

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CATIANA REGINA BRUMATTI**

**COMPORTAMENTO DE VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR  
(*SACCHARUM SPP.*) EM INOCULAÇÕES COM DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE *LEIFSONIA XYLI* SUBSP. *XYLI*.**

**SÃO CARLOS  
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPG-  
BIOTEC**

**CATIANA REGINA BRUMATTI**

**COMPORTAMENTO DE VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR  
(*SACCHARUM SPP.*) EM INOCULAÇÕES COM DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE *LEIFSONIA XYLI* SUBSP. *XYLI*.**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia para a obtenção  
do título de Mestre em Biotecnologia. Área de  
concentração: Biotecnologia**

***Orientadores:*  
Prof. Dr. Marcos Antônio Sanches Vieira  
Prof. Dr. Flávio Henrique Silva**

**SÃO CARLOS  
2010**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B893cv

Brumatti, Catiana Regina.

Comportamento de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) em inoculações com diferentes concentrações de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. / Catiana Regina Brumatti. -- São Carlos : UFSCar, 2011.  
84 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Biotecnologia. 2. Raquitismo da soqueira. 3. Sacarose.  
4. Resistência. I. Título.

CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

**Catiana Regina Brumatti**

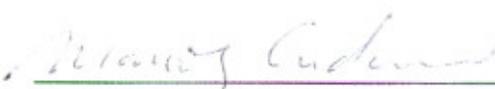
Dissertação de Mestrado submetida  
à Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

**Aprovado em: 30/09/2010**

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcos Antônio Sanches Vieira (Orientador)  
(CCA/UFSCar)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Flávia Cristina Sossae  
(UNIARA)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcos Arduin  
(DB/UFSCar)

*A Deus, meu guia.*

Dedico àqueles que marcaram e marcam minha vida, sem os quais nada do que fiz teria sido possível.

*A meus pais, Claudete e Elpídio,  
A meus irmãos, Márcio e Adriel,  
A minha avó Valdomira.*

## **Agradecimentos**

*Meus sinceros agradecimentos...*

*... a minhas cunhadas Rose e Drieli pela confiança e apoio;*  
*... aos meus sobrinhos Arthur e Ana Clara pelo carinho;*  
*... à Francisco, pelo cuidado e paciência;*  
*... a meus orientadores Marcos e Flávio;*  
*...aos amigos que moram em meu coração em especial as amigas Varlene, Stela e Elisabete;*  
*... ao incansável companheiro Plínio Zavaglia pelo conhecimento transmitido;*  
*ao professor Norberto pelos sábios ensinamentos;*  
*... ao Prof. Dr. Alfredo Seiti Urashima pelo exemplo de trabalho;*  
*...ao Prof. Márcio Soares que em poucas horas mostrou conhecimento e dedicação ao ensino;*  
*... à amiga e companheira Lauricema Marchetti;*  
*... aos companheiros de laboratório: Nathália, Analucia, Maria Luiza, Vanessa, Adriana e*  
*aos várias estagiários que passaram pelo Lagem;*  
*... aos amigos Evandro (Arface), Daiane (Lança), Aline (Garapa), Vanessa (Pérpétua,*  
*Nathália (Cabana) e Waleska (Kutia) pela amizade;*  
*...aos amigos do PPGBiotec em especial Prof. Fernando, Livia, Camila, Simone, Ana*  
*Carolina, Estevão, Henrique, Mateus e Fernanda;*  
*... à Antônio (Toninho) e João Ricardo (Flor) pela ajuda em meus árduos trabalhos de*  
*campo;*  
*...a todos os técnicos do PMGCA em especial Carlos, José Cioffi, Gustavo, Stênio, e Sandro;*  
*... a todos do Centro de Ciências Agrárias pelo companheirismo diário;*  
*... aos técnicos e funcionários do PMGCA ;*  
*... aos funcionários das usinas envolvidas nos projetos, Usina Santa Fé e Usina da Barra, em*  
*especial: Emerson Bazani, Gêrsio e Sebastião;*  
*... a todo pessoal de campo que cultivou e colheu os frutos deste trabalho;*  
*... a bibliotecária Maria Helena pelo auxílio valioso*  
*todos que passaram pela minha vida.*

*“A gente só conhece bem as coisas que cativou (...) os homens não têm mais tempo de conhecer coisa alguma. Compram tudo já pronto nas lojas. Mas como não existem lojas de amigos, os homens não têm mais amigos. Se tu queres um amigo, cativa-me!”*

*Antoine de Saint-Exupéry*

## RESUMO

### **Comportamento de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) em inoculações com diferentes concentrações de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.**

A cana-de-açúcar é uma planta semi perene considerada atualmente uma das mais importantes culturas agrícolas no mundo devido a sua capacidade de produzir energia renovável (álcool) e açúcar. A qualidade do solo, a disponibilidade de água e principalmente a temperatura são os principais efeitos que tornaram o Brasil o maior produtor mundial. Entretanto alguns fatores interferem na produtividade dos canaviais principalmente as doenças. Dentre elas podemos citar o raquitismo-das-soqueiras causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* mundialmente conhecido por causar perdas que podem chegar a 30% na produtividade. A disseminação de mudas contaminadas e a ausência de sintomas externos tornam difícil sua diagnose sendo necessário o uso de técnicas laboratoriais. Termoterapia, limpeza de material de corte com soluções detergentes e uso de variedades resistentes são as principais medidas para conter a doença. Devido a sua fácil disseminação e as altas taxas de redução na produtividade o objetivo deste trabalho foi avaliar como o efeito de quatro diferentes concentrações de Lxx, durante quatro cortes, afetaria as interações variedades x cortes x concentração bacteriana. Além de avaliar possíveis perdas nas variáveis tecnológicas e a confiabilidade do teste de Dot blot em relação ao PCR a partir da extração de DNA de acordo com o protocolo de CTAB. Os dados analisados mostraram que não houve redução significativa na produtividade das variedades em nenhuma das quatro diferentes concentrações bacterianas inclusive nas plantas testemunhas, assim como nas variáveis tecnológicas em estudo. De acordo com os dados a técnica de Dot blot mostrou-se mais sensível que a do PCR nas condições empregadas neste trabalho.

**Palavras-chave:** Raquitismo-das-soqueiras, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, comportamento de variedades.

## ABSTRACT

### **Performance of varieties of sugarcane (*Saccharum* spp.) inoculated with different concentrations of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.**

The sugar cane is a semiperennial plant currently considered one of the most important crops in the world due to its ability to produce renewable energy (ethanol) and sugar. The soil quality, water availability and temperature are the main effects that made Brazil the largest producer. However some factors influence the sugarcane productivity, mainly diseases. Among them we can cite the ratoon stunting disease caused by the bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* worldwide known to cause up-to-30% losses in the productivity. The spread of infected seedlings and the absence of external symptoms make it difficult to diagnose and require the use of laboratory techniques. Thermotherapy, cutting-material cleaning with detergent solutions and the use of resistant varieties are the key measures to contain the disease. Due to its easy spread and high rates of reduction in the productivity the objective of this study was to evaluate how the effect of four different concentrations of Lxx for four cuts, would affect the interaction varieties x cuts x bacterial concentration. Therefore it evaluates possible losses on the technological variants and the reliability of Dot blot test for the PCR from DNA extraction according to the protocol of CTAB. The analyzed data showed no significant reduction in varieties productivity in none of the four different bacterial concentrations including the control plants, as well as in technological variables on study. According to data the Dot blot technique was more sensitive than the PCR conditions utilized in this study.

**Key words:** ratoon-stunting disease, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, performance of varieties

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição geográfica da área de cana-de-açúcar e número de produtores no estado de São Paulo .....	12
Figura 2 - Composição tecnológica da cana-de-açúcar .....	16
Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura da bactéria <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> estirpe CTCB07.....	19
Figura 4 - Sintomas internos e externos associados ao raquitismo-das-soqueiras .....	21
Figura 5 – Localização do município de Nova Europa no centro do estado de São Paulo, local de implantação do experimento .....	26
Figura 6 - Índices pluviométricos registrados mensalmente no período em estudo.....	40
Figura 7 - Médias anuais dos quatro cortes realizados entre os anos de 2007 e 2010 no local do experimento .....	40
Figura 8 - Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	42
Figura 9 - Exame diagnóstico de raquitismo-das-soqueiras por Dot Blot na variedade CB49260.....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cronograma do experimento .....	27
Tabela 2 - Características agroindustriais das variedades RB selecionadas para o estudo .....	28
Tabela 3 - Parcelas do experimento e respectivas inoculações .....	31
Tabela 4 - Iniciadores utilizados para amplificar uma região intergênica do DNA ribossomal de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> .....	38

## SUMÁRIO

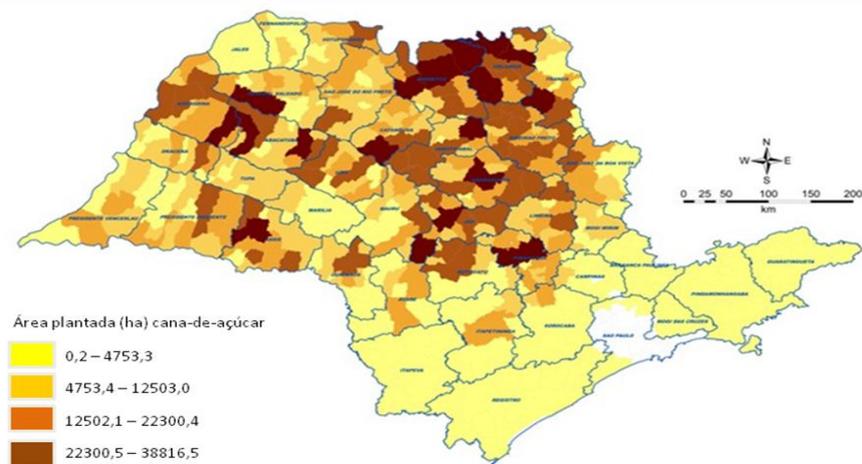
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>15</b>
2.1 Revisão Bibliográfica .....	15
2.1.1 Cana-de-açúcar .....	15
2.1.1.1 Composição da cana-de-açúcar .....	16
2.1.2 Classificação Botânica .....	17
2.1.3 História do raquitismo das soqueiras (RSD) .....	17
2.1.4 Biologia da bactéria <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> .....	18
2.1.5 Sintomas do RSD .....	20
2.1.6 Transmissão .....	21
2.1.7 Diagnose .....	22
2.1.8 Controle e prevenção do patógeno .....	23
2.2. Métodos de detecção .....	24
2.2.1 Dot Blot .....	24
2.2.2 PCR (“Polimerase Chain Reaction”) .....	25
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1 Características gerais do experimento .....	26
3.1.1 Área experimental .....	26
3.1.2 Instalação do experimento .....	27
3.2 Características das variedades utilizadas .....	27
3.2.1 Variedade RB72454 .....	28
3.2.2 Variedade RB855453 .....	29
3.2.3 Variedade RB855536 .....	29
3.2.4 Variedade RB867515 .....	29
3.2.5 Variedade RB928064 .....	29
3.2.6 Variedade RB925345 .....	30
3.2.7 Variedade RB925268 .....	30
3.3 Disposição do experimento .....	30
3.4 Histórico de chuvas durante os anos do experimento.....	31

3.5 Análise de solo .....	31
3.6 Coleta de material em campo .....	32
3.7 Determinações e cálculos .....	34
3.7.1 Cálculos químico-tecnológicos .....	34
3.7.2 Cálculo de TCH.....	35
3.8 Análises laboratoriais .....	35
3.8.1 Análise de “Dot blot enzyme immunoassay” .....	35
3.8.2 Material utilizado na extração de DNA do caldo .....	36
3.8.3 Extração de DNA da bactéria <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> .....	37
3.8.4 Reação de PCR .....	37
3.9. Análise estatística .....	38
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
4.1 Resultados das análises dos dados pluviométricos.....	39
4.2 Resultados das análises de solo .....	41
4.3 Resultados das análises de “Dot Blot enzyme immunoassay” .....	41
4.4 Resultados da reação em cadeia da polimerase (“Polymerase chain reaction”) .....	42
4.5 Análises das variáveis tecnológicas.....	43
4.5.1 Análise dos dados para PBU (peso do bagaço úmido) .....	43
4.5.2 Análise dos dados para Brix, Pol e Pureza .....	44
4.5.3 Análise dos dados para Fibras .....	46
4.5.4 Análise dos dados para ATR (Açúcares Totais Recuperáveis) .....	46
4.5.5 Análise dos dados de TCH (tonelada de cana por hectare) .....	47
4.6 Resultados das análises biométricas .....	48
4.6.1 Análise dos dados para a variável comprimento dos colmos .....	48
4.6.2 Análise dos dados para a variável diâmetro dos colmos .....	48
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>
<b>APÊNDICES:.....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma importante cultura agrícola, cultivada em mais de 127 países e de acordo com dados da Food and Agricultural Organization of the United Nations - FAO (2009) está entre as mais plantadas no mundo. A crescente busca por combustíveis renováveis (álcool) e auto-sustentáveis transformou o mercado da cana-de-açúcar em um dos mais promissores do agronegócio mundial, pois fornece ainda açúcar, fibras, fertilizantes além de produtos e co-produtos com sustentabilidade ecológica como o plástico biodegradável e cinzas na construção civil.

De acordo com estimativas da FAO os três maiores produtores de cana-de-açúcar no mundo são Brasil (34%), Índia (19%) e China (7%). No Brasil é a terceira cultura mais plantada, depois da soja e do milho (BRASIL, 2010), as áreas ocupadas abrangem quase todas as regiões, predominando no sudeste, centro-sul e norte-nordeste (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-AÇÚCAR, 2010). Dados da Secretaria de Comércio Exterior (2009) mostram que o Brasil exportou na safra 2008/2009, cinco bilhões de litros de álcool e 19 milhões de toneladas de açúcar. Matsuoka, Garcia e Arizono (2005) mostram que esse valor corresponde a cerca de 25% da produção nacional. O estado de São Paulo é o maior produtor brasileiro e segundo a Coordenadoria de Assistência Técnica Integral – CATI (2010) a área plantada é de aproximadamente 5,5 milhões de hectares, além disso o setor é responsável por disponibilizar cerca de um milhão de empregos diretos na área rural e outros 300 mil diretos e indiretos na industrial (BELOTI, 2008).



**Figura 1.** Distribuição geográfica da área cultivada de cana-de-açúcar e número de produtores no estado de São Paulo 2007/2008.

Fonte: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral – CATI (2010)

Condições atmosféricas favoráveis, variedades melhoradas através de cruzamentos genéticos e mais adaptadas contribuíram para impulsionar a produção açucareira a níveis historicamente altos. Por outro lado fatores como: deficiência hídrica, cultivo de variedades ultrapassadas e ocorrência de pragas e doenças influenciam a baixa produtividade da cana-de-açúcar (CARNEIRO JR. et al., 2004), por esse motivo a cultura é resultado de intensos programas de melhoramento genético que visam criar variedades mais produtivas e resistentes.

