



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

**INFLUÊNCIA DA IDADE DA CANA-DE-AÇÚCAR NA DETECÇÃO SOROLÓGICA
DE *Xanthomonas albilineans* E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE
VARIEDADES À ESCALDADURA**

LOURDES BELÉN CUBA MAIDANA

Araras

2023



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

**INFLUÊNCIA DA IDADE DA CANA-DE-AÇÚCAR NA DETECÇÃO SOROLÓGICA
DE *Xanthomonas albilineans* E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE
VARIEDADES À ESCALDADURA**

LOURDES BELÉN CUBA MAIDANA

ORIENTADOR: PROF. DR. ALFREDO SEIITI URASHIMA

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

2023

Maidana, Lourdes Belén Cuba

Influência da idade da cana-de-açúcar na detecção sorológica de *Xanthomonas albilineans* e avaliação da resistência de variedades à escaudadura / Lourdes Belén Cuba Maidana -- 2023.
49f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Alfredo Seiiti Urashima

Banca Examinadora: Roberto Giacomini Chapola,
Catiana Regina Brumatti

Bibliografia

1. Cana-de-açúcar. 2. Detecção de *Xanthomonas albilineans*. 3. Resistência varietal. I. Maidana, Lourdes Belén Cuba. 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 Lourdes Belén Cuba Maidana, realizada em 30/08/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Alfredo Seiiti Urashima (UFSCar)

Prof. Dr. Roberto Giacomini Chapola (FAI)

Profa. Dra. Catiana Regina Brumatti (Raízen)

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

A Deus por ser meu guia.

Aos meus pais, Crispin e Aurora, e minhas irmãs Fátima e Yessica por sempre me apoiarem em cada decisão, obrigada pelos valores inculcados.

Ao Prof. Alfredo, um dos melhores professores que conheci até agora, obrigado pela orientação e as oportunidades, o conhecimento adquirido ao seu lado não tem preço, graças a você me encontrei na Fitopatologia.

Ao Laboratório de Genética Molecular (LAGEM), especialmente à Nathalia e à Monique, por não pouparem esforços em me ajudar e sempre estarem disponíveis para me ensinar, obrigada pela paciência e ajuda diária.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste trabalho (Nº de Processo: 2017/25258-1).

À Fundação de Apoio Institucional ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FAI-UFSCar pela bolsa de extensão, ProEx nº 9861/2020-43 "Difundindo e popularizando as atividades de ensino, pesquisa e extensão do CCA (Araras)".

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

A todos os funcionários de campo do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar - PMGCA, obrigado pelo apoio e dedicação, especialmente ao Genio, João, Cido e Fernandinho, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao Prof. Rodrigo, por sempre estar disposto a fazer reuniões para falar da estatística do meu trabalho, muito obrigado!

A meus amigos do mestrado Claudia, Israel e Evelyn, obrigada pela ajuda no laboratório, extraíndo seiva, picando amostras, estou imensamente agradecida com vocês. Também a Carla, Well e Élica pela amizade e apoio durante este período.

A meus amigos do laboratório, Rafa e Bárbara, muito obrigada pela parceria e apoio. Também a Laura, Ana, Berlim, Eleven e Diskda pelas conversas, todos vocês fizeram com que os dias fossem melhores, desejo muito sucesso a todos!

À Profa. Lidia Quintana, que numa tarde do mês de maio me ligou para passar o convite do Prof. Alfredo para fazer mestrado na UFSCar – Araras.

A todos aqueles que de alguma forma me ajudaram a concluir este objetivo e estar onde estou hoje, o meu sincero agradecimento.

Aguyje!

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	3
REVISÃO DA LITERATURA.....	4
1 Cana de açúcar.....	4
2 Importância.....	4
3 Sistema de plantio convencional.....	5
4 Escaldadura-das-folhas (LSD).....	7
5 Controle.....	8
5.1 Variedades Resistentes.....	9
5.2 Mudas sadias.....	10
LITERATURA CITADA.....	10
CAPÍTULO 1. INFLUÊNCIA DA IDADE DA CANA-DE-AÇÚCAR NA DETECÇÃO SOROLÓGICA DE <i>Xanthomonas albilineans</i>.....	13
1 Resumo.....	14
2 Introdução.....	14
3 Materiais e Métodos.....	16
3.1 Material vegetal.....	16
3.2 Diagnóstico pré-plantio.....	16
3.3 Obtenção de mudas.....	17
3.4 Exame diagnóstico por “dot blot”.....	17
4 Delineamento estatístico.....	18
5 Resultados.....	19
5.1 Exame diagnóstico aos oito meses.....	19
5.2 Exame diagnóstico aos nove meses.....	21
6 Discussão.....	24
7 Conclusões.....	27
8 Literatura citada.....	27
CAPÍTULO 2. APRIMORAMENTO DA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE VARIEDADES ATRAVÉS DA COLONIZAÇÃO DOS VASOS.....	29
1 Resumo.....	30
2 Introdução.....	30
3 Materiais e Métodos.....	32
3.1 Material vegetal.....	32
3.2 Extração de seiva.....	32
3.3 Dot blot immunoassay.....	32

3.4 Avaliação da taxa de colonização dos vasos por “dot blot”	33
4 Análise estatística do experimento.....	34
5 Resultados.....	34
5.1 Incidência.....	34
5.2 Severidade.....	35
6 Discussão.....	37
7 Conclusões.....	44
8 Literatura citada.....	44
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
APÊNDICE.....	48

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Capítulo 1

Tabela 1. Resultados da análise sorológica “dot blot” em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB966928 com infecção inicial de <i>Xanthomonas albilineans</i> de 10^6 ufc.mL ⁻¹ , analisados aos oito e nove meses de idade.	22
--	----

Capítulo 2

Tabela 1. Resultado da análises de variância da incidência de <i>Xanthomonas albilineans</i> obtida em três variedades de cana-de-açúcar RB966928, RB92579 e RB867515, analisados em cana de terceira soca.	34
Tabela 2. Incidência de <i>Xanthomonas albilineans</i> em três variedades de cana-de-açúcar.	34
Tabela 3. Populações bacterianas de <i>Xanthomonas albilineans</i> em cana de terceira soca em três variedades de cana-de-açúcar.	35
Tabela 4. Porcentagem de diferentes concentrações de <i>Xanthomonas albilineans</i> em cana de terceira soca.	
Tabela 4. Porcentagem de diferentes concentrações de <i>Xanthomonas albilineans</i> em cana de terceira soca.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Capítulo 1	
Figura 1. Processo da análise sorológica para detecção de <i>Xanthomonas albilineans</i> em seivas extraídas de colmos de cana-de-açúcar para a obtenção de gemas infectadas com um título de bactérias N4 (10^6 cfu.mL ⁻¹).	16
Figura 2. Resultado do PCR de colmos utilizados para extração de seiva.	17
Figura 3. Canas com oito meses de idade da variedade RB966928 com infecção inicial de <i>Xanthomonas albilineans</i> de 10^6 ufc.mL ⁻¹ , analisados pelo exame sorológico “dot blot”.	19
Figura 4. Foto de uma membrana resultante da análise sorológica para detecção de <i>Xanthomonas albilineans</i> em seivas extraídas de colmos de cana-de-açúcar com oito meses.	19
Figura 5. Canas com nove meses de idade da variedade RB966928 com infecção inicial de <i>Xanthomonas albilineans</i> (Xa) de 10^6 ufc.mL ⁻¹ , analisados pelo sorológico “dot blot”.	21
Figura 6. Foto da membrana resultante da análise sorológica para detecção de <i>Xanthomonas albilineans</i> em seivas extraídas de colmos de cana-de-açúcar com nove meses.	21
Figura 7. Exemplo do processo de disseminação de <i>Xanthomonas albilineans</i> a partir de colmos contaminados que não foram detectados (escape) no exame sorológico "dot blot".	25
Capítulo 2	
Figura 1. Incidência e colonização de <i>Xanthomonas albilineans</i> em três secções de cana de terceira soca. Os valores são as médias (\pm erro padrão) de cada variável. Para as figuras de colonização, os dados foram transformados com a formula raiz quadrada (1+x).	41
Figura 2. Regressão linear entre a incidência média da doença e as densidades populacionais médias (raiz quadrada (1+x)) de <i>Xanthomonas albilineans</i> . (A) secção basal, (B) secção média, (C) secção apical, (D) concentração bactéria “N1” (E) concentração de bactéria “N4”.	42

INFLUÊNCIA DA IDADE DA CANA-DE-AÇÚCAR NA DETECÇÃO SOROLÓGICA DE *Xanthomonas albilineans* E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE VARIEDADES À ESCALDADURA

Autor: LOURDES BELÉN CUBA MAIDANA

Orientador: Prof. Dr. ALFREDO SEIITI URASHIMA

RESUMO

Entre as doenças, a escaaldadura-das-folhas (LSD) é uma das mais importantes no setor canavieiro. Os métodos de controle mais empregados são dois: utilização de mudas sadias (Capítulo I) e o uso de variedades resistentes (Capítulo II). Para a obtenção de mudas sadias no plantio convencional, é essencial a realização do exame laboratorial "dot blot" das seivas dos colmos que serão utilizados como materiais propagativos para garantir a sanidade do canavial. No entanto, não se conhece a idade mínima das canas para a extração da seiva que proporcione um diagnóstico seguro no método sorológico "dot blot". Portanto, o objetivo foi examinar qual a idade dos colmos que permite um diagnóstico seguro da escaaldadura-das-folhas através do exame sorológico "dot blot". A variedade utilizada foi a RB966928, infectada com *Xanthomonas albilineans* (Xa) na concentração de 10^6 ufc.mL⁻¹. Os exames para detecção da doença foram iniciados com canas de oito meses para a extração de seiva. Os resultados mostraram que a cana planta de nove meses apresenta escape, indicando que plantas dessa idade não são adequadas para um diagnóstico seguro de LSD. No Capítulo II, adotou-se a avaliação da população bacteriana nos vasos, com o objetivo de aprimorar esse método e avaliar a resistência de três cultivares (RB867515, RB92579 e RB966928) à LSD. Os resultados demonstraram que a densidade populacional de Xa permitiu obter mais informações sobre a colonização do patógeno, sendo esta a mais apropriada para o tipo de disseminação do patógeno no Brasil, além de permitir a avaliação da resistência de genótipos. Duas das variedades mais cultivadas no Brasil (RB92579 e RB966928) são altamente suscetíveis a Xa.

Palavras-chave: *Saccharum* spp., inóculo inicial, diagnoses, disseminação, dot blot

INFLUENCE OF SUGARCANE AGE ON THE SEROLOGICAL DETECTION OF *Xanthomonas albilineans* AND THE EVALUATION OF VARIETAL RESISTANCE TO SCALD DISEASE

Author: LOURDES BELÉN CUBA MAIDANA

Adviser: Prof. Dr. ALFREDO SEITI URASHIMA

ABSTRACT

Leaf scald disease (LSD) is one of the most important disease of sugarcane in Brazil. Two of the most employed control methods are the use of healthy seedcanes (seen in Chapter I) and resistant genotypes (seen in Chapter II). Laboratory diagnostic test is essential to obtain healthy seedcanes, and dot blot immunoassay is the serological technique employed for conventional planting. However, the adequate stalk age for sap extraction that provides reliable results in the dot blot method is unknown. Therefore, the objective of this work was to determine the stalk age that allows reliable diagnostic test of LSD. The variety employed was RB966928, infected with *Xanthomonas albilineans* (Xa) at a concentration of 10^6 cfu.mL⁻¹. Sap extraction for LSD detection commenced at eight-month-old canes. The results showed that nine-month-old sugarcane plants exhibited escape, indicating that sap from plants of this age is not suitable for a reliable diagnosis of LSD. In Chapter II, assessment of genotype resistance to LSD was carried out by bacterial population of three cultivars (RB867515, RB92579, and RB966928) grown in pots. The results demonstrated that the Xa population density provided more information on the pathogen's colonization, making it the most appropriate, especially because it resembles the type of pathogen dissemination that occurs by harvester in Brazil, enlighten the cultivar reaction to it. Two of the most cultivated varieties in Brazil (RB92579 and RB966928) are highly susceptible to Xa.

Key-words: *Saccharum* spp., initial inoculum, diagnoses, dissemination, dot blot.

INTRODUÇÃO

No cenário atual, o setor canavieiro desempenha um papel importante no agronegócio e no meio ambiente brasileiro. A estimativa da produção de cana-de-açúcar para a safra 2023/2024 indica um crescimento de 4,4% em comparação com a safra anterior, totalizando 637,1 milhões de toneladas. Além disso, a área cultivada destinada à safra 2023/2024 está projetada em 8,4 milhões de hectares de cana-de-açúcar (CONAB, 2023).

Os principais produtos obtidos da cana-de-açúcar são o açúcar, o etanol e a bioenergia. Em relação à produção de açúcar, o Brasil é considerado o maior produtor mundial, com uma produção estimada de 38,77 milhões de toneladas na safra 2023/24, 4,7% acima do volume da safra 2022/23 colocando, como a segunda maior produção de açúcar da série histórica da Conab (CONAB, 2023). Aproximadamente 70% do açúcar produzido no Brasil é exportado, correspondendo a 42% das exportações mundiais (UNICA, 2022a).

Quanto ao etanol a estimativa de produção a partir da cana-de-açúcar no primeiro levantamento da safra 2023/24 é de 27,53 bilhões de litros, dos quais a produção de etanol hidratado, usado em carros com sistema “flex-fuel” está estimada em 15,71 bilhões de litros e a produção do etanol anidro, o qual é adicionado à gasolina, está estimada em 11,82 bilhões de litros (CONAB, 2023). O etanol produzido no Brasil é principalmente direcionado para a produção de biocombustíveis. Essa escolha estratégica se baseia na capacidade dos biocombustíveis de contribuir significativamente para a redução das emissões de gases de efeito estufa. Comparado com a gasolina, o etanol tem potencial para reduzir em até 90% as emissões de CO₂. No Brasil, desde o lançamento dos carros flex (2003) até dezembro de 2021, evitou a liberação de 600 milhões de toneladas de CO₂ na atmosfera, o que representaria cultivar 4 bilhões de árvores pelos próximos 20 anos (UNICA, 2022c).

Além de gerar biocombustível, a matriz elétrica brasileira utiliza bagaço e palha de cana-de-açúcar para gerar bioeletricidade, que é considerada a quarta fonte mais importante de produção de eletricidade do país. Em 2022, a produção de bioeletricidade de cana foi de 18,4 mil GWh, representando 72% de toda a geração

de energia elétrica a partir de biomassa (UNICA, 2023). A bioenergia complementa a produção de eletricidade gerada por hidrelétricas, pois estas apresentam baixa produção durante a estação seca coincidindo com início da colheita da cana-de-açúcar e consequente disponibilidade de matéria prima para geração de bioeletricidade, aumentando assim a segurança energética do país (UNICA, 2022).

O setor sucroenergético é de grande importância econômica e agrícola, não obstante, o setor canavieiro ainda enfrenta alguns desafios, incluindo doenças, entre as quais se destaca a escaldadura-das-folhas, também conhecida como "leaf scald disease" (LSD). Essa doença ganhou relevância devido à sua disseminação generalizada no Brasil e à sua prevalência na maioria das variedades comerciais (TOKESHI; RAGO, 2016). As principais recomendações de controle para LSD são duas: utilização de mudas saudáveis e variedades resistentes as quais serão abordadas nos Capítulos I e II desta dissertação.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Examinar qual a idade da cana permite um exame diagnóstico seguro através de exame sorológico “dot blot” e aprimorar a avaliação da população de *Xanthomonas albilineans* em cana-de-açúcar para examinar a resistência de diferentes genótipos do Brasil.

