



Universidade Federal de São Carlos
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Curso de Engenharia Agrônoma



MAYSA MARIANO AGUIAR DE OLIVEIRA

Raquitismo-das-soqueiras: métodos de diagnose, influência da idade da cana-de-açúcar para detecção e efeito da termoterapia em dois títulos de *Leifsonia xyli subsp. xyli*

ARARAS - 2021



Universidade Federal de São Carlos
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Curso de Engenharia Agrônoma



MAYSA MARIANO AGUIAR DE OLIVEIRA

Raquitismo-das-soqueiras: métodos de diagnose, influência da idade da cana-de-açúcar para detecção e efeito da termoterapia em dois títulos de *Leifsonia xyli subsp. xyli*

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Agrônoma – CCA – UFSCar para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Seiti Urashima

ARARAS – 2021

Dedico esse trabalho a minha família base, Antônio e Simone, meus pais, Aline e Giovanni, meus irmãos, que sempre me apoiaram, acreditaram no meu potencial e nunca mediram esforços para me permitir chegar onde estou hoje.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo de minha jornada e nunca me deixar desamparada.

Agradeço aos meus pais, Antônio Mariano de Oliveira e Simone de Aguiar Teodoro Oliveira, por todo amor incondicional e carinho dedicado a mim, que sempre apoiaram minhas escolhas e me incentivaram nos momentos mais difíceis. Sou grata por todos os ensinamentos, “puxões de orelha”, confiança, amizade e dedicação para que eu pudesse me tornar quem eu sou hoje, vocês me inspiram, obrigada.

Agradeço aos meus irmãos, Aline Mariana Aguiar de Oliveira Allegretti e Giovanni Mariano Aguiar de Oliveira, pelo companheirismo, paciência, amor e apoio, vocês foram e são peças fundamentais de minha trajetória, gratidão.

Agradeço ao meu companheiro, Pedro Felipe Di Madureira Ivo, pelos anos de amizade, companheirismo e cumplicidade, por toda ajuda e paciência, obrigada por sempre me apoiar e acreditar em mim.

Agradeço a UFSCar pelo investimento feito em mim, a todo seu corpo docente pelo acolhimento e disposição em ajudar.

Agradeço a todos meus professores pelos ensinamentos, paciência e resiliência, vocês foram fundamentais para meu desenvolvimento pessoal e profissional, muito obrigada.

Agradeço em especial ao professor Dr. Alfredo Seiiti Urashima, por aceitar me orientar, acreditar e confiar em mim, pela oportunidade de desenvolver pesquisas dentro de seu laboratório, pela amizade, paciência, tempo, disposição e, principalmente, por todo ensinamento e conhecimento que adquiri durante minha jornada acadêmica em sua companhia, serei eternamente grata.

Agradeço a equipe de campo do Programa de Melhoramento Genético de

Cana-de-Açúcar (PMGCA – UFSCar) por toda ajuda e disposição para a realização deste trabalho.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de iniciação científica (número do processo: 2019/11424-2).

Agradeço a minha segunda família, República Gaia, por me aceitarem como sou, por todo acolhimento, carinho e companheirismo durante esses anos, obrigada por me ensinarem a ser paciente, resiliente e me mostrarem o verdadeiro significado de união, vocês foram e são peças essenciais para minha formação pessoal e profissional, meus sinceros agradecimentos à todas vocês.

Por fim, agradeço pelas amizades feitas durante esses anos de faculdade que levarei comigo, por sempre acreditarem e torcerem por mim, vocês são muito especiais, gratidão.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

O raquitismo-das-soqueiras (RSD), causado pela bactéria *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx), é considerada a principal doença da cana-de-açúcar por influenciar diretamente na produtividade da cultura. No Brasil, a doença está disseminada em todos estados e variedades, e mesmo assim pesquisas com essa doença ainda são escassas. Os métodos recomendados no Brasil para controle de RSD são exame diagnóstico e/ou termoterapia dos materiais propagativos. O exame diagnóstico sorológico é utilizado quando o método de propagação é o convencional, que emprega toletes de cana-de-açúcar; enquanto que a técnica molecular de PCR é empregada quando se usa mudas-pré-brotadas (MPB). Para termoterapia, duas condições são empregadas: 52°C/30min e 50°C/2h, sendo que a primeira tem uma capacidade de tratamento maior, mas apresenta maior escape de Lxx. Embora o título de Lxx possa ter influência na ineficiência da termoterapia, dados mais detalhados sobre sua influência em cada uma das combinações da termoterapia ainda são necessários. Outra informação necessária se refere a precocidade de detecção de Lxx em plantios feitos com materiais propagativos contaminados. Pelo exposto, o presente trabalho teve os seguintes objetivos: (a) determinar a eficiência das termoterapias em materiais propagativos contaminados com títulos distintos de Lxx; (b) examinar a interação entre idade da cana-de-açúcar e detecção de Lxx; (c) avaliar a eficiência dos métodos sorológico e molecular na detecção de Lxx em diferentes idades de cana-de-açúcar. O experimento foi conduzido em campo com seis tratamentos, sendo dois tratamentos formados por mudas doentes com títulos distintos de Lxx e quatro tratamentos com combinações de termoterapia e títulos da bactéria. As avaliações se iniciaram a partir do sétimo mês da termoterapia, quando a extração da seiva foi possível, e depois, mensalmente. O trabalho comprovou: (a) termoterapia foi importante para controle de RSD, independentemente da idade de amostragem da planta, título de Lxx e do método de detecção, (b) as duas condições de termoterapia apresentou escape de Lxx; (c) Lxx foi detectada já a partir do sétimo mês, independentemente da concentração de Lxx no material vegetal; (d) o escape da termoterapia foi detectado pelo dois métodos de diagnose.

Palavras-chave: *Saccharum*, dot blot, PCR, termoterapia, técnicas diagnósticas, disseminação de doença.

ABSTRACT

Ratoon stunt: diagnostic methods, influence of sugarcane age for detection, and effect of thermotherapy on two titers of *Leifsonia xyli subsp. xyli*

Ratoon stunt (RSD), caused by *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx), is considered the main sugarcane disease for directly affecting yield crop. The disease is disseminated in all cultivars and states of the Country; still, little information under Brazilian conditions is available. The most recommended method in Brazil for RSD control are diagnostic test and thermotherapy of seedcanes. The serological diagnostic test is employed for the conventional billet planting while the PCR-based technique is preferred for the presprouted seedcane (MPB). Two combinations of thermotherapy are employed: 52°C/30min and 50°C/2h, the first higher treatment performance as well as higher failure to eliminate Lxx. Although Lxx titer may affect thermotherapy efficiency more data is still necessary on its importance for each of the thermotherapy combination. Also, more information is needed on early Lxx detection when contaminated seedcane is employed. Therefore, this work aimed at the following objectives: (a) determine the thermotherapy efficacy in seedcanes contaminated with different Lxx titer; (b) examine the interaction between sugarcane age and Lxx detection; (c) evaluate the efficiency of serological and molecular detection technique on different ages of sugarcane. The experiment was carried out in field with six diseased treatments formed by two untreated ones with two distinct Lxx titer, and four treated with two combinations of thermotherapy and Lxx titer. Data collection started at seventh month after treatment, when sap extraction was possible and after that, monthly. Data showed: (a) thermotherapy was an important measure of RSD control, regardless the sampling age of plants, Lxx titer, and diagnostic technique; (b) both thermotherapy combination showed Lxx elimination failure; (c) Lxx was already detected in seven month plant regardless the Lxx titer; (d) failure of the thermotherapy was identified by both diagnostic techniques.

Key-words: *Saccharum*, dot blot, PCR, thermotherapy, diagnostic techniques, disease dissemination.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A. Canavial utilizado para coleta das canas em estudo; B. Identificação das canas separadas por touceiras de cada tratamento; C. Esterilização do material utilizado para o corte das touceiras; D. Realização do corte das canas; E. Extração de seiva; F. Processo do “dot blot” para análise sorológica. 22
- Figura 2.** Processos da extração de DNA: A. Amostras picadas colocadas no banho-maria por período de quatro horas; B. Processo de extração de DNA das amostras. 23
- Figura 3.** Processos da análise molecular: A. Homogeneização das amostras; B. Preparo do “mix” para reação da PCR (Polymerase Chain Reaction); C. Amostras no termociclador; D. Pipetagem das amostras no gel de agarose 2%. 23
- Figura 4.** A. Corte de colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928 utilizadas no estudo retiradas de um campo experimental para individualização das gemas; B. Gemas de cana-de-açúcar da variedade RB 866928 separadas em sacos de “nylon” vazados por título de contaminação por Lxx; C. Gemas de cana-de-açúcar individualizadas e separadas em sacos de “nylon” no processo de tratamento térmico na condição de termoterapia igual a 50°C/2h. 24
- Figura 5.** A. Gemas de cana-de-açúcar da variedade RB 866928 de todos os tratamentos (gemas tratadas termicamente e gemas doentes) plantadas em bandejas devidamente identificadas; B. Plantio das gemas de cana-de-açúcar de todos os tratamentos finalizado..... 25
- Figura 6.** A. Gemas de cana-de-açúcar da variedade RB 866928 germinadas e individualizadas para produção das mudas; B. Processo de produção das mudas; C. Mudanças de cana-de-açúcar em bandejas sob uma bancada com sistema de irrigação por aspersão..... 25

Figura 7. A. Seleção de mudas de cana-de-açúcar para transplantar para o campo experimental; B. Organização e distribuição das mudas de cana-de-açúcar separadas por tratamentos; C. Plantio manual das mudas de cana-de-açúcar com auxílio de uma plantadeira; D. Experimento instalado no campo. E. Verificação de pegamento das mudas de cana-de-açúcar..... 26

Figura 8. Foto de uma membrana resultante da análise sorológica para detecção de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx) em seivas extraídas de colmos de cana-de-açúcar, em que os cinco primeiros “poços” da membrana são os controles (poços de 1 a 4 controle positivo e poço 5 controle negativo) e os demais poços são as amostras analisadas..... 29

Figura 9. Incidência (em %) de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx) em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928, analisados via método sorológico em diferentes idades, com dois níveis de título, previamente submetidas a duas condições de termoterapia e sem tratamento térmico 30