Doenças de cana são graves, pois causam a degenerescência das variedades em cultivo, obrigando a sua substituição periódica (GATI DE ALMEIDA, 2008). Entre as doenças de maior importância para a cana no âmbito mundial, algumas são causadas por bactérias entre elas raquitismo-das-soqueiras e escaldadura das folhas. Dessas doenças destaca-se o raquitismo-dassoqueiras (“Ratoon Stunting Disease” - RSD) causada pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) (EVTUSHENKO et al., 2000) internacionalmente considerada uma das mais prejudiciais e intratáveis doenças da cana-de-açúcar (BRUMBLEY et al., 2002) e indiscutivelmente a doença mais importante economicamente do setor canavieiro mundial (BAILEY; TOUGH, 1992).

Nenhuma variedade de cana está imune à infecção por Lxx, embora tolerância ao RSD tenha sido reconhecida em algumas (WISMER, 1971, TEAKLE; SMITH; STEINDL, 1975, TEAKLE; APPLETON; STEINDL, 1978), sua incidência tem sido difícil de avaliar (HARRISON; DAVIS, 1986). Em decorrência da dificuldade na diagnose, os sintomas visíveis só são observados quando a doença atinge sua fase crítica de desenvolvimento, pois há a ausência de sintomas externos (GILLASPIE JR; TEAKLE, 1989) nos primeiros anos de crescimento das plantas.

Os danos atingem as principais regiões onde a agroindústria sucroalcooleira está presente (GILLASPIE JR; DAVIS, 1992; DAVIS et al., 1994). Atualmente a bactéria é encontrada na maioria das áreas cultivadas de cana-de-açúcar e as perdas podem chegar a 50% em variedades tolerantes e suscetíveis (GILLASPIE; TEAKLE, 1989), dependendo da disponibilidade de água no solo, da presença de outras doenças e do ciclo da cultura (DEAN; DAVIS, 1990; GILLASPIE; DAVIS, 1992). Outros autores como Comstock (1995) reconhecem perdas que variam entre 5 e 15% na produtividade dos canaviais infectados. De acordo com dados de Sanguino (1987), na década de 80 dos quatro milhões de hectares plantados no Brasil cerca de 90% estavam infectados pela bactéria. Por ser reconhecida como uma das mais importantes doenças da cana-de-açúcar práticas de controle tem sido usadas a

mais de 40 anos (CROFT; SMITH,1995) entre elas o tratamento térmico da semente e o saneamento por cultivo de meristema (IGLESIA et al., 2003).

Devido à importância da doença o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de quatro diferentes concentrações de bactérias (Lxx) inoculadas em sete variedades de cana-de-açúcar cultivadas comercialmente, e escolhidas entre as mais plantadas no censo do Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (PMGCA/RIDESA). Os resultados obtidos nesse experimento não têm a função de classificar variedades como resistentes, tolerantes ou suscetíveis, mas verificar se as interações variedades x cortes x concentrações bacterianas provocam danos nas variáveis tecnológicas, na biometria das plantas e na produtividade dos canaviais ao longo dos cortes. E, também, avaliar o nível de segurança da técnica de Dot Blot em relação à técnica molecular do PCR utilizando extração de DNA a partir do caldo.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Revisão Bibliográfica**

#### **2.1.1 Cana-de-açúcar**

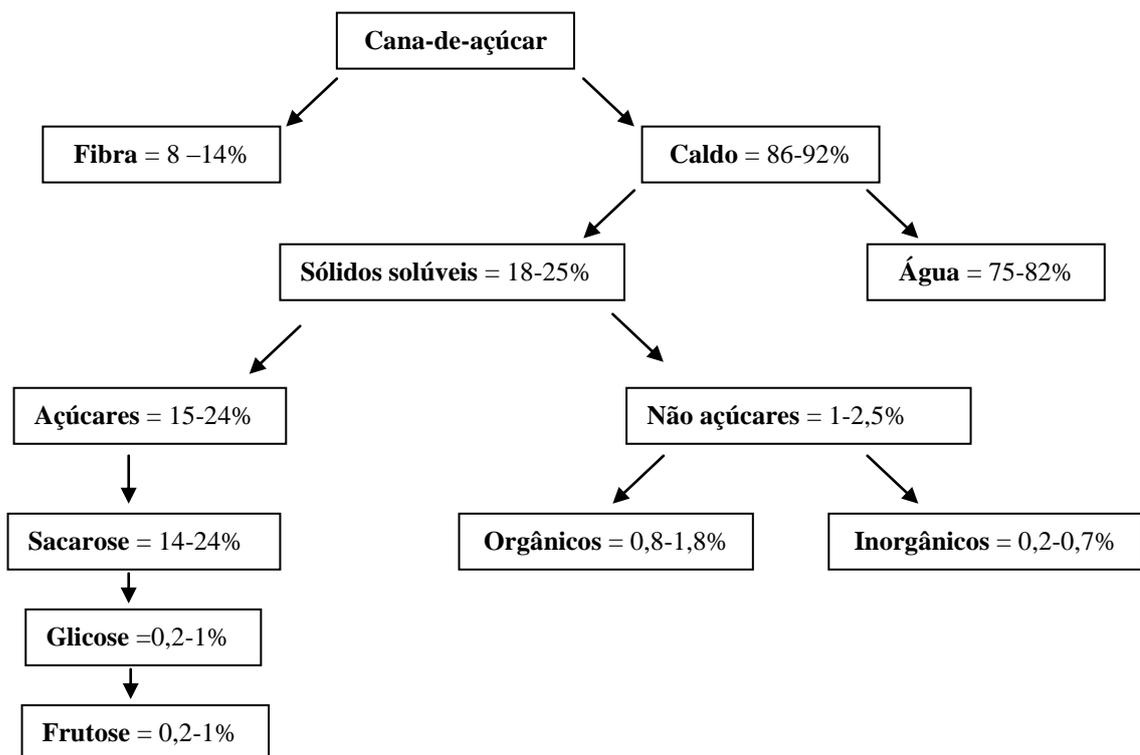
Originária da Ásia, provavelmente de nova Guiné, a cana de açúcar sempre foi uma das principais culturas agrícolas. No século XVIII foi considerada remédio e artigo de luxo, consumida somente por reis e nobres, e seu alto custo foi o motivo da busca por novas áreas pelos colonizadores (CESNIK; MIOCQUE, 2004).

A entrada da cana-de-açúcar no continente americano ocorreu em 1493 durante a segunda viagem de Cristovão Colombo (FIGUEIREDO, 2008). No Brasil sua entrada foi resultado da colonização portuguesa, no ano de 1502, que já cultivava a planta em outras regiões. Graças ao clima, solo fértil e mão-de-obra barata a cultura espalhou-se primeiramente pela região nordeste, devido à facilidade no escoamento do produto, e em seguida pelas outras regiões do país. Em fins do século XVI, os estados de Pernambuco e Bahia possuíam mais de cem engenhos e em 1650 o Brasil já era o maior produtor mundial de açúcar (MOZAMBANI et al., 2006). De acordo com o mesmo autor a cultura da cana atingiu o planalto paulista no ano de 1615. A primeira variedade plantada no país foi a Creoula, seguida por Caiana, o aparecimento de problemas fitossanitários obrigou a hibridação para criação de novas variedades, entretanto estudos sobre inflorescência e produção de sementes férteis só iniciaram em 1889 (FIGUEIREDO, 2008). Diferentemente da época da colonização a cana-de-açúcar plantada no país atualmente não está direcionada apenas para a produção de açúcar, outros valores são agregados a ela principalmente aqueles relacionadas à diminuição do uso de combustíveis fósseis.

A produção de cana depende de vários setores e grande importância se dá aos programas de melhoramento genético que a partir da engenharia genética visam produzir variedades com altos valores de açúcares e fibras. Porém uma das principais buscas em plantas melhoradas geneticamente é a resistência a doenças, afinal muitas são as enfermidades que afetam a cana de açúcar.

### 2.1.1.1 Composição da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é composta principalmente por fibras e caldo. De acordo com Lavanholi (2008) fibras são considerados os sólidos insolúveis enquanto o caldo é composto por água e sólidos solúveis. A figura 2 mostra a composição tecnológica da cana-de-açúcar e a porcentagem de cada um dos seus componentes.



**Figura 2.** Composição tecnológica da cana-de-açúcar. Fonte: Waldemar (2007 apud LAVANHOLI, 2008).

Os três principais açúcares contidos na cana são: frutose, glicose e sacarose, sendo este último encontrado em maior quantidade, cerca de 14-24% do total, e está relacionado diretamente com o ponto de maturação da cana (LAVANHOLI, 2008). Cada variedade apresenta um período em que há o valor máximo de sacarose, onde deve ser cortada. Após esse período a planta inicia o processo de hidrólise natural, quando ocorre a inversão da sacarose por enzimas da própria planta obtendo energia para processos vitais (SEGATO; PEREIRA, 2006).

Atualmente grande importância tem sido dada às fibras e a palha da cana que vem sendo usadas para co-geração de energia nas caldeiras e para o desenvolvimento de

subprodutos biotecnológicos como os plásticos biodegradáveis além de tijolos, painéis aglomerados, álcool de primeira e segunda geração.

### **2.1.2 Classificação Botânica**

A cana-de-açúcar foi descrita primeiramente por Linné (1753) como *Saccharum officinarum* e *Saccharum spicatum*. Atualmente a classificação proposta por Souza e Lorenzi 2005 a colocam na *Espécie Saccharum officinalis L Gênero Saccharum, Família Poaceae, Ordem Poales*. Compreende algumas espécies como: *Saccharum barberi*, *Saccharum edule*, *Saccharum officinarum*, *Saccharum robustum*, *Saccharum sinensis* e *Saccharum spontaneum*.

### **2.1.3 Histórico do raquitismo-das-soqueiras (RSD)**

O primeiro relato da doença raquitismo-das-soqueiras aconteceu em Queensland - Austrália, no verão seco de 1944-1945 (STEINDL, 1961) quando alguns campos e porções de campos da promissora variedade Q28 produziam socas pobres (cana soca = canas oriundas do segundo e dos demais cortes da cana-de-açúcar) (GRISHAM, 2004), retardamento anormal e descoloração vascular (JAMES, 1996). Na época de seu aparecimento foi chamada de “Q28 trouble” ou “Q28 disease” (GIGLIOTI, 1997). Em 1949, a natureza infecciosa do RSD foi comprovada através de estudos de reprodução de sintomas em colmos saudáveis de cana-de-açúcar a partir de inoculações artificiais com caldo extraído de colmos afetados (STEINDL, 1949). Embora não tenha sido observado em cana-planta, a mesma anomalia ocorria em socas de viveiros que deram origem a esses canaviais indicando que a doença tenha se iniciado no viveiro de Q28 (STEINDL, 1961). Em 1950 Steindl sugeriu que a doença poderia ser causada por um vírus, mas somente 30 anos depois do primeiro relato e descrição do RSD, uma bactéria foi associada com a doença. Gillaspie Jr., Davis e Worley (1973), Maramorosch et al. (1973) e Teakle, Smith e Steindl. (1973), demonstraram independentemente a associação de uma bactéria limitada ao xilema com a doença. Estudos com microscopia eletrônica de tecidos vasculares mostraram que a bactéria estava confinada a elementos do xilema (WORLEY; GILLASPIE JR., 1975). Em outro estudo Kao e Damann Jr. (1980)

demonstraram através de microscopia eletrônica a presença da bactéria em traqueídes, parênquima e no lúmen dos vasos do xilema. Davis (1986) identificou a bactéria em cultura axênica e confirmou sua patogenicidade através dos postulados de Koch como sendo *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*. Mais tarde foi reclassificada como *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* baseado na evidencia de que ela difere de outras espécies de *Clavibacter* em termos de morfologia, composição da parede celular, cultivo em meio específico e características fisiológicas (SUZUKI, 1999; EVTUSHENKO et al., 2000).

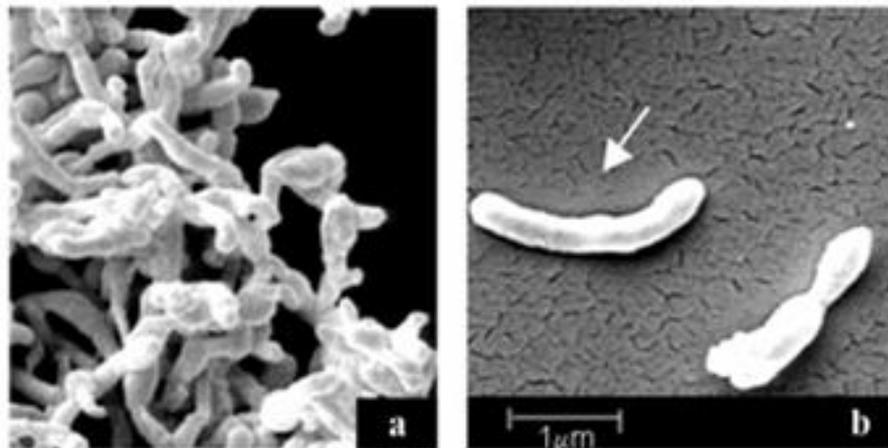
No Brasil o primeiro relato oficial ocorreu no ano de 1956, no município de Campo de Goycatazes - Rio de Janeiro (CHAGAS; TOKESHI, 1988). Nesse período acredita-se que já estava disseminada por todas as regiões brasileiras e em 1989 já havia sido relatada em mais de 61 países (TOKESHI, 1997).

A doença afeta tanto a planta quanto a soca e é uma das maiores causas do declínio ou deterioração varietal em cana-de-açúcar (DUTTAMAJUMDER, 2004). Por ser uma das doenças que mais afeta o setor (GILLASPIE; TEAKLE 1989; HUGHES, 1974) é uma das mais importantes (DAVIS; PURCEL; THOMPSON, 1980), sendo a falta de sintomas característicos e específicos o principal motivo de sua disseminação em todas as regiões canavieiras do mundo (CARDOSO, 1986). Os efeitos da doença e as perdas dependem primariamente da disponibilidade de água (MCDOUGALL; STEINDL; ELLIOT, 1948; ROSSLER, 1974 apud BRUMBLEY et al., 2004) e de variedades suscetíveis (GIGLIOTI, 1998).

#### **2.1.4 Biologia da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***

O xilema é um tecido vascular complexo através do qual a maior parte da água e dos sais minerais é conduzida na planta. Numerosas bactérias têm sido isoladas de plantas e muitas habitam esse tecido, mas somente três são limitadas a ele como *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas syzygii* e *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (PURCELL; HOPKINS, 1996). Bactérias invasoras do xilema interferem no movimento da água e dos nutrientes inorgânicos, produzindo polissacarídeos de alto peso molecular que provocam murchas e morte da planta afetada (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). De acordo com Purcell e Hopkins (1996) a conclusão de que essas bactérias são limitadas ao xilema baseia-se principalmente em exame de microscopia das plantas doentes.