Objetivos específicos

- Determinar a porcentagem de escape de LSD obtida em cana-planta aos oito e nove meses.
- Determinar a segurança do diagnóstico em cana planta de nove meses a qual é usualmente utilizada para a formação de mudas.
- Avaliar a resistência de três variedades RB966928, RB867515 e RB92579 pela densidade populacional nos vasos condutores.
- Avaliar a resistência dos genótipos pela incidência da bactéria nos internódios.
- Avaliar a reação dos genótipos pela severidade da colonização nos vasos condutores.

REVISÃO DA LITERATURA

1 Cana de açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta originária do sudoeste asiático, especificamente da região entre Nova Guiné e Indonésia (JAMES, 2004). É uma cultura importante em regiões de clima tropical e subtropical, como América do Sul, Central e do Norte, Caribe, África e ilhas adjacentes, Sul da Ásia e Ásia Austral (BRUMBLEY *et al.*, 2008). A cana-de-açúcar pertence à família das Poaceae, da tribo Andropogoneae, e está classificada no gênero *Saccharum*. Existem seis espécies, *S. spontaneum* e *S. robustum* que são encontradas em estado selvagem, enquanto *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. Sinense* e *S. edule* foram cultivadas no passado. As variedades comerciais cultivadas atualmente são híbridos complexos provenientes de duas ou mais espécies (JULIEN; IRVINE; BENDA, 1989).

2 Importância

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, a área cultivada destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2023/24 está estimada em 8,4 milhões de hectares de cana-de-açúcar para a colheita (CONAB, 2023). Entre os produtos obtidos da cana-de-açúcar estão o açúcar, o etanol e a produção de bioenergia.

A produção de açúcar total na safra 2022/2023 estimasse em 36,37 milhões de toneladas. Esta produção é 4,1% superior a observada na safra passada, resultado da melhoria dos canaviais, tanto em produtividade como na qualidade do açúcar total recuperável (ATR), que, apesar de estar abaixo ao da safra passada, teve elevação em relação ao último levantamento (CONAB, 2022). A primeira previsão para a produção de açúcar, na safra 2023/24, indica um volume de 38,77 milhões de toneladas, 4,7% acima do volume da safra 2022/23 (CONAB, 2023). O principal destino do açúcar exportado pelo Brasil durante a safra 2022/23 foi a China que comprou US\$ 1,57 bilhões, seguido pela Argélia com US\$ 774,8 milhões e Marrocos com aproximadamente US\$ 704,4 milhões. Juntos estes países representaram aproximadamente 27% do volume exportado pelo Brasil (CONAB, 2023).

O etanol produzido no Brasil é principalmente direcionado para a produção de biocombustíveis. Essa escolha estratégica se baseia na capacidade dos biocombustíveis de contribuir significativamente para a redução das emissões de gases de efeito estufa. Comparado com a gasolina, o etanol tem potencial para reduzir em até 90% as emissões de CO₂. No Brasil, desde o lançamento dos carros flex desde o ano 2003 até dezembro de 2021, evitou a liberação de 630 milhões de toneladas de CO₂ na atmosfera, o que representaria cultivar 4 bilhões de árvores pelos próximos 20 anos (ÚNICA, 2022c).

Atualmente, os Estados Unidos é o maior produtor de etanol do mundo, seguido pelo Brasil como o segundo maior produtor. A produção de etanol no Brasil atinge 31,2 bilhões de litros, das quais 2,4 bilhões de litros são exportados (UNICA, 2022c). A estimativa da produção brasileira de etanol, fabricado a partir da cana-de-açúcar, no primeiro levantamento da safra 2023/24, é de 27,53 bilhões de litros, para os produtos derivados da cana-de-açúcar, destaque para a produção do etanol anidro, o qual é adicionado na gasolina, nesta safra está estimada em 11,82 bilhões de litros (CONAB, 2023).

Além de gerar biocombustível a partir do etanol para reduzir as emissões de gases de efeito estufa, a matriz elétrica brasileira utiliza bagaço e palha de cana-de-açúcar para gerar bioeletricidade, que é considerada a quarta fonte mais importante de produção de eletricidade do país. Em 2022, a produção de bioeletricidade de cana foi de 18,4 mil GWh, representando 72% de toda a geração de energia elétrica a partir de biomassa no país. A bioenergia complementa a produção de eletricidade gerada por hidrelétricas, pois estas apresentam baixa produção durante a estação seca, aumentando assim a segurança energética do país (ÚNICA, 2022b).

3 Sistema de plantio convencional

A cana-de-açúcar é propagada a partir de nós ou de colmos, sendo esta última utilizada para a produção comercial. Em condições favoráveis, as gemas das estacas brotam e produzem os colmos primários. Posteriormente, as gemas localizadas na base dos colmos primários dão origem aos brotos secundários, que por sua vez produzirão colmos terciários, e assim sucessivamente, formando o que

é conhecido como planta, cepa ou touceira de cana (JULIEN; IRVINE; BENDA, 1989).

Atualmente a formação de novos canaviais ou áreas de reforma são através de colmos inteiros ou fracionados com três a quatro gemas distribuídos sobre sulcos profundos de plantio. A distribuição dos colmos nas linhas de plantio se realiza por meio de maquinários embora que muitas usinas estão voltando a distribuição dos colmos de forma manual devido a menores danos às gemas e, assim, diminuindo o consumo de colmos por hectare (MAY; RAMOS, 2019).

O plantio de colmo inteiro tem duas desvantagens, a primeira é que, se não forem adequadamente cobertos com solo, a porção superior pode sair do sulco, e a segunda é que a brotação ao longo do colmo é previsivelmente irregular. Isso ocorre porque, na porção superior, os brotos brotam primeiro, enquanto os brotos na parte inferior do colmo levarão mais tempo para aparecer do que aqueles na parte superior. Os colmos de três a seis entrenós parecem brotar mais rapidamente quando comparados com o colmo inteiro, mas se o plantio for cuidadosamente controlado, a vantagem aparente de duas semanas após o plantio pode desaparecer após seis meses. A escolha de usar estacas do colmo inteiro ou de porções do colmo dependerá do método de plantio preferido pelos agricultores, das condições de cultivo e dos resultados desejados. É importante garantir que os colmos sejam plantados adequadamente, cobertos com solo suficiente e posicionados corretamente para obter uma brotação uniforme (JAMES, 2004).

A origem das mudas a ser plantadas em área comercial deriva 50,8% de talhões comerciais de primeiro corte (BRAGA JR., 2020) com 8 a 12 meses de idade (SILVA *et al.*, 2017). Atualmente são utilizadas de 15 a 21 gemas/metro e em torno de 20 t/ha de colmos na operação de plantio mecanizado. Os colmos utilizados para dar origem ao sistema de produção são extraídos de colmos-semente provenientes de viveiros básicos, os quais tem que receber acompanhamento técnico em todas as práticas de manejo e protocolos direcionados para obtenção de mudas livres de doenças e pragas em especial para evitar a disseminação de doenças sistêmicas como raquitismo-das-soqueiras e escaldadura-das-folhas. Neste caso é importante a realização de exames laboratoriais para descartar as touceiras contaminadas antes do plantio (LANDELL *et al.*, 2012) ou podem ser tratadas com a termoterapia; o

sistema australiano (24 horas em água corrente fria, seguido de 3 horas a 50°C) é o mais recomendável para o controle de carvão, raquitismo-das-soqueiras e a escaldadura-das-folhas (JAMES, 2004).

4 Escaldadura-das-folhas (LSD)

Historicamente, na cultura da cana-de-açúcar no mundo, são quatro as doenças consideradas mais importantes, entre elas se encontra a escaldadura-das-folhas (LSD). No Brasil, sua importância tem sido subestimada devido aos erros de identificação e à confusão de seus prejuízos com aqueles causados pelo raquitismo-das-soqueiras (TOKESHI, 1997).

A LSD foi identificada como uma doença bacteriana fibrovascular da cana-de-açúcar na década de 1920 na Austrália. Foi descoberta pouco depois em outros países. A doença já foi reportada em pelo menos 60 países, e muitos desses países estão nas áreas de cana-de-açúcar mais produtivas do mundo (RICAUD; RYAN, 1989; ROTT *et al.*, 2017). A LSD é uma doença que pode causar a morte da cana-de-açúcar. Portanto, pode ter um grande efeito na produtividade da cana-de-açúcar e tem o potencial de limitar seriamente o cultivo de variedades suscetíveis (ROTT *et al.*, 2017). Esta doença é considerada um patógeno de quarentena para o cultivo de cana-de-açúcar em países como a Austrália e China devido a que o inóculo pode encontrar-se nas mudas (ZHAG *et al.*, 2017; PLANT HEALTH AUSTRALIA, 2021).

LSD se manifesta em três fases diferentes: a forma latente, crônica e a forma aguda. A fase crônica apresenta vários sintomas externos característicos da LSD são uma linha de lápis branca de aproximadamente 1 a 2mm de largura na folha que se estende da nervura central até a margem da folha paralela às nervuras. À medida que a doença progride, a necrose se desenvolve a partir da ponta ou margem da folha. Nos colmos maduros, as folhas tornam-se necróticas a partir das pontas e desenvolvem-se brotações laterais moderadas a abundantes. Os brotos laterais aparecem primeiro na parte basal dos colmos e progridem para cima. Esses brotos laterais geralmente apresentam as linhas brancas de lápis e/ou escaldaduras características da LSD. Brotações com atrofia e murcha também são relatadas em estágios mais avançados, as folhas apresentam aspecto queimado e enroladas para dentro, podendo levar à morte das plantas, sintomas externos que representam a

fase crônica. A fase aguda da doença ocorre em variedades suscetíveis, é caracterizada por murcha súbita e morte de colmos, geralmente o aparecimento desta fase é acompanhado por um período de estiagem prolongada. Os aparecimentos destes sintomas mencionados nem sempre aparecem em plantas infectadas, pois as plantas geralmente não apresentam nenhum sintoma externo visível (assintomático), isso dificulta a diferenciação entre uma planta sadia e uma doente, esta fase corresponde à fase latente e até agora o mecanismo de infecção não é ainda compreendido. A fase latente facilita a disseminação da doença para novas áreas da lavoura através do uso de colmos assintomáticos e infectados, como resultado de ferramentas de diagnóstico não confiáveis. Portanto, além da identificação visual dos sintomas, é importante a aplicação de outras formas de diagnoses da doença para seu correto controle, entre as formas de detecção estão os testes sorológicos, PCR qualitativo e quantitativo (ROTT *et al.*, 1997).

5 Controle

5.1 Variedades Resistentes

O meio mais adequado e fácil de controlar LSD é usar cultivares de cana-de-açúcar resistentes à doença (RICAUD; RYAN, 1989; ROTT, 1995). É fundamental identificar e eliminar variedades suscetíveis durante o processo de seleção da cana-de-açúcar. Testes de *screening* de variedades foram implementados em vários países onde a doença é prevalente.

Os níveis de resistência são geralmente avaliados através da observação de sintomas após inoculação artificial nos colmos (ROTT, 1995).

O desenvolvimento de um método de inoculação por Antoine e Ricaud (1962) na qual simularam a transmissão de campo através de facas de corte constituiu um passo importante que resultou numa melhoria da metodologia de ensaio. Hoje em dia, a técnica de inoculação de decapitação é amplamente utilizada, com ligeiras variações de país para país (ANTOINE; RICAUD, 1962; KOIKE, 1965; EGAN, 1969).

Outro método foi desenvolvido por Rott *et al.* (1994, 1997) em seu estudo de resistência a LSD foi baseada na colonização limitada de *Xanthomonas albilineans* (Xa) nos vasos, em Guadalupe. Esta metodologia baseou-se na colonização do

patógeno, a qual difere dependendo da variedade. As maiores densidades de Xa foram detectadas nas variedades suscetíveis e as menores nas resistentes, independentemente da evolução dos sintomas de LSD. Assim, variedades suscetíveis ou altamente suscetíveis foram altamente colonizadas pelo patógeno, mesmo quando os sintomas não se desenvolveram devido a que doença se encontrava na fase de latência. Estes autores ressaltaram que embora a base para comparar a colonização bacteriana entre as variedades seja desconhecida, os procedimentos de *screening* para resistência ao LSD aparentemente podem ser baseados em densidades populacionais de patógenos. Esse procedimento parece ser ainda mais valioso que o *screening* baseado em sintomas de LSD, a qual nem sempre é eficiente e poder ser impossível quando os sintomas não se desenvolvem (ROTT *et al.*, 1994, 1997).

5.2 Mudanças sadias

Introduções de patógenos podem ser evitadas em regiões onde a LSD ainda não estão presentes, importando apenas materiais vegetais livres de doenças. Isso também é válido para áreas já infectadas, pois sempre há o risco de transmissão de uma nova cepa bacteriana mais virulenta. Medidas rigorosas devem ser adotadas para controlar a distribuição e o intercâmbio de materiais vegetais, especialmente colmos (ROTT, 1994).

LITERATURA CITADA

ANTOINE, R.; RYCAUD, C. Cane diseases: A method for inoculationg leaf scald in field trials. Mauritius **Sugar Ind. Res. Inst., Annu. Rep**, p. 55-56, 1962.

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.

BRUMBLEY, S. M.; SNYMAN, S. J.; GNANASAMBANDAM, A.; JOYCE, P.; HERMANN, S. R.; DA SILVA, J. A. G.; MCQUALTER, R. B.; WANG, M.-L.; EGAN, B. T.; PATERSON, A. H.; ALBERT, H. H.; MOORE, P. H. Sugarcane. *In: Compendium of Transgenic Crop Plants*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 24 Oct. 2008. p. 1-58.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTCIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar safra 2022/23. 3er levantamento**, Brasília, DF, v. 11, n. 1 abril 2023.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTCIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar safra 2023/24 1º levantamento**, Brasília, DF, v. 9, n. 3 dezembro 2022

EGAN, B.T. Evaluation of the aluminum cap method for leaf scald disease resistance testing in Queensland. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol**, v.13, p.1153-1158, 1969.

JAMES, G. L. An introduction to sugarcane. *In: JAMES, G. L. (Ed.) Sugarcane*. 2. Ed. Oxfprd, UK: Blackwell Punlishing, 2004. p. 1-19.

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

KOIKE, H. The aluminum-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. **Phytopathology**, v.55, n. 3, p. 317-319, 1965.

LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P. **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Campinas: Instituto Agronômico, 2012. 16p. (Documento IAC, n. 109).

MAY, A., RAMOS, P. N. **Uso de gemas individualizadas de cana-de-açúcar para a produção de mudas**. 1ª edição eletrônica (2019), Embrapa Agricultura, pecuária e abastecimento. 2019. 19p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/197206/1/Andre-May-CT-29.pdf>. Acessado em: 1 de agosto de 2023.

PLANT HEALTH AUSTRALIA. **National Plant Biosecurity Status Report**. AUSTRALIA: Canberra, ACT., 2020. Disponível em: <https://www.planthealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2021/08/2020-National-Plant-Biosecurity-Status-Report.pdf>. Acesso 01 out. 2022.