Figura 10. Foto do gel resultante da análise molecular, ilustrando o produto da PCR (Polymerase Chain Reaction) amplificado para identificação de mudas de cana-de-açúcar com *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx), sendo possível visualizar fragmento de DNA da bactéria nos poços devidamente identificados; os últimos poços que apresentam fragmento de DNA são os controles positivos validando a presença do patógeno (A. Amostras não tratadas termicamente com alto título de Lxx; B. Amostras tratadas a 52°C/30 min. com alto título de Lxx)..... 33

Figura 11. Incidência (em %) de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx) em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928, analisados via método molecular em diferentes idades, com dois níveis de título, previamente submetidas a duas condições de termoterapia e sem tratamento térmico 34

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Dados relativos às respostas sorológicas em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928, analisados de forma agrupada e em estratos de diferentes idades (216-378 dias), oriunda de duas concentrações de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx), não submetidas ao tratamento térmico30
- Tabela 2.** Dados relativos às respostas sorológicas em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928, analisados de forma agrupada e em estratos de diferentes idades (216-378 dias), oriunda de duas concentrações de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx), previamente submetida a termoterapia de 52°C/30min.....30
- Tabela 3.** Dados relativos às respostas sorológicas em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928, analisados de forma agrupada e em estratos de diferentes idades (216-378 dias), oriunda de duas concentrações de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx), previamente submetida a termoterapia de 50°C/2h31
- Tabela 4.** Dados relativos às respostas moleculares em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928, analisados de forma agrupada e em estratos de diferentes idades (216-378 dias), oriunda de duas concentrações de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx), não submetidas ao tratamento térmico34
- Tabela 5.** Dados relativos às respostas moleculares em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928, analisados de forma agrupada e em estratos de diferentes idades (216-378 dias), oriunda de duas concentrações de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx), previamente submetida a termoterapia de 52°C/30min.....34
- Tabela 6.** Dados relativos às respostas moleculares em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928, analisados de forma agrupada e em estratos de diferentes idades (216-378 dias), oriunda de duas concentrações de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx), previamente submetida a termoterapia de 50°C/2h35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Exame diagnóstico de RSD.....	21
4.1.1. Método Sorológico	21
4.1.2. Método Molecular	22
4.2. Termoterapia	23
4.3. Tratamentos	24
4.4. Plantio	24
4.4.1. Plantio em bandejas.....	24
4.4.2. Mudanças de cana-de-açúcar.....	25
4.4.3. Plantio em campo (dezembro 2019)	26
4.5. Coleta de dados	27
4.5.1. Amostragem.....	27
4.5.2. Detecção de Lxx.....	27
4.6. Análise de dados.....	28
4.6.1. Coeficiente de correlação (Pearson)	28
4.6.2. Estatística.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Análise sorológica	29
5.2. Análise molecular	33
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ANEXO I.....	43

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar ocupa atualmente posição de destaque na economia brasileira por ser o açúcar uma das principais commodities do agronegócio; que vem sendo também um dos elementos responsáveis pelo saldo positivo na balança comercial nos últimos anos, sendo que no ano de 2020 os valores com a exportação chegaram a 7,94 bilhões de dólares (Fiesp, 2020). O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar com a safra 2020/21 estimada em mais de 665 milhões de toneladas (Conab, 2020). A produção de cana tem crescido a cada ano, sendo que na safra de 2020/21 houve um incremento na produção de 3,5% em relação à safra de 2019/2020. Entretanto a produtividade não cresce na mesma proporção, tendo crescido apenas 1,5% em relação a temporada passada, ou seja, o aumento de produção está ocorrendo mais pelo aumento de área em 1,9% do que por aumento de produtividade (Conab, 2020).

A produtividade da cana-de-açúcar é influenciada por muitos fatores, sendo doenças uma das mais importantes. A cultura é atacada por inúmeras enfermidades (Tokeshi; Rago, 2016), onde o raquitismo-das-soqueiras (RSD) é considerada a mais importante em muitos países produtores, além de ser apontada sendo uma das principais causas do declínio da produtividade (Zekarias et al., 2012). A doença foi constatada em campos brasileiros pela primeira vez em 1956 em Campos dos Goytacazes (RJ) (Ponte et al., 2010), porém já estava presente em outras regiões do país sem ter sido identificada.

A RSD ganha importância em muitos países devido as dificuldades de controle, uma vez que esta doença é causada por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), uma bactéria fastidiosa que não sobrevive no solo, não tem inseto vetor e não tem outro hospedeiro, além da cana-de-açúcar (Gillaspie; Teakle, 1989; Davis; Bailey, 2000; Grisham, 2004). Assim sendo, a única fonte de inóculo primário em um canavial é através do plantio de material propagativo contaminado. No entanto, essa doença não apresenta sintomas característicos impossibilitando a identificação de plantas doentes no campo, a diagnose precisa somente pode ser conseguida através das análises laboratoriais (Hoy et al., 1999).

O método de multiplicação de mudas é determinante para o sucesso do canavial por estar intrinsecamente relacionado à sanidade do material propagativo. Dentre os métodos de formação de novos canaviais, tem-se que o uso de toletes como

material propagativo (método convencional) correspondeu a mais de 90% enquanto MPB (mudas pré-brotadas), uma tecnologia alternativa, foi apenas de 9,1% (Braga Jr, 2020; Landell et al., 2012). Levantamento realizado em campos candidatos a fornecerem mudas para propagação mostraram incidência de RSD variando de 20,54% em 2013 a 86,71% em 2018, sendo a maior incidência observada no último ano do levantamento (Urashima et al., 2020), tal fator está diretamente relacionado ao aumento da mecanização da colheita. A mecanização é um dos fatores responsáveis pelo aumento da incidência de RSD, tendo em vista sua evolução no decorrer dos anos que na safra 2007/08 possuía 24,4% da colheita mecanizada, passando para 91,8% na última safra de 2019/20 (Conab, 2020). Esses dados sugerem que as usinas podem não estar cientes da dimensão do problema, dos altos níveis de infecção de Lxx nos campos prospectivos para formação de mudas que darão origem as novas áreas canavieiras, podendo alastrar a doença em proporções nunca vista anteriormente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Além do açúcar produzido, a cana-de-açúcar é matéria prima para a produção de etanol, um biocombustível que substitui com vantagens a gasolina, que é um combustível não renovável. A produção de carros “flex-fuel” no Brasil é vista no exterior como uma alternativa bastante interessante para diminuir a emissão de CO₂ pela indústria automobilística (Weiner; Clingan, 2012). A produção brasileira foi estimada em 29,8 bilhões de litros de etanol (Conab, 2020), para uma frota circulante de carros com motores “flex” representam 69,5% da frota total em 2019 (Sindipeças, 2020). Um terceiro produto da cana-de-açúcar que também tem papel fundamental para uma agricultura mais sustentável é a bioenergia. O bagaço de cana, que é um sub-produto resultante da extração do caldo para produção de açúcar ou etanol, pode ser empregado para cogeração de energia. Das fontes de energia renovável, a bioeletricidade da cana é mais interessante para o Sudeste que a energia solar e eólica, pois esses dois são produzidos na região Nordeste, enquanto 62,3% da cana do Brasil se localiza no Sudeste, fazendo com que a distância de transmissão seja menor. A bioeletricidade da cana poupou o equivalente a 17% da água dos reservatórios de hidrelétricas em 2020 (Única, 2020), especialmente importante porque o período de diminuição de chuvas (abril e novembro) coincide com a colheita da cana.

A crescente valorização dos produtos da cana-de-açúcar tem sido acompanhada pelo aumento da área de plantio: por exemplo, em 2009 a área foi de 7,8 milhões de hectares enquanto em 2020 foi de 8,6 milhões de hectares (Conab, 2009; Conab, 2020). Vale ressaltar que nas safras de 2014/15 houve oscilação no crescimento da área produtiva e, nas últimas safras, esse valor vinha caindo, representado por uma variação de 12,9% a menos de crescimento quando comparado a safra 2019/20 a 2020/21 (Conab, 2020). No entanto, o aumento na área não tem sido acompanhado pelo aumento na produtividade. Esse aspecto é de fundamental importância para o futuro da cana-de-açúcar como agente primário da agricultura sustentável, pois a crescente necessidade dessas matérias-primas não pode ser obtida pela invasão de áreas cultivadas com outras culturas ou pela invasão de áreas virgens, mas sim pela melhora da produtividade. Nesse quesito, a produtividade também tem oscilado, visto que em 2009 foi de 81,2 t/ha e de 77,3 t/ha em 2020 (Conab, 2009; Conab, 2020), mostrando claramente a necessidade de aumentar a

produtividade da cultura, que somente pode ser obtida através de pesquisas científicas nessa área. Outro ponto importante é o fato de que dentro desse intervalo de tempo a produtividade chegou a menos de 70 t/ha, porém nas últimas duas safras vem aumentando. Trata-se de uma questão extremamente complexa uma vez que há inúmeros fatores envolvidos, dentre eles o avanço de doenças como o RSD.

Dentre as várias razões para a RSD ser considerada a mais importante, se destaca o potencial de dano à produtividade, cujo nível de dano aumentou em função dos cortes (o que justifica o nome “raquitismo-das-soqueiras” para a doença) em várias localidades, por exemplo, na África do Sul foi de 18% no primeiro ano e de 27% no seguinte (Bailey; Bechet, 1997), em Louisiana (Estados Unidos da América) foi de 14% no primeiro ano, aumentando para 27% no terceiro (Grisham, 1991), enquanto na Etiópia foi de 12% no primeiro e de 28% no terceiro (Zekarias et al., 2012). No Brasil, os dados relativos às perdas oriundas de infecções causadas por Lxx são ainda muito escassos; um dos estudos mostrou dados que comprovaram queda de produtividade variando no primeiro ano de 9 a 14% e de 27 a 44% no terceiro ano em três variedades diferentes de cana-de-açúcar (Matsuoka, 1984). A doença continua sendo importante em diversas variedades atuais de cana-de-açúcar, além de que estudo já mostrou a redução de peso médio dos colmos em três cortes subsequentes em 5,3% para a variedade RB 855156 e de 26,2% para a variedade RB 867515 (Gagliardi; Camargo, 2009), sendo as duas das cinco variedades mais cultivadas (Chapola, 2015).