O gênero *Leifsonia* pertence à família Microbacteriaceae e possui cerca de sete espécies que foram isoladas de solos, lagos gelados na Antártida e água. A espécie *Leifsonia xyli* é a única do gênero que provoca doenças em plantas e compreende duas espécies: *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) e *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* (Lxc) (ZERILLO, 2008). *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* causadora do raquitismo-das-soqueiras é uma bactéria restrita ao xilema e de acordo com Kao e Damann Jr. (1980) seu crescimento é limitado aos elementos de vasos, parênquima e lacunas do xilema. É uma bactéria gram-positiva, corineforme, não móvel, obrigatoriamente aeróbia, pleomórfica e fastidiosa (GILLASPIE JR.; TEAKLE, 1989). Suas células são geralmente baciliformes e medem de 0,25 por 0,5 μm (largura-comprimento), com forma reta ou levemente curva, podem ser inchadas na ponta ou no meio (TEAKLE; KONTZE; APPLETON, 1979). As colônias apresentam aspecto circular não pigmentado, com diâmetro variando de 0,1 a 0,3 mm em meio de cultura “Soybean Corn” - SC (DAVIS et al., 1984). Não há relatos de variações em patogenicidade e virulência entre isolados de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* de diferentes regiões do mundo apesar da similaridade em relação a morfologia, sorologia e bioquímica (DAVIS; PURCEL; THOMSON, 1980; DAVIS et al., 1984).



**Figura 3.** Microscopia eletrônica de varredura da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* da estirpe CTC B07. **a)** aglomerado de células bacterianas (aumento de 15.000 vezes); **b)** as setas apontam o formato corineforme característico da bactéria (aumento de 20.000 vezes). Fonte: Gagliardi (2003).

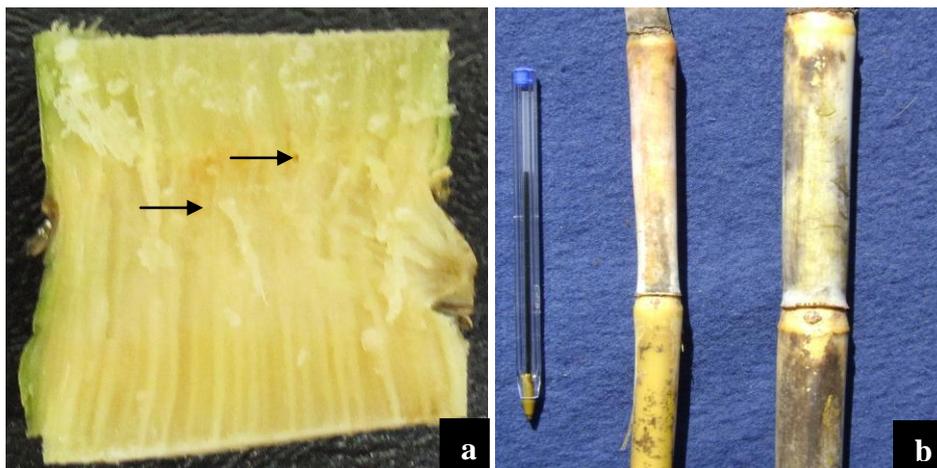
*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* coloniza os vasos provocando entupimento (GILLASPIE JR.; DAVIS; WORLEY, 1973; MARAMOROSCH et al., 1973; TEAKLE, SMITH; STEINDL, 1973) e afetando a condução de água e sais minerais através dos elementos de vasos

(BRUMBLEY et al., 2002) que ocasiona desnutrição na planta (KAO; DAMANN JR., 1980) e interrupção da transpiração (IGLESIA et al., 2003). Além disso, Ramos (2004) sugere que sua patogenicidade está ligada a uma atividade celulolítica, degradação de celulose pela bactéria, que provavelmente contribui para a degradação de tecidos da planta hospedeira.

### 2.1.5 Sintomas do RSD

O raquitismo das soqueiras não causa sintomas característicos (TOKESHI; RAGO, 2005), mas como o nome sugere provoca definhamento e diminui o crescimento das plantas afetadas. Entre os sintomas externos os mais comuns são crescimento irregular e retardado, subdesenvolvimento e encurtamento dos colmos e, em condições extremas, aspecto de murcha, necrose nas pontas e bordas das folhas de plantas de cana-de-açúcar (URASHIMA, 2008) que pode ser seguida de morte da planta (STEINDL, 1961; TOKESHI, 1997). Os sintomas da doença dependem ainda da idade da touceira e de condições climáticas (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2010), pois as perdas estão ligadas basicamente a disponibilidade de água (MCDOUGALL; STEINDL; ELLIOT, 1948; ROSSLER, 1974) e suscetibilidade das variedades (WISMER, 1971). Danos decorrentes de estresse hídrico podem chegar a 50% em variedades suscetíveis submetidas a essas condições (TEAKLE; KONTZE; APPLETON, 1979; TOKESHI, 1997).

Sintomas internos, em algumas variedades, podem ser caracterizados por pontuações ou vírgulas avermelhadas nos feixes vasculares dos nós de canas maduras e em plantas jovens a coloração rosa salmão, próximo ao meristema apical, pode servir como auxílio na detecção de RSD em fase precoce (GRISHAM, 1991; COMSTOCK; LENTINI, 2005). Porém esses sintomas não são característicos de RSD e podem ser resultado da reação da planta à presença de outros organismos como *Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum*, *Erwinia herbicola*, *Fusarium moniliforme* (RICAUD, 1974; BELOTTI, 2008).



**Figura 4.** Sintomas internos e externos associados ao raquitismo-das-soqueiras: **a)** as setas apontam pontuações internas nos feixes vasculares dos nós; **b)** diminuição no diâmetro dos colmos de plantas doentes (à esquerda) em relação a plantas sadias (à direita).

### 2.1.6 Transmissão

*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é transmitida através de ferimentos causados por materiais cortantes e pelo contato da seiva de plantas doentes com plantas sadias (GRISHAM, 1991). Como a cana-de-açúcar é propagada vegetativamente, um único plantio produz colheitas múltiplas, pois a bactéria proveniente de plantas doentes é transmitida por estacas ou colmosesementes (GAGLIARDI, 2003). Materiais como ferramentas de corte, colheitadeiras e plantadoras de cana-de-açúcar são as principais vias de transmissão. Consequentemente, o controle da doença é dificultado pela facilidade de transmissão mecânica que ocorre durante essas operações.

A sobrevivência de Lxx em campo está relacionada com a própria cana-de-açúcar, sendo transmitida durante os ciclos da cultura onde células viáveis são transportadas para dentro do tecido suscetível dos colmos (GIGLIOTI, 1997). James (1996) relata a presença da bactéria no solo onde pode permanecer viável e infectiva em pequenos pedaços de tecido por períodos entre três e seis meses.

### 2.1.7 Diagnose

A distribuição cosmopolita da doença é justificada pela dificuldade no seu diagnóstico que passa a ser mais evidenciado no avançar dos cortes e pelo longo período de incubação da bactéria que pode chegar a oito meses (ZERILLO, 2008). Além disso, sintomas internos e externos do raquitismo-das-soqueiras podem ser confundidos com outras doenças e também mascarados dependendo da variedade e condições climáticas (BELOTI, 2008). Por esse motivo a aplicação de diagnósticos que expressam níveis de infecção para recomendações de manejos varietais adequados vem despertando interesse em estudos que visam determinar o grau de infecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e suas implicações nas conseqüentes perdas provocadas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar.

Dificuldades no isolamento da bactéria devido ao crescimento lento, complexidade do meio de cultura e fácil contaminação por microrganismos (HARRISON; DAVIS, 1990), dificultaram o uso dessa técnica como rotineira. Porém com o êxito do cultivo de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em meio SC –“Soybean Corn” (DAVIS; PURCEL; THOMSON, 1980) foi possível a produção específica de anticorpos para a sua detecção em técnicas sorológicas (JAMES, 1996).

O diagnóstico de RSD por técnicas sensíveis como ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”), EB-EIA (“evaporative-binding enzyme-linked immunoassay”) (HARRISON; DAVIS, 1990; LOUWS; FULBRIGHT; STEPHENS, 1995; JAMES, 1996; LOUWS; BELL; MEDINA-MORA, 1998), mais recentemente TBEIA (“tissue blot enzyme immunoassay”) e Dot Blot (“dot-blot enzyme immunoassay”) foram desenvolvidas para determinar o número de feixes vasculares colonizados por Lxx e os feixes vasculares funcionais da planta (IGLESIA et al., 2003).

Métodos de microscopia como contraste de fase, microscopia de campo escuro e microscopia eletrônica também podem ser utilizados para diagnóstico da doença (KAO; DAMANN JR, 1980; DAVIS et al., 1984). Entretanto de acordo com Gao et al. (2008) envolvem tediosos e complexos procedimentos operacionais produzindo resultados de baixa sensibilidade. Com o avanço da biologia molecular os métodos baseados em DNA têm sido usados para diagnóstico de Lxx nos quais podemos incluir a técnica de PCR convencional (“polimerase chain reaction”) e “real-time” PCR (GRISHAM, 2004). Essas técnicas permitem alta confiabilidade e especificidade na detecção de fitopatógenos e de acordo com Schneider e Bruijn (1996) detectam o patógeno em extratos da planta, conteúdo dos vasos condutores e

colônias em placas ou meio de cultura, utilizando iniciadores (“primers”) específicos derivados da região 16S e 23S do RNA ribossômico da bactéria (FEGAN et al., 1998).

### **2.1.8 Controle e prevenção do patógeno**

A falta de sintomas característicos foi um dos principais motivos para a disseminação de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em todas as regiões canavieiras (CARDOSO, 1986). Por ser o RSD reconhecido como uma das mais importantes doenças da cana-de-açúcar e pela facilidade na disseminação mecânica (GIGLIOTI, 1997) há mais de 40 anos práticas de controle têm sido usadas para evitar a proliferação da doença (CROFT; SMITH 1995).

O controle da doença fundamenta-se na adoção de um conjunto de medidas preventivas (GAGLIARDI, 2008). O plantio de toletes sadios é muito importante para prevenir o estabelecimento e a disseminação da doença em campo (GATI DE ALMEIDA, 2008), pois a bactéria é espalhada durante o plantio de colmos infestados ou durante a colheita mecanizada por instrumentos que introduzem a bactéria nos vasos do xilema (DAMANN JR., HOLLER, 1991). Devido à forma de transmissão, o controle da doença tem sido realizado através de métodos de exclusão, baseados no uso de material sadio para plantio. Materiais cortantes como facões e colheitadeiras devem ser desinfetados, especialmente quando usados em campos de propagação de material, a limpeza pode ser realizada com auxílio de produtos químicos como amônia quaternária, solução de ácido cresílico e etanol 50% (STEINDL, 1961; TEAKLE, 1983; GILLASPIE JR.; TEAKLE, 1989).

A termoterapia, também chamada de tratamento térmico, vem sendo comumente utilizada para eliminar o patógeno de toletes infectados. O tratamento consiste na imersão de toletes-sementes em água quente com o objetivo de destruir enzimas e proteínas da bactéria sem injuriar os toletes (FERNANDES JR. et al., 2010). No Brasil duas combinações são recomendadas, tratamento curto, temperatura de 52°C por 30 minutos (SANGUINO, 1989) ou tratamento longo 50,5°C durante duas horas (DAMANN JR.; BENDA, 1983). Esses tratamentos proporcionam a obtenção de mudas de boa sanidade (SANGUINO, 1989). Entretanto o tratamento não elimina por completo as células bacterianas podendo ser repetido no mesmo material para evitar um possível aumento no potencial de inóculo (TOKESHI; RAGO, 2005).

Atualmente a maioria dos programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar está envolvida na execução de atividades de rotina para a identificação de genótipos resistentes ou tolerantes ao RSD.

## **2.2 Métodos de detecção**

### **2.2.1. Dot Blot**

Desde que a bactéria Lxx foi isolada em meio de cultura, seu diagnóstico ficou mais fácil e alguns métodos de detecção foram desenvolvidos para esta finalidade (GATTI DE ALMEIDA, 2008). A técnica laboratorial usada para análise rotineira de RSD é o “Dot Blot”. O método de “Dot Blot” é uma técnica de hibridização baseada no princípio da especificidade antígeno-anticorpo (HSU, 2009). Ela detecta a presença de um anticorpo ou antígeno bacteriano em uma amostra de tecido ou fluido vascular. Amostras de DNA de diversos tecidos ou indivíduos podem ser testados. Forças eletrostáticas são responsáveis por ligar o DNA da bactéria, que possui carga positiva, a membrana que tem carga negativa. Nesta técnica dois tipos de anti-soro são usados um específico de coelho e um anti-soro monoclonal de cabra contra IGG de coelho conjugado a fosfatase alcalina.

O material usado na análise de Dot Blot deve ser retirado do terço basal do colmo, pois nesta região são encontradas as maiores densidades bacterianas na maioria das variedades (HARRISON; DAVIS, 1988). Além disso, Westphal e Mirkov (2003) sugere que a bactéria é detectada mais frequentemente quando colmos de cana têm quantidades limitadas de líquido vascular por internódio. Assim diversos internódios são necessários para coletar suco suficiente para a análise. Ainda de acordo com o autor quando somente um internódio fornece quantidade suficiente de suco para o procedimento de detecção os resultados são irregulares e falsos negativos são mais frequentes.

### 2.2.2 PCR (“Polimerase Chain Reaction”)

As técnicas moleculares surgiram como uma alternativa mais eficiente e eficaz para o diagnóstico de doenças, pois são altamente específicas e sensíveis que outros métodos (FEGAN et al., 1998). De acordo com Iglesia et al. (2003) essas técnicas se converteram em uma ferramenta de incalculável valor para a detecção de fitopatógenos.

Em 2004 o projeto ONSA/FAPESP sequenciou o genoma de *Lxx* (MONTEIRO-VITORELLO et. al., 2004) e autores como Pan, Grisham e Burner (2008) e Gao et al. (2008) usaram as regiões de espaços intergênicos 16S e 23S de rRNA para desenvolvimento de primers específicos os quais foram nomeados Cxx1 e Cxx2 para a identificação de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* como o agente causal do RSD (DAVIS; PURCELL; THOMPSONI, 1980).