RICAUD, C.; RYAN, C.C. Leaf scald. *In*: **Diseases of Sugarcane. Major Diseases**. RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE, A.G.; HUGHES, C.G. (ed.). Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1989. p. 39-58.

ROTT, O.; SANDHU, H. S.; COMSTOCK, J.C.; GILBERT, R.A. Sugarcane Leaf Scald. **Florida Sugarcane Handbook**, p. 1-4. 2017. Disponível em: <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/SC001>. Acesso em: 2 ago. 2023.

ROTT, P. Leaf scald of sugarcane. CIRAD/ISSCT, p. 47–54, 1995. Disponível em: https://agritrop.cirad.fr/389753/1/document_389753.pdf. Acesso em: 29 jul. 2023.

ROTT, P., ABEL, M.; SOUPA, D.; FELDMANN, P.; LETOURMY, P. Population dynamics of *Xanthomonas albilineans* n sugarcane plants as determined with an antibiotic-resistant mutant. **Plant disease**, v. 78, n. 3, p. 241-247, 1994.

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, 1997.

SILVA, S. D.; NAVA, D. E.; MONTERO, C. R.; STURZA, V. **Sistema de produção de cana-de-açúcar para agricultura familiar**. Embrapa, 2017. 47 -55p. (Documento, n. 443). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/168067/1/Sergio-dos-Anjos-Documento-443-web.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2023.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.) In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. v.2, p.207-225.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F. CARVALHO, P. C. TOKESHI, H.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.; SALGADO, C. L.; KRUGNER, T. L.; CARDOSO, E. J. B.; BERGAMIN, A (ed.). **Manual de Fitopatologia II: Doenças das plantas cultivadas 2da Edição**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1980. p. 141–206.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.) In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2016. v.2, p.220-221.

ÚNICA. 2022a. **AÇÚCAR**. Disponível em: <https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/acucar/>. Acesso em: 29 jul. 2023.

UNICA. 2022b. **BIOELETRICIDADE**. Disponível em: <https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/bioeletricidade/>. Acesso em: 29 jul. 2023.

UNICA. 2022c. **ETANOL.** Disponível em:
<https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/etanol/>. Acesso em: 1 ago. 2023.

ZHANG, R. Y.; SHAN, H. L.; LI, W. F.; CANG, X. Y.; WANG, X. Y.; YIN, J.; LUO, Z. M.; HUANG, K. First Report of Sugarcane Leaf Scald Caused by *Xanthomonas albilineans* in the Province of Guangxi, China. **Plant Disease**, v.101, n.8, p.15-41, 2017.

CAPÍTULO 1. INFLUÊNCIA DA IDADE DA CANA-DE-AÇÚCAR NA DETECÇÃO SOROLÓGICA DE *Xanthomonas albilineans*

1 Resumo

Entre as doenças a escaudadura-das-folhas (LSD) é uma das mais importantes no setor canavieiro. Esta doença apresenta três sintomas entre os quais a fase latente se destaca pela ausência de sintomas visíveis, a qual dificulta a detecção da doença no campo além de facilitar a disseminação da doença através de mudas contaminadas, sendo essa a única fonte de inóculo primário de LSD para novas áreas de plantio. Assim, o exame laboratorial é essencial para a detecção da doença dos materiais propagativos e para o sucesso do manejo da doença. No entanto, não se conhece a idade mínima das canas para extração da seiva que proporcione um diagnóstico seguro no método sorológico “dot blot”, que é o mais empregado pelas usinas. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi examinar qual idade permite diagnose segura da escaudadura-das-folhas através de exame sorológico “dot blot”. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com três tratamentos (oito e nove meses) e dez repetições; cada unidade experimental foi composta por uma planta por vaso; esse ensaio foi conduzido em duplicata. A variedade empregada neste estudo foi RB966928 infectada com *Xanthomonas albilineans* na concentração de 10^6 ufc.mL⁻¹. Os exames para detecção da doença se iniciaram com canas de oito meses para extração de seiva. Para a análise dos dados, foi utilizado o teste qui-quadrado com um nível de significância de 5%, realizado no programa estatístico R Studio. Os resultados mostraram que apenas 5% de LSD foi detectada aos oito meses, enquanto aos nove meses esse número aumentou para 80%. Esses dados mostram que cana planta de nove meses apresenta escape, indicando que plantas dessa idade não são adequadas para um diagnóstico seguro de LSD.

Palavras-chave: *Saccharum* spp., inóculo inicial, diagnoses, disseminação

2 Introdução

Uma das características de LSD é que ela apresenta três tipos de sintoma: agudo, crônico e latente. A fase aguda da doença é caracterizada por murcha súbita e morte de colmos maduros, geralmente o aparecimento desta fase é acompanhado por um período de estiagem prolongada (ROTT *et al.*, 2017). A segunda se caracteriza por uma linha de lápis branca que se estende desde a nervura central até a margem da folha paralela às nervuras (sintomas característicos de LSD). À medida que a doença progride pode aparecer necrose e brotações laterais com linhas brancas (TOKESHI; RAGO, 2016).

Os aparecimentos destes sintomas mencionados nem sempre ocorrem em plantas infectadas, pois as plantas geralmente não apresentam nenhum sintoma externo visível (assintomático). Essa característica é comum nesta doença e dificulta a diferenciação entre uma planta sadia e uma doente, esta fase corresponde à fase latente e até agora o mecanismo de infecção não é compreendido. A fase latente facilita a disseminação da doença para novas áreas da cultura através do uso de material propagativo assintomático, mas infectado, sendo esta a única fonte de inóculo de propagação da doença no Brasil, já que a disseminação aérea ainda não foi reportada, comparado ao Caribe, aonde se reportou esse tipo de disseminação (DAVIS *et al.*, 1997)

Por isso, é importante a aplicação de exames laboratoriais para a detecção de LSD com a finalidade que as mesmas possam ser descartadas antes de serem utilizadas para a formação de mudas. No Brasil, os laboratórios especializados em detecção de doenças de cana-de-açúcar empregam duas tecnologias distintas: a molecular e a sorológica. A primeira é principalmente empregada para formação de MPB (mudas-pré-brotadas), onde seu uso é essencial para produção de plantas matrizes (LANDELL *et al.*, 2012). Já o exame sorológico é empregado quando se usa colmos como material propagativo. Nesse tipo de exame é empregado seiva de canas advindas de talhões que fornecerão os materiais propagativos.

Dentre as duas metodologias, o exame sorológico “dot blot” é o mais demandado, visto que o plantio convencional com colmos corresponde a mais de 91,9% das áreas reformadas (BRAGA JR. *et al.*, 2020). Portanto, a representatividade deste sistema de plantio sugere também que o método de detecção de doença para o material propagativo tem que ser confiável, pois uma área de 813,3 mil ha foi empregada para plantio de novos talhões na safra 2022/2023 (RIDESA, 2022) dos quais 747,4 mil ha foram plantados com colmos.

A sensibilidade e a especificidade do teste de “dot blot” podem variar dependendo do estágio de desenvolvimento da cana-de-açúcar, é importante o conhecimento da influência que o estágio de desenvolvimento pode afetar diretamente o resultado do exame diagnóstico para garantir um diagnóstico confiável.

Nesse sentido, McFarlane (2003) reportou que o exame sorológico “dot blot” foi suficientemente sensível para detectar rotineiramente infecções por *Leifsonia xyli* subs. *xyli* (Lxx) em cana com nove meses, já que os níveis de populações da bactéria atingiram seu pico em nove meses e se estabilizou após esse período. No entanto, Urashima e Grachet (2012) e Andreato *et al.* (2022) mostraram que cana-planta de nove meses apresentaram escape na detecção de Lxx pelo método sorológico “dot blot”, indicando que essa idade não é adequada para uma detecção segura. Esses dados foram obtidos na diagnose de RSD, e acredita-se que possam ser utilizados também para LSD já que são duas doenças que apresentam aspectos epidemiológicos semelhantes.

Devido a controvérsia acima, ainda não existe seguridade no que tange detecção de LSD pelo método sorológico “dot blot” e os escapes de detecção em função do estágio fenológico. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi examinar a influência idade dos colmos nos exames diagnósticos por “dot blot” e assim determinar a idade que permite diagnose segura da escaldadura-das-folhas pelo método sorológico “dot blot”.

3 Materiais e Métodos

3.1 Material vegetal

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular (LAGEM), dependente da Universidade Federal de São Carlos campus Araras. A variedade de cana utilizada foi a RB966928 devido ao fato de ser a mais cultivada no Brasil (RIDESA, 2022).

3.2 Diagnóstico pré-plantio

As canas mães doentes das quais foram obtidas as gemas passaram pelo teste sorológico "dot blot" para garantir que todas as mudas estão sob efeito do LSD, foram selecionadas aquelas gemas com o menor título de bactéria detectada pelo “dot blot”, N4 (10^6 cfu.mL⁻¹). Para isso foi feita a extração de 100µL de seiva de cada internódio (figura 1A) de cada colmo com a finalidade de conhecer a concentração ao longo do colmo. Após a leitura dos resultados de “dot blot”, as gemas a serem

plantadas foram escolhidas quando o entrenó superior e inferior foi N4 (10^6 cfu.mL⁻¹) como se pode observar na figura 1C.

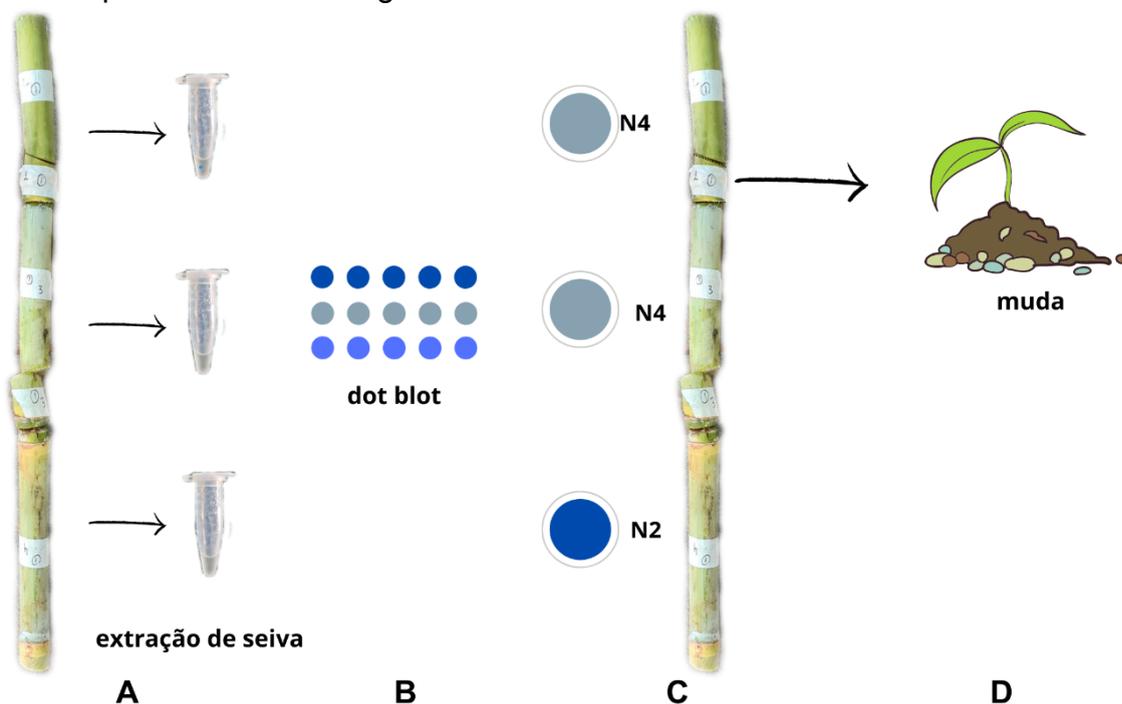


Figura 1. Processo da análise sorológica para detecção de *Xanthomonas albilineans* em seivas extraídas de colmos de cana-de-açúcar para a obtenção de gemas infectadas com um título de bactérias N4 (10^6 cfu.mL⁻¹). (A) extração de seiva de cada internódio (B) exame sorológico "dot blot". (C) seleção de gemas com N4, (D) mudas com infecção inicial N4.

3.3 Obtenção de mudas

Após a confirmação da presença de LSD, as gemas com título de bactéria N4 (10^6 cfu.mL⁻¹) foram plantadas em média 12 gemas em cada bandeja de 39x28x10cm contendo substrato, a 2-3 cm de profundidade, e mantidas em casa de vegetação por um período de dois meses, logo cada planta foi transferida em vasos de 30L onde ficaram até as datas de amostragem. Os plantios foram realizados nos meses de junho e julho do ano 2022.

3.4 Exame diagnóstico por "dot blot"

Os exames para detecção da doença foram conforme descritos por Carneiro Jr. *et al.* (2004) com algumas modificações. A extração de seiva neste trabalho se iniciou com canas de oito meses, tempo contado a partir do plantio das gemas. As amostras foram coletadas em um microtubo de 1,5mL, se coletou 100 a 500 µl de seiva com preservante Cloreto de Aquil Dimetil Benzil Amônio (produto comercial Ourofino Saúde Animal) diluído 1:10.

Foram extraídos seiva da parte basal de cada colmo por meio de pressão positiva, com auxílio de compressor. Logo, as amostras foram aplicadas em uma membrana de nitrocelulose (tamanho de poro de $0,45\mu\text{m}$; GE Healthcare, Alemanha) empregando um aparelho com 104 poços de 7mm de diâmetro. A membrana foi seca a 80°C por 1 hora e os sítios não ligados foram bloqueados por leite em pó desnatado em 5% PBST, lavando-se logo após por três vezes com solução PBST, durante 10 min cada. A membrana foi incubada em solução de anti-soro Xa de coelho por 1:15 hora e novamente lavada por três vezes durante 10 min. Em seguida, a membrana foi incubada por 2 horas na presença de conjugado com fosfatase alcalina. Foram repetidas as três lavagens sucessivas. O processo sorológico foi finalizado no escuro, mantendo-se a membrana em solução reveladora. A presença de Xa foi visualizada por um gradiente de pontos de cor azul na membrana, a estimativa da concentração do patógeno foi realizada por comparação visual com o controle positivo da concentração conhecida do patógeno: o azul mais escuro correspondendo a 10^9 cfu.mL^{-1} , diminuindo para 10^8 cfu.mL^{-1} , 10^7 cfu.mL^{-1} e o azul mais fraco para 10^6 cfu.mL^{-1} . O controle negativo foi formado por seiva de cana-de-açúcar de colmo sadio, determinado por PCR (Figura 2) com o primers 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).

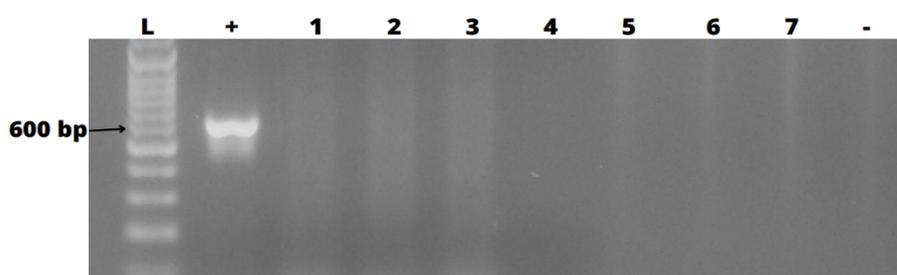


Figura 2. Resultado do PCR de colmos utilizados para extração de seiva (controle negativo “dot blot”). L (Ladder), “+” controle positivo, poços 1-7 (amostras), “-” controle negativo.