As formas de cultivo adotadas pelas usinas correspondem a 67,1% de material sem diagnose e sem termoterapia, oriundo diretamente dos campos comerciais; 16% de material com diagnose e sem termoterapia, oriundo de viveiros; 7,5% de material com diagnose e termoterapia, também oriundo de viveiros; e apenas 9,1% de material oriundo de MPB, ou seja, mudas já formadas com diagnose (Braga Jr., 2020). Por mais que o tratamento térmico seja essencial para garantir a sanidade canavieira, esta prática ainda não é comum para as usinas, visto que mais de 80% de mudas são formadas através de métodos convencionais sem tratamento térmico. Mudas oriundas de campos comerciais, ou seja, mudas que são retiradas de um campo produtivo e plantadas em outra área, sem passar por nenhum processo como a termoterapia ou serem submetidas a análises, ainda predominam no mercado, uma vez que as usinas optam por métodos convencionais para minimizar custos, no qual as mudas serão multiplicadas a partir de colmos sem diagnose advindos de campos já formados e dará

origem a uma nova área canavieira, porém este método não garante sanidade do material propagativo podendo estar contaminado por Lxx.

O sistema convencional de multiplicação de mudas também conhecido como plantio mecânico de toletes, a recomendação técnica é que as mudas sejam produzidas a partir dos colmos mais saudáveis do campo comercial, oriundos da cana-planta ou primeira soca, selecionados e submetidos a um teste diagnóstico de laboratórios, tratados termicamente e utilizados em viveiros para produção de novas canas (Barbosa, 2013).

O sistema de MPB, outra técnica de multiplicação de mudas com conceitos diferentes do convencional, traz algumas vantagens no processo de implantação da área canavieira como redução do volume a ser plantado; material tratado termicamente, que reflete em um melhor controle fitossanitário na área; melhoria na qualidade de vigor das mudas; canaviais de excelente padrão clonal; e maior homogeneidade da área visando melhoria no ganho produtivo; além de que para a realização da diagnose é utilizado o método molecular (Landell et al., 2012). Este sistema também possibilita adotar outros métodos de cultivo, como o sistema de meiosi (método inter-rotacional), que em uma mesma área mudas de cana-de-açúcar são plantadas juntamente ao cultivo de outras culturas como, por exemplo, a soja ou amendoim; reduzindo o custo da renovação do canavial, e permitindo a multiplicação de mudas (Coury, 2019).

A taxa de adesão da tecnologia de MPB ainda representa uma pequena porcentagem no mercado canavieiro, mas com alto potencial de crescimento e prospecções de adoção. O método não foi bem aceito pelas usinas por encarecer o sistema produtivo como um todo, gerando maiores gastos com aquisição de mudas, análises laboratoriais, e mecanização do processo.

Em paralelo ao fato do aumento de RSD nos próximos anos, também existe a pressão de expansão das áreas produtivas a cada ano o que pode resultar em escassez de materiais propagativos que atenda tal demanda, estimulando cada vez mais o uso de canas oriundas de campos comerciais e não de viveiros (Urashima et al., 2020).

Os métodos mais empregados para erradicação de Lxx é o exame laboratorial complementado com termoterapia para eliminação da bactéria. Nesse sentido, a situação dos materiais empregados na multiplicação dos canaviais no Brasil é

preocupante, visto que levantamento de RSD em viveiros de multiplicação de mudas em usinas do Espírito Santo, Bahia e Minas Gerais mostrou 67,6% de contaminação com Lxx em amostras de 2003 e 2004 (Ponte et al., 2010). A incidência da doença tem sido alta ao longo dos anos também em campos de multiplicação de usinas do estado de S. Paulo, o maior produtor nacional, pois os valores variaram de 0,4 a 38,9% no período de 2005 a 2007 e de 23,6 a 27,1% nos anos de 2009 a 2011 (Urashima et al., 2010; Urashima; Marchetti, 2013). A alta contaminação dos viveiros de multiplicação de materiais propagativos de cana-de-açúcar também se refletiu em alta incidência de RSD em campos comerciais da região Centro-Sul, responsável por 85% da área nacional, onde 10% dos 1154 talhões avaliados estavam doentes, 58% das 50 usinas tinham pelo menos um talhão contaminado e 9% das áreas novas empregaram materiais propagativos contaminados com Lxx em 2012-13 (Urashima et al., 2017).

O exame diagnóstico para todas as análises citadas foi feito com seiva dos vasos da cana, empregando-se o método sorológico. Esse exame diagnóstico vem sendo utilizado em diversos países ao redor do mundo (Comstock, 2002; Viswanathan, 2004), devido a capacidade de se analisar um grande número de amostras, facilidade de manipulação da seiva e custo não proibitivo para o setor produtivo. No Brasil, o exame diagnóstico “dot blot” é o mais empregado no Brasil para exames de rotina, que tem capacidade de detecção de 10^9 a 10^6 UFC/mL (Leaman et al., 1991; Urashima et al., 2017). Métodos mais sensíveis como o molecular, com PCR qualitativo e quantitativos, já estão disponíveis com vários “primers” específicos e maior precisão que o método sorológico (Fegan et al, 1998; Pan et al., 1998; Taylor et al., 2003; Grisham et al., 2007; Pelosi et al., 2013; Carvalho et al., 2016). No entanto, diagnose molecular tem sido empregada somente em pesquisas científicas e empresas relacionadas a produção de MPB, e não vem sendo adotado em exames diagnóstico de rotina de RSD.

Termoterapia é uma outra medida de controle de RSD que complementa o exame diagnóstico, sendo a tecnologia mais empregada em todo mundo para obter materiais propagativos sadios (Damann Jr; Benda, 1983). Nesse quesito, um aspecto que ainda necessita ser esclarecido no tratamento térmico se refere ao binômio temperatura/tempo, já que muitas usinas no Brasil preferem 52°C/30min (Sanguino et al., 1988) enquanto 50°C/2h é o empregado no exterior (Damann Jr; Benda, 1983). A escolha da indústria canavieira brasileira pela primeira combinação se deve a dois

fatores: 1) maior número de toletes pode ser tratado por unidade de tempo (tempo de imersão em água quente é quatro vezes menor) uma vez que o volume de material de plantio e cultivo no País é maior que em outros países; 2) Receio de que 50°C/2h possa ter efeito deletério na brotação dos toletes (Fernandes Jr et al., 2010).

Quando o tratamento térmico de toletes foi feito com o binômio 52°C/30min observou-se uma redução na população de Lxx, mas sem eliminar totalmente a bactéria (Carvalho et al., 2016). Esse importante achado necessita ser complementado com um outro aspecto importante do manejo do RSD, qual seja, determinar as consequências desse escape sobre a produtividade. Novamente, sem uma resposta adequada a esse questionamento o setor produtivo não vai adotar nenhuma mudança, já que implicaria tempo maior de tratamento térmico para um mesmo número de materiais a serem tratados.

A pesquisa de Carvalho et al. (2016) também sugeriu a possibilidade de que 52°C/30min possa não apresentar escape e ser eficiente no controle de Lxx, quando em baixas concentrações da bactéria. Assim, surgiu a hipótese de que a concentração de Lxx vai influir no resultado da termoterapia, seja no binômio 52°C/30min, seja em 50°C/2h onde escape também já foi observado (Damann Jr; Benda, 1983; Grisham et al., 2007). No entanto, devido ao impacto dessa informação no controle de RSD pela termoterapia, esse achado precisa ser cientificamente comprovado, o que não foi possível nos estudos anteriores, e que não tiveram esse objetivo. Complementarmente, é de fundamental importância que o escape resultante da termoterapia seja detectado o mais rapidamente.

A detecção de Lxx o mais rapidamente possível, que não foi eliminada pela termoterapia, é de fundamental importância, pois permitiria descartar o material vegetativo antes de sua multiplicação no campo, aumentando a eficácia da exclusão como método de controle de RSD.

3. OBJETIVOS

Pelo exposto, o objetivo do presente trabalho foi (a) determinar a eficiência das termoterapias em materiais propagativos contaminados com títulos distintos de Lxx; (b) examinar a interação entre idade da cana-de-açúcar e detecção de Lxx; (c) avaliar a eficiência dos métodos sorológico e molecular na detecção de Lxx em diferentes idades de cana-de-açúcar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A variedade da cana-de-açúcar nesse ensaio foi RB966928, por ser a mais importante em áreas de reforma na região Centro Sul (Chapola et al., 2016). O material para estudo foi obtido a partir de um campo experimental situado na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – Campus Araras, onde as plantas de cana-de-açúcar eram de primeiro corte com nove meses de idade, realizado na primeira etapa desse estudo (agosto/setembro - 2019). O exame diagnóstico foi feito em diferentes canas das touceiras dos tratamentos de 50°/2hr, 52°C/30min e canas doentes pelo exame sorológico “dot blot” para identificação das mesmas com diferentes níveis de Lxx. Essa análise permitiu a identificação de canas saudáveis e os níveis de contaminação de Lxx em canas doentes, antes da termoterapia.

4.1. Exame diagnóstico de RSD

4.1.1. Método Sorológico

O método sorológico para identificação de Lxx foi o de “dot blot”, que vem sendo realizado em diagnose de rotina do Laboratório de Genética Molecular (LAGEM) situado dentro da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – Campus Araras, junto ao setor produtivo e descrito em detalhes em trabalhos já publicados (Urashima; Marchetti, 2013; Urashima et al. 2017). Conforme mencionado, essa tecnologia permite a quantificação do título de Lxx nas amostras positivas (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 UFC/mL) (Leaman et al., 1991). O controle negativo é formado por seiva de cana saudável, identificada pelo método molecular. Para esse exame diagnóstico é essencial a extração da seiva da cana.

O exame diagnóstico “dot blot” foi feito antes da termoterapia para se conhecer o título de Lxx de cada touceira individualizada. O material foi colhido do campo (cana planta), passou pelo processo de extração de seiva e logo em seguida realizou-se a análise das amostras através do método sorológico.