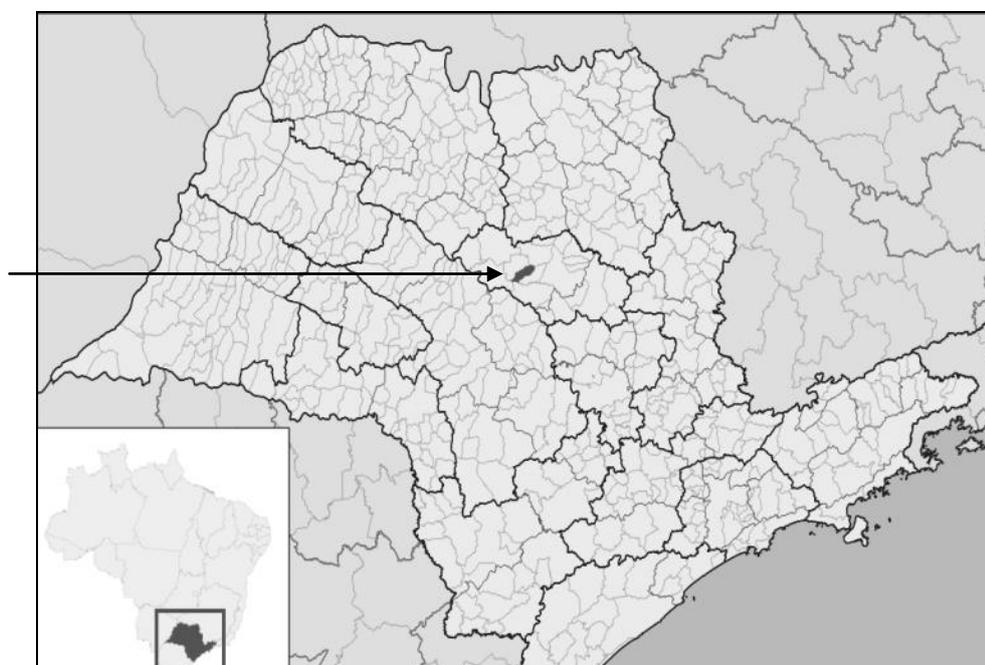
O impacto das ferramentas biotecnológicas na indústria canavieira faz com que os testes de doenças sejam capazes de detectar infecções em caules e assim saber se as práticas de controle são eficazes, impedindo a propagação da bactéria para novos campos (IGLESIA et al., 2003).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Características gerais do experimento

##### 3.1.1 Área experimental

O experimento foi conduzido no município de Nova Europa – SP (Figura 5), localizado na Fazenda Parque, setor 119, terreno de propriedade da Usina Santa Fé. A área apresenta topografia típica de um planalto centro ocidental e o clima da região é descrito como do tipo Aw (segundo classificação Köppen), tropical chuvoso, com inverno seco (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2010).



**Figura 5.** Localização do município de Nova Europa no centro do estado de São Paulo, local de implantação do experimento. Fonte: Nova Europa (2010).

### 3.1.2 Instalação do experimento

Implantado em 23 de maio de 2006 o primeiro corte foi conduzido por Gagliardi (2008) no ano de 2007 e a partir do ano de 2008 iniciamos os estudos dando continuidade ao trabalho. Portanto a implantação do experimento e inoculações foram inicialmente implantadas, mas não conduzidas até o final pelo autor.

**Tabela 1.** Cronograma do experimento. Escolha das variedades, tratamento dos toletes, inoculações, plantio e coleta das amostras em campo.

	<b>Mês</b>	<b>Ano</b>
<b>*Escolha das variedades</b>	Dezembro	2005
<b>*Tratamento Térmico (50,5°C)</b>	Fevereiro	2006
<b>*Inoculação (10<sup>8</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>2</sup>, controle UFC/ml)</b>	Fevereiro	2006
<b>*Plantio (casa de vegetação)</b>	Fevereiro	2006
<b>*Plantio (campo)</b>	Maio	2006
<b>Primeiro corte</b>	Junho	2007
<b>Segundo corte</b>	Junho	2008
<b>Terceiro corte</b>	Junho	2009
<b>Quarto corte</b>	Junho	2010

\* Etapas realizadas por Gagliardi (2008)

Das variedades selecionadas as utilizadas neste trabalho foram: RB72454, RB855453, RB855536, RB867515, RB928064, RB925345 e RB925268. O cronograma de plantio e coletas de amostras é apresentado na Tabela 1. A primeira coleta foi realizada no ano de 2007 em plantas com idade de 13 meses e as demais, entre os anos de 2008 a 2010, em plantas com 12 meses.

### 3.2 Características das variedades utilizadas

Para o experimento foram selecionadas dez variedades de cana-de-açúcar, todas RB (República Federativa do Brasil) selecionadas dentro do Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar da Universidade Federal de São Carlos Campus de Araras –

PMGCA/UFSCar/Araras, relacionadas no censo varietal das variedades mais plantadas no ano de 2004 na região centro-sul do país.

As variedades utilizadas liberadas pela RIDESA, Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético. De acordo com PMGCA as variedades RB ocupam mais de 50% dos canaviais do país chegando a 70% em algumas regiões. A tabela 2 apresenta um resumo das características agroindustriais, ambiente de produção e época de colheita de cada uma das sete variedades utilizadas no estudo. Essas variedades são resultado de intensas pesquisas de melhoramento genético e estão entre as mais produtivas, relativas aos altos teores de açúcares. O resultado do melhoramento das plantas é visto somente após 15 anos, tempo correspondente entre os primeiros cruzamentos das sementes em campo até a liberação para plantio.

**Tabela 2.** Características agroindustriais das variedades RB selecionadas para o estudo. Ambiente de produção e época de colheita de cada variedade na região centro-sul.

Variedade	Destaque *	Ambiente de produção**					Época de colheita - centro-sul***								
		A	B	C	D	E	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	Nov	
RB72454	Produtividade														
RB835453	Precocidade e Riqueza														
RB855536	Brotação da soca														
RB867515	Rusticidade														
RB928064	Porte ereto e brotação														
RB925345	Riqueza e fibra														
RB925268	Colheita mecanizada														

\* Características da variedade

\*\* Ambiente de produção A= favoráveis e E= menos favorável

\*\*\* Época de colheita de cada variedade

Fonte: REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROALCOOLEIRO (2010)

### 3.2.1 Variedade RB72454

Resultado de policruzamento tem como variedade genitora CP53-76 que foi fecundada com pólen de diversas outras variedades. Plantas da variedade RB72454 apresentam alto teor de sacarose com maturação média tardia. Sua produtividade agrícola é alta. E desenvolve-se bem em solos com baixa fertilidade.

### **3.2.2 Variedade RB855453**

Resultado de policruzamento sua genitora é a variedade TUC71-7 com pólen de várias outras variedades. A variedade RB855453 apresenta rápido desenvolvimento, suas principais características são precocidade e riqueza.

### **3.2.3 Variedade RB855536**

A variedade RB855536 é resultado de cruzamento biparental entre a genitora SP70-1143 sendo fecundada com pólen da variedade RB72454. Plantas da variedade RB855536 têm ausência de florescimento. Possui alta produtividade e alto teor de sacarose.

### **3.2.4 Variedade RB867515**

Resultado de policruzamento tem como genitora RB72454 que foi fecundada com pólen de várias outras variedades. A variedade RB867515 é conhecida por apresentar alto teor de sacarose e produtividade.

### **3.2.5 Variedade RB928064**

A variedade RB928064 é resultado de policruzamento, sua genitora é a variedade SP70-1143. Apresenta porte médio com alta produtividade agrícola.

### **3.2.6 Variedade RB925345**

Variedade resultante de policruzamento tendo como genitora a variedade RB855511. Essa variedade apresenta desenvolvimento rápido com alta produtividade. A variedade apresenta altos teores de sacarose, de produtividade e alto teor de fibras.

### **3.2.7 Variedade RB925268**

Resultado de policruzamento a variedade RB925268 tem como genitora a variedade H59-1966. Apresenta alta produtividade com médio teor de sacarose.

## **3.3 Disposição do experimento**

Originalmente 10 variedades foram plantadas, porém três delas retiradas das análises finais devido a problemas durante o desenvolvimento em campo. Os toletes de cada variedade foram inicialmente tratados com termoterapia por 2 horas a 50,5°C. Em seguida foram submersos em soluções com as seguintes concentrações bacterianas:  $10^8$ ,  $10^4$ ,  $10^2$  UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitros) e controle, submerso apenas em tampão fosfato. Após serem drenados, os toletes foram plantados em caixas por quatro meses e transplantados em campo após esse período (GAGLIARDI, 2008). A tabela 3 mostra as parcelas do experimento de acordo com as inoculações em campo e as numerações recebidas depois de inoculadas. As numerações foram feitas de acordo com a variedade e a inoculação. Os mapas B1 e B2 (apêndices) mostram o delineamento em campo e a distribuição do plantio dentro das quatro repetições.

O delineamento experimental utilizado foi o de parcelas subdivididas no tempo com as parcelas em blocos casualizados e os cortes como subparcelas. A área foi dividida em quatro blocos (repetições), com as parcelas sendo as combinações das variedades e a aplicação de 4 diferentes concentrações bacterianas. Cada parcela foi formada de três linhas espaçadas de 1,50 m entre si, por 5 metros de comprimento. Ao redor do experimento foram plantadas duas

linhas como bordadura (variedade RB835453), sendo então colhidas amostras das linhas centrais.

**Tabela 3.** Parcelas do experimento sorteadas em cada um dos quatro blocos.

Concentração bacteriana	Parcelas						
	RB72454	RB855453	RB855536	RB867515	RB928064	RB925345	RB925268
Controle	1	2	3	4	5	6	7
$1,0 \times 10^2$	11	12	13	14	15	16	17
$1,0 \times 10^4$	21	22	23	24	25	26	27
$1,0 \times 10^8$	31	32	33	34	35	36	37

### 3.4 Histórico de chuvas durante os anos do experimento

A cana-de-açúcar apresenta elevado consumo de água, necessitando de 250 partes de água para formar uma parte de matéria seca na planta (DILLEWIJN, 1952 apud MAULE; MAZZA; MARTHA, 2001). Para melhor analisar o experimento durante o período total de condução da pesquisa, entre os anos de 2006 e 2010, foram coletadas amostras diárias do índice pluviométrico local e os valores foram expressos em milímetros (mm) de chuvas por mês ou ano.

### 3.5 Análises de solo

A alta produtividade da cana-de-açúcar está intimamente ligada às condições do solo, temperatura, quantidade de água disponível e intensidade luminosa. O solo é um meio de crescimento que fornece nutrientes, água e fixação das plantas em crescimento, ele é a camada mais externa da crosta terrestre composta de matéria orgânica, argila, areia, fragmentos de rochas entre outros componentes. Nele ocorre o desenvolvimento dos vegetais que obtém através das raízes água e nutrientes, muitas vezes os solos não apresentam capacidade de fornecer à cultura da cana-de-açúcar nutrientes em quantidades adequadas para o seu desenvolvimento (DIAS; ROSSETO, 2006). De acordo com Prado et al. (2008) para

atingir altas produtividades a cana-de-açúcar precisa estar sob uma camada arável corrigida e balanceada por macro e micronutrientes.

A localidade escolhida para implantação do experimento apresentava solo de baixa fertilidade denominado argissolo vermelho amarelo álico com textura arenosa e ambiente de produção E-II. Esse solo tem como principais características relevo ondulado que favorece a erosão, com desfavorável disponibilidade de água, além de apresentar elevada saturação por alumínio, portanto pode ser considerado uma barreira química ao crescimento radicular (PRADO et al., 2008). Para verificar as condições do solo uma amostragem composta da área total do experimento foi retirada antes do plantio da cana-de-açúcar, no final do ano de 2005, e enviada ao Laboratório de Química e Fertilidade do Solo, Programa de Avaliação da Fertilidade do Solo do Departamento de Recursos Naturais e Proteção Ambiental da Universidade Federal de São Carlos campus Araras.

As análises químicas, adubações e correções de solo empregadas no experimento foram de responsabilidade da Usina Santa Fé. Isso nos assegurou resultados para condições normais de plantio em campo. Para atingir a produtividade esperada foram aplicadas correções de calagem e adubação ao longo do experimento, pois é comum que a cada corte a produtividade se reduza. Inicialmente a calagem foi feita na dosagem de 1,2 t/ha para preparo do solo e no plantio utilizou-se a fórmula 04-12-20 (NPK- Nitrogênio, Fósforo, Potássio) resultando em uma dosagem de 0,57 t/ha e Agrolmin®, promove a mineralização da matéria orgânica e a fixação de nitrogênio atmosférico por meio do aumento na atividade biológica do solo, na dose de 82,6 litros/ha. Após o primeiro corte foi realizada adubação com a formulação 19-07-20 (dose de 0,50 t/ha) e no segundo corte adicionado nitrato de amônio na dose de 0,20 t/ha. No último ano (2009) a adubação com NPK foi a proporção 25-10-00 (dose 0,40 t/ha) e adicionado calcário e gesso (1,5 t/ha). É importante salientar que a colheita foi realizada manualmente em todos os cortes e que não houve queima da palha.

### **3.6 Coleta de material em campo**

Os materiais foram colhidos em campo no ano de 2007 no mês de julho e nos meses de junho dos anos de 2008, 2009 e 2010, respectivamente. A coleta de material em anos consecutivos foi motivada pelo fato de que a doença manifesta-se de modo mais claro nas socas da cana, daí o nome raquitismo-das-soqueiras. A análise de quatro cortes foi necessária,

pois normalmente canaviais comerciais são colhidos por quatro anos consecutivos, no mínimo, ou até quando apresentarem produtividade viável.

Durante a colheita os materiais cortantes foram desinfetados (Apêndice C1) com amônia quaternária na diluição de 0,2% (cloreto de alquil dimetil benzil amônio, polioxetilenoilfenileter) nome comercial Amonex®, para evitar contaminação entre os talhões. Esse detergente tem apresentado alta eficiência no controle da disseminação da doença entre os canaviais (GATTI DE ALMEIDA, 2008). As canas no campo foram cortadas junto à base, despalhadas manualmente até o ponto de quebra natural do palmito e amarradas formando feixes de 10 unidades. Cada uma das parcelas foi cortada individualmente, e em seguida esse material seguiu para análise biométrica que permite estimar a produtividade agrícola. Os 10 colmos foram medidos de acordo com seu comprimento com auxílio de uma trena. Para mensuração do diâmetro utilizou-se um paquímetro (Apêndice C2), as medições foram feitas no quinto internódio de cada colmo. Os feixes de 10 canas foram pesados em uma balança (FILIZOLA/MS-60), pois é um dos parâmetros para análise de TCH (tonelada de cana por hectare).

Com auxílio de uma guilhotina, desinfestada com detergente apropriado, as canas foram limpas e cortadas. Os colmos de cada uma das canas foram cortados em dois ou três toletes, uma gema por tolete, do terço inferior da planta. O caldo é retirado dos primeiros nós da cana, pois de acordo com estudos de Bailey (1977) a bactéria que está distribuída sistematicamente no sistema vascular da planta doente aparece em maior concentração nos nós que nos internódios dos colmos na região basal. O lado inferior do tolete deve ser cortado em formato de bisel, para melhorar o escoamento do caldo (Apêndice C2). Para retirada do fluido vascular os toletes são ajustados a um compressor de pressão positiva. Cerca de 500  $\mu$ L de fluido vascular foi coletado de cada cana e em seguida acondicionado em microtubos de 1,5 ml contendo 50  $\mu$ L (aproximadamente duas gotas) de Amonex® na concentração de 0,02% para conservação do material, pois de acordo com Silva et al. (2009) esse tipo de estabilizador é eficiente na conservação de bactérias. Cerca de 1500 amostras foram coletadas em cada ano de coleta do experimento. Em seguida o material foi congelado para posterior análise de “dot blot enzyme immunoassay”.