4 Delineamento estatístico

O delineamento utilizado foi em blocos inteiramente casualizado com dois tratamentos (datas de amostragem: oito e nove meses) com dez repetições. A unidade experimental foi de uma planta por vaso, este estudo foi conduzido em duplicata, totalizando assim 40 plantas. Para a análise dos dados, foi utilizado o

teste qui-quadrado com um nível de significância de 5%, realizado no software R Studio.

5 Resultados

5.1 Exame diagnóstico aos oito meses

Aos oito meses de idade começaram a extração de seiva para análises sorológica “dot blot”. No momento da amostragem as plantas não apresentavam nenhum sintoma característico de LSD, os colmos se apresentavam finos com oito a dez internódios (Figura 3B). O fato de os colmos se apresentarem finos dificultou a extração de seiva devido ao tamanho do insuflador de silicone (Figura 3D) do compressor ser muito maior, porém só foi possível coletar 100 a 200µl de amostra da parte basal de cada colmo sendo este suficiente para análises de “dot blot” (Figura 3C).

Os resultados da membrana (Figura 4) mostram a presença de Xa no “poço” situado na linha “C” coluna “13”, a amostra analisada indica um título de 10^6 ufc.mL⁻¹(N4). Esses resultados indicam que o patógeno foi detectado em 5% das amostras analisadas (1/20) demonstrando assim que cana-planta de oito meses não é adequado para uma diagnose segura apresentando um escape de 95% na detecção de Xa, já que todas as canas teriam que apresentar resultado positivo para a bactéria.

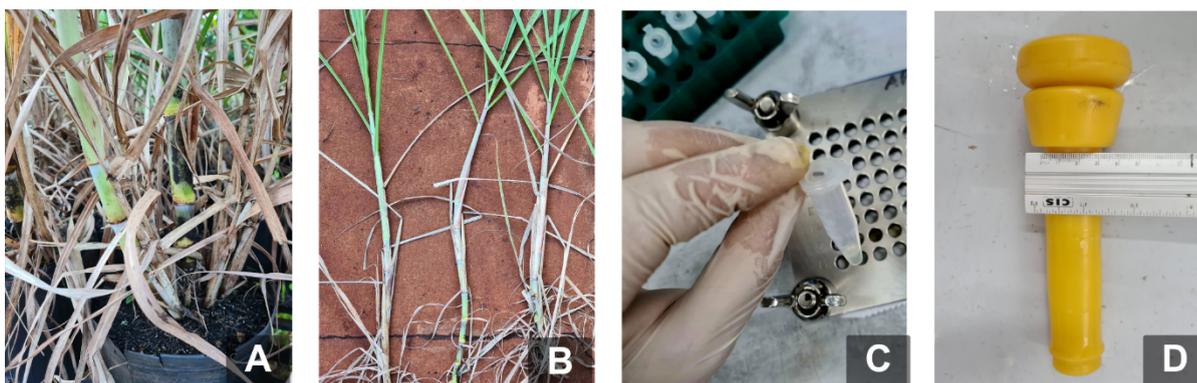


Figura 3. Canas com oito meses de idade da variedade RB966928 com infecção inicial de *Xanthomonas albilineans* de 10^6 ufc.mL⁻¹, analisados pelo exame sorológico “dot blot”. (A-B) colmos de cana-de-açúcar com oito meses, (C) seiva extraída para análises sorológicas “dot blot” para a detecção de *Xanthomonas albilineans* (D) Insuflado de silicone “teteira” de 3cm de diâmetro adaptado ao compressor para extração de seiva.

A Figura a seguir (4) representa a membrana resultante da análise sorológica “dot blot”, onde os cinco primeiros “poços” devidamente identificados (1 a 5) são os controles que variam de acordo com a tonalidade do azul. O primeiro “poço-A1” de tonalidade mais intensa representa o N1 de maior título de *Xa* (10^9 ufc.mL⁻¹), o segundo “poço” representa N2 (10^8 ufc.mL⁻¹), o terceiro “poço” N3 (10^7 ufc.mL⁻¹), o quarto “poço” representa o menor título de *Xa* “N4” (10^6 ufc.mL⁻¹) e o quinto “poço” onde a tonalidade é ausente representa o controle negativo.

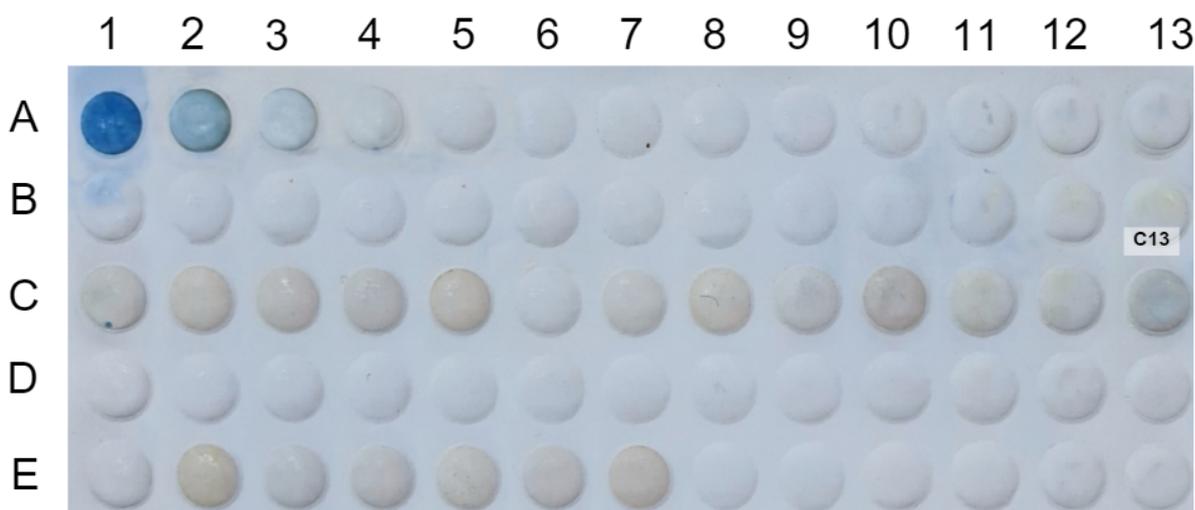


Figura 4. Foto de uma membrana resultante da análise sorológica para detecção de *Xanthomonas albilineans* em seivas extraídas de colmos de cana-de-açúcar com oito meses, em que os cinco primeiros “poços” da membrana A1-A5 são os controles (poços de 1 a 4 controle positivo e poço 5 controle negativo) e as amostras analisadas (C1-C13), (E1-E7).

5.2 Exame diagnóstico aos nove meses

As canas-planta de nove meses no momento da amostragem se apresentavam aparentemente saudáveis sem nenhum sintoma característico visível de LSD, os colmos tinham em média 10 a 12 internódios (Figura 5B), a extração de seiva foi fácil podendo-se coletar com facilidade 0,4mL a 0,5mL (Figura 5C) com a qual foram feitas quatro vezes a análise de “dot blot”.

A membrana da figura (6) mostra a presença de Xa em diferentes títulos a qual variou de N2 (10^8 ufc.mL⁻¹) a N4 (10^6 ufc.mL⁻¹). Os “poços” C9, C12, D1 foram analisados como N4 (10^6 ufc.mL⁻¹), os “poços” C1, C3, C8, C11, D3, D4, D5, D6 foram analisados como N3 (10^7 ufc.mL⁻¹) e os “poços” C4, C5, C6, D2, D7 foram analisados como N2 (10^8 ufc.mL⁻¹).

Estes resultados mostram que a concentração da bactéria é totalmente independente do sintoma de LSD (agudo, crônico e latente) que se apresenta na planta. As análises sorológicas de “dot blot” em seivas extraídas de colmos de cana-de-açúcar com nove meses (figura 6) mostraram que Xa foi detectada em 80% das amostras (16/20), a detecção foi maior comparada com as análises feitas aos oito meses. No entanto, as análises aos nove meses ainda apresentam falsos negativos em 20% das amostras, indicando que plantas dessa idade não são adequadas para um diagnóstico seguro de LSD.

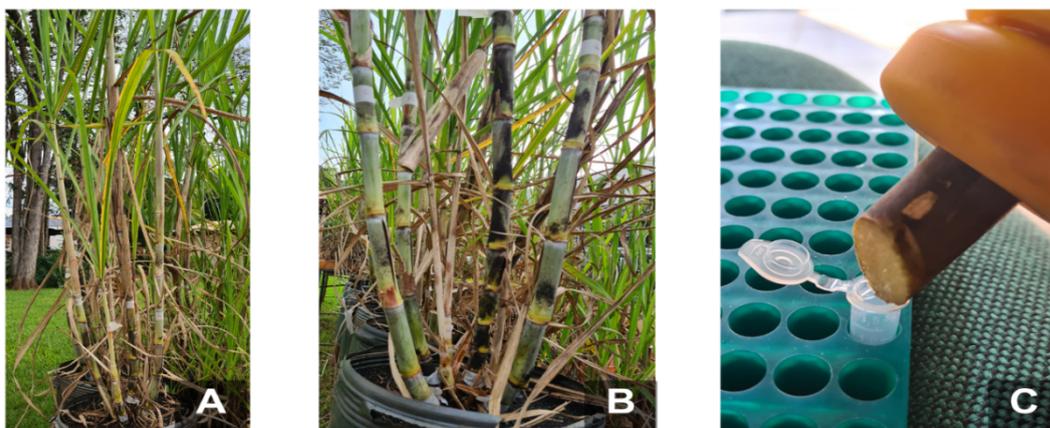


Figura 5. Canas com nove meses de idade da variedade RB966928 com infecção inicial de *Xanthomonas albilineans* (Xa) de 10^6 ufc.mL⁻¹, analisadas pelo método sorológico “dot blot”. (A-B) colmos de cana-de-açúcar com nove meses, (C) seiva extraída para análises sorológicas “dot blot” para a detecção de Xa.

A seguinte figura (6) representa a membrana obtida da análise de “dot blot” de seiva obtida de cana-planta de nove meses, onde os poços A1 - A4 são os controles positivos e o poço A5 representa o controle negativo.

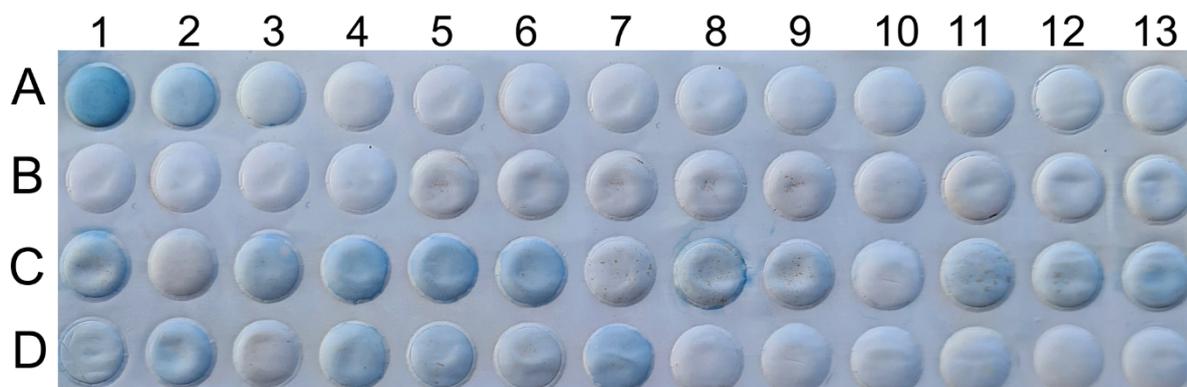


Figura 6. Foto da membrana resultante da análise sorológica para detecção de *Xanthomonas albilineans* em seivas extraídas de colmos de cana-de-açúcar com nove meses, em que os cinco primeiros “poços” da membrana A1-A5 são os controles, os poços 1 a 4 são os controles positivos e poço 5 é o controle negativo respectivamente e as amostras analisadas (C1-C13), (D1-D7).

Tabela 1. Resultados da análise sorológica “dot blot” em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB966928 com infecção inicial de *Xanthomonas albilineans* de 10^6 ufc.mL⁻¹, analisados aos oito e nove meses de idade.

Bloco	Detecção “dot blot” oito meses	População bacteriana (ufc.mL ⁻¹)	Detecção “dot blot” nove meses	População bacteriana (ufc.mL ⁻¹)
1	N0	-	N3	10 ⁷
2	N0	-	N0	-
3	N0	-	N3	10 ⁷
4	N0	-	N2	10 ⁸
5	N0	-	N2	10 ⁸
6	N0	-	N2	10 ⁸
7	N0	-	N0	-
8	N0	-	N3	10 ⁷
9	N0	-	N4	10 ⁶
10	N0	-	-	-
11	N0	-	N3	10 ⁷
12	N0	-	N4	10 ⁶
13	N4	10 ⁶	N3	10 ⁷
14	N0	-	N4	10 ⁶
15	N0	-	N2	10 ⁸
16	N0	-	N0	-
17	N0	-	N3	10 ⁷
18	N0	-	N3	10 ⁷
19	N0	-	N3	10 ⁷
20	N0	-	N2	10 ⁸
Detecção LSD oito meses				5%
Detecção LSD nove meses				80%
X-squared				20,051**
p-value				7,54e-06
gL				1

Com os dados obtidos da análise sorológica “dot blot ” aos oito e nove meses de idade. Segundo o teste de qui-quadrado as análises realizadas com seiva de canas de nove meses são estatisticamente significativa (p-valor: 7,54e-06) comparadas com as diagnoses realizadas aos oito meses pelo método sorológico “dot blot”. Porém, aos nove meses ainda se apresenta escape, demonstrando assim que essas idades não são adequadas para uma diagnose segura.

6 Discussão

Nesse trabalho foram obtidas as informações sobre a segurança de detecção de *Xa* por meio do exame sorológico “dot blot” aos oito e nove meses, que são as idades de colmos mais utilizadas para material propagativo (SILVA *et al.*, 2017). O presente trabalho é o único a examinar a eficiência do exame sorológico em diferentes estágios fenológicos, conhecendo a infecção inicial de *Xa* de 10^6 ufc.mL⁻¹, analisados aos oito e nove meses de idade.

Aos oito meses, foi detectada a presença de *Xa* em 5% das canas infectadas, enquanto aos nove meses, que é a idade recomendada para a extração de seiva (MCFARLANE, 2003), esse número aumentou para 80%. Os dados do presente trabalho demonstraram que cana-planta dessas idades não são adequadas para um diagnóstico seguro de escaldadura-das-folhas, demonstrando um escape na detecção de 95 % (oito meses) a 20% (nove meses).

Essa porcentagem de escape aos nove meses foi observada na seiva de gemas infectadas com o menor título bacteriano (N4: 10^6 ufc.mL⁻¹) detectável pelo “dot blot”. Assim, especula-se que se a gema estivesse infectada com título maior da bactéria (N1, N2 ou N3) possivelmente não haveria escape. A escolha da concentração 10^6 nas gemas infectadas se justifica por ser a menor concentração de bactéria detectável por exame sorológico “dot blot”. Essa abordagem raramente é feita, ou nunca, e é um ponto-chave para a melhoria das medidas de controle da doença baseado na exclusão da bactéria nos materiais propagativos.