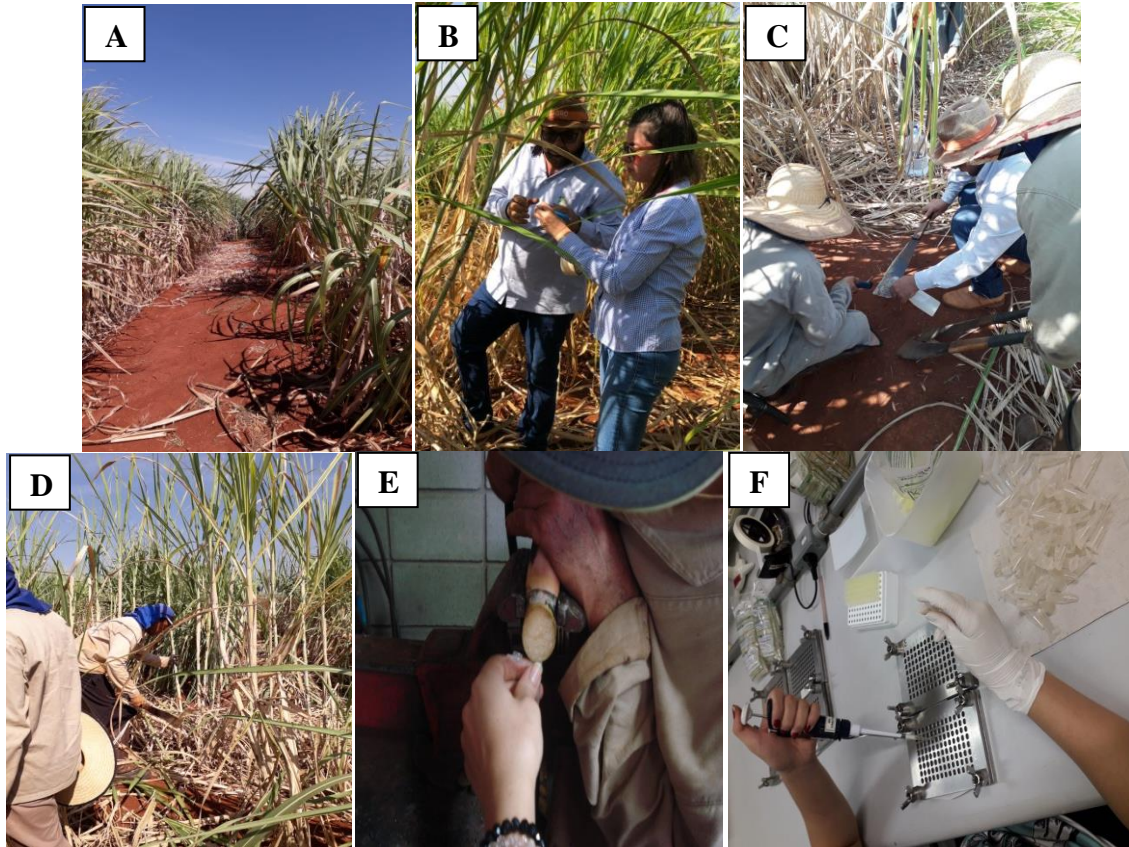


Figura 1. A. Canavial utilizado para coleta das canas em estudo; B. Identificação das canas separadas por touceiras de cada tratamento; C. Esterilização do material utilizado para o corte das touceiras; D. Realização do corte das canas; E. Extração de seiva; F. Processo do “dot blot” para análise sorológica.

4.1.2. Método Molecular

O método molecular empregado para detecção de Lxx consistiu de PCR (Polymerase Chain Reaction) qualitativo com “primers” específicos selecionados por Fegan et al. (1998) CxxITSf#5 (5' – TCA ACG CAG AGA TTG TCC A) e CxxITSr#5 (5' – GTA CGG GCG GTA CCT TTT C) e condições de amplificação propostas por Taylor et al. (2003) e aprimoradas por Oliveira; Urashima (2018) com acréscimo de 1°C na temperatura de anelamento, iniciando o ciclo de amplificação com a desnaturação por 5 min em 96°C, seguido por 35 ciclos em 94°C por 15 s, 57°C por 30 s e 72°C por 30s, com extensão final em 72°C por 10 min. Antes de extrair a seiva para realização na análise sorológica, retirou-se o primeiro nó basal para extração do DNA, ou seja, a seiva foi retirada do primeiro entre-nó basal após a retirada do nó, local de maior concentração da bactéria quando se faz presente na touceira.

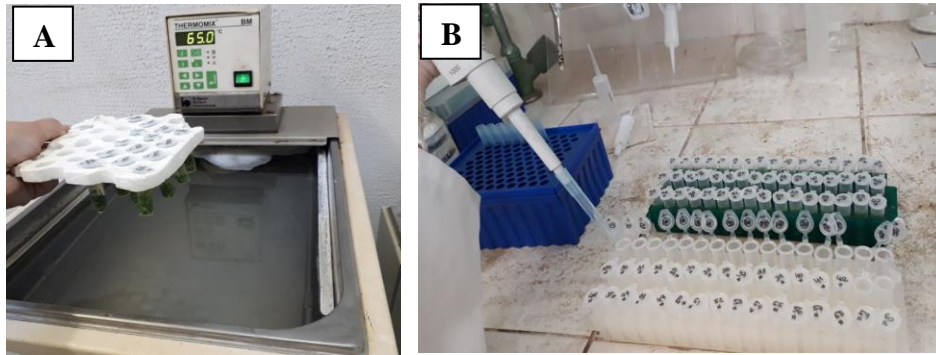


Figura 2. Processos da extração de DNA: A. Amostras picadas colocadas no banho-maria por período de quatro horas; B. Processo de extração de DNA das amostras.

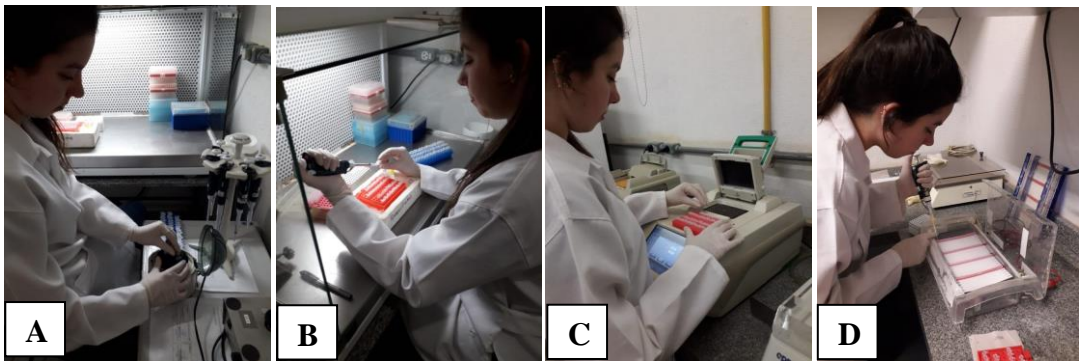


Figura 3. Processos da análise molecular: A. Homogeneização das amostras; B. Preparo do “mix” para reação da PCR (Polymerase Chain Reaction); C. Amostras no termociclador; D. Pipetagem das amostras no gel de agarose 2%.

4.2. Termoterapia

Essa operação foi objeto de estudo da presente pesquisa, qual seja, as duas condições de tratamento térmico para RSD (52°C/30min e 50°C/2h) foram feitas em material propagativo, gemas individualizadas, cujo nível de contaminação por Lxx era conhecida. Gemas individualizadas foram colocadas em sacos de “nylon” vazados, posteriormente em caixotes plásticos, submersos em tanques de 2000 litros e mantidos nas temperaturas e tempos estipulados. Em seguida, retirados, resfriados naturalmente e plantados em bandejas. O tratamento testemunha (cana doente sem termoterapia) foi formado por gemas retiradas do campo cujo título de Lxx era conhecido não passando por nenhum processo, apenas individualização das gemas e plantio em bandeja.



Figura 4. A. Corte de colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928 utilizadas no estudo retiradas de um campo experimental para individualização das gemas; B. Gemas de cana-de-açúcar da variedade RB 866928 separadas em sacos de “nylon” vazados por título de contaminação por Lxx; C. Gemas de cana-de-açúcar individualizadas e separadas em sacos de “nylon” no processo de tratamento térmico na condição de termoterapia igual a 50°C/2h.

4.3. Tratamentos

Assim, os tratamentos foram: T1 = cana doente com baixo título de Lxx (10^6 UFC/mL) e sem termoterapia, T2 = cana doente com baixo título de Lxx e termoterapia de 52°C/30min, T3 = cana com baixo título de Lxx e termoterapia de 50°C/2h, T4 = cana doente com alto título de Lxx (10^8 UFC/mL) e sem termoterapia, T5 = cana doente com alto título de Lxx e termoterapia de 52°C/30min, T6 = cana com alto título de Lxx e termoterapia de 50°C/2h.

4.4. Plantio

4.4.1. Plantio em bandejas

Após a termoterapia, as gemas foram retiradas do tratamento térmico e resfriadas naturalmente. O material foi plantado em bandejas com uma média de 60 gemas/bandejas, devidamente identificadas por tratamento e título de Lxx. Ao término do plantio, as bandejas foram mantidas em estufas com temperatura controlada em torno de 30°C por um período de 15 dias. Logo após esse período, as mesmas foram retiradas e colocadas apenas em ambiente protegido para que houvesse a climatização, permanecendo por mais 15 dias.



Figura 5. A. Gemas de cana-de-açúcar da variedade RB 866928 de todos os tratamentos (gemas tratadas termicamente e gemas doentes) plantadas em bandejas devidamente identificadas; B. Plantio das gemas de cana-de-açúcar de todos os tratamentos finalizado.

4.4.2. Mudanças de cana-de-açúcar

As mudas de cana-de-açúcar foram produzidas a partir do processo de transplante das mudas brotadas que estavam plantadas em bandejas para copos plásticos de duzentos microlitros. Todas as mudas inicialmente plantadas em bandejas foram transplantadas para os copos plásticos, resultando em média de setenta mudas por tratamento. Esse processo ocorreu logo após o período de climatização, em que as gemas de cana-de-açúcar já haviam germinado e apresentavam sistema radicular bem desenvolvido. Os copos plásticos com as mudas de cana-de-açúcar transplantadas foram levados para uma bancada onde havia sistema de irrigação por aspersão diariamente, permanecendo neste local por 25 dias até que o sistema radicular da muda se desenvolvesse formando um “torrão”, para que fosse possível o transplante para o campo.



Figura 6. A. Gemas de cana-de-açúcar da variedade RB 866928 germinadas e individualizadas para produção das mudas; B. Processo de produção das mudas; C. Mudanças de cana-de-açúcar em bandejas sob uma bancada com sistema de irrigação por aspersão.