### 3.7 Determinações e cálculos

#### 3.7.1 Cálculos químico-tecnológicos

Brix expressa a porcentagem (peso/peso) dos sólidos solúveis contidos em uma solução pura de sacarose (FERNANDES, 2000), corresponde à porcentagem aparente de sólidos solúveis contidos no caldo de cana-de-açúcar, de 18 e 25% do total do caldo (LAVANHOLI, 2008). É determinado por refratometria.

O Pol (pol % caldo) é a porcentagem aparente de sacarose contida numa solução de açúcares (caldo da cana) (FERNANDES, 2000). A cana-de-açúcar contém três tipos de açúcares: sacarose, glicose e frutose, sendo a sacarose encontrada em maior quantidade, e está diretamente ligada ao ponto de maturação da cana (LAVANHOLI, 2008). A determinação do pol é feita por métodos sacarimétricos (polarímetros ou sacarímetros) por meio do desvio do feixe de luz polarizada.

Pureza ou pureza total (%) representa o coeficiente de pureza aparente da cana (FERNANDES, 2000). Seu valor é menor que 100% (LAVANHOLI, 2008). A pureza é calculada:

$$\text{Pureza} = \frac{\text{Pol\%cana}}{\text{Brix \% cana}} \times 100$$

Fibra seu teor é importante para o balanço energético da indústria, já que são utilizadas para queima nas caldeiras (LAVANHOLI, 2008). Determinação feita de acordo com a Consecana (1998)

$$\text{Fibra} = 0,08 \times \text{PBU} \times 0,876$$

PBU= peso do bagaço úmido da prensa, resíduo da prensagem em 500 gramas

Açúcares totais recuperáveis (Kg t colmos) representam a quantidade de açúcares redutores totais (ART) recuperada da cana até o xarope (FERNANDES, 2000), além de ser parâmetro do sistema para pagamento da cana implantado no estado de São Paulo.

$$\text{ATRr} = \text{ATRfg} + \text{ATRus} - \text{ATRuq}$$

onde:

ATRR = ATR relativo do fornecedor

ATRfg = ATR do fornecedor na quinzena

ATRus = ATR da usina (própria + fornecedor) na safra estimado pela média das últimas 3 a 5 safras, considerando a cana total processada;

ATRuq = ATR da usina (própria + fornecedor) na quinzena.

### 3.7.2 Cálculo de TCH

Para calcular a produtividade do experimento foi estimada a produtividade agrícola, expressa em tonelada de cana por hectare (TCH) a partir do peso da parcela (kg) (BIDOIA; BIDOIA, 2008), peso de 10 canas (kg) e número de perfilhos da parcela. Os dados utilizados para cálculo foram:

TCH = tonelada de Cana por hectare;

P = peso da parcela (kg);

NS = número de sulcos;

CS = comprimento do sulco (m);

ES = espaçamento entre os sulcos.

$$TCH = (P \times 10) / (NS \times CS \times ES)$$

## 3.8 Análises laboratoriais

### 3.8.1 Análise de “Dot blot enzyme immunoassay”

As amostras de caldos coletadas em campo foram congeladas e conduzidas ao Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de São Carlos - LAGEM onde foram analisadas pelo teste quantitativo de “Dot blot enzyme immunoassay” de acordo com Hsu (2009) e Carneiro Jr et al. (2004). Apesar das várias ferramentas de diagnóstico de RSD o “Dot Blot” (Apêndice C3) continua sendo a técnica rotineira, pois de acordo com GAO et al.

(2008) sua precisão é de 87% enquanto que o PCR convencional teria uma precisão de 61% de eficiência. Os controles positivos usados como parâmetro foram culturas puras de bactéria Lxx ( $1 \times 10^7$  UFC/ml) nas diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  e como controle negativo foi empregado água ultra-pura (Mili-Q®). A membrana de nitrocelulose (GE Healthcare Amersham™ Hybond™ – ECL - 0,45  $\mu$ m) foi hidratada com água ultra-pura (Mili-Q®) por 10 minutos e em seguida colocada sobre papel filtro e sob um aparato com 98 poços de aço inoxidável. A membrana de nitrocelulose usada apresenta carga negativa com mecanismo de ligação de proteínas hidrofóbicas por forças eletrostáticas e capacidade de ligação protéica de  $249 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Em cada poço foi aplicado 100  $\mu\text{L}$  de fluido vascular com auxílio de pipeta. Após a aplicação do caldo na membrana ela foi retirada e seca em estufa por uma hora, logo após foi bloqueada por 30 minutos em solução tampão TS (tris base – tris plusone – Amersham biosciences, pH 7,2; NaCl JT Baker, México, 1,5M; Tween 20 - polysorbate LGC Biotecnologia Brasil; PBS (NaCl, KCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) LGC Biotecnologia Brasil) com 0,3% de leite em pó desnatado (Molico - Nestlé®) sendo posteriormente lavada por três vezes durante 10 minutos. A membrana foi incubada em solução de anti-soro de coelho bruto (1:10.000) por 1 hora e lavado por três vezes sucessivas com solução de TS, 10 minutos são necessários para cada lavagem. A membrana foi incubada por 1 hora em anti-soro monoclonal de cabra contra IgG de coelho conjugado a fosfatase-alcálica (Sigma-USA) diluído 1:2.000 em solução tampão PBS, sem adição de leite e Tween (10  $\mu\text{L}$  de IgG/20 ml PBS) três lavagens com tampão TS foram realizadas novamente. O processo é finalizado no escuro mantendo-se a membrana por 40 minutos em solução reveladora (TS – (trizma Base, pH 9,1); naphthol-AS-phosphate Sigma-USA; Dimetylformamide Fluka-Switzerland) juntamente com a solução Fast Blue BB Salt sigma Germany), previamente preparada (dissolvida em Fast Blue Salt em  $\text{MgCl}_2$  em solução revelação).

### **3.8.2 Material utilizado na extração de DNA de caldo**

Para realização de PCR (“polimerase chain reaction”) com metodologia baseada na extração de DNA foram utilizados apenas caldos de cana da variedade CB49260, reconhecidamente suscetível ao RSD. Essas plantas apresentavam altas taxas de infecção, de acordo com exame prévio realizado com microscopia de contraste de fase. Variedades

comerciais não foram utilizadas devido à inviabilidade das amostras (contaminação por fungos) e do resultado obtido.

### **3.8.3 Extração de DNA da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***

O procedimento foi realizado segundo Murray e Thompson (1980) modificado: 200 µl de caldo de fluido vascular, retirado por pressão positiva, com auxílio de uma bomba de vácuo (Apêndice C3a). Ao caldo extraído foi acrescentado 1 ml de tampão de extração (CTAB 1mM; NaCl 5M; PVP 40000; 1M de Tris-HCl e 1M de EDTA – pH 8,0) acrescido de 2-mercaptoetanol (proporção 1ml para 2µl) e incubados por 1 hora/65°C; posteriormente o volume total foi centrifugado (8000 rpm/5 minutos). O material sobrenadante (800 µl) foi recolhido para um novo tubo e 1 volume de clorofórmio álcool-isoamílico (CIA 24:1) foram acrescentados e centrifugados (12800 rpm/ 5 minutos), o sobrenadante recolhido para um novo tubo e a ele adicionados 0,6% do volume de isopropanol e mantido em temperatura baixa (1 hora/ 4°C). Posteriormente o DNA foi precipitado em centrifuga refrigerada (12800 rpm/20 minutos) e em seguida lavado com álcool 70% (12800 rpm/10 minutos) e finalmente ressuspenso em 10 µl de água ultrapura autoclavada (Mili-Q) incubado 1 hora/37°C. O material foi estocado a -20°C.

### **3.8.4 Reação de PCR**

A presença da bactéria em extratos de cana-de-açúcar foi identificada usando os iniciadores (*primers*) desenhados a partir das regiões espaçadoras intergênicas (ITS) 16S-23S do RNAr que correspondem a sequências únicas em Lxx (PAN; GRISHAM; BURNER, 1998).

**Tabela 4.** Iniciadores utilizados para amplificar uma região intergênica do DNA ribossomal de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

<i>Primers</i>	Sequência	Amplicon
Cxx 1	3` GGTC AATCTGCTCACTTCGGT 5`	438 pb
Cxx 2	5` ACCCTGTGTTGTTTTCAACG 3`	

Fonte: Pan, Grisham e Burner (1998).

Tanto a metodologia utilizada quanto as condições de corrida foram baseadas no protocolo de Pan, Grisham e Burner (1998). Cada 25 µl de reação foi composta por Taq buffer Tris-HCL (pH 8,8 a 25°C), 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% (v/v) Tween 20, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 de cada primer (Cxx1 e Cxx2), 0,625 unidades de Taq DNA Polimerase (Fermentas) e 2 µl de DNA (40 nanogramas - previamente quantificados) utilizados como molde de amplificação. Para as amplificações foi adotado o seguinte ciclo, modificado a partir de: Pan, Grisham e Burner (1998):

Desnaturação inicial: 95°C por 5 minutos ;foram empregados 40 ciclos, divididos como descrito: Desnaturação do DNA: 95°C por 10 segundos – repetir 40 vezes

Hibridização: 57°C por 10 segundos – repetir 40 vezes

Extensão: 72°C por 30 segundos – repetir 40 vezes

Extensão final: 72°C por 5 minutos.

Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% em TBE (Tris/Borato/EDTA) 1X, e corados em brometo de etídeo 0,5 mg/ml em TBE 1X, e observado em transiluminador ultravioleta (Major science® UVDI).

### 3.9 Análise estatística

Os dados estatísticos de variância foram analisados através de Análise de Variância do delineamento em parcelas subdivididas no tempo e submetidos ao programa estatístico InStat 3,36®. A análise de variância (ANOVA) é uma técnica que decompõe em vários componentes identificáveis a variação total entre os valores obtidos (CALLEGARI-JACQUES, 2004).

Para as comparações múltiplas de médias, onde os efeitos principais foram significativos, foi utilizado o teste “t” (Student), através do cálculo da diferença mínima significativa (LSD) ao nível de 5% de probabilidade.

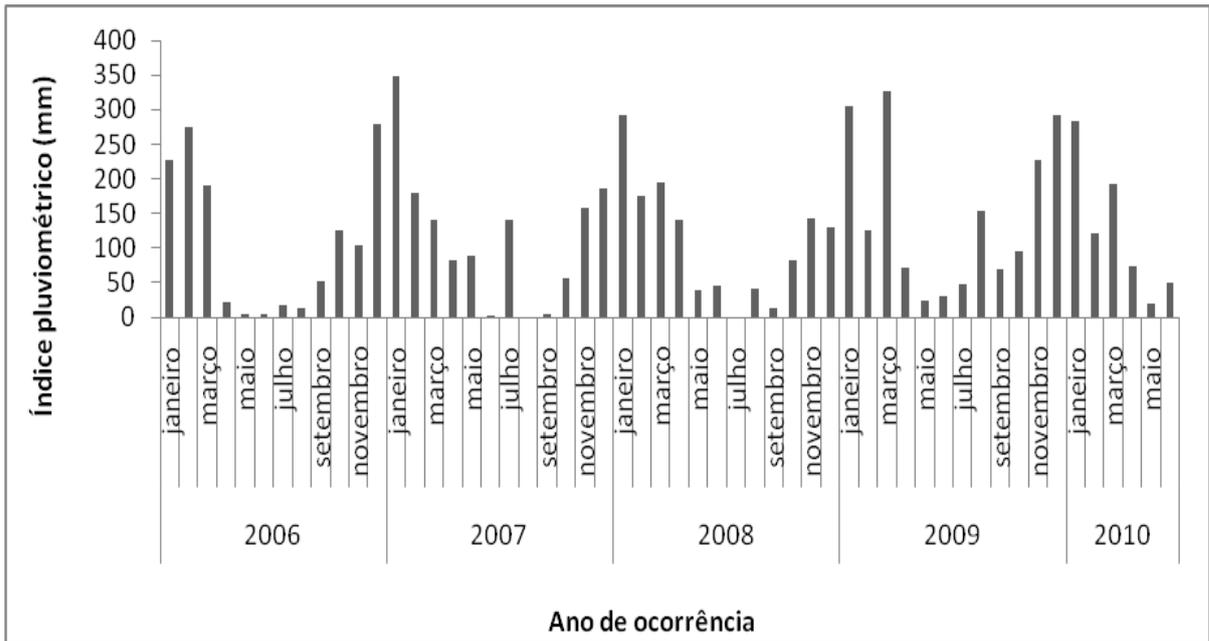
## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As análises estatísticas de variância foram calculadas para um experimento utilizando o delineamento de parcelas subdivididas no tempo. Em primeiro lugar foram analisadas as variáveis tecnológicas: Peso do Bagaço Úmido (PBU), Brix, Pol, Fibras, Pureza, Açúcares Totais Recuperáveis (ATR) e Tonelada de Cana por Hectare (TCH) e em seguida os dados biométricos: diâmetro e comprimento dos colmos. Não há relatos bibliográficos que confirmem que a doença afeta algumas variáveis tecnológicas, como PBU e Pureza.

### **4.1 Resultados das análises dos dados pluviométricos**

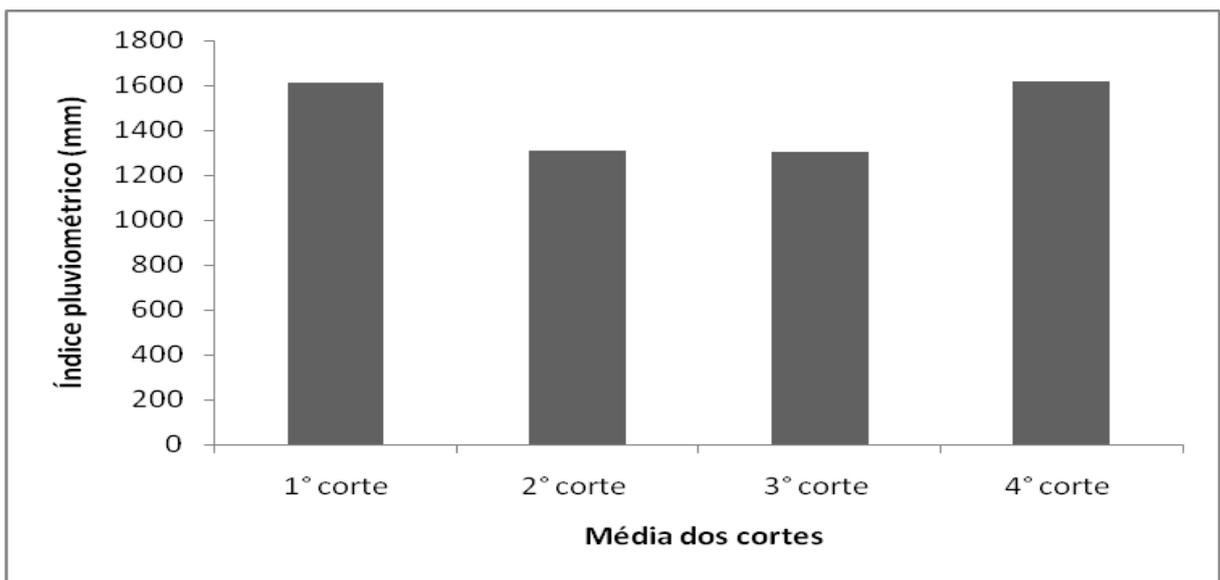
Dados de precipitação sugerem que as plantas não sofreram com estresse hídrico entre os períodos de maior expressão da doença (terceiro e quarto anos do experimento), pelo contrário, os índices mostraram-se favoráveis ao desenvolvimento. Brunini (2008) salienta que para a produção de sacarose, a planta precisa de condições favoráveis de umidade durante a fase vegetativa seguida de um período de restrição hídrica para induzir o repouso vegetativo e o enriquecimento em sacarose na época do corte. Essa colocação está de acordo com os resultados obtidos anualmente, no entanto as plantas estavam inoculadas com RSD e de acordo com Bailey e Bechet (1997), a doença pode causar reduções significativas na produtividade mesmo em boas condições de crescimento.