Os resultados da diagnose neste trabalho corroboram com o achado inicial de Urashima e Grachet (2012) e Andreato *et al.* (2022) onde observaram que seiva extraída de cana-planta de nove meses de idade apresentou falsos negativos na detecção pelo método sorológico “dot blot”. Portanto, se poderia dizer que mudas de

cana de viveiros comerciais podem estar sendo usados com falsos negativos e portanto, disseminando a doença inadvertidamente.

Tomando como parâmetro as falhas obtidas na detecção de cana com nove meses, uma das consequências seria a disseminação de LSD na formação de novas áreas, através de colmos infectados (inóculo primário) que não foram detectados por análises sorológicas.

É importante ressaltar que a cana-de-açúcar é uma cultura semi-perene, com um ciclo de cinco a seis anos, com um custo elevado de implantação (CORTEVA, 2022). Por isso é importante a utilização de mudas sadias verificadas por algum exame laboratorial, já que uma vez introduzida a doença no campo, por meio de material propagativo contaminado seu controle é impossível, já que não existe controle químico (ROTT, 1994). Além disso, a propagação do patógeno para talhões sadios é transmitida por facões de corte, no qual a bactéria pode sobreviver por mais de 6 dias (TOKESHI, 1980). Este tipo de disseminação é a única forma de propagação no Brasil; a transmissão do patógeno é facilitada pela colheita mecanizada podendo disseminar o patógeno até 12,9m em linha reta a partir de um único talhão infetado (HOY; GRISHAM; DAMANN, 1999). Nesse sentido, no Brasil a colheita mecanizada hoje é realidade em todos os estados produtores, chegando em algumas regiões até 99,2% de mecanização (CONAB, 2023).

É assim, que, o número de colhedoras, saltou de 1.221, na safra 2007/08, para as atuais 4.225. Um exemplo disso é São Paulo, maior estado produtor, o índice de colheita mecanizada saiu de 62,7%, na safra 2010/11, para 99,2%, na safra 2022/23. A intensificação da colheita mecanizada é inevitável devido à evolução tecnológica, que possibilita um ganho ambiental e resulta, principalmente, em menor emissão de poluentes atmosféricos e na conservação do solo, além de proporcionar maior eficiência e redução dos custos de produção (CONAB, 2023).

No entanto, a mecanização da colheita também trouxe com ela algumas desvantagens como já se mencionou: disseminação de doenças sistêmicas como LSD. As colhedoras podem chegar a disseminar de 1,5 a 12,9 m por lâmina a partir de um ponto de infecção (HOY; GRISHAM; DAMANN, 1999), no caso poderia ser uma touceira advinda de um colmo contaminado não detectado por exame sorológico (Figura 7).

A desinfecção das lâminas das colhedoras de uma área para outra é uma opção para evitar a disseminação do patógeno (Rott, 1994), mas esta pode se tornar inviável quando se trabalha com grandes extensões de plantio. Por isso, é importante assegurar a sanidade dos materiais propagativos por meio de um diagnóstico seguro antes de serem levados ao campo, a fim de garantir a sanidade do canavial.

Nesse sentido, Andreato *et al.* (2022) explicaram esta situação desde a perspectiva epidemiologia da doença, onde a presença de alguma falha no controle (mudas sadias, termoterapia) deve ser considerada crítica, pois uma vez que o material de plantio é estabelecido em um campo, ele é mecanicamente colhido várias vezes e aumentado vegetativamente e, portanto, magnitudes muito diferentes de aumento da doença as quais resultaram de pequenas diferenças iniciais de incidência e detecção.

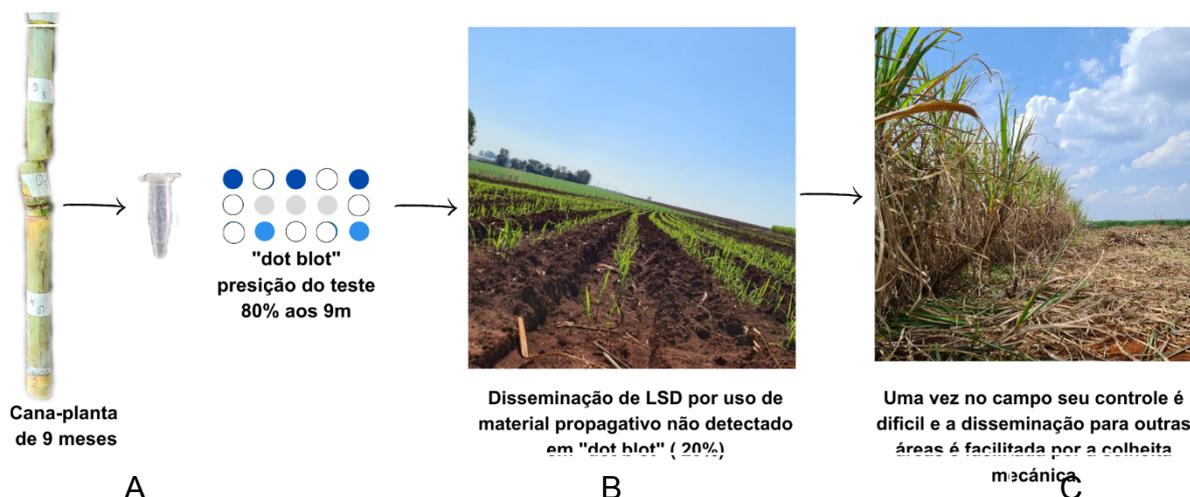


Figura 7. Exemplo do processo de disseminação de *Xanthomonas albilineans* a partir de colmos contaminados que não foram detectados (escape) no exame sorológico "dot blot". (A) Colmos contaminados pelo patógeno não detectado por "dot blot" (B) disseminação de LSD como consequência do escape. (C) disseminação facilitada por colheita mecanizada.

Neste estudo foi utilizada a variedade RB966928, a mais cultivada no estado de São Paulo na safra 2022/2023. Essa variedade representou 13,30% da área de plantio (105,94 mil hectares) (RIDESA, 2022), dessas, 97,36 mil hectares são provenientes de material propagativo obtido a partir de colmos, já que o plantio convencional corresponde a mais de 91,9% das áreas plantadas (BRAGA JR. *et al.*, 2020).

Um das vantagens do método sorológico “dot blot” é, permitir a identificação de canas sadias e a quantificação do título de Xa em colmos doentes (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 ufc.mL⁻¹). Isso possibilita ao produtor controlar a doença por meio do uso da termoterapia em canas com baixo título de bactéria (10^6 ufc.mL⁻¹). Nesse sentido, Andreato *et al.* (2020) mostraram que a termoterapia longa (50°C/2h) apresentou melhor desempenho do que a curta (52°C/30m), mas sua eficiência depende dos títulos de Lxx. Quando os títulos bacterianos eram baixos, como N4 (10^6 ufc.mL⁻¹), a termoterapia longa obteve sucesso. Em relação à Xa não há trabalhos sobre termoterapia, mas é possível utilizar os dados obtidos com Lxx como referência, devido a que estas doenças apresentam semelhança na epidemiologia, portanto, espera-se a mesma reposta. Daí a importância da análise sorológica, que fornece uma ampla informação sobre a situação geral do talhão e permite ao produtor tomar decisões com base nos resultados obtidos. Nesse caso, os autores sugeriram descartar as canas com altos títulos de bactéria, ou seja, aquelas propensas a falhar no tratamento térmico, e realizar o tratamento longo nas canas com baixos títulos de Lxx.

7 Conclusões

- Seivas advindas de cana-planta com oito e nove meses não foram adequadas para um diagnóstico seguro de LSD.
- O conhecimento da concentração inicial da bactéria nas gemas permitiu segurança nos resultados obtidos.

8 Literatura citada

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, 2022.

BRAGA JR.; R.L.C.; LANDELL, M.G.A.; XAVIER, M.A. MPB se consolida como importante ferramenta para produtores de cana. **RPAnews cana&industria**, 2020.

CARNEIRO JR.; J.B.; SILVEIRA, S.F. da; SOUZA FILHO, G.A. de; OLIVARES, F. L.; GIGLIOTI, E.A. Especificidade de anti-soro policlonal à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Fitopatologia brasileira**, v. 29, n. 6, p. 614–619, 2004.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTCIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar safra 2022/23. 3er levantamento**, Brasília, DF, v. 11, n. 1 abril 2023.

CORTEVA. **QUANTO CUSTA PLANTAR CANA?: Atualização do custo de Formação do Canavial**. 2022. Disponível em: https://www.corteva.com.br/content/dam/dpagco/corteva/la/br/pt/files/Relat%C3%B3rio-Custo-de-Plantio_Corteva-VF2.pdf. Acesso em: 7 jun. 2023.

DAVIS, M.J.; ROTT, P.; WARMUTH, C.J.; CHATENET, M.; BAUDIN, E.P. Intraspecific Genomic Variation Within *Xanthomonas albilineans*, the Sugarcane Leaf Scald Pathogen. **Phytopathology**, v.87, n.3, p.316–324, 1997.

HOY, J.W.; GRISHAM, M.P.; DAMANN, K.E. Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. **Plant disease**, v. 83, n. 12, p. 1170–1175, 1999.

LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P. **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2012. 16p. (Documento IAC, n. 109).

MCFARLANE, S. A. **Evaluation of sugarcane varieties for resistance to ratoon stunting disease**. Dissertação (Master of Science). School of Life and Environmental Sciences University of Natal Durban, 2003.

RIDESA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucreenergético. Censo Varietal por estados 2022. **RIDESA**. Disponível em: <https://www.ridesa.com.br/censo-varietal>. Acesso em: 29 jul. 2023. Acesso em: 05 maio 2023.

ROTT, O.; SANDHU, H. S.; COMSTOCK, J.C.; GILBERT, R.A. Sugarcane Leaf Scald. **Florida Sugarcane Handbook**, p. 1-4. 2017. Disponível em: <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/SC001>. Acesso em: 2 ago. 2023.

ROTT, P. Leaf scald of sugarcane. **CIRAD/ISSCT**, p. 47–54, 1995. Disponível em: https://agritrop.cirad.fr/389753/1/document_389753.pdf. Acesso em: 29 maio. 2023.

SILVA, S. D.; NAVA, D. E.; MONTERO, C. R.; STURZA, V. **Sistema de produção de cana-de-açúcar para agricultura familiar**. Embrapa, 2017. 47 -55p. (Documento, n. 443). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/168067/1/Sergio-dos-Anjos-Documento-443-web.pdf>. Acesso 01 julho 2023.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. *In*: GALLI, F. CARVALHO, P. C. TOKESHI, H.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.; SALGADO, C. L.; KRUGNER, T. L.; CARDOSO, E. J. B.; BERGAMIN, A (ed.). **Manual de Fitopatologia II: Doenças das plantas cultivadas 2da Edição**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1980. p. 141–206.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.) *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2016. v.2, p.220-221.

URASHIMA, A. S.; GRACHET, N. G. Métodos de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e efeito da termoterapia na brotação das gemas de diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Tropical plant pathology**, v. 37, n. 1, p. 57–64, 2012. DOI 10.1590/S1982-56762012000100007.

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, 1999.

CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE VARIEDADES A ESCALDADURA-DAS-FOLHAS ATRAVÉS DA COLONIZAÇÃO VASCULAR NA CANA-DE-AÇÚCAR

1 Resumo

A escaaldadura-das-folhas *Xanthomonas albilineans* (Xa) é uma doença sistêmica que afeta a cultura da cana-de-açúcar. Esta doença pode ocasionar quedas significativas de produtividade e, em casos extremos, destruição total da cultura em variedades susceptíveis. Uma das melhores formas de controle é a utilização de variedades resistentes obtidas a partir de uma seleção rigorosa. Nesse contexto, o presente trabalho adotou a avaliação da população bacteriana nos vasos com o objetivo de aprimorar esse método e avaliar a resistência de cultivares de cana-de-açúcar à Xa. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos (variedades RB867515, RB92579 e RB966928) e sete repetições. As plantas utilizadas neste estudo para extração de seiva foram de terceira soca com sete meses de idade. Foi quantificada a concentração de bactéria em cada internódio de cada colmo através o exame sorológico “dot blot”, a partir dos resultados obtidos foram calculadas a incidência e severidade. Foi realizada regressão linear e análises de variância das variáveis incidência e severidade, quando houve diferenças estatísticas as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os resultados demonstraram que: a) a densidade populacional de Xa permitiu obter maiores informações sobre a colonização do patógeno sendo esta a mais apropriada para o tipo disseminação do patógeno no Brasil, além de permitir a avaliação da resistência de genótipos b) duas variedades: RB966928 que se destaca principalmente na região Centro-Sul e a RB92579, com maior participação na região Norte-Nordeste são altamente susceptíveis à Xa.

Palavras chaves: severidade, *Saccharum* spp., população bacteriana, dot blot, *Xanthomonas albilineans*

2 Introdução

A doença da cana-de-açúcar, escaaldadura-das-folhas (leaf scald disease-LSD) causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans* (Xa), é uma das doenças mais importantes no setor canavieiro. Esta doença pode causar quedas severas de produtividade de 12 a 21% como foi relatado no Caribe (ROTT, 1995) e em variedades suscetíveis pode causar a destruição total da cultura (HOY; GRISHAM, 1994). Alguns surtos de LSD foram registrados: um em Louisiana onde clones promissores apresentaram 100% de perda por queima das folhas e apodrecimento dos colmos levando à morte (HOY; GRISHAM, 1994). Outro na África

do Sul, onde demonstraram pela primeira vez que variedades suscetíveis podem ser gravemente danificadas pela LSD (BECHET; BAILEY; NUSS, 1992).

Estes acontecimentos ajudaram a modificar a estratégia de melhoramento varietal, ficando claro que, a resistência à LSD é um pré-requisito para que as variedades fossem lançadas. A resistência varietal é uma ferramenta fundamental para o controle de importantes doenças de cana-de-açúcar, geralmente é realizado nos testes de *screening* varietal, onde os níveis de resistência são avaliados pela verificação de sintomas após a inoculação, sendo o corte das pontas dos colmos uma das metodologias empregadas (ROTT, 1995).

Alguns dos métodos mais utilizados para avaliar a resistência de LSD envolvem, a avaliação da área necrótica na folha após inoculação por decapitação (KOIKE, 1965; BAILEY; BECHET, 1982) e resistência associada com a colonização limitada nos vasos (ROTT *et al.*, 1997). O método de decapitação, que foi desenvolvido originalmente por Koike (1965) e modificado por Bailey e Bechet (1982), é empregado para avaliar as reações varietais pelo sintoma. No entanto, essa abordagem possui algumas limitações como: a avaliação das reações requer o exame e classificação dos sintomas em cada folha, o que demanda considerável habilidade diagnóstica e torna a operação lenta e subjetiva. Além disso, a base da avaliação nos sintomas de LSD pode ser ineficiente, especialmente quando os sintomas não se desenvolvem devido a infecção latente a qual é uma importante característica da doença, o que impossibilita a avaliação. Esses aspectos tornam difícil examinar uma grande quantidade de genótipos.