4.4.3. Plantio em campo (dezembro 2019)

Mudas de cana-de-açúcar provenientes de gemas submetidas aos diferentes tratamentos foram transplantadas manualmente para o campo com auxílio de uma “matraca” (plantadeira) conforme os tratamentos e delineamento descritos posteriormente. Cada área experimental foi composta por 360 plantas (sendo uma planta equivalente a uma parcela) distribuídas em sulcos e espaçadas a 0,50 m entre planta e 1,2 m entre linhas, com profundidade de sulco entre 30-35 cm, seguindo o espaçamento adotado em campos comerciais. O delineamento estatístico do experimento implantado foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e sessenta repetições para cada tratamento. No campo, o mesmo ensaio foi instalado em duplicata, que é uma exigência para publicação em revista internacional. Segue em anexo (Anexo I) o croqui da área experimental.



Figura 7. A. Seleção de mudas de cana-de-açúcar para transplantar para o campo experimental; B. Organização e distribuição das mudas de cana-de-açúcar separadas por tratamentos; C. Plantio manual das mudas de cana-de-açúcar com auxílio de uma plantadeira; D. Experimento instalado no campo. E. Verificação de pegamento das mudas de cana-de-açúcar.

4.5. Coleta de dados

4.5.1. Amostragem

A coleta das amostras de cana-de-açúcar para exame diagnóstico iniciou-se a partir do momento que foi possível extrair seiva do material vegetal, constituindo assim a primeira avaliação realizada. Na primeira amostragem aos sete meses, idade contabilizada após os colmos serem submetidos a termoterapia, foram coletadas dez plantas por tratamento, sendo selecionadas aleatoriamente, totalizando sessenta plantas avaliadas.

O experimento foi instalado em duplicata separados por uma bordadura de trinta metros formada pela variedade SP89-11 15, afim de diminuir a variabilidade dos dados, visto que em cada amostragem foram coletadas apenas dez plantas de um todo de sessenta plantas por tratamento, logo as análises realizadas por data de avaliação não examinaram cem por cento do campo experimental. A cada amostragem retirou-se a cana “mãe” para realização das análises, deste modo adotou-se a estratégia de coletar apenas dez plantas a cada data de avaliação para não influenciar nas avaliações subsequentes.

Os materiais para as avaliações subsequentes foram coletados em intervalos de 30 a 35 dias. A amostragem foi realizada do mesmo modo, coletaram-se aleatoriamente dez plantas por tratamento para cada campo experimental, totalizando cento e vinte plantas analisadas. Planta uma vez amostrada e com Lxx presente no exame diagnóstico, não foi amostrada novamente, deste modo foi possível aumentar o universo de amostragem de um mesmo tratamento.

4.5.2. Detecção de Lxx

4.5.2. a) Sorológico

A análise sorológica foi possível quando as canas transplantadas para o campo atingiram idade suficiente para cortar o material (cana “mãe”) e extrair a seiva da parte basal (primeiro entre-nó após retirada do nó basal) para realização desta análise, isto aconteceu a partir de 216 dias (7 meses).

2.5.2. b) Molecular

A análise molecular foi realizada em conjunto a análise sorológica, após as plantas de cana-de-açúcar atingirem idade suficiente para que fosse possível extrair

sua seiva. Portanto, a partir do mês de maio, a diagnose realizada através da extração da seiva da cana-de-açúcar foi possível, visto que as plantas atingiram a idade para corte da “cana-mãe”, possibilitando a obtenção do material para análise. Para a extração do DNA utilizou-se material oriundo do primeiro nó basal. Este tipo de avaliação é conhecido como “avaliação destrutiva”, uma vez que há necessidade de corte total da planta de cana-de-açúcar em campo para realização das análises.

4.6. Análise de dados

4.6.1. Coeficiente de correlação (Pearson)

Para o cálculo de correlação dos dados coletados em ambos os campos (dados não apresentados), calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson separado em função do tratamento e método de diagnose. Inicialmente os dados foram analisados separados por data de coleta e posteriormente foram agrupados independentemente da data de coleta, sendo possível comparar os dois campos experimentais. O valor encontrado do coeficiente para análise sorológica na data de 216 dias (7 meses) foi de $r=0,915$ e $r=0,928$ para análise molecular, quando os dados foram agrupados o coeficiente para análise sorológica foi de $r=0,987$ e $r=0,977$ para análise molecular. Deste modo, os valores são bem próximos a $r=1$ o que significa uma correlação positiva, as variáveis analisadas estão diretamente correlacionadas (Cargnelutti Filho et al., 2011). Portanto, para a análise estatística foi utilizado os dados de ambos os campos agrupados como um dado somente, para aumentar os graus de liberdade nas análises estatísticas e aumentar a precisão do experimento (Cargnelutti Filho et al., 2009).

4.6.2. Estatística

Os dados foram analisados a partir do teste de Tukey, um dos métodos de análise de variância e comparação múltipla entre médias do experimento, a 5% de significância. Sendo analisados de duas maneiras: (a) dados obtidos em cada idade das plantas, separados por tratamento; (b) dados agrupados independentemente da idade da planta, separados por tratamento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise sorológica

A Figura a seguir (8) representa uma das membranas 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” de tonalidade mais intensa representa maior título de Lxx (10^9 UFC/mL) o que vai diminuindo gradativamente até o quinto “poço” onde a tonalidade é ausente por representar o controle negativo.

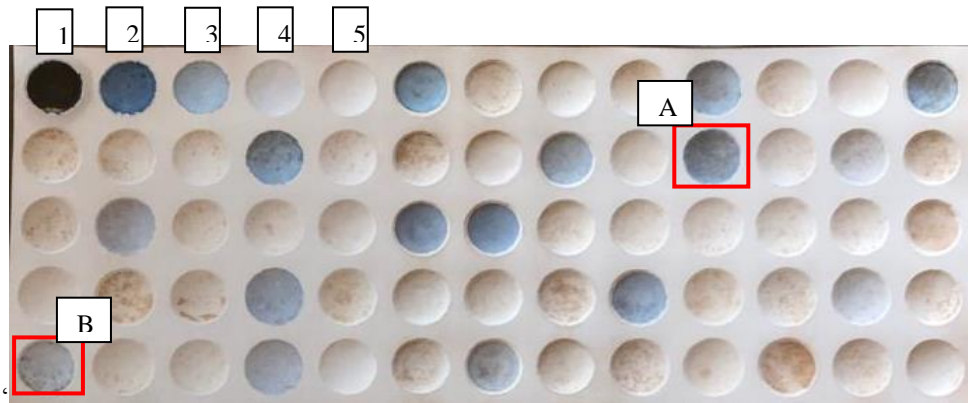


Figura 8. Foto de uma membrana resultante da análise sorológica para detecção de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx) em seivas extraídas de colmos de cana-de-açúcar, em que os cinco primeiros “poços” da membrana são os controles (poços de 1 a 4 controle positivo e poço 5 controle negativo) e os demais poços são as amostras analisadas.

O resultado desta membrana mostra a presença de Lxx em diferentes títulos em um dos campos experimentais na última data de avaliação (378 dias/ 12 meses). Os dois “poços” ressaltados na Figura 8 mostram duas amostras distintas com diferentes títulos de Lxx, sendo a primeira amostra analisada como N2 (10^8 UFC/mL) identificada pela letra “A” e a outra em destaque como N4 (10^6 UFC/mL) identificada pela letra “B”, respectivamente.

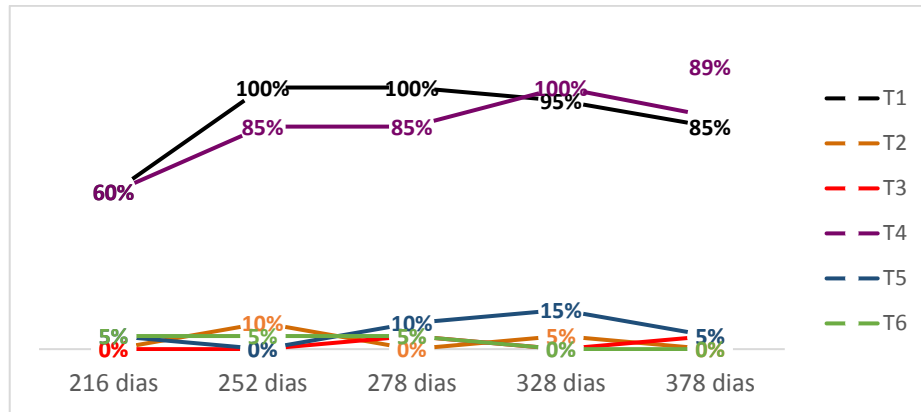


Figura 9. Incidência (em %) de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx) em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928, analisados via método sorológico em diferentes idades, com dois níveis de título, previamente submetidas a duas condições de termoterapia e sem tratamento térmico

Tabela 1. Dados relativos às respostas sorológicas em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928, analisados de forma agrupada e em estratos de diferentes idades (216-378 dias), oriunda de duas concentrações de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx), não submetidas ao tratamento térmico

Análise de variância	Sorológico						
	Idade (dias)	Geral*	216	252	278	328	378
GL resíduo	8	38	38	38	38	38	37
F tratamentos	0,18	0,1	3,35	3,35	1,00	0,17	
Média geral	0,86	0,63	0,93	0,93	0,98	0,87	
Desvio-padrão	0,16	0,5	0,26	0,26	0,16	0,34	
DMS (5%)	0,23	0,32	0,17	0,17	0,10	0,23	
CV (%)	18,36	79,37	28,01	28,01	16,22	39,28	
Teste de Tukey a 5%							
T1	0,88 a	0,60 a	1,00 a	1,00 a	0,95 a	0,85 a	
T4	0,84 a	0,60 a	0,85 a	0,85 a	1,0 a	0,89 a	

GL: graus de liberdade; DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação.
*Dados analisados de forma agrupada, independentemente da idade das plantas.

Tabela 2. Dados relativos às respostas sorológicas em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928, analisados de forma agrupada e em estratos de diferentes idades (216-378 dias), oriunda de duas concentrações de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx), previamente submetida a termoterapia de 52°C/30min

Análise de variância	Sorológico						
	Idade (dias)	Geral*	216	252	278	328	378
GL resíduo	8	38	38	38	38	38	38
F tratamentos	1,52	1	2,11	2,11	1,09	1,00	
Média geral	0,95	0,98	0,95	0,95	0,90	0,98	
Desvio-padrão	0,05	0,16	0,22	0,22	0,30	0,16	
DMS (5%)	0,07	0,10	0,14	0,14	0,19	0,10	
CV (%)	5,39	16,22	22,91	22,91	33,72	16,22	
Teste de Tukey a 5%							
T2	0,97 a	1,00 a	0,90 a	1,00 a	0,95 a	1,00 a	
T5	0,93 a	0,95 a	1,00 a	0,90 a	0,85 a	0,95 a	

GL: graus de liberdade; DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação.
*Dados analisados de forma agrupada, independentemente da idade das plantas.

