uma vez que o tratamento térmico a 50°C/2h não foi capaz de eliminar totalmente a bactéria, o que mostra que as variedades se comportam de maneira diferente em relação ao RSD. Já o tratamento curto foi mais sujeito a escapes da bactéria, assim como observado por Fernandes Jr et al. (2010) e Carvalho et al. (2016), onde os níveis de Lxx sofriam redução quanto utilizado este binômio, e não foi eficiente no controle de Lxx em nenhuma das três variedades, ainda que tenha reduzido a concentração do patógeno quando a concentração inicial era alta e o eliminado quando a concentração de Lxx no colmo era baixa nas variedades RB92579 e RB867515.

Reação diferente foi observada na variedade RB966928, que mostrou-se mais suscetível ao RSD, apresentando maior número de plantas positivas para Lxx mesmo após as termoterapias, sendo que a termoterapia curta permitiu escapes em situação de baixa concentração de Lxx e também não teve influência na alta concentração do patógeno. As análises individuais podem ser vistas nas tabelas abaixo.

Tabela 9: Distribuição dos resultados obtidos no Dot Blot por tratamento da variedade RB867515

Tratamento	N° de plantas	N° de positivos	N1	N2	N3	N4
Não infectado	100	0	0	0	0	0
Infectado	100	47	0	0	15	32
52°C/30min	100	1	0	0	1	0
50°C/2h	100	3	0	0	0	3

Ns representam a concentração de *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*, sendo: N1=10⁹ UFC/mL de Lxx; N2=10⁸ UFC/mL; N3=10⁷ UFC/mL e N4=10⁶ UFC/mL de Lxx

Tabela 10: Distribuição dos resultados obtidos no Dot Blot por tratamento da variedade RB92579

Tratamento	N° de plantas	N° de positivos	N1	N2	N3	N4
Não infectado	100	0	0	0	0	0
Infectado	100	46	0	23	23	0
52°C/30min	100	1	0	0	0	1
50°C/2h	100	0	0	0	0	0

Tabela 11: Distribuição dos resultados obtidos no Dot Blot por tratamento da variedade RB966928

Tratamento	N° de plantas	N° de positivos	N1	N2	N3	N4
Não infectado	100	8	0	0	0	8
Infectado	100	62	0	33	27	2
52°C/30min	100	13	0	0	7	6
50°C/2h	100	0	0	0	0	0

O aparecimento de plantas positivas após um ano de plantio no tratamento não-infectado da variedade RB966928, pode ser explicado pois quando foi realizada a diagnose de rotina antes da termoterapia para o plantio das gemas individualizadas a concentração de Lxx nas plantas-mãe era menor que 10⁶ UFC/mL, ou seja, abaixo do nível de detecção do Dot Blot, o que fez com que os colmos com baixa concentração do patógeno não fossem detectados pelo método diagnóstico empregado. Apesar disso, o uso da diagnose de rotina do tipo Dot Blot se mostra interessante pois este é capaz de identificar a concentração da bactéria na planta em quatro níveis de concentração, diferentemente do PCR que não individualiza a concentração da bactéria em cada amostra. O conhecimento quanto à concentração de Lxx presente na planta é importante pois em situações onde se tem alta concentração da bactéria (10⁹ e 10⁸ UFC/mL) não é recomendado que se faça a termoterapia dos toletes e sim que se faça o descarte do talhão inteiro para uso na multiplicação de plantas.

Contudo, todos os escapes ocorridos nas duas condições de termoterapia são importantes pois, como demonstrado por Hoy et al. (1999) um único tolete contaminado pode disseminar a doença por até 12,9 metros dentro de um mesmo talhão através do uso de facas e materiais de corte contaminados. Sendo assim, o maior número de escapes observados na termoterapia com o binômio 52°C/30min reforça a necessidade de se utilizar o binômio 50°C/2h que, apesar da desvantagem de tratar menos canas por unidade de

tempo, tem uma maior eficiência no controle da Lxx, confirmando os estudos de Hoy et al. (1999), Fernandes Jr et al (2010) e Benda (1994).

5.2. Peso de colmos

A análise de variância para o peso das plantas pode ser observada na Tabela 12.