Posteriormente, Rott *et al.* (1994, 1997) chegaram na conclusão de que avaliar a resistência pela densidade populacional nos vasos condutores pode ser efetivo pois maiores densidades populacionais bacterianas foram encontradas nas cultivares suscetíveis e que a resistência ao LSD é caracterizada pela colonização limitada da planta hospedeira por Xa, conseqüentemente, as densidades populacionais bacterianas geralmente são menores em plantas resistentes do que em susceptíveis; assim esta característica pode ser utilizada em procedimentos de *screening* para resistência a LSD. No Brasil, são poucos os estudos sobre a resistência das variedades a Xa, assim, este trabalho adotou a avaliação pela

população de bactéria nos vasos e aprimorou para examinar a resistência das variedades de cana-de-açúcar.

3 Materiais e Métodos

3.1 Material vegetal

As variedades empregadas neste estudo foram RB966928, RB867515 e RB92579, a escolha das variedades baseou-se no censo varietal do ano 2021/2022 estas variedades se encontram entre as cinco variedades mais cultivadas no Brasil (RIDESA, 2022).

Os colmos utilizados neste trabalho foram obtidos de um campo experimental situado na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – Campus Araras. As plantas de cana-de-açúcar foram de terceira soca com sete meses de idade (plantados em Set/2018). Para este trabalho foi selecionado sete touceiras por variedade com inóculo inicial de 10^8 ufc.mL⁻¹ (N2) de *Xanthomonas albilineans* (Xa) (diagnoses Out/2022). De cada touceira foi retirado o colmo principal, após identificação de cada amostra os colmos foram levados para o laboratório de genética molecular (LAGEM) para extração de seiva e análise diagnóstica de LSD pelo método sorológico “dot blot”.

3.2 Extração de seiva

Foi retirada seiva ao longo do colmo para conhecer a colonização da bactéria ao longo de todo o colmo da cana. Para isso, os colmos foram limpos com pano úmido, evitando a contaminação por partículas de solo e outras impurezas. Em cada internódio do colmo foi feito um corte em bisel na parte inferior, a extração foi feita com um compressor de baixa pressão adaptado a um insuflador de silicone (teteira tipo ordenhador) para facilitar a extração. Foram coletados 100 a 500ul de seiva em um microtubo de 1,5mL, logo foi colocado preservante Cloreto de Aquil Dimetil Benzil Amônio (produto comercial Ourofino Saúde Animal) diluído 1:10.

3.3 Dot blot immunoassay

Foi realizado o teste sorológico “dot blot” para confirmar a presença de Xa nas seivas coletadas, além disso esse método permite determinar a concentração de

bactérias em cada internódio de cada colmo, com a finalidade de logo avaliar a incidência e severidade.

A seiva foi aplicada 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 foi observado um gradiente de tonalidade azul, conforme a concentração de bactéria presente na amostra.

3.4 Avaliação da taxa de colonização dos vasos por “dot blot”

Foi utilizado o método sorológico “dot blot” para quantificar a concentração de bactéria em cada internódio. A partir dos resultados, foi possível avaliar dois parâmetros.

- **Incidência:** foi avaliada a presença de Xa em cada um dos internódios de um colmo. O resultado foi expresso em porcentagem dos internódios onde a bactéria foi encontrada em relação ao total de internódios examinados em um colmo.

$$\text{Incidência} = \left(\frac{\text{número de internódios com Xa}}{\text{número de internódios examinados}} \right) \times 100$$

- **Severidade:** avaliou-se de duas maneiras.

- 1 População bacteriana de Xa nas seções basal, média e apical do colmo.

Neste parâmetro se avaliou a população de Xa em três seções distintas do colmo, para isso foi retirada seiva da parte basal (2^{do} internódio), média (terço médio do colmo) e apical (último internódio) do colmo. Logo, foi calculada a média da população bactéria de cada secção para cada variedade.

- 2 Porcentagem de concentração de Xa.

Inicialmente classificou-se a concentração bacteriana em quatro níveis detectados pelo exame “dot blot”: “N1”: 10⁹ ufc.mL⁻¹, “N2”: 10⁸ ufc.mL⁻¹, “N3”: 10⁷ ufc.mL⁻¹, “N4”: 10⁶ ufc.mL⁻¹. Essa classificação foi adotada em cada internódio. Assim, a população bacteriana foi conhecida em cada internódio do colmo onde a bactéria foi encontrada. Depois determinou-se a porcentagem de cada concentração em relação ao total dos internódios positivos para LSD, aqueles onde a bactéria foi

detectada. Variedades que possuírem maior porcentagem de internódios com maior concentração de Xa serão classificados como mais suscetíveis, seguindo o raciocínio de Rott *et al.* (1997).

4 Análise estatística do experimento

O delineamento estatístico do experimento foi inteiramente casualizado, com três tratamentos (variedades) e sete repetições. A unidade experimental foi de um colmo para cada tratamento. As variáveis do experimento incidência e severidade foram calculadas a partir dos resultados obtidos do exame sorológico “dot blot” (Apêndice). Foram realizadas análises de variância das variáveis incidência e severidade; quando houve diferenças estatísticas foi feita comparação de médias com o teste de Tukey ao 5%. Foi realizada regressão linear entre a incidência e a severidade. Para a severidade os dados foram transformados pela fórmula raiz quadrada $(1+x)$ para cumprir com os supostos de anova. As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico R versão 4.31.

5 Resultados

5.1 Incidência

A tabela a seguir (1) representa a análise estatística da variável incidência de *Xanthomonas albilineans* em três variedades de cana-de-açúcar.

Tabela 1. Resultado da análise de variância da incidência de *Xanthomonas albilineans* obtida em três variedades de cana-de-açúcar RB966928, RB92579 e RB867515, analisada em cana de terceira soca.

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Variedade	2	687,92	343,96	3,6055*	0,048209
Resíduo	18	1717,16	95,40		
Total	20	2405,08			

*significativo; coeficiente de variação (CV)= 11,49%; média geral = 85,00; GL: graus de liberdade; dados analisados a partir da presença de Xa pelo método sorológico “dot blot”.

Para fonte de variação variedade houve efeito significativo, as diferenças foram identificadas com teste de médias (Tabela 2), a variedade RB966928 apresentou uma alta incidência de Xa com uma média de 92,54% que não diferiu estatisticamente da variedade RB92579 (83,77%). A variedade RB867515

apresentou a menor média de incidência de Xa neste estudo, com 78,69%, este diferiu estatisticamente da RB966928, demonstrando assim que a RB966928 tem uma susceptibilidade mais alta à Xa que RB867515.

Tabela 2. Incidência de *Xanthomonas albilineans* em três variedades de cana-de-açúcar

Variedades	Incidência (%)
RB966928	92,54 a
RB92579	83,77 ab
RB867515	78,69 b

Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre variedades ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

5.2 Severidade

A tabela a seguir (3) representa os resultados da severidade de Xa avaliada em três partes do colmo: basal, média e ápice, em três variedades de cana-de-açúcar.

Tabela 3. Populações bacterianas de *Xanthomonas albilineans* em cana de terceira soca em três variedades de cana-de-açúcar.

Variedades	Colonização basal (ufc.mL ⁻¹)	Colonização na parte média (ufc.mL ⁻¹)	Colonização no ápice (ufc.mL ⁻¹)
RB966928	8,71x10 ⁸ a	6,14x10 ⁸ a	1,71x10 ⁶
RB92579	6,14x10 ⁸ ab	8,59x10 ⁷ ab	1,43x10 ⁶
RB867515	2,02x10 ⁸ b	3,19x10 ⁷ b	0
Fc	5,07*	9,25**	0,64ns
p-valor	0,0179	0,0017	0,5409

Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre variedades ao nível de 5% pelo teste de Tukey. * significativo ao 5%, ** significativo ao 1%, ns: não significativo, GL: 18. Resultados obtidos no exame sorológico "dot blot".

O p-valor da colonização basal (0,0179) e a colonização média do colmo (0,0017), demonstraram que houve a efeito significativo nessas variáveis. As diferenças foram identificadas com teste de médias (Tabela 3), onde as variedades RB966928 e RB92579, não diferiram estatisticamente entre elas, estes genótipos apresentaram uma média de 8,71x10⁸ e 6,14x10⁸ ufc.mL⁻¹ na parte basal, e uma população de 6,14x10⁸ e 8,59x10⁷ ufc.mL⁻¹ na secção média do colmo, estes resultados mostraram uma maior colonização de bactéria nessas variedades (Figura

1) indicando uma maior susceptibilidade à Xa. A variedade RB867515 teve uma menor população de bactéria na secção basal e média do colmo com respeito as outras duas variedades, com uma média de $2,02 \times 10^8$ e $3,19 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹ respectivamente, esta variedade diferiu estatisticamente da RB966928.

Na secção do ápice do colmo as populações médias de Xa foram muito baixas, o p-valor da tabela 3 mostra que as diferenças entre as variedades não foram significativas, ao nível de significância de 5%. As médias foram $1,71 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ e $1,43 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ para as variedades RB966928 e RB92579 respectivamente, no entanto a variedade RB867515 não apresentou colonização de Xa no ápice do colmo (Figura 1).

A tabela 4 mostra a percentagem de diferentes títulos de Xa (“N1: 10^9 ufc.mL⁻¹”, “N2: 10^8 ufc.mL⁻¹”, “N3: 10^7 ufc.mL⁻¹” e “N4: 10^6 ufc.mL⁻¹”) ao longo do colmo.

Tabela 4. Percentagem de diferentes concentrações de *Xanthomonas albilineans* em cana de terceira soca.

Variedades	Médias “N1” ^a	Médias “N2” ^b	Médias “N3” ^c	Médias “N4” ^d
RB966928	51,60 a	23,08	16,36	8,97 b
RB92579	20,31 b	54,27	14,19	11,23 b
RB867515	3,57 b	26,00	31,23	39,19 a
Fc	13,3*	3,44ns	1,79ns	3,76*
P-valor	0,0002	0,0542	0,1952	0,0429

(a) “N1”: 10^9 ufc.mL⁻¹ (b) “N2”: 10^8 ufc.mL⁻¹ (c) “N3”: 10^7 ufc.mL⁻¹, (d) “N4”: 10^6 ufc.mL⁻¹. * significativo, ns: não significativo. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre variedades ao nível de 5% pelo teste de Tukey. Resultados obtidos a partir do exame sorológico “dot blot”.

A percentagem das concentrações de Xa “N1” e “N4”, apresentaram diferenças estatísticas, a separação de médias foi realizada com o teste de comparação múltipla Tukey ao 5% de significância. A percentagem da concentração de Xa “N1” variaram de 51,60% a 3,57%. A concentração mais baixa detectada por “dot blot” “N4” se apresentou em maior percentagem na variedade RB867515 (39,19%) que diferiu estatisticamente das variedades RB966928 e RB92579 que tiveram uma média de 8,97% e 11,23%.

Para as variáveis porcentagem das concentrações de bactéria “N2” e “N3 não houve diferença estatística. As médias para a porcentagem de concentração de Xa “N2” variaram de 23,08% (RB966928) a 54,27% (RB92579), e para a porcentagem de concentração “N3” variaram de 14,19% (RB92579) a 31,23% (RB867515).

Um dado importante na tabela (4) é a porcentagem da concentração mais alta N1, na qual a variedade RB966928 apresentou a maior média com 51,60% de colonização de Xa nos colmos, este resultado diferiu estatisticamente das outras duas variedades, isso indica que a RB966928 apresenta uma alta susceptibilidade à Xa. Também se pode destacar que as mais altas concentrações (N1 e N2) foram apresentadas nas variedades RB966928 e RB92579 com 74,68% e 74,58% (soma das concentrações N1 e N2) indicando assim a facilidade de multiplicação do patógeno nos vasos desses genótipos.

6 Discussão

O *screening* de cana-de-açúcar para resistência que se baseia nas populações de patógenos é recomendável e promissor para avaliar a resistência à LSD (ROTT *et al.*, 1997). Existem duas metodologias usadas para avaliar a reação de genótipos: a inoculação por decapitação, que foca nos sintomas externos após a infecção, e a avaliação da densidade populacional da bactéria nos vasos, que considera a colonização interna da planta. É importante considerar que ambas abordagens têm suas vantagens e limitações e podem fornecer informações complementares sobre a epidemiologia de LSD.

Assim, a metodologia pela decapitação simula a reação de genótipos caso ocorra infecção de Xa. advinda de disseminação aérea, informação importante onde esse fenômeno ocorre, como no Caribe (DAUGROIS; DUMONT; CHAMPOISEAU, 2003). No Brasil, essa informação fica restrita para usos práticos, já que a disseminação aérea não acontece, a maior parte da infecção e disseminação ocorre por meio de corte de lâmina da colhedeira, assim o estudo da população bacteriana ajuda a entender melhor a disseminação por implementos de corte por ter o enfoque de estudo diferente a comparação a decapitação, já que este método tem em consideração a colonização nos vasos e posterior apresentação de sintoma se houver.

Portanto, a decapitação avalia a reação da planta (externo) e a densidade populacional nos vasos avalia a infecção desde a parte interna da planta, inclusive a latente, porém este tipo de estudo é muito mais coerente com o modo de disseminação da doença no Brasil, além de proporcionar informações para entender melhor a epidemiologia de LSD quanto a disseminação e colonização.

Seguindo a proposta inicial de Rott *et al.* (1997), esta dissertação estudou a densidade populacional da bactéria o que permitiu a obtenção de informações como a incidência e a severidade, permitindo entender melhor a relação entre a dinâmica da colonização e a incidência do patógeno.

Neste sentido, as informações obtidas da severidade permitiram obter uma maior informação sobre a multiplicação ou grau da colonização nos vasos, a qual é interessante desde o aspecto da disseminação de Xa para talhões sadios, devido a que, as maiores populações de bactéria foram encontradas nas variedades susceptíveis e em maior porcentagem na secção basal do colmo (Tabela 3) o que propicia maior disseminação do patógeno por meio de lâminas de colhedeira, isto foi comprovado por Hoy, Grisham e Damann (1999), onde acharam que as variedades susceptíveis podem disseminar de 1,5m até 12,9m a partir de um único talhão doente, isto é importante já que a colheita mecânica no Brasil é de 92% (CONAB, 2023).

Os dados deste trabalho mostraram que quanto maior a colonização da bactéria, maior é a incidência do patógeno (Figura 2), em genótipos altamente susceptíveis o patógeno chega a colonizar até o ápice além de apresentar altas populações de bactéria na secção basal e média do colmo. Neste sentido, se apresentou uma alta correlação entre a incidência de Xa e alta população da bactéria (Figura 2), ou seja, quando maior a população bacteriana encontrada num genótipo maior será a incidência de Xa, os dados mostraram que 99% (R^2 : 0,99) da variabilidade de alta população bacteriana é explicada pela variabilidade de incidência. Também se observou uma leve correlação negativa (R^2 : 0,67- p-valor ns) entre a incidência e a baixa população de bactéria, ou seja, quando se apresentam baixa população de bactéria menor vai ser a incidência de Xa num genótipo.

Outro aspecto interessante que ainda deve ser investigado é, se existe relação entre o sintoma latente e baixas populações de bactéria, e ao inverso altas populações de bactéria com a presença de sintoma e a presença de maiores danos e se a correlação negativa entre a incidência e baixas concentrações de bactéria é verdadeira, estas questões podem ser respondidas adotando esta metodologia, a respeito Rott *et al.* (1994; 1997) falaram que altas populações de Xa são necessárias, mas não suficiente para o desenvolvimento dos sintomas de LSD.