Tabela 3. Dados relativos às respostas sorológicas em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928, analisados de forma agrupada e em estratos de diferentes idades (216-378 dias), oriunda de duas concentrações de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx), previamente submetida a termoterapia de 50°C/2h

Análise de variância		Sorológico				
Idade (dias)	Geral*	216	252	278	328	378
GL resíduo	8	38	38	38	38	37
F tratamentos	0,33	1	1	1	1	1,05
Média geral	0,98	0,98	0,98	0,95	1	0,97
Desvio-padrão	0,03	0,16	0,16	0,22	0	0,16
DMS (5%)	0,04	0,1	0,1	0,14	0	0,12
CV (%)	2,81	16,22	16,22	23,54	0,32	16,42
Teste de Tukey a 5%						
T3	0,98 a	1,00 a	1,00 a	0,95 a	1,00 a	0,95 a
T6	0,97 a	0,95 a	0,95 a	0,95 a	1,00 a	1,00 a

GL: graus de liberdade; DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação. *Dados analisados de forma agrupada, independentemente da idade das plantas.

Na Figura 9 foi possível observar dois grupos distintos dentre os tratamentos em relação a eficácia da termoterapia, o primeiro grupo formado pelos tratamentos que não sofreram termoterapia (T1 e T4) e o segundo grupo formado pelos tratamentos que sofreram termoterapia (T2, T3, T5 e T6). Outro ponto observado foi que os dados de todos os tratamentos mostraram que não houve diferença estatística, a partir da realização de um dos testes de comparação múltipla, o teste de Tukey, com 5% de significância, entre baixo e alto título de Lxx (Tabela 1), uma vez que os resultados apresentaram a mesma letra “a” e ao analisar a Figura 9 as linhas seguem uma mesma tendência de presença da bactéria, independente do título de Lxx.

Nos tratamentos sem termoterapia (T1 e T4) nota-se que não houve diferença na detecção de Lxx para as idades de 252 dias e 278 dias (8 meses e 9 meses, respectivamente) entre os tratamentos, não seguindo a mesma tendência de presença de Lxx como nas outras idades. Tal fator pode ser explicado pela amostragem das plantas, uma vez que no início do experimento foi realizada a avaliação somente da seiva oriunda do entre-nó basal, o resultado encontrado (título de Lxx) foi considerado o mesmo para o colmo todo. Assim sendo, existe a possibilidade de terem sido plantadas gemas apicais supondo que estavam com o mesmo título de Lxx igualmente a parte basal da planta, porém tal fato não foi comprovado, o que justifica também as discrepâncias dos resultados entre as idades da planta de um mesmo tratamento. Isso porque um estudo mostrou que houve diferença entre os títulos de Lxx entre a gema basal e apical de um mesmo tolete (Torquesi et al., 2019), logo tal fato pode justificar

a ocorrência desta pequena variação entre os mesmos tratamentos, uma vez que há possibilidade da planta analisada ser oriunda da gema basal ou apical. Nas outras datas de avaliação não houve diferença entre os resultados obtidos através da análise sorológica, quando outras plantas do mesmo tratamento foram analisadas, como pode ser visto na Tabela 1 a partir dos resultados que apresentaram a mesma letra “a”, ou seja, não houve diferença estatística entre os dados analisados.

Quando os dados foram examinados como tendência (Figura 9), desde a primeira data de avaliação 216 dias (7 meses) a termoterapia mostrou eficiência no controle de Lxx. Do mesmo modo que os dados dos tratamentos sem termoterapia seguem uma linha de tendência de presença de Lxx, independente das concentrações, os dados do segundo grupo (T2, T3, T5 e T6), plantas que sofreram termoterapia em diferentes condições, também seguem uma linha de tendência de presença de Lxx, independente das concentrações, uma vez que na última data de avaliação (378 dias/ 12 meses) todos os tratamentos tenderam para o mesmo ponto, validando os dados obtidos nas outras datas de avaliação. Para as duas condições de termoterapia (50°C/2h e 52°C/30min) não houve diferença estatística, como mostrado na Tabela 2 e Tabela 3. Para o tratamento T5 (plantas com alto título de Lxx e termoterapia de 52°C/30min) na data de 328 dias (10 meses) observa-se uma discrepância dos dados comparado a tendência de baixa presença de Lxx dos demais tratamentos, independente do título de Lxx, tal fator também pode ser entendido como plantas oriundas de gemas apicais, contendo diferentes títulos de Lxx das demais plantas tratadas e amostradas.

A análise sorológica é a mais usada quando as próprias usinas produzem os materiais propagativos. O método do “dot blot” além de ser economicamente mais viável, contribui para facilidade de logística, uma vez que para identificar a doença em determinada planta de um determinado talhão é necessário o envio apenas da seiva para o laboratório que realizará as análises e não o material vegetal por completo, reduzindo os custos de frete. A capacidade de processamento das análises é maior por ser um método mais simples e prático, envolvendo menor quantidade de etapas quando comparado ao método molecular. Também pode-se citar o melhor custo benefício para usina em relação ao maior número de amostras a serem diagnosticadas.

A taxa de incidência de Lxx variou de 25 a 68% em todas as variedades estudadas no Brasil (Urashima et al., 2017), tendo em vista que 67,1% das mudas são

oriundas de campos comerciais (sem termoterapia) em oposição a 7,5% de mudas oriundas de MPB e que passaram pelo processo de tratamento térmico (Braga Jr., 2020), a preocupação permanece visto que a maioria das amostras que são enviadas para análises de RSD é diagnosticado com Lxx, que provavelmente serão utilizadas como materiais de propagação e, conseqüentemente, retiradas dos campos comerciais mais produtivos, reforçando ainda mais a ideia de que a incidência da doença em campos brasileiros é desconhecida e ainda maior (Urashima; Marchetti, 2013).

Portanto, a diferença significativa foi observada na presença ou ausência do tratamento térmico, independentemente da concentração de Lxx e das condições de termoterapia, tal fato é confirmado estatisticamente uma vez que os dados não se diferiram (representados pela mesma letra “a”). O ponto chave para sucesso no controle do RSD é a realização da termoterapia, independente das condições.

5.2. Análise molecular

A Figura a seguir (10) representa uma das fotos do gel resultante da análise molecular, onde no primeiro “poço” está o “marcador de referência” para identificação do tamanho do fragmento de DNA detectado (presença de banda), funcionando como uma “régua”, e nos demais “poços” encontram-se as amostras.

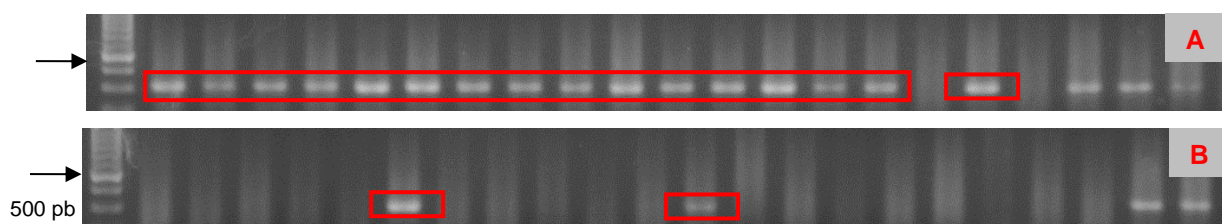


Figura 10. Foto do gel resultante da análise molecular, ilustrando o produto da PCR (Polymerase Chain Reaction) amplificado para identificação de mudas de cana-de-açúcar com *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx), sendo possível visualizar fragmento de DNA da bactéria nos poços devidamente identificados; os últimos poços que apresentam fragmento de DNA são os controles positivos validando a presença do patógeno (A. Amostras não tratadas termicamente com alto título de Lxx; B. Amostras tratadas a 52°C/30 min. com alto título de Lxx).

No item A é possível observar fragmentos de DNA de Lxx presente nas amostras do tratamento T4 (alto título de Lxx e sem termoterapia) na última data de avaliação (378 dias/ 12 meses), em oposição ao item B que representa amostras do tratamento T5 (alto título de Lxx e termoterapia de 52°C/30 min.), deixando evidente a eficácia do tratamento térmico para o controle da bactéria.

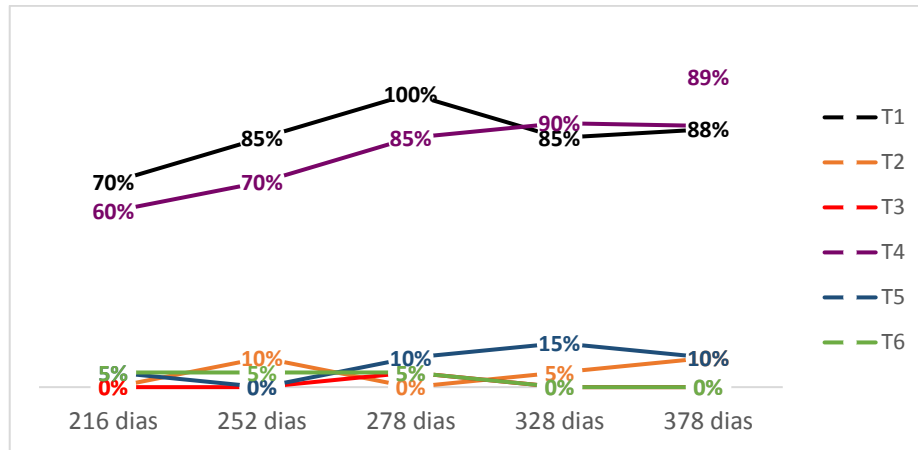


Figura 11. Incidência (em %) de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx) em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928, analisados via método molecular em diferentes idades, com dois níveis de título, previamente submetidas a duas condições de termoterapia e sem tratamento térmico

Tabela 4. Dados relativos às respostas moleculares em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928, analisados de forma agrupada e em estratos de diferentes idades (216-378 dias), oriunda de duas concentrações de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx), não submetidas ao tratamento térmico

Análise de variância	Molecular						
	Idade (dias)	Geral*	216	252	278	328	378
GL resíduo	8	38	38	38	38	38	34
F tratamentos	0,68	0,11	1,27	3,35	0,22	1,74	
Média geral	0,83	0,68	0,78	0,93	0,88	0,78	
Desvio-padrão	0,11	0,48	0,42	0,26	0,34	0,42	
DMS (5%)	0,16	0,31	0,27	0,17	0,22	0,28	
CV (%)	13,44	71,09	54,38	28,01	38,67	53,65	
Teste de Tukey a 5%							
T1	0,86 a	0,70 a	0,85 a	1,00 a	0,85 a	0,88 a	
T4	0,80 a	0,65 a	0,70 a	0,85 a	0,90 a	0,89 a	

GL: graus de liberdade; DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação. *Dados analisados de forma agrupada, independentemente da idade das plantas.