Tabela 12: Análise de variância ANOVA considerando todas as variedades e os quatro tratamentos

	GL	SQ	QM	F	Pvalor
Bloco	4	0,008	0,202	0,453	0,769
Variedade (V)	2	0,333	0,166	3,74*	0,031
Tratamento (T)	3	0,116	0,038	0,868	0,464
TxV	6	0,228	0,038	0,852	0,537
Resíduo	44	1,962	0,044		
Total	59	2,722			

CV = 16.32 %

De forma geral, o efeito de blocos não foi significativo, novamente indicando que houve homogeneidade entre os blocos. Também, pode-se afirmar que a precisão experimental está adequada, ao considerar um CV de 16,32%. A ausência de interação significativa indica que a produção das variedades ocorreu de maneira análoga ao longo dos diferentes tratamentos. Nota-se que para as quatro condições de tratamento não houve diferença estatística quando observada a produção de colmos, ou seja, para nove meses ainda não foi possível identificar influência dos tratamentos na produção do colmo primário. A única diferença observada foi entre variedades, isto é, intrinsecamente as variedades apresentavam pesos distintos entre si (Tabela 13). Ao aplicar o teste de médias nota-se a produção média entre RB867515 e RB966928 foi estatisticamente significativa, mas as comparações entre RB867515 e RB92579, e RB92579 e RB966928 não foram significativas.

Tabela 13: Teste de Tukey para a variável "variedade"

Variedades	Médias	Grupos
RB867515	1,38	a
RB92579	1,29	ab
RB966928	1,2	b

6 CONCLUSÃO

Conclusão 1: o método de diagnose sorológica do tipo Dot Blot estatisticamente tem uma correlação de 99% com o método molecular PCR.

Conclusão 2: a concentração inicial de Lxx foi o único fator que influenciou a resposta da termoterapia das gemas.

Conclusão 3: a variedade foi o único fator que influenciou o peso final dos colmos.

Conclusão 4: as variedades se comportam de formas diferentes diante de diferentes condições de termoterapia, podendo gerar uma recomendação individual de uso.

7 LITERATURA CITADA

1. Bailey RA, Bechet GR (1997). Further evidence of the effects of ratoon stunting disease on production under irrigated and rainfed conditions. Proc. S. Afr. Sugar Technol. Assoc. 71:97101.
2. Bailey RA, Tough SA (1992). Rapid spread of ratoon stunting disease during manual harvesting of sugarcane and the effect of knife cleaning on the rate of spread. Proceedings of The South African Sugar Technologists' Association.
3. Benda GTA (1994). Serial hot-water treatment for sugarcane disease control. In: Rao GP, Gillaspie Jr AG, Upadhyaya PP, Bergamin Filho A, Agnihotri VP, Chen CT (Eds.) Current trends in sugarcane pathology. New Delhi. International Books and Periodicals Supply Service. pp. 297-310.
4. Carneiro JB., Silveira SF., de Souza Filho GA., Olivares FL. & Giglioti EA. Especificidade de anti-soro policlonal à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Fitopatologia Brasileira 29:614-619. 2004.
5. Carvalho G, Silva TGER, Munhoz AT, Monterio-Vitorello CB, Azevedo RA, Meloto M, Camargo LEA (2016). Development of a qPCR for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and quantification of the effects of heat treatment of sugarcane cuttings on Lxx. Crop Protection 80:51-55
6. Comstock JC (2002). Ratoon stunting disease. Sugar Tech 4:1-6
7. Conab, Companhia Nacional de Abastecimento, (2020) Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2019/2020—Quarto levantamento / abril 2020.
8. Dias VN, Carrer RF, da Cunha MG (2019). Comparison of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* molecular detection in heat-treated sugarcane setts. Pesquisa Agropecuária Tropical 49, e55132. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-40632019000100229&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 15 July 2020.
9. Federação das Indústrias do Estado de São Paulo, Fiesp, (2020). Informativo Deagro, junho de 2020 - Balança comercial do agronegócio: consolidado de 2020. Disponível em: <<https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/balanca-comercial/attachment/file-20200611172025-bca2020/>>.
10. Fernandes Jr AR, Ganem Jr EJ, Marchetti LBL, Urashima AS (2010). Avaliação de diferentes tipos de tratamento térmico no controle do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar. Tropical Plant Pathology 35:60-64.
11. Gagliardi PR, Camargo LEA (2009). Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. Ciência Rural 39:1222-1226.
12. Grisham MP (1991). Effect of ratoon stunting disease on yield of sugarcane grown in multiple three-year plantings. Phytopathology 81:337-340.
13. Grisham MP, Pan YB, Richard Jr EP (2007). Early detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by Real-Time Polymerase Chain Reaction. Plant Disease 91:430-434.
14. Grisham MP, Johnson RM, Viator RV (2009). Effect of ratoon stunting disease on yield of recently released sugarcane cultivars in Louisiana. Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists 29: 119-127.
15. Hoy JW, Grisham MP, Damann KE (1999). Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. Plant Disease 83:1170-1175.