Os dados deste trabalho mostraram que todas as variedades avaliadas neste estudo tiveram alta incidência de Xa, isso indica que nenhum dos genótipos avaliados apresentou resistência a Xa. Entre os genótipos avaliados se destacou a incidência apresentada na variedade RB966928 com uma média de 92,54%, indicando que é altamente susceptível a Xa, esta variedade foi a mais cultivada nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul com 15,02% da área cultivada na safra 2021/2022, ou seja 582.557 hectares foram ocupadas por esta variedade (RIDESA, 2022), a qual mostra a importância na região, no entanto, os dados deste trabalho indicaram que esta variedade é a mais vulnerável ao desenvolvimento de LSD e poderia sofrer perdas severas de rendimento ou destruição total do cultivo (BECHET; BAILEY; NUSS, 1992; HOY; GRISHAM, 1994).

A variedade RB92579 (tabela 2) também demonstrou ser altamente suscetível à Xa, a respeito Harrison e Davis (1988) demonstraram que variedades susceptíveis apresentaram maior número de feixes vasculares e a maior população de Lxx. Por outro lado, a variedade RB867515 apresentou uma incidência de 78,69%, esse valor é menor em comparação com as outras duas variedades, porém ainda apresentou uma alta incidência indicando que esta variedade tem uma suscetibilidade baixa à Xa.

Com respeito aos resultados da severidade, alta população de bactéria foi verificada nas variedades RB966928 e RB92579 na secção basal e média dos colmos, estas variedades também apresentaram colonização na parte apical e uma alta incidência de Xa, indicando que altas concentrações de bactéria apresenta uma correlação direta com a incidência de Xa (Figura 2) colocando a estes genótipos como susceptíveis, pois as maiores populações bacterianas geralmente foram encontradas em cultivares susceptíveis (ROTT *et al.*, 1997).

Por outro lado, a variedade RB867515 se destacou por não apresentar colonização no ápice, além de que apresentou uma menor população de bactéria tanto na parte basal quanto na parte média do colmo, considerando que, o talhão de onde se obteve as amostras foi de terceira soca, mostra que este genótipo possui uma baixa susceptibilidade a Xa, a respeito Rott *et al.* (1997) mencionaram que a colonização limitada do ápice pode ser considerada uma característica de resistência à LSD.

Portanto, com base nos resultados apresentados, é possível concluir que: as duas variedades: RB966928 que se destaca principalmente na região Centro-Sul e a RB92579, com maior participação na região Norte-Nordeste (RIDESA, 2022) mostraram ser altamente suscetíveis, com alta severidade da colonização bacteriana e incidência elevada de Xa. E por outro lado, a variedade RB867515 também se apresentou suscetível, mas em comparação com as outras duas variedades demonstrou ser menos suscetível à Xa, apresentando menor colonização bacteriana, ausência de colonização no ápice e menor incidência de Xa.

Essas informações são importantes, pois, por um lado, os resultados apresentados mostraram que é possível avaliar a resistência dos materiais através da densidade populacional de Xa. Por outro lado, ao quantificar a população bacteriana, foi possível identificar quais variedades de cana-de-açúcar são mais eficientes em restringir o crescimento da bactéria, auxiliando, assim, no desenvolvimento de estratégias de resistência mais eficazes. Além disso, o conhecimento da densidade populacional nos colmos permite obter um melhor desempenho da termoterapia, isso foi demonstrado por Andreato *et al.* (2022) em seu trabalho com raquitismo-das-soqueiras, onde demonstraram que quanto maior a densidade populacional, menos eficiente será a termoterapia, tanto longa como curta. Esses autores afirmaram que a termoterapia longa (50°/2h) é mais eficiente do que a termoterapia curta (52°/30m), mas o seu desempenho depende de baixas populações de bactérias (N4: 10^6 ufc.mL⁻¹).

A metodologia utilizada neste estudo, que se baseou nas populações bacterianas nunca havia sido empregada anteriormente para avaliar variedades brasileiras de cana-de-açúcar. Os resultados deste estudo revelaram que três das principais variedades empregadas atualmente RB867515, RB966928 e RB92579

mostraram-se susceptíveis e altamente susceptíveis ao patógeno Xa, respectivamente. Esses achados indicam que essa metodologia é adequada para avaliar a resistência à LSD, considerando a forma de infecção e disseminação que ocorre no Brasil, tornando-se uma abordagem promissora e recomendável para estudos futuros.

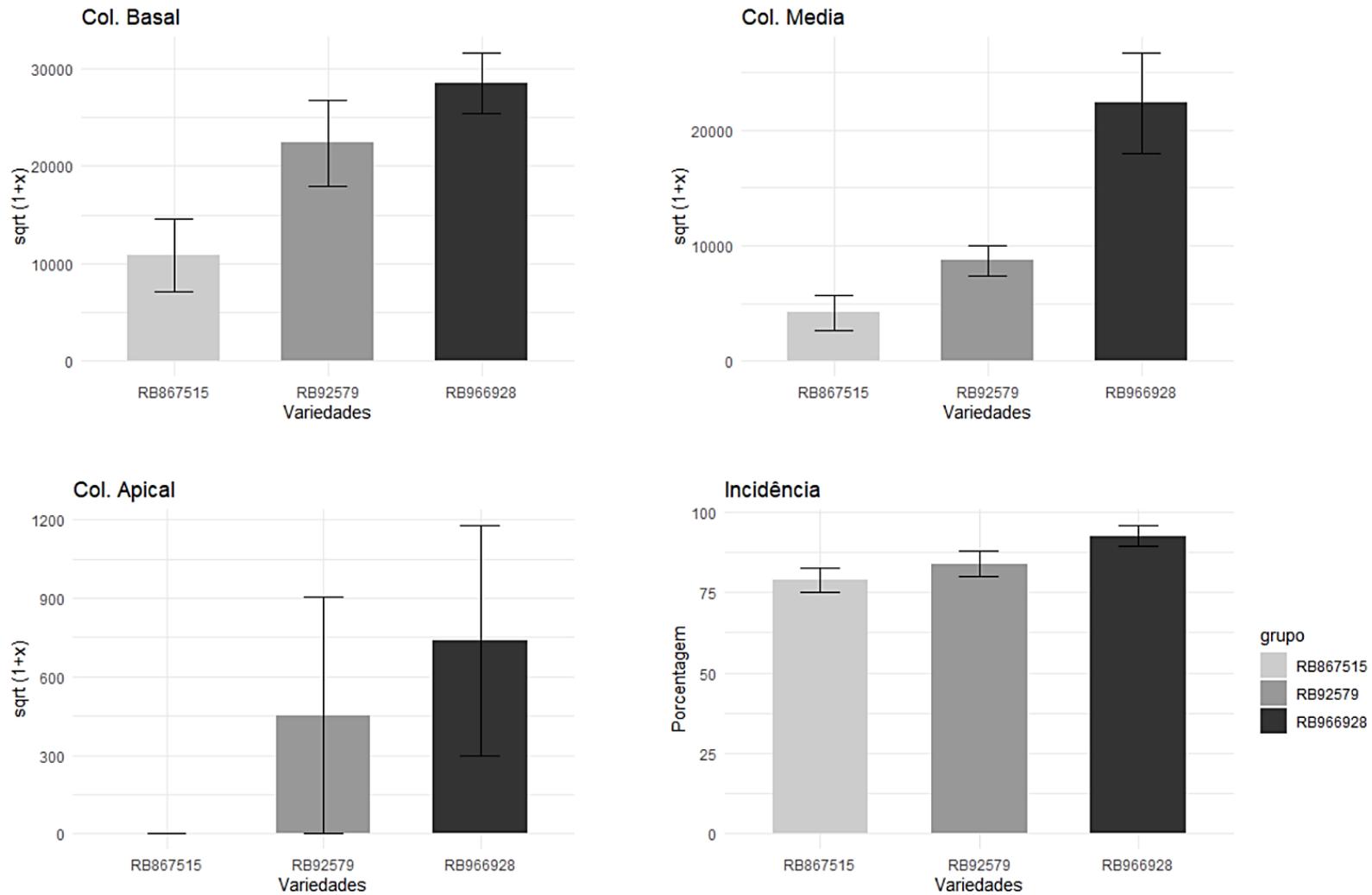


Figura 1. Incidência e colonização de *Xanthomonas albilineans* em três secções de cana de terceira soca. Os valores são as médias (\pm erro padrão) de cada variável. Para as figuras de colonização, os dados foram transformados com a fórmula raiz quadrada ($1+x$).

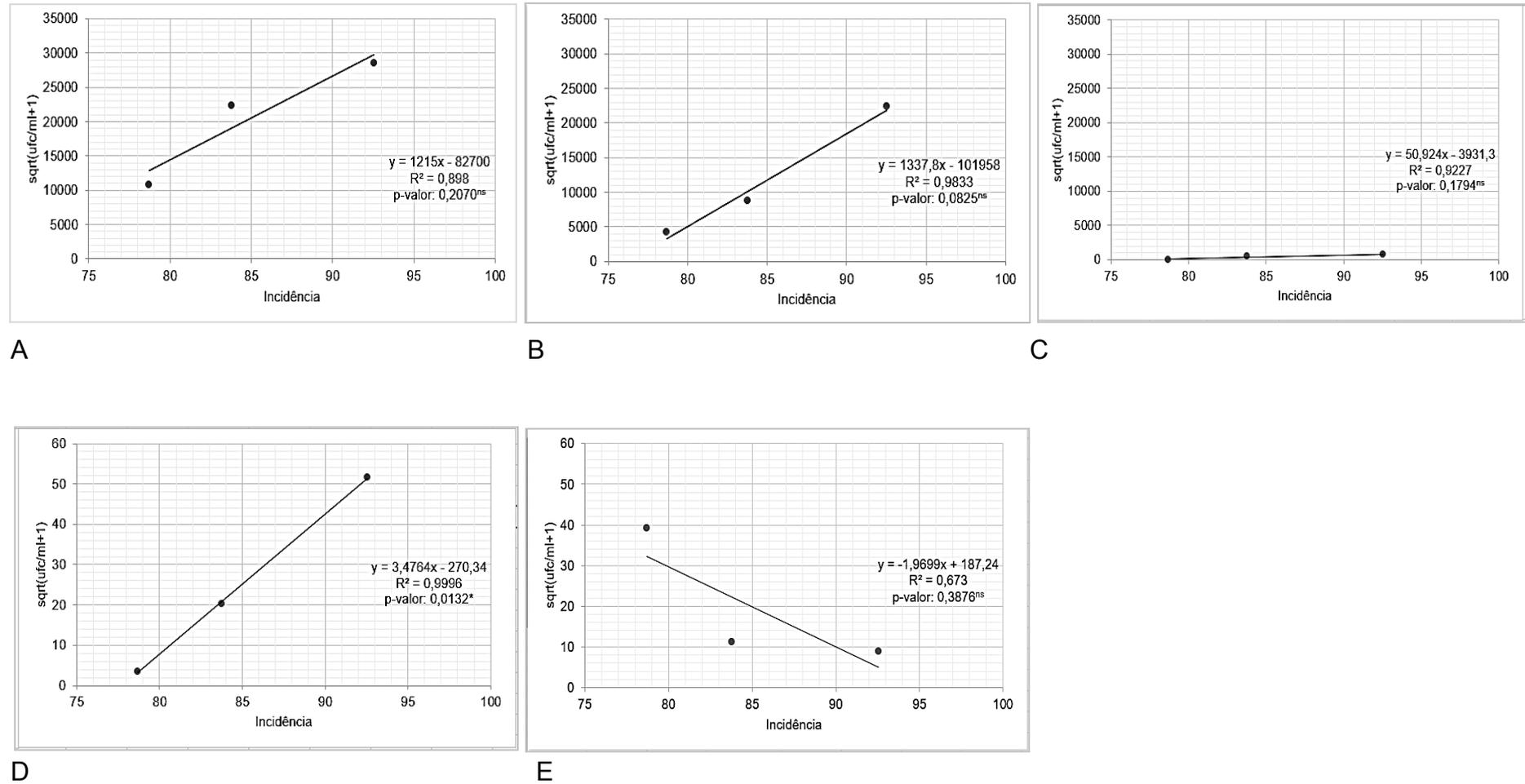


Figura 2. Regressão linear entre a incidência média da doença e as densidades populacionais médias (raiz quadrada (1+x)) de *Xanthomonas albilineans*. (A) secção basal, (B) secção média, (C) secção apical, (D) concentração bactéria "N1: 10^9 ufc.mL⁻¹" (E) concentração de bactéria "N4: 10^6 ufc.mL⁻¹"

7 Conclusões

- A densidade populacional de bactérias nos vasos condutores permitiu identificar diferenças na reação das variedades à Xa., sendo esta metodologia a mais adequada para o tipo de disseminação que ocorre no Brasil.
- Segundo os parâmetros da incidência e a severidade, as variedades RB966928 e RB92579 são altamente susceptíveis a *Xanthomonas albilineans*.

8 Literatura citada

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, 2022.

BAILEY, R.A.; BECHET, G.R. Progress in *screening* for resistance to sugarcane diseases in South Africa. **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association**, v.56, p.143- 149, 1982.

BECHET, G.R.; BAILEY, R.A.; NUSS, K.J. Screening of new sugarcane clones for resistance to leaf scald (*Xanthomonas albilineans*). **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association**, v.66, p. 82-86, 1992.

BRAGA JR.; R.L.C.; LANDELL, M.G.A.; XAVIER, M.A. MPB se consolida como importante ferramenta para produtores de cana. **RPAnews cana&industria**, 2020.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTCIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar safra 2023/24 1º levantamento**, Brasília, DF, v. 11, n. 1 abril 2023.

DAUGROIS, J. H.; DUMONT, V.; CHAMPOISEAU, P.; COSTET, L.; BOISNE-NOC, R.; ROTT, P. **European journal of plant pathology**, v. 109, n. 5, p. 445–458, 2003.

HARRISON, N. A. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp.*xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, v. 78, n. 6, p. 722, 1988.

HOY, J. W.; GRISHAM, M. P.; DAMANN, K. E. Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. **Plant disease**, v. 83, n. 12, p. 1170–1175, 1999.

HOY, J.W.; GRISHAM, M.P. Sugarcane leaf scald distribution, symptomatology, and effect on yield in Louisiana. **Plant Disease**, v.78, n.11, p.1083-1087, 1994.

KOIKE, H. The aluminum-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. **Phytopathology**, v.55, n. 3, p. 317-319, 1965.

RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético). Censo Varietal por estados 2022. **RIDESA**. Disponível em: <https://www.ridesa.com.br/censo-varietal>. Acesso em: 29 jul. 2023. Acesso: 05 maio 2023.

ROTT, P. Leaf scald of sugarcane. **CIRAD/ISSCT**, p. 47–54, 1995. Disponível em: https://agritrop.cirad.fr/389753/1/document_389753.pdf. Acessado em: 29 jul. 2023.

ROTT, P.; ABEL, M.; SOUPA, D.; FELDMANN, P.; LETOURMY, P. Population dynamics of *Xanthomonas albilineans* in sugarcane plants as determined with an antibiotic-resistant mutant. **Plant disease**, v. 78, n. 3, p. 241-247, 1994.

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, 1997.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CAPITULO I: Influência da idade da cana-de-açúcar na detecção sorológica de *Xanthomonas albilineans*.