Tabela 5. Dados relativos às respostas moleculares em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928, analisados de forma agrupada e em estratos de diferentes idades (216-378 dias), oriunda de duas concentrações de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx), previamente submetida a termoterapia de 52°C/30min

Análise de variância	Molecular						
	Idade (dias)	Geral*	216	252	278	328	378
GL resíduo	8	38	38	38	38	38	38
F tratamentos	0,78	1	2,11	2,11	1,09	1,10	
Média geral	0,94	0,98	0,95	0,95	0,90	0,90	
Desvio-padrão	0,05	0,16	0,22	0,22	0,30	0,31	
DMS (5%)	0,08	0,1	0,14	0,14	0,19	0,20	
CV (%)	5,73	16,22	22,91	22,91	33,72	34,20	
Teste de Tukey a 5%							
T2	0,95 a	1,00 a	0,90 a	1,00 a	0,95 a	0,90 a	
T5	0,92 a	0,95 a	1,00 a	0,90 a	0,85 a	0,90 a	

GL: graus de liberdade; DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação. *Dados analisados de forma agrupada, independentemente da idade das plantas.

Tabela 6. Dados relativos às respostas moleculares em colmos de cana-de-açúcar da variedade RB 866928, analisados de forma agrupada e em estratos de diferentes idades (216-378 dias), oriunda de duas concentrações de *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx), previamente submetida a termoterapia de 50°C/2h

Análise de variância	Molecular						
	Idade (dias)	Geral*	216	252	278	328	378
GL resíduo	8	38	38	38	38	38	38
F tratamentos	1,60	1	1	1	1	1	1
Média geral	0,98	0,98	0,98	0,95	1	1	
Desvio-padrão	0,02	0,16	0,16	0,22	0	0	
DMS (5%)	0,04	0,1	0,1	0,14	0	0	
CV (%)	2,55	16,22	16,22	23,54	0,32	0,32	
Teste de Tukey a 5%							
T3	0,99 a	1,00 a	1,00 a	0,95 a	1,00 a	1,00 a	
T6	0,97 a	0,95 a	0,95 a	0,95 a	1,00 a	1,00 a	

GL: graus de liberdade; DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação. *Dados analisados de forma agrupada, independentemente da idade das plantas.

Na Figura 11 é possível observar dois grupos distintos dentre os tratamentos em relação a eficiência da termoterapia, o primeiro grupo formado pelos tratamentos que não sofreram termoterapia (T1 e T4) e o segundo grupo formado pelos tratamentos que sofreram termoterapia (T2, T3, T5 e T6). Outro ponto a ser observado, de modo geral, é que os dados mostraram que não houve diferença estatística entre baixo e alto título de Lxx (Tabelas 4, 5 e 6), uma vez que as linhas de porcentagem de incidência seguem uma mesma tendência para presença da bactéria, não diferenciando pelo título de Lxx.

Na Figura 11, nota-se que entre os tratamentos T1 e T4 (baixo e alto título de Lxx e sem termoterapia) nas três primeiras datas de avaliação (216, 252 e 278 dias/7, 8 e 9 meses) mostraram dados não esperados, ou seja, espera-se detectar Lxx em maior porcentagem em plantas de cana-de-açúcar com altas concentrações da bactéria (alto título). Porém ao realizar a análise dos dados a partir do teste de comparação múltipla (Tabela 4), pode-se confirmar que não houve diferença estatística entre os tratamentos (letras iguais para todas as idades amostradas) mesmo apresentando porcentagens de incidência em diferentes proporções. Para os tratamentos T2, T5 (plantas com baixo e alto título de Lxx e termoterapia de 52°C/30min), T3, e T6 (plantas com baixo e alto título de Lxx e termoterapia de 50°C/2h) não houve diferença estatística entre eles apresentando a mesma letra (“a”) em todas as datas analisadas, seguindo a linha de tendência de presença da bactéria, independente do título de Lxx. Sabe-se que para validação de experimentos em

campo é utilizado o coeficiente de variação (CV) como parâmetro para validação dos resultados obtidos com valores de até 15% (boa precisão) e até 20% (precisão regular), deste modo, os valores de CV dos tratamentos estão dentro do esperado para ensaios agrícolas de campo quando analisados de forma agrupada independentemente da idade da planta, o que traz maior precisão e confiabilidade para os dados do experimento (Silva et al., 2011).

A análise molecular é difundida pela sua capacidade de detecção, ou seja, trata-se de uma técnica com maior sensibilidade para identificação de Lxx. Porém os custos com esta tecnologia são maiores, desde o valor por análise do material até o frete, uma vez que para realização da análise é necessário o envio do material vegetal para extração de seu DNA e não apenas a seiva advinda da gema basal, como no método sorológico.

Empresas que possuem viveiros de mudas com plantas matrizes optam por análises mais sensíveis como a do PCR (Polymerase Chain Reaction), uma vez que a quantidade de plantas analisadas é menor e é utilizada como material vegetal para multiplicação (formação de MPB), tornando-se viável o investimento financeiro com esta análise, que garante a sanidade das mudas e evita a disseminação da doença, razão pela qual esse método diagnóstico é recomendado (Landell et al., 2012).

Assim sendo, tem-se dois métodos distintos de diagnose que não competem no mercado, cada qual com sua especificidade e finalidade particular. O método sorológico, mais barato e prático, vai continuar tendo a preferência das usinas por todas as vantagens que o método traz em relação a logística e custo a partir do volume de material a ser analisado. No atual cenário canavieiro, considerando os antecedentes adotados pelas usinas, é de presumir-se que dificilmente novos métodos de diagnose sejam adotados, tendo em vista que algum dia as análises via “dot blot” podem não ser mais uma opção no mercado, acredita-se que seja pouco provável que os produtores adotarão outro método de diagnose como, por exemplo, o molecular, mas sim podem optar a multiplicar mudas de cana-de-açúcar sem diagnóstico prévio por conta do alto custo que outro tipo de análise agregaria ao sistema produtivo como um todo.

Por outro lado, o método molecular continuará tendo a preferência e sendo utilizado para diagnose em plantas matrizes, que demanda um pequeno volume de material a ser analisado e serão utilizadas por um período de tempo maior quando comparado aos toletes. Para empresas que produzem MPB de cana é fundamental

produzir mudas isentas de quaisquer tipos de doenças para garantir a sanidade e qualidade do material que está sendo comercializado.

Logo, independentemente do método de diagnose a ser utilizado é crucial que haja exames diagnósticos de sanidade para detecção de RSD e termoterapia para controle de Lxx, uma vez que estudos já mostraram que ao comparar três safras de cana-soca houve uma redução média de 22% na produtividade (Matsuoka, 1984).

6. CONCLUSÃO

- A termoterapia foi importante para controle de RSD, independentemente da idade de amostragem da planta, título de Lxx e do método de detecção;
- As duas condições de termoterapia apresentou escape de Lxx;
- Lxx foi detectada já a partir do sétimo mês, independentemente da concentração de Lxx no material vegetal;
- O escape da termoterapia foi detectado pelos dois métodos de diagnose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida J, Urashima A (2014). Resistance of Brazilian cultivars to ratoon stunting disease measured by sugarcane leaves. *Phytopathology* 104 (Suppl 3):S3.6.

Bailey RA, Bechet GR (1997). Further evidence of the effects of ratoon stunting disease on production under irrigated and rainfed conditions. *Proc. S. Afr. Sugar Technol. Assoc.* 71:97-101.

Barbosa, V. F. A. M. (2013). Sistemas de plantio. In: F. Santos, A. Borém (Eds), *Cana-de-açúcar: Do plantio à colheita* (pp. 27-48). Viçosa, MG.

Braga Jr, R. L. C., Landell, M. G. A., Xavier, M. A. (2020). MPB se consolida como importante ferramenta para produtores de cana. *RPA News*. <<https://revistarpanews.com.br/mpb-se-consolida-como-importante-ferramenta-para-produtores-de-cana>>. Acesso: 07/01/21.

Cargnelutti Filho A, Lúcio AD, Lopes SJ (2009). *Experimentação agrícola e florestal*. Santa Maria: UFSM/ CCR/ Departamento de fitotecnia, 204 pp. Disponível em: <http://w3.ufsm.br/cargnelutti/EXPERIMENTACAO_AGRICOLA_E_FLORESTAL_A5_web.pdf>. Acesso 18/08/2020.

Cargnelutti Filho A, Lopes SJ, Toebe M, Silveira TR, Schwantes IA (2011). Tamanho de amostra para estimação do coeficiente de correlação de Pearson entre caracteres de *Crambe abyssinica*. *Revista Ciência Agronômica* 42: 149-158.

Carvalho G, Silva TGER, Munhoz AT, Monterio-Vitorello CB, Azevedo RA, Meloto M, Camargo LEA (2016). Development of a qPCR for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and quantification of the effects of heat treatment of sugarcane cuttings on Lxx. *Crop Protection* 80:51-55.

Chapola RG, Fernandes Jr AR, Cursi DE, Hofmann HP (2016). Censo de variedades de cana-de-açúcar nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul em 2015. *STAB* 34:37-39.

Comstock JC (2002). Ratoon stunting disease. *Sugar Tech* 4:1-6.

Conab, Companhia Nacional de Abastecimento (2009). Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2009 - Primeiro levantamento / Abril 2009.