Os dados pluviométricos analisados mostram oscilação durante os quatro anos de condução do experimento, as médias das precipitações obtidas variaram entre 107,4 mm/mês (1611 mm/ano) no primeiro ano, 109 mm/mês (1309 mm/ano) no segundo ano, 108 mm/mês (1303 mm/ano) no terceiro ano e 134 mm/mês (1618 mm/ano) de chuvas no quarto ano do experimento. Na figura 6 são apresentadas as precipitações entre os anos de 2006 a 2010 e as setas indicam os meses em que foram realizadas as coletas.



**Figura 6.** Índices pluviométricos registrados mensalmente no período em estudo. As setas indicam os meses em que foram realizadas as colheitas.

A figura 7 representa os índices médios anuais para cada corte realizado no local do experimento. Os dados foram calculados a partir de resultados obtidos diariamente no local do experimento e calculadas as médias anuais.



**Figura 7.** Médias anuais dos quatro cortes realizados entre os anos de 2007 e 2010 no local do experimento. Os números representam as quantidades médias anuais de chuvas.

## 4.2 Resultados das análises de solo

Os resultados da análise química estão apresentados no apêndice A e os dados cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), alumínio ( $\text{Al}^{3+}$ ) de acidez total de alumínio a pH 7 ( $\text{H}^+ + \text{Al}^{3+}$ ), de soma de bases (SB) e capacidade de troca iônica (CTC) são representados em  $\text{mmol}/\text{dm}^3$  (milimol de carga por decímetro cúbico). Os resultados de matéria orgânica (MO) são apresentados em  $\text{g}/\text{dm}^3$  (gramas por decímetro cúbico) saturação por bases (V) e saturação por alumínio (m) serão expressos em porcentagem (RAIJ et al., 1997).

De acordo com a análise química do solo o ambiente de produção possuía condições favoráveis de desenvolvimento para as plantas e os resultados esperados de produtividade para os quatro anos deveriam girar em torno de 100 t/ha, no entanto podemos observar quebras na produtividade (Apêndice E14) a partir do segundo corte.

## 4.3 Resultados das análises de “Dot Blot enzyme immunoassay”

Os resultados obtidos mostraram que em nenhuma das variedades estudadas entre o primeiro e segundo cortes houve detecção da bactéria nas plantas controle (não inoculadas com o patógeno) e que a variedade RB855453 também não apresentou o patógeno no terceiro corte do experimento. Estes dados mostram que a termoterapia (binômio temperatura e tempo – 50,5°C por 2 horas) foi eficiente nos dois primeiros ciclos (cana-planta e primeira soca) das variedades de cana-de-açúcar utilizadas no trabalho. Portanto podemos concluir que a termoterapia é uma importante aliada no controle da bactéria Lxx, pois mantém a sanidade de plantas pelo menos entre o primeiro e o segundo cortes.

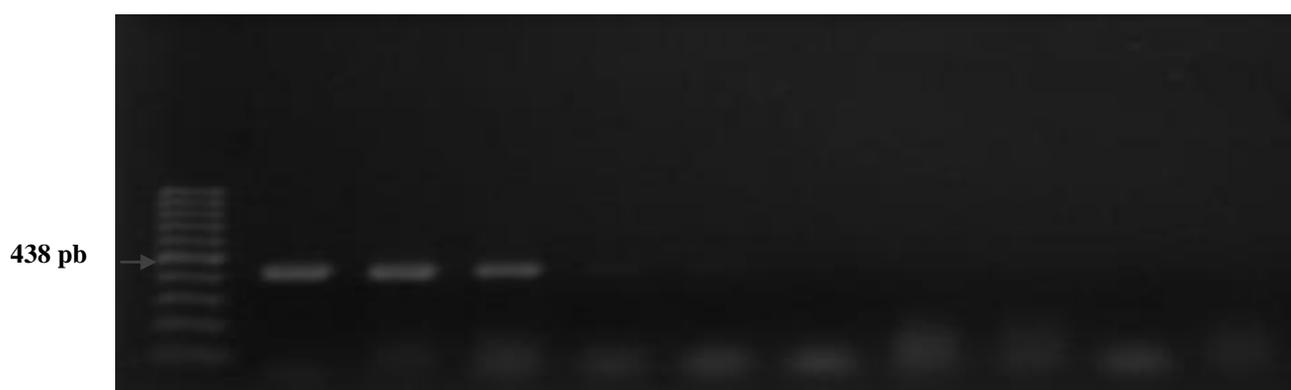
As maiores taxas de infecção foram detectadas no terceiro corte das variedades: RB855536, RB867515, RB925345 e RB928064 nas concentrações  $10^4$  e  $10^8$  UFC/ml (unidades formadoras de colônias por mililitros). Se considerarmos os dados obtidos por Gagliardi (2008) podemos sugerir que a variedade RB72454 que se comportou com características suscetíveis manteve o mesmo padrão nesse experimento onde nos dois primeiros anos apresentou baixa infecção pelo patógeno e sua produtividade média foi de

103,3 t/ha, ou seja, por ser uma variedade que apresenta baixa exigência em fertilidade do solo poderia ter apresentado uma produtividade pouco maior.

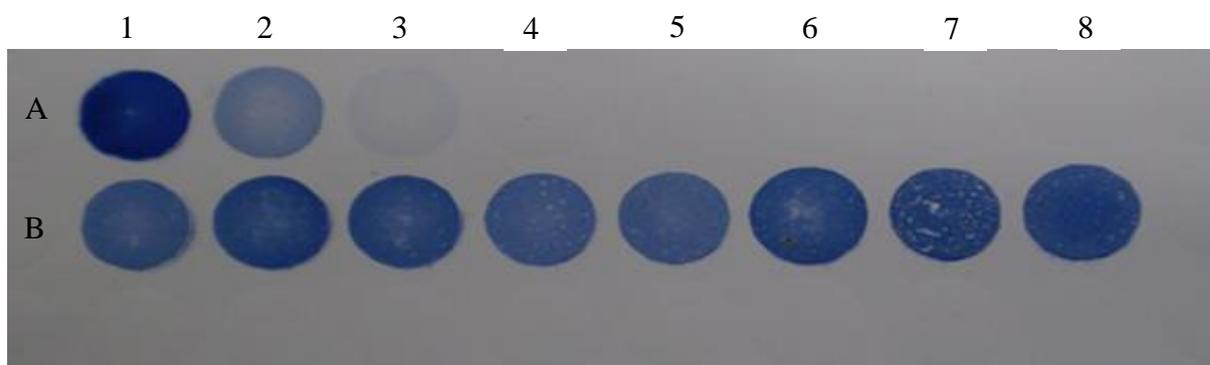
No quarto corte todas as parcelas apresentavam o patógeno, porém as taxas de infecção foram menores que as do terceiro corte, variando entre 10 a 40% o número de plantas infectadas em cada parcela.

#### 4.4 Resultados da reação em cadeia da polimerase (“Polymerase Chain Reaction”)

Os resultados obtidos mostrados nas Figuras 8 e 9 mostram que a reação de PCR, a partir da extração do caldo do xilema da cana, não foi tão sensível quanto a reação de Dot Blot. Esse fato foi confirmado, pois apenas duas plantas doentes foram detectadas no PCR enquanto no Dot Blot todas acusaram a presença do patógeno. Esses dados estão de acordo com Gao (2008) que obteve baixa eficiência do “PCR” com a metodologia de CTAB em relação ao “Dot Blot” utilizando caldo de xilema. Iglesia et al. (2003) sugere que a baixa eficiência possa estar ligada a inibidores exógenos e falsos positivos. Apesar da não obtenção de resultados positivos para a utilização do caldo nas análises rotineiras, outras metodologias poderão ser empregadas para detecção do patógeno.



**Figura 8.** Reação em cadeia da polimerase (PCR) coradas com brometo de etídeo, amplificando 438 pares de bases (pb) usando os iniciadores Cxx1 e Cxx2, nas condições estabelecidas de extração de DNA da variedade CB49260. Linha 1: marcador de peso molecular; Linha 2: controle positivo; Linhas de 3-10 DNA extraído do xilema de plantas infectadas da variedade CB49260; Linha 11 controle negativo.



**Figura 9.** Exame diagnóstico de raquitismo-das-soqueiras por “Dot blot” na variedade CB49260. As amostras dispostas em linhas (letras) e colunas números representam: A - Suspensão de células de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* utilizadas como controle positivo com concentração A1 –  $10^7$ UFC/mL; A2 –  $10^6$  UFC/mL; A3 –  $10^5$ UFC/mL; A4 –  $10^4$  UFC/mL. B1 – B8 caldo da variedade CB49260 empregado na análise.

## 4.5 Análises das variáveis tecnológicas

### 4.5.1 Análise dos dados para PBU (peso do bagaço úmido)

Os dados de PBU foram calculados a partir da coleta de 10 colmos em cada uma das parcelas do experimento durante os quatro anos de desenvolvimento do projeto. Resultados da análise estatística mostram valores da estatística F (Apêndice E1) para a variável tecnológica PBU significativo ao nível de 1% de probabilidade para os fatores variedade, cortes (Ano) e para a interação envolvendo os fatores variedade e ano. A variedade RB855536 normalmente apresenta um PBU mais baixo que as demais variedades, porém nesse ambiente de produção os valores apresentados foram intermediários enquanto a variedade RB72454 apresentou a menor média de PBU.

Comparações apresentadas (Apêndice E2) mostram que não houve diferenças significativas entre as médias das variedades calculadas entre os níveis dos principais fatores calculados para PBU nas quatro repetições dentro das sete variedades estudadas com diferentes concentrações. Entre as variedades as que tiveram maior diferença entre os valores

médios calculados para esta variável foram RB72454 (125,8 g) e RB925345 (139,6 g) diferindo estatisticamente entre si.

Também o fator ano foi altamente significativo, F igual a 231,4 (Apêndice E2). A interação dos fatores ano x variedade foi a única que afetou o peso do bolo úmido indicando que o comportamento das variedades dentro de cada corte não foi exatamente o mesmo, enquanto outras interações envolvendo o fator concentração de bactérias dentro de cada uma das variedades e nos diferentes cortes não foram significativas. Uma melhor visualização do que ocorreu com a interação significativa pode ser observada no Apêndice F1. De acordo com os dados obtidos o PBU é influenciado pelos fatores, variedades, ano e pela interação entre variedade e ano, porém os fatores, concentração de bactérias e todas as interações envolvendo este fator não influenciaram o resultado do PBU, ou seja, os valores médios obtidos mostram que as inoculações não foram eficientes a ponto de causar diferença significativa entre os resultados obtidos. O aumento da doença constatado pelo aumento do número de bactérias no terceiro e quarto cortes não influenciou na pesagem do bagaço úmido já que no terceiro e quarto cortes as médias do PBU foram mais significativas que no primeiro e segundo ano onde o número de bactérias foi menor.

#### **4.5.2 Análise dos dados para Brix, Pol e Pureza**

A análise de variância realizada para a variável Brix (Apêndice E3) mostra que o valor d teste estatístico de F foi significativo apenas para os fatores principais: variedade e ano e não para concentrações. Ou seja, os valores médios obtidos são significativamente diferentes quando referentes às variedades utilizadas no estudo e não às diferentes concentrações de bactérias inoculadas nas variedades.

Dos resultados das interações ano x variedades (Apêndice F2), ano x concentração e ano x concentração x variedades apenas a primeira foi significativa, ou seja, apenas em relação à interação entre anos e variedades utilizadas. A interação ano x concentração de bactérias e a interação tripla não apresentaram resultados significativos.

Resultados médios obtidos para a variável Brix (Apêndice E4) mostram que houve variação pouco significativa entre as médias das variedades. A RB855453 foi a que apresentou a maior média diferindo significativamente das variedades. Entre as concentrações inoculadas de Lxx não houve diferença significativa entre os resultados médios. O fator ano

apresentou diferença significativa entre os dados médios obtidos nos quatro cortes mostrando que o aumento bacteriano não afetou a produção de açúcar, pois houve aumento do Brix, esse aumento poderia ser resultado de índices de infecção mais baixo no quarto ano do experimento. Esses dados condizem com os apresentados por Bailey e Bechet (1997) que obtiveram em plantas irrigadas infectadas com RSD valores altos de Brix, porém esse resultado não persistiu entre os quatro cortes.

Os dados analisados para Pol (Apêndice E5) mostram que o valor de F foi altamente significativo (nível de significância menor que 1%) para os fatores, variedades (F=15,11) e ano (F=269,0), esses dados sugerem que essa variável foi influenciada apenas pelos cortes e pelas variedades, mas não pelas concentrações bacterianas inoculadas. A melhor visualização dessa interação pode ser observada no apêndice F3. Com relação às interações a variável Pol é influenciada apenas pela interação ano x variedade.

Os dados médios dos principais efeitos calculados para Pol (Apêndice E6) mostram que no primeiro ano a média para esse fator foi a menor nos quatro anos do experimento (14,38%) coincidindo com os dados de Gagliardi (2008), no segundo e terceiro ano do experimento a porcentagem em massa de sacarose aparente aumentou para 17% e no quarto ano (correspondente ao quarto corte) ocorreu a maior porcentagem de Pol (18,87%). Portanto valores de dados médios dos quatro cortes mostram um aumento progressivo do Pol ao longo dos anos, isso poderia ser um indício de que a planta aumenta o seu potencial de produção de açúcar como resposta ao ambiente ou a colonização bacteriana.

Entre as concentrações utilizadas a inoculação  $10^2$  apresentou uma média maior que o controle, sugerindo falha durante as inoculações bacterianas. Os dados médios de cortes (ano) mostram oscilação entre os quatro anos, porém o aumento no número de bactérias identificadas no terceiro e quarto cortes não influenciam na variável Pol das variedades utilizadas.