16. Hsu HT (2009). Development of enzyme linked, tissue blot and Dot Blot immunoassays for plant virus detection. *Plant Pathology* 508: 15-25.
17. Instituto Agrônomo de Campinas, IAC, (2019). Censo varietal de Cana. Disponível em: <<https://jornalcana.com.br/conheca-o-ranking-das-variedades-de-cana-na-safra-2019-20/>>.
18. Johnson SS, Tyagi AP (2010). Effect of ratoon stunting disease (RSD) on sugarcane yield in Fiji. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences* 28:69-73.
19. Leaman TM, Teakle DS, Croft BJ (1991). Comparison of serological diagnostic tests for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of ratoon stunting disease in sugarcane. *Proc. Aust. Soc. of Sugarcane Technol.* 13:88-94.
20. Matsuoka S (1984). Benefícios da prática de tratamento térmico de mudas de cana-de-açúcar e eficiência dos métodos existentes no Brasil. *Cadernos Planalsucar*, Piracicaba, n.3, p. 22-24.
21. Matsuoka S, Garcia AAF, Calheiros GG (1999). Melhoramento da cana-de-açúcar. In: Borém A (ed.). *Melhoramento de espécies cultivadas*. UFV, Viçosa: Editora: UFV. p. 225-274.
22. Nogueira GA (2006). Produção de mudas de cana-de-açúcar. In: Segato SV, Pinto AS, Jendiroba E, Nóbrega JCM (org.) *Atualização em produção de cana-de-açúcar*. Piracicaba, CP2, 415pp. Pg 79-92.
23. Pan YB, Grisham MP, Burner DM, Damann Jr KE, Wei Q (1998) A Polymerase Chain Reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. *Plant Disease* 82:285-290.
24. Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroenergético, RIDESA, (2018). Censo varietal. Disponível em: <<https://www.ridesa.com.br/>>.
25. Sanguino A, Moraes VA, Campos JDP, Fernandes CR (1988). O controle do raquitismo-da- soqueira da cana-de-açúcar. *Fitopatologia Brasileira* 13:97.
26. Taylor PWJ, Petrasovits LA, Van Der Velde R, Birch RG, Croft BJ, Fegan M, Smith GR, Brumbley SM (2003). Development of PCR-based markers for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in fibrovascular fluid of infected sugarcane plants. *Australasian Plant Pathology* 32:367-375.
27. Tokeshi H, Rago A.(2005). Doenças da cana-de-açúcar. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA. (Ed). *Manual de Fitopatologia*. 4ed. São Paulo 197, 197-223.
28. Torquesi JG, Coraini NF, da Silva MF, Urashima AS (2019). Inter- and intra- stalk distribution of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane plants. *Anais do Congresso Brasileiro de Fitopatologia* p.121. Disponível em: <<http://www.cbfito2019.com.br/files/cbf-anais-final2.pdf>>.
29. União da Indústria da Cana-de-açúcar, UNICA, (2020). Bioeletricidade. Disponível em: <<https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/bioeletricidade/>>
30. Urashima AS, Ganem Jr EJ, Marchetti LBL, Gagliardi PR (2010). Prevalence of *Leifsonia xyli* subsp *xyli* in sugarcane crops from São Paulo State. *Summa Phytopathologica* 36:322-328.
31. Urashima AS, Grachet NG (2012). Métodos de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e efeito da termoterapia na brotação das gemas de diferentes variedades de cana-de-açúcar. *Tropical Plant Pathology* 37:57-64.
32. Urashima AS, Zavaglia AC (2012). Comparison of methods of DNA extraction for identification of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*: Feasibility for routine diagnosis in young plants in Brazil. *Phytopathology* 102:S4.124.
33. Urashima AS, Marchetti LBL (2013). Prevalence and severity of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* infection of sugarcane in São Paulo state, Brazil. *Journal of Phytopathology* 161:478-484.
34. Urashima AS, Silva MF, Correa JJ, Moraes MC, Singh EC, Smith EC, Sainz MB (2017). Prevalence and severity of ratoon stunt in commercial Brazilian sugarcane fields. *Plant Disease* 101:815-821.