Conab, Companhia Nacional de Abastecimento (2017). Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2017/2018 – Segundo levantamento anual. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/cana/safra/conab-2-levantamento-safra-2017-18-cana-de-acucar-240817>>. Acesso: 15/08/2020.

Conab, Companhia Nacional de Abastecimento (2020). Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2020 – Terceiro levantamento / Dezembro 2020.

Coury, R. (2019) Meiosi ganha força como alternativa para aumentar produtividade dos canaviais. NovaCana.com. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/cana/plantio/meiosi-forca-alternativa-aumentar-produtividade-canaviais-300419>>. Acesso: 07/01/21.

Damann Jr KE, Benda GTA (1983). Evaluation of commercial heat-treatment methods for control of ratoon stunting disease. *Plant Disease* 67:966-967.

Davis MJ, Bailey RA (2000). Ratoon stunting. In: Rott P, Bailey JC, Comstock JC, Croft BJ, Saumtally S. (Eds.), *A guide to sugarcane diseases*. ISSCT and CIRAD Publications, Montpellier, France, pp. 49-54.

Fegan M, Croft BJ, Teakle DS, Hayward AC, Smith GR (1998). Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. *Plant Pathology* 47:495-504, 1998.

Fernandes Jr AR, Ganem Jr EJ, Marchetti LBL, Urashima AS (2010). Avaliação de diferentes tipos de tratamento térmico no controle do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar. *Tropical Plant Pathology* 35:60-64.

Fiesp, Federação das Indústrias do Estado de São Paulo, (2020). Informativo Deagro, novembro de 2020 - Balança comercial do agronegócio: consolidado de 2020. Disponível em: <<http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/balanca-comercial>>. Acesso: 05/01/2021.

Gagliardi, PR, Camargo LEA (2009). Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. *Ciência Rural* 39:1222-1226.

Gillaspie AG, Teakle DS (1989). Ratoon stunting disease. In: Ricaud C, Egan BT, Gillaspie Jr AG, Hughes CG (Eds.), *Diseases of sugarcane: Major diseases*. Elsevier Sciences Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 59-74.

Grisham MP (1991). Effect of ratoon stunting disease on yield of sugarcane grown in multiple three-year plantings. *Phytopathology* 81:337-340.

Grisham MP (2004). Ratoon stunting disease. in: Rao, G.P., Saumtally, A.S., Rott, P. (Eds), *Sugarcane Pathology: Bacterial and Nematodes Diseases*. Science Publishers, Enfield, pp. 77-96.

Grisham MP, Pan YB, Richard Jr EP (2007). Early detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. *Plant Disease* 91:430-434.

Hoy JW, Grisham MP, Damann KE (1999). Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. *Plant Disease* 83:1170-1175.

Landell, M. G. A., Campana, M. P., Figueiredo, P., Xavier, M. A., Anjos, I. A., Dinardo-Miranda L. L. et al. (2012). Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de

mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. Documento IAC No. 109, Instituto Agrônomo Campinas, 16pp. <https://www.udop.com.br/ebiblio/pagina/arquivos/2013_sistema_multiplicacao_cana_com_mudas_pre_brotadas.pdf>. Acesso: 07/01/21.

Leaman TM, Teakle DS, Croft BJ (1991). Comparison of serological diagnostic tests for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of ratoon stunting disease in sugarcane. *Proceedings of Australian Society of Sugar Cane Technologists* 13:88-94.

Matsuoka S (1984). Benefícios da prática de tratamento térmico de mudas de cana-de-açúcar e eficiência dos métodos existentes no Brasil. *Cadernos Planalsucar*, Piracicaba, n.3, p. 22-24.

Oliveira D, Urashima AS (2018). Detecção de *Leifsonia xyli subsp. xyli* em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. *Summa Phytopathol*, Botucatu, v. 44, n. 3, p. 223-228.

Pan YB, Grisham MP, Burner DM, Damann Jr KE, Wei Q (1998). A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. *Plant Disease* 82:285-290.

Pelosi CS, Lourenço MV, Silva M, Santos AZ, França SC, Marins M (2013). Development of a Taqman real-time PCR assay for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Tropical Plant Pathology* 38:343-345.

Ponte EC, Silveira SF, Carneiro Jr JB, Lima RMP (2010). Incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em áreas de multiplicação de cana-de-açúcar no Espírito Santo, sul da Bahia e oeste de Minas Gerais. *Summa Phytopathologica* 36:313-321.

Sanguino A, Moraes VA, Campos JDP, Fernandes CR (1988). O controle do raquitismo-da- soqueira da cana-de-açúcar. *Fitopatologia Brasileira* 13:97.

Silva AR, Cecon PR, Rêgo ER, Nascimento M (2011). Avaliação do coeficiente de variação experimental para caracteres de frutos de pimenteiras. *Rev. Ceres* 58: 168-171.

Sindipeças, Sindicato Nacional da Indústria de Componentes para Veículos Automotores, 2020. Relatório da Frota Circulante. Disponível em: <https://www.sindipeças.org.br/sindinews/Economia/2020/RelatorioFrotaCirculante_Abril_2020.pdf >. Acesso: 05/01/2021.

Taylor PWJ, Petrasovits LA, Van Der Velde R, Birch RG, Croft BJ, Fegan M, Smith GR, Brumbley SM (2003). Development of PCR-based markers for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in fibrovascular fluid of infected sugarcane plants. *Australasian Plant Pathology* 32:367-375.

Tokeshi H, Rago A (2016). Doenças da cana-de-açúcar. In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (eds.). *Doenças das plantas cultivadas, Agrônoma Ceres*, Ouro Fino, MG, pg: 219-231.

Torquesi JG, Coraini NF, da Silva MF, Urashima AS (2019). Inter- and intra- stalk distribution of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane plants. Anais do Congresso Brasileiro de Fitopatologia p.121. Disponível em: <<http://www.cbfito2019.com.br/files/cbf- anais-final2.pdf>>. Acesso: 07/01/21.

Unica, União da Indústria da Cana-de-açúcar (2020). A Bioeletricidade gerada a partir da cana-de-açúcar é a 4º fonte mais importante da matriz elétrica brasileira. Disponível em: <<https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/bioeletricidade/>>. Acesso: 05/01/2021.

Urashima AS, Ganem Jr EJ, Marchetti LBL, Gagliardi PR (2010). Prevalence of *Leifsonia xyli* subsp *xyli* in sugarcane crops from São Paulo State. *Summa Phytopathologica* 36:322-328.

Urashima AS, Marchetti LBL (2013). Prevalence and severity of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* infection of sugarcane in São Paulo state, Brazil. *Journal of Phytopathology* 161:478-484.

Urashima AS, Silva MF, Correa JJ, Moraes MC, Singh EC, Smith EC, Sainz MB (2017). Prevalence and severity of ratoon stunt in commercial Brazilian sugarcane fields. *Plant Disease* 101:815-821.

Urashima, A. S., Silva, M. F., Coraini, N. F., Gazaffi, R. (2020). Temporal incidence of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane propagating materials of Brazilian cultivars. *Crop Protection*, 128, 104976 (doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104976).

Viswanathan R (2004). Serodiagnosis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* causing ratoon stunting disease in sugarcane. In: Rao GP, Saumtally AS, Rott P. (Eds) *Sugarcane Pathology: Bacterial and Nematodes Diseases*, vol.III. Science Publishers Inc., Enfield, pp. 155-173.

Weiner R, Clingan G (2012). Brazil is zooming ahead on ethanol. *The Miami Herald*. Posted 9 Agosto 2012.

Zekarias Y, Yirefu F, Baissa T, Tafesse A, Mengistu L (2012). Effect of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* concentration on yields of four sugarcane varieties in the sugarcane plantations of Ethiopia. *Ethip. J. Appl. Sci. Technol.* 3:25-30.

ANEXO I

T6	T2	T1	T3	T4	T5	T6	T2	T1	T3	T4	T5	T6	T2	T1	T3	T4	T5	T6	T2	T1	T3	T4	T5	T6	T2
T1	T3	T4	T6	T2	T1	T4	T6	T5	T6	T5	T2	T1	T3	T4	T5	T6	T2	T3	T4	T2	T3	T5	T1	T2	T6
T6	T2	T4	T3	T1	T5	T6	T2	T1	T3	T5	T4	T6	T2	T3	T1	T4	T2	T6	T5	T1	T4	T2	T3	T6	T5
T3	T6	T1	T2	T6	T2	T5	T1	T4	T6	T2	T6	T5	T3	T4	T3	T1	T5	T2	T4	T3	T5	T6	T2	T4	T1
T6	T2	T1	T5	T4	T5	T6	T2	T1	T3	T4	T5	T6	T2	T1	T3	T4	T5	T6	T2	T1	T3	T4	T5	T6	T2
T2	T6	T3	T2	T6	T1	T5	T4	T2	T6	T3	T1	T4	T5	T2	T3	T4	T1	T6	T5	T4	T6	T5	T2	T3	T1
T1	T4	T6	T5	T3	T2	T6	T2	T1	T4	T2	T5	T6	T4	T3	T2	T1	T6	T5	T4	T3	T2	T1	T5	T6	T3
T3	T6	T2	T1	T4	T5	T6	T2	T1	T3	T4	T5	T6	T2	T1	T3	T4	T5	T6	T2	T1	T3	T4	T5	T6	T2
T4	T1	T5	T3	T6	T1	T2	T5	T4	T6	T3	T2	T5	T4	T6	T5	T1	T3	T2	T6	T2	T6	T3	T2	T1	T4
T1	T3	T4	T5	T6	T2	T6	T2	T4	T5	T3	T6	T1	T3	T6	T2	T5	T1	T2	T4	T3	T1	T4	T5	T6	T2
T6	T2	T5	T3	T4	T1	T2	T4	T6	T1	T2	T3	T6	T5	T1	T2	T6	T3	T5	T4	T6	T1	T3	T2	T4	T5
T4	T1	T2	T5	T4	T3	T2	T1	T3	T5	T6	T4	T1	T2	T4	T5	T4	T6	T1	T2	T3	T5	T4	T3	T2	T6
T5	T4	T3	T1	T3	T5	T1	T4	T5	T1	T3	T5	T6	T1	T5	T3	T4	T3	T5	T4	T1	T3	T6	T1	T5	T4
						T4	T1	T5	T4	T3	T5	T1	T3	T1	T5	T3	T4	T1	T3	T4	T3	T1	T5	T4	T1