Os dados obtidos para Brix e Pol coincidem com os obtidos para Pureza (Apêndices E7 e E8), pois os únicos fatores estatisticamente significativos foram: variedades e ano (Apêndice F4) além da interação de ambos, portanto as concentrações bacterianas não influenciaram na quantidade de açúcar de cada uma das variedades em estudo. Dados de Comstock (2008) mostram que não há perda significativa de açúcar em parcelas infectadas por RSD, entretanto Grisham (1991) considera perdas de produção de açúcar a partir do segundo ano quando há variedades suscetíveis a doença. Esses dados não coincidem com os de Ngaruiya, Shipton e Coventry (2005) que obtiveram resultados que mostram que socas saudáveis rendem mais açúcar que socas doentes, pois não houve diferença entre plantas

doentes e saudáveis neste experimento. Entretanto em nosso estudo não podemos afirmar que a doença reduz a taxa de açúcares já que não houve diferença entre plantas doentes e saudas.

#### **4.5.3 Análise dos dados para Fibras**

Os dados analisados (Apêndices E9 e E10) mostram que a variável fibras foi influenciada pelas interações entre variedades x anos de estudo (Apêndice F5), que se mostrou estatisticamente significativa, ou seja, a variável fibra é influenciada pelos cortes em relação a cada uma das variedades e não pela quantidade de bactérias inoculadas.

Entre as variedades a maioria apresentou resultados médios similares (Apêndice E10) em relação à variável fibra. A melhor visualização dessa interação pode ser observada no Apêndice F2. Duas variedades contrastaram em relação aos valores médios, a variedade RB72454 apresentou resultado abaixo da média (10,93 g) e a variedade RB925345 apresentou a média mais alta para teor de fibra, esses dados coincidem com os apresentados pela RIDESA (REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROALCOOLEIRO, 2010) demonstrando que o ambiente de produção interfere na produtividade das plantas. Os valores obtidos sugerem ainda que as inoculações bacterianas utilizadas nesse experimento não afetaram os teores de fibras das variedades.

#### **4.5.4 Análise dos dados para ATR (Açúcares Totais Recuperáveis)**

As variáveis estudadas mostraram alto grau de significância para os fatores variedades e ano (Apêndice E11) visualizar gráfico no apêndice F6. Entre as interações estudadas variedades x ano foi significativa. Dados médios de ATR (Apêndice E12) mostram que houve um aumento na média anual entre os cortes: primeiro ano 123 kg t<sup>-1</sup>, 143 kg t<sup>-1</sup> no segundo ano; 140 kg t<sup>-1</sup> no terceiro ano e 150 kg t<sup>-1</sup> no quarto ano. Entre as médias inoculadas com diferentes concentrações bacterianas não houve diferença significativa. A variedade RB928064 foi a que apresentou a menor média (136 kg t<sup>-1</sup>) enquanto RB855453 apresentou a maior média (146 kg t<sup>-1</sup>) diferindo estatisticamente entre si. A melhor visualização das interações entre variedades e anos pode ser visualizada no Apêndice F6.

#### **4.5.5 Análise dos dados para TCH (tonelada de cana por hectare).**

Perdas na produtividade dos canaviais devido ao RSD podem variar dependendo da variedade, do corte e da severidade da doença (GAO et al., 2008). Dados médios de TCH (Apêndice E13) mostram que houve queda na produtividade geral do experimento ao longo dos cortes. No primeiro corte a produtividade média foi de 147 toneladas de cana por hectare, considerada alta. No segundo corte houve queda de 37% entre as duas safras, e o valor de TCH foi de 93 t/ha. A variedade RB855453 foi a que apresentou a menor produtividade com uma média de 90 t/ha e em contrapartida a variedade RB925345 foi a que manteve a média mais alta de produtividade, cerca de 116 toneladas de cana por hectare.

Não houve queda na produtividade entre o terceiro e quarto cortes onde os valores foram 86 toneladas de cana por hectare. Houve redução de 58% do primeiro corte em relação ao terceiro e quarto, esses valores estão acima da média considerando que a preparação do solo continha nutrientes suficientes para manter uma produtividade média de 100 t/ha por quatro ou cinco cortes. Além disso, os dados confirmam que a incidência de RSD aumenta na maioria dos cultivares com a idade de corte em cada soca sucessiva (COMSTOCK, 1995). Bailey e Bechett (1997) mostram redução que variam entre 19 e 20% na produtividade.

Os dados obtidos mostram ainda que todas as variedades foram afetadas, considerando que a análise de variância para a interação ano x variedades foi altamente significativa. Visualizar gráfico de interações variedades x ano no apêndice F7. Entretanto para a interação ano x concentração de bactérias os dados não foram significativos (Apêndice E14) como nas variáveis anteriores, sugerindo que as etapas iniciais de implantação do experimento não foram realizadas de maneira adequada de modo que houve contaminação durante o plantio do experimento ou que as variedades utilizadas respondem da mesma maneira quando infectadas ou não pelo patógeno.

## **4.6 Resultados das análises biométricas**

### **4.6.1 Análise dos dados para a variável comprimento dos colmos**

Os resultados obtidos (Apêndice E15) mostraram que houve diminuição no comprimento dos colmos de todas as variedades constadas no experimento. A diminuição no comprimento dos colmos das plantas ocorre a partir do segundo ano e se torna mais evidente no terceiro e quarto cortes. Dados de Bailey e Bechett (1986) mostram que a redução no comprimento dos colmos gira em torno de 3,8% ao ano.

A variedade RB925345 (Apêndice E16) apresentou a maior média de comprimento dos colmos (2,96 metros) e, em contrapartida à variedade RB855453 teve média de 2,39 metros de comprimento. As variedades RB928064, RB72454 e RB925268 apresentaram valores médios de 2,53, 2,56 e 2,63 metros respectivamente. Duas outras variedades, RB855536 e RB867515 são variedades que apesar de mostrar altas taxas de infecção na análise de Dot Blot mantêm uma média no comprimento variando entre 2,70 e 2,75 metros, entretanto não houve variação significativa entre as médias de concentração bacteriana, mostrando que as inoculações podem não ter sido eficientes. As únicas interações estatisticamente significativas foram entre anos x variedades, que podem ser observadas no apêndice F8.

### **4.6.2 Análise dos dados para a variável diâmetro dos colmos**

Os dados analisados mostram que houve redução no diâmetro dos colmos no terceiro e quarto cortes, mostrando-se mais significativa no quarto corte. Diferenças significativas foram observadas entre as interações ano x variedades apenas, e os dados podem ser melhor observados no Apêndice F9. A variedade RB925453 apresentou (Apêndice E17) a maior média de diâmetro de colmos (2,95 centímetros) e diminuição foi constatada entre o terceiro e quarto cortes, porém pouco significativa. RB72454, RB928064 e RB925268 apresentaram diâmetro médio de colmos de 2,74 cm esses dados estão acima daqueles apresentados por Gagliardi (2008) que mostra a variedade RB72454 com média de 2,59 cm de diâmetro.

Dados de Ngaruya, Shipton e Coventry (2005) mostram que não existe evidência que sugere que a infecção por RSD tem algum efeito significativo no diâmetro dos colmos e de acordo com Viswanathan (2004) a redução pode chegar a 10 mm entre canas saudáveis e doentes. Porém em nosso trabalho não podemos sugerir que a infecção por Lxx tenha sido a responsável por reduções já que não ocorreram diferenças significativas entre as plantas inoculadas com diferentes doses de Lxx e plantas não inoculadas.

## 5 CONCLUSÕES

Com base nos dados observados e na metodologia empregada podemos concluir:

- a) Perdas na produtividade (TCH) foram observadas nos quatro cortes do experimento e essas perdas não estão relacionadas com plantas inoculadas com Lxx já que não houve diferença significativa entre plantas doentes e sadias;
- b) Houve aumento nas taxas de Lxx ao longo dos anos em todas as variedades, constatado pela metodologia de Dot Blot, entretanto não podemos considerar que elas estejam ligadas a diminuição da produtividade;
- c) Resultados mostram que os dados tecnológicos não foram afetados ao longo dos cortes, apenas a produtividade foi reduzida devido a fatores relacionados à número de cortes e variedade utilizada, ou seja, as perdas ocorreram de maneira gradual e natural ao longo dos cortes;
- d) Apesar da redução na produtividade as taxas de açúcares não foram afetadas;
- e) A redução no comprimento e diâmetro dos colmos provoca uma ligeira diminuição nos tecidos da planta ocasionando uma severa redução da produtividade em canaviais entre o primeiro e terceiro corte;
- f) Os resultados obtidos no PCR, a partir da extração de DNA de caldo, mostraram ser menos eficientes que o Dot Blot nas condições estudadas. Isso sugere que outras partes da planta devam ser utilizadas bem como outros métodos de extração.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, R.A. The systematic distribution and relative occurrence of bacteria in sugarcane varieties by ratoon stunting disease. **Proceedings of the South African Technologies Association**, Mont Edgecombe, v.6, n.9, p. 466-467, 1977.

BAILEY, R.A.; BECHET, G.R. Further evidence of the effects of ratoon stunting disease on production under irrigated and rainfed conditions. **South African Sugar Association Experiment Station**, Mount Edgecombe, v.71, p 97-101, 1997.

BAILEY, R.A.; BECHET, G.R. Effect of ratoon stunting disease on the yield and components of yield of sugarcane under rainfed conditions. **Proceedings of the South African Technologies Association**, Mont Edgecombe, p. 143-147, 1986.

BAILEY, R.A.; TOUGH, S.A. Ratoon stunting disease: survival of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, in field soil and its spread to newly planted sugarcane. **Proceedings of the South African Technologies Association**, Mont Edgecombe, p. 75-77, 1992.

BELOTI, L.L. **Análise *in vitro* da expressão de genes de adaptação e de patogenicidade de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em presença de fluido vascular de cana-de-açúcar**. 2008. 51f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

BIDOIA, M. A. P.; BIDOIA, M.A.P. Instalação, condução e colheita de experimentos. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p.821-838.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **MAPA**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

BRUMBLEY, S.M.; PETRASOVITS, L.A.; BIRCH, R.C.; TAYLOR, P.W.J. Transformation and transposon mutagenesis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease of sugarcane. **The American Phytopathological Society**, Queensland, v. 15, n. 3, p. 262–268, 2002.

BRUMBLEY, S.M.; PETRASOVITS, L. A.; MURPHY, R.M.; NAGEL, R.J.; CANDY, J.M.; HERMANN S.R. Establishment of a functional genomics platform for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **The American Phytopathological Society**, Queensland, v. 17, n. 2, p. 175–183, 2004.

BRUNINI, O. Ambientes climáticos e exploração agrícola da cana-de-açúcar. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p.179-204.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística**: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed, 2004. 255 p.

CARDOSO, C.O.N. Isolamento da bactéria do raquitismo (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) no Brasil. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, n.34, p.48-52, 1986.

CARNEIRO, J.B. ; SILVEIRA, S.F. ; SOUZA FILHO, G.A.; OLIVARES, F.L.; GIGLIOTI, E.A. Especificidade de anti-soro policlonal à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* . **Fitopatologia Brasileira**, Campos de Goycatazes, v.29, p.614-619, 2004.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília EMBRAPA, 2004. 307p.

CHAGAS, P.R.R.; TOKESHI, H. Método alternativo de coloração do xilema para avaliação do índice de contaminação do raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar. **Brasil Açucareiro**, Piracicaba, v.106, n. 4, p. 16 -24, 1988.

COMSTOCK, J.C.; LENTINI, R.S. **Sugarcane ratoon stunting disease**. Gainesville: University of Florida, 2005. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/files/SC/SC00200.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2010.

COMSTOCK, J.C. Sugarcane yield loss due to ratoon stunt. **Journal Association Sugar Cane Technologists**, Baton Rouge, v.28, p.22-31, 2008.

COMSTOCK, J.C. The effect of ratoon stunting disease on the yield of some south African sugarcane varieties under irrigated and rainfed conditions. **Journal Association Sugar Cane Technologists**, Mount Edgecombe, p.74-79, 1995.

COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL – CATI. **Distribuição geográfica de área cultivada e número de produtores, 2007/2008**. Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/Cati/principal/index.php>>. Acesso em: 05 jul. 2010.

CROFT, B. J.; SMITH, G. R. Major diseases affecting sugarcane production in Australia and recent experiences with sugarcane diseases in quarantine. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON SUGARCANE GERMPLASM CONSERVATION AND EXCHANGE, 1995, Queensland. **Proceedings...** Canberra, 1995. p. 55-58,

DAMANN JR., K.; BENDA, G.T.A. Evaluation of commercial heat-treatment methods for control of ratoon stunting disease of sugarcane. **Plant Disease**, Baton Rouge, v.6, p.966-967, 1983.

DAMANN JR., K.E.; HOLLER, C.A. Distribution and incidence of ratoon stunting disease in Louisiana sugarcane. **Plant Disease**, Baton Rouge, v. 75, p. 568-571, 1991.

DAVIS, M.J. ; GILLASPIE, A. G.; VIDAVER, A. K.; HARRIS, R. W. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov.; subsp. nov and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov.; pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermuda grass stunting disease. **International Journal of Sugarcane Bacteriology**, Washington, v.34, p. 107-117, 1984.

\_\_\_\_\_. A method to screen for resistance to ratoon stunting disease of sugarcane. **Sugar cane**, High Wycombe, v.6, p. 9-16, 1994.

DAVIS, M.J.; PURCEL, A.H.; THOMSON, S.V. Isolation media for the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, Lancaster, v.70, p. 425-429, 1980.

DAVIS, M.J. Taxonomy of plant-pathogenic coryneform bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 115-140, 1986.

DEAN, J.L.; DAVIS, M.J. Yield losses caused by ratoon stunting disease of sugarcane in Flórida. **Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists**, Washington, v.10, p. 66-72, 1990.

DIAS, F.L.F.; ROSSETTO, R. Calagem e adubação em cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V. et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, p.108-119, 2006.

DUTTAMAJUMDER, S.K. Bacterial Diseases of sugarcane in India: a Bird's eye view. In. RAO, G.P.; SALEM, S.A.; ROTT, P. **Sugarcane pathology: bacterial and nematode diseases**. Enfield: Science Publishers, v.3. p.15-50, 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. A **Embrapa**. Disponível em: <[http://www.embrapa.br/a\\_embrapa](http://www.embrapa.br/a_embrapa)>. Acesso em: 09 mar. 2010.

EVTUSHENKO, L.I.; DOROFEEVA, L. V.; SUBBOTIN, S. A.; COLE, J. R.; TIEDJE, J. M. *Leifsonia poae* gen. Nov.; sp.nov.; isolated from nematode galls on *Poa Annua*, and

reclassification of ‘*Corynebacterium aquaticum*’ Leifson 1962 as *Leifsonia aquatic* (ex Leifson 1962) gen. nov.; nom. rev.; comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al., 1984) gen. nov.; comb. nov. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, Pushchino, v.50, p. 371-380, 2000.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.  
Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 14 nov. 2009.

FEGAN, M.; CROFT, B.J.; TEAKLE, D.S.; HAYWARD, A.C.; SMITH, G.R. 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**, London, v.4, n.47, p. 495-504, 1998.

FERNANDES, A.C. **Cálculos na agroindústria canavieira**. Piracicaba: STAB, 2000.193 p.

FERNANDES JR., A.R.; GANEM JR., E.J.; MARCHETTI, L. B. L.; URASHIMA, A.S. Avaliação de diferentes tratamentos térmicos no controle do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n.1, p. 60-64, 2010.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do Instituto Agronômico no seu estabelecimento no Brasil. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. p.31-44.