Para garantir um diagnóstico confiável é essencial o conhecimento da influência do estágio de desenvolvimento da cana-de-açúcar e assim, assegurar a obtenção de colmos livres de patógeno para a formação de novos canaviais. Os dados do presente trabalho demonstraram que cana-planta de nove meses não são adequadas para um diagnóstico seguro de LSD, já que apresentou uma taxa de escape de 20% na detecção. Isso indica que a utilização de cana com nove meses pode levar à disseminação de LSD em novas áreas através de colmos infectados, que atuam como o inóculo primário da doença, sendo esta a principal forma de disseminação de LSD. Portanto, é fundamental levar em consideração essa informação para evitar a propagação da doença. Nesse sentido, os dados que serão obtidos aos dez meses de idade serão fundamentais para conhecer se essa idade é a adequada para a extração de seiva. Assim, o conhecimento da influência do estágio de desenvolvimento da cana-de-açúcar para a extração de seiva é um componente crucial para o sucesso no manejo e prevenção da disseminação da LSD no setor canavieiro.

CAPITULO II: Avaliação da resistência de variedades a escaldadura-das-folhas através da colonização vascular na cana-de-açúcar.

A metodologia utilizada neste estudo, que se baseou nas populações bacterianas nos vasos condutores, nunca havia sido empregada anteriormente para avaliar variedades brasileiras de cana-de-açúcar. Os resultados deste estudo revelaram que essa metodologia é adequada para avaliar a resistência à LSD, sendo mais coerente com o tipo de infecção e disseminação que ocorre no Brasil, tornando-se interessante para entender melhor a epidemiologia de LSD. Os dados deste trabalho mostraram que as maiores densidades populacionais foram encontradas em variedades susceptíveis, este parâmetro teve correlação com a incidência de Xa, assim, os genótipos altamente susceptíveis também apresentaram alta incidência de Xa, além de apresentar colonização na secção do ápice do colmo, demonstrando assim que o patógeno teve a facilidade de multiplicar-se ao longo do colmo. Assim, os dados da colonização permitiram identificar quais variedades de

cana-de-açúcar são mais eficientes em restringir o crescimento da bactéria, auxiliando no desenvolvimento de estratégias de resistência mais eficazes, sendo uma abordagem promissora e recomendável para estudos futuros. Pois, estas informações permitiram avaliar melhor a resistências das variedades desde a perspectiva da multiplicação do patógeno nos vasos.

APÊNDICE

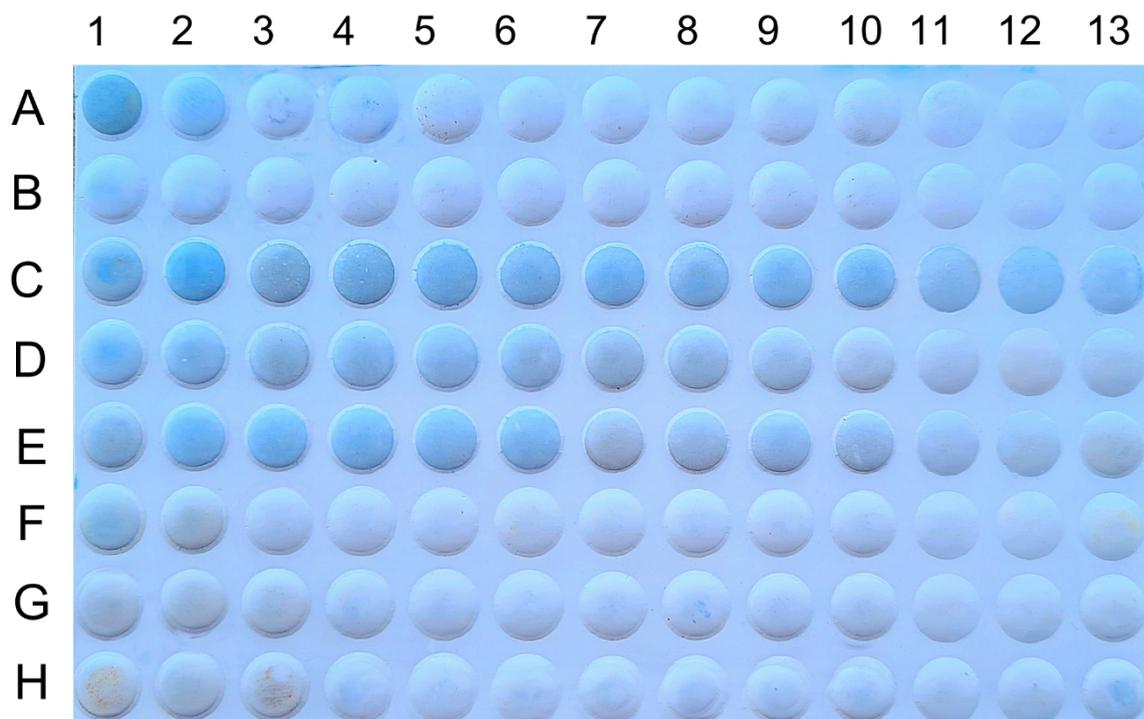


Figura 1. Foto da membrana resultante da análise sorológica “dot blot” para quantificar a concentração de *Xanthomonas albilineans* em cada internódio. A partir dos resultados, foi possível avaliar os parâmetros de incidência e severidade, em cana de terceira soca com sete meses de idade. Os cinco primeiros “poços” da membrana A1-A5 são os controles, os poços 1 a 4 são os controles positivos e poço 5 é o controle negativo. As amostras analisadas (C1-C13), (F1-F3) correspondem a variedade RB966928, os poços (D1-D13) e (G1-G3) correspondem a variedade RB92579 e os poços (E1-E13) e (H1-H3) correspondem a variedade RB867515.

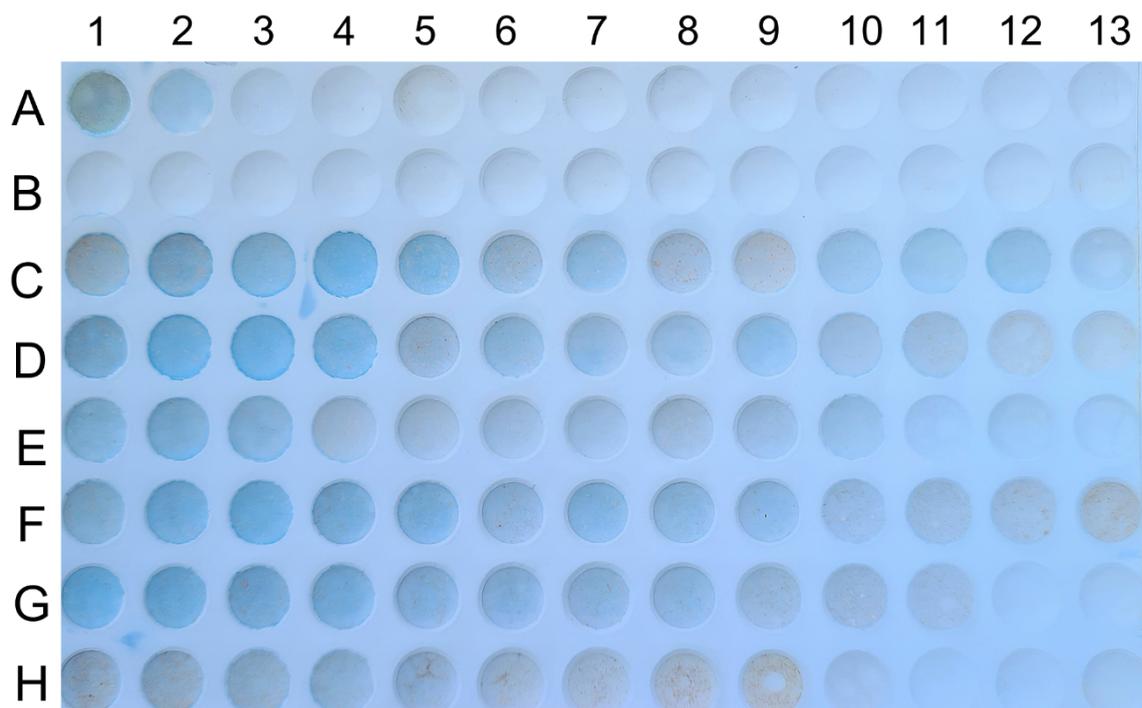


Figura 2. Foto da membrana resultante da análise sorológica “dot blot” para quantificar a concentração de *Xanthomonas albilineans* em cada internódio. A partir dos resultados, foi possível avaliar os parâmetros de incidência e severidade, em cana de terceira soca com sete meses de idade. Os cinco primeiros “poços” da membrana A1-A5 são os controles, os poços 1 a 4 são os controles positivos e poço 5 é o controle negativo. As amostras analisadas (C1-C13), (F1-F13) correspondem a variedade RB966928, os poços (D1-D13) e (G1-G13) correspondem a variedade RB92579 e os poços (E1-E13) e (H1-H13) correspondem a variedade RB867515.

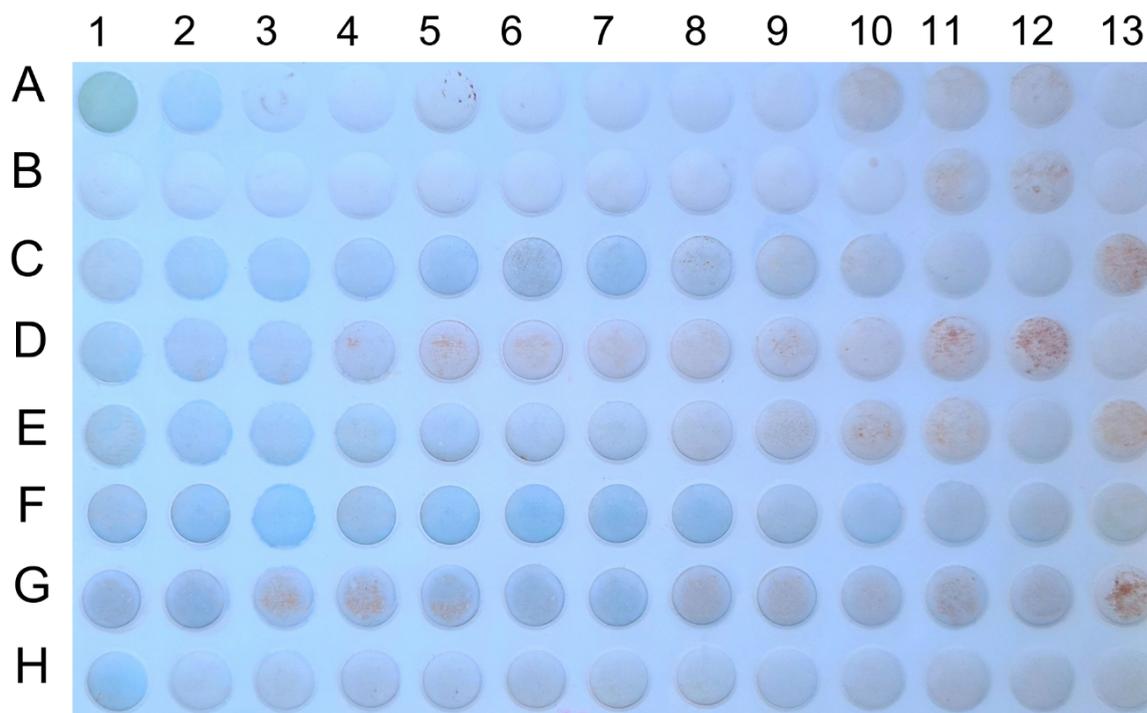


Figura 3. Foto da membrana resultante da análise sorológica “dot blot” para quantificar a concentração de *Xanthomonas albilineans* em cada internódio. A partir dos resultados, foi possível avaliar os parâmetros de incidência e severidade, em cana de terceira soca com sete meses de idade. Os cinco primeiros “poços” da membrana A1-A5 são os controles, os poços 1 a 4 são os controles positivos e poço 5 é o controle negativo. As amostras analisadas (C1-C13), (F1-F13) correspondem a variedade RB966928, os poços (D1-D13) e (G1-G13) correspondem a variedade RB92579 e os poços (E1-E13) e (H1-H13) correspondem a variedade RB867515.

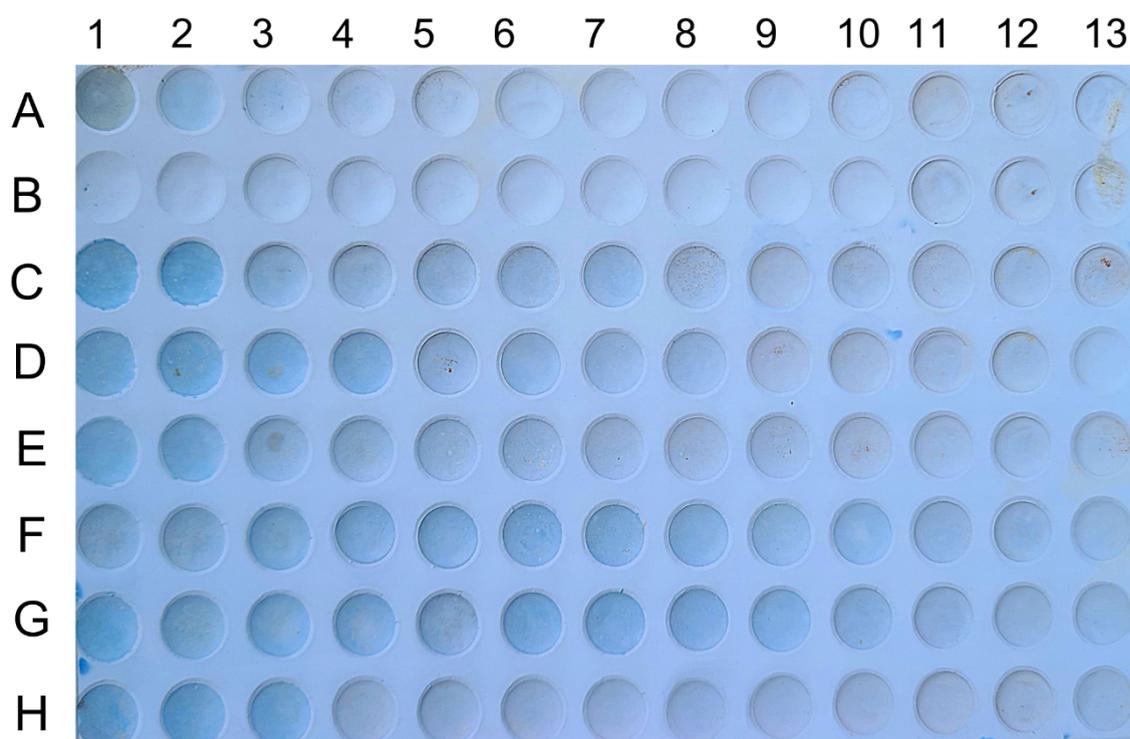


Figura 4. Foto da membrana resultante da análise sorológica “dot blot” para quantificar a concentração de *Xanthomonas albilineans* em cada internódio. A partir dos resultados, foi possível avaliar os parâmetros de incidência e severidade, em cana de terceira soca com sete meses de idade. Os cinco primeiros “poços” da membrana A1-A5 são os controles, os poços 1 a 4 são os controles positivos e poço 5 é o controle negativo. As amostras analisadas (C1-C13) e (F1-F13, A10) correspondem a variedade RB966928, os poços (D1-D13)(G1-G13, A12, B12). correspondem a variedade RB92579 e os poços (E1-E13) e (H1-H13, A13, B13) correspondem a variedade RB867515.