35. Urashima AS, Silva MF, Coraini NF, Gazaffi, R (2020). Temporal incidence of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane propagating materials of Brazilian cultivars. *Crop Protection*, v. 128, p. 104976.
36. Young, AJ (2018). Turning a blind eye to ratoon stunting disease of sugarcane in Australia. *Plant Disease* 102:473-482.
37. Zekarias Y, Yirefu F, Baissa T, Tafesse A, Mengistu L (2012). Effect of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* concentration on yields of four sugarcane varieties in the sugarcane plantations of Ethiopia. *Ethip. J. Appl. Sci. Technol.* 3:25-30.

APÊNDICES



Imagem 1: processo de tratamento térmico das gemas individualizadas dentro de sacos de nylon, em tanque de 2000 litros



Imagem 2: bandejas de plantio identificadas com variedade e nível de concentração de Lxx, dentro de casa de vegetação



Imagem 3: germinação das plântulas, 7 dias após plantio.

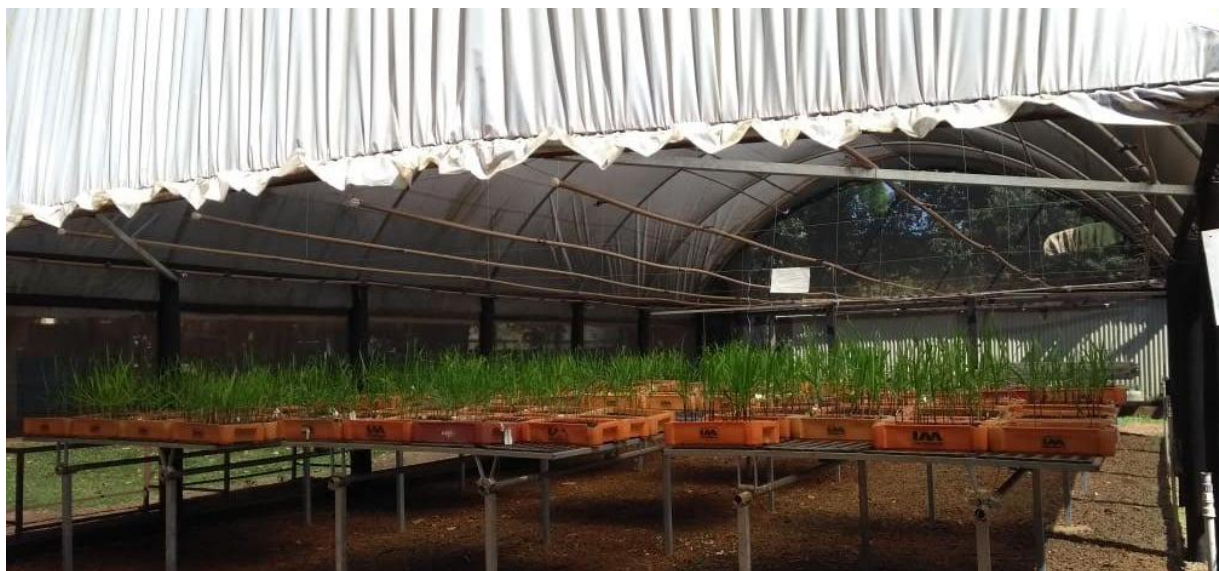


Imagem 4: mudas dois meses após plantio, climatização em estufa



Imagem 5: plantio manual em campo



Imagem 6: irrigação das mudas após plantio



Imagem 7: estabelecimento das mudas em campo



Imagem 8: identificação dos colmos principais com fitas



Imagem 9: plantas com nove meses de idade em campo