GAGLIARDI, P.R. **Avaliação da resistência à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* , agente causal do raquitismo-da-soqueira (RSD), em variedades comerciais de cana-de-açúcar**. 2008. 119f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

GAGLIARDI, P.R. **Análise estrutural e comparativa do genoma de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 2003. 61f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

GAO, S.J.; PAN, Y.B.; CHEN, R.K.; CHEN, P.H.; ZHANG,H.; XU, L.P. Quick detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by PCR and nucleotide sequence analysis of PCR amplicons from Chinese *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* isolates. **Sugar Technology**, Houma, v.10, n.4, p.334-340, 2008.

GATI DE ALMEIDA, I.M. Doenças causadas por bactérias. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. p.437-450.

GIGLIOTI, E.A. RSD impact in sugar industries: Brasil. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 1998, Edimburg. **Anais...** Edimburg: [s.n.], 1998. p. 9-16.

GIGLIOTI, E.A. **Método conciliado para avaliar os efeitos da colonização de colmos de cana-de-açúcar por *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* na funcionalidade do xilema.** 1997. 134f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

GILLASPIE JR., A.G.; DAVIS, J.M. Ratoon stunting disease of sugarcane. In: MUKHOPADHYAY, A. N. et al. (Ed.). **Plant disease of importance: diseases of sugar, forest and plantation crops.** New Jersey: Prentice Hal, 1992. v.4. p.41-61.

GILLASPIE, A.G.; TEAKLE, D.S. Ratoon stunting disease In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE JR., A.G. **Diseases of sugarcane: major diseases.** Amsterdam: Elsevier Science, 1989. p. 59-80.

GILLASPIE JR., A.G.; DAVIS, R.E.; WORLEY, J.F. Diagnosis of ratoon stunting disease based on the presence of a specific microorganism. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.57, n.12, p.987-990, 1973.

GRISHAM, M.P. Ratoon stunting disease. In: RAO, G.P.; SALEM, S.A.; ROTT, P. **Sugarcane pathology: bacterial and nematode diseases.** Enfield: Science Publishers, 2004. v. 3. p.77- 96.

GRISHAM, M.P. Effect of ratoon stunting disease on yield of sugarcane grown in multiple three-year plantings. **Phytopathology**, Houma, v. 81, n. 3, p. 337- 40, 1991.

HARRISON, N.A.; DAVIS, M.J. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, Fort Lauderdale, v.78, n.6, p. 722-727, 1988.

\_\_\_\_\_. Comparison of serological techniques for diagnosis of ratoon stunting disease. **Sugar Cane**, Port Talbot, p.5-9, 1990.

\_\_\_\_\_. Infectivity titrations of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and sugarcane cultivar differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Plant Disease**, St. Paul, v.70, n.6, p. 556-558, 1986.

HUGHES, C.G. The economic importance of ratoon stunting disease. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, Durban, v. 15, n. 1, p. 213-217, 1974.

HSU, H.T. Development of enzyme linked, tissue blot and dot blot immunoassays for plant virus detection. In: BURNS R (Ed.) **Plant pathology: techniques and protocols**. New York: Humana Press, 2009. p. 15-25.

IGLESIA, A. et al. Detección de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* mediante la reacción en cadena de polimerase (PCR). **Revista Protección Vegetal**, Havana, v.18, n.1, p.23-27, 2003.

JAMES, G. A review of ratoon stunting disease. **International Sugar Journal**, London, v. 98, n.1174, p. 532-541, 1996.

KAO, J.; DAMANN, JR., K.E. In situ localization and morphology of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. **Canadian Journal of Botany**, Los Angeles, v.58, p. 310-315, 1980.

LAVANHOLI, M.G.D.P. Qualidade da cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de açúcar e álcool. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p.697-722.

LINNÉ, C. **Species plantarum**. Stockholm: Imprensis Laurentii Salvii, 1753. v.2. p. 970-971.

LOUWS, F.J.; BELL, J.; MEDINA-MORA, C.M. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. **Phytopathology**, Lancaster, v.88, p.862-868, 1998.

LOUWS, F.J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C.T. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 85, p. 528-536, 1995.

MARAMOROSCH, K.; PLAVSIC-BANJAC; BIRD, J.; LIU, L. J. Electron microscopy of the ratoon stunted sugar cane: microorganisms in xylem. **Phytopathologische zeitschrift**, Berlin, v.77, p.270-273, 1973.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; ARIZONO, H. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2005. 969p.

MAULE, R. F.; MAZZA, J.A.; MARTHA JR, G.B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.58, n.2, p.295-301, 2001.

MCDOUGALL, W.A.; STEINDL, D.R.L.; ELLIOT, J.T. Variations in primary vigour in the variety Q28. **Cane Growers' Quarterly Bulletin**, Brisbane, v. 12, p. 31-34, 1948.

MONTEIRO-VITORELLO, C.B. et al. The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v.17, p. 827-836, 2004.

MOZAMBANI, A.E.; PINTO, A.S.; SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V. et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP2, 2006. p.108-119.

MURRAY, M.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.8, p.4321-4325, 1980.

NGARUIYA, P.N.; SHIPTON, W.A.; COVENTRY, R. Ratoon stunting disease of sugarcane as influenced by environmental stressors. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology**, Queensland, v.27, p. 324- 333, 2005.

NOVA Europa. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/Nova\\_Europa](http://pt.wikipedia.org/wiki/Nova_Europa)>. Acesso em: 10 maio 2010.

PAN, Y.B.; GRISHAM, M.P.; BURNER, D.M. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of ratoon stunting disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v.3, n.82, p.285-290, 1998.

PRADO, H.; PÁDUA JR., A.L.; GARCIA, J.C.; MORAES, J.F.L.; CARVALHO, J.P.; DONZELI, P.L. Solos e ambientes de produção. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p.179-204.

PURCELL, A.H.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review Phytopathology**, Leesburg, v.34, p 131-151, 1996.

RAIJ, B.V.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. Instituto Agrônômico. 2 ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 1997. p. 237-239. (Boletim Técnico, 100).

RAMOS, A.T.M. Ensaio da atividade celulolítica das bactérias *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 11, 2004, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: USP, 2004. Disponível em: <<http://www.usp.br/siicusp/Resumos/12Siicusp/ficha4297.htm>>. Acesso em: 18 fev. 2010.

RAVEN, P.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROALCOOLEIRO. **Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar**. Curitiba, 2010. p. 136.

RICAUD, C. Problems in the diagnosis of ratoon stunting disease. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, Durban, v.15, p. 241-8, 1974.

ROSSLER, L.A. The effects of ratoon stunting disease on three sugarcane varieties under different irrigation regimes. **Proceedings International Society of Sugar Cane Technologists**, Durban, v.15, p. 250-257, 1974.

SANGUINO, A. Binômio tempo x temperatura no controle do raquitismo da soqueira (RSD) da cana-de-açúcar, pelo processo de termoterapia de gemas isoladas. **Cadernos Copersucar**, Campinas, v.25, p. 1-5, 1989.

\_\_\_\_\_. Principais moléstias da cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B. **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.41-57.

SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR. **SECEX: competências**. Disponível em: <<http://www2.desenvolvimento.gov.br/sitio/secex/secex/competencia.php>>. Acesso em: 18 nov. 2009.

SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F.J. The. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assited phylogenetic pattern analysis. **World Journal of Microbiology**, Oxford, v.2, n.12, p.163-174, 1996.

SEGATO, S.V.; PEREIRA, L.L. Colheita da cana-de-açúcar: corte manual. In: SEGATO, S.V. et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP2, 2006. p.319-332.

SILVA, E. J.; CHAVES, A.; OLIVEIRA, M. K. R. S.; RODRIGUES, W. D. L.; GUIMARÃES, L. M. P. Eficiência e aspectos econômicos na preservação de amostra para diagnóstico do raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 9., 2009, Recife. **Anais ...** Recife: UFRPE, 2009. p. R1200-R1200.

SOUZA, V.C.;LORENZI,H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado na APGII. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, 2005. 639p.

STEINDL, D.R.L. Ratoon stunting disease. In: MARTIN, J.P.; ABBOTT, E.V.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Sugar cane disease of the world**. Amsterdam: Elsevier, 1961. v.1. p.433-459.

\_\_\_\_\_. Ratoon stunting disease. **Proceedings International Society Sugar Cane Technology**, Durban, v.7, p. 457-465, 1950.

\_\_\_\_\_. Q28 disease. **Cane Grow**, Melbourne, v.12, n.4, p. 191-193, 1949.

SUZUKI, K. *Leifsonia* gen. Nov., a genus for 2,4-diaminobutyric acid containing actionmycetes to accommodate “*Corynebacterium aquaticum*” Leifson 1962 and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Wako, v.45, p. 253-262, 1999.

TEAKLE, D.S. The sugarcane ratoon stunting disease bacterium. In: FAHY, P.C.; PERSLEY, G.J. (Ed.) **Plant bacterial diseases**: a diagnostic guide. North Ryde: Academic Press, 1983. p. 247-257.

TEAKLE, D.S.; APPLETON, J.M.; STEINDL, D.R.L. An anatomical basis for resistance for resistance of sugarcane to ratoon stunting disease. **Physiological Plant Pathology**, New York, v. 12, p. 83-91, 1978.

TEAKLE, D.S.; KONTZE, D.; APPLETON, J.M. A note on the diagnosis of ratoon stunting disease of sugarcane by negative-stain electron microscopy of associated bacterium. **Journal of Applied Bacteriology**, Princeton, v.46, p. 279-284, 1979.

TEAKLE, D.S.; SMITH, P.M.; STEINDL, D.R.L. Association of a small coryneform bacterium with the ratoon stunting disease of sugarcane. **Australian Journal of Agricultural Research**, Queensland, v. 24, p.269-74, 1973.

\_\_\_\_\_. Ratoon stunting disease of sugarcane: possible correlation of resistance with vascular anatomy. **Phytopathology**, Queensland, v. 65, p. 138-141, 1975.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2. p. 207-225.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2. p. 181-196.

URASHIMA, A. S. **Análise de RSD**. Disponível em:  
<<http://pmgca.dbv.cca.ufscar.br/htm/serv/rsd.php>>. Acesso em: 11 abr. 2008.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em:  
<<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 24 fev. 2010.

VISWANATHAN, R. Serodiagnosis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* causing ratoon stunting disease in sugarcane. In: RAO, G.P.; SALEM, S.A.; ROTT, P. **Sugarcane pathology: bacterial and nematode diseases**. Enfield: Science Publishers, 2004. v.3. p.155-173.

ZERILLO, M. M. **Análise genômica macro comparativa entre *Leifsonia xyli* subsp. *cyndontis* e *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 2008. 159f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

WESTPHAL, A.; MIRKOV, T.E. Need for Improved detection of ratoon stunting disease in sugarcane in south Texas. **Subtropical Plant Science**, Welasco, v. 55, p. 68-71, 2003.

WISMER, C.A. A sugarcane clone apparently immune to RSD. **Sugarcane Pathology**, Florida, v. 6, p.46, 1971.

WORLEY, J.F.; GILLASPIE JR., A.G. Electron microscopy in situ of the bacterium associated with ratoon stunting disease in sudangrass. **Phytopathology**, Beltsville, v. 65, p. 287-295, 1975.

**APÊNDICES**

**APÊNDICE A** - Análise química do solo da área do experimento com RSD na cultura da cana-de-açúcar

**A.** Análise química do solo da área do experimento com RSD na cultura da cana-de-açúcar.

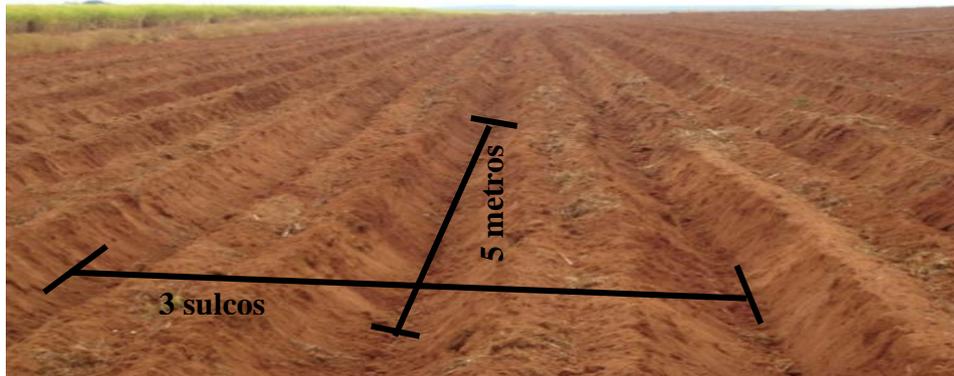
Amostras	P Resina <sup>1</sup>	MO	pH	K	Ca	Mg	H <sup>+</sup> Al	Al	SB	CTC	V	S	M
	mg/dm <sup>3</sup>	g/dm <sup>3**</sup>	CaCl <sub>2</sub>				mmol <sub>C</sub> /dm <sup>3****</sup>				%	mg/dm <sup>3</sup>	%
Superfície	3	20	5,1	1,8	19	7	16	0,4	27,8	43,8	63	6	1,4
Profundidade	3	12	4,3	1,2	11	4	28	2,5	16,2	44,2	37	9	13,4

<sup>1</sup>Método de análise

\* Os dados referentes a análise química são apresentados na página 31

## APÊNDICE B - Mapas de campo

**B1.** Preparação do terreno – 3 sulcos com 1,5 metros de espaçamento por 5 metros de comprimento.



Área total 6000 m<sup>2</sup>

**B2.** Distribuição das variedades plantadas em campo

Repetição IV	23	36	25	35	11	X	4	X	X	17
	34	X	32	2	7	X	13	26	X	21
	14	X	12	22	31	X	33	6	X	1
	3	16	5	15	27	X	24	X	X	37
Repetição III	X	12	22	23	31	X	33	X	X	1
	16	32	35	7	26	X	11	X	37	17
	5	25	15	14	X	4	24	X	13	X
	34	X	36	2	7	X	27	X	6	21
Repetição II	X	5	12	X	14	31	33	22	X	X
	X	32	25	1	11	36	4	37	23	3
	X	X	X	27	17	16	24	15	21	35
	X	26	X	6	34	7	13	2	X	X
Repetição I	13	17	X	X	3	X	2	7	32	X
	37	X	X	X	24	6	15	27	5	16
	25	35	X	X	4	X	26	11	14	36
	1	34	X	X	33	21	22	31	12	23

80 metros

\*Os quadrantes marcados em X variedades retiradas do experimento devido a problemas na análise dos resultados

**APÊNDICE C - Ilustrações**

**C1.** Coleta de material em campo. **a**, visão geral de um dos corredores do experimento; **b**, desinfecção do material de corte em campo para evitar contaminação entre as parcelas; **c**, retirada de dez canas de cada uma das parcelas; **d e e** separação e amarração dos feixes de canas enviadas para análise tecnológica e biométrica.



a



c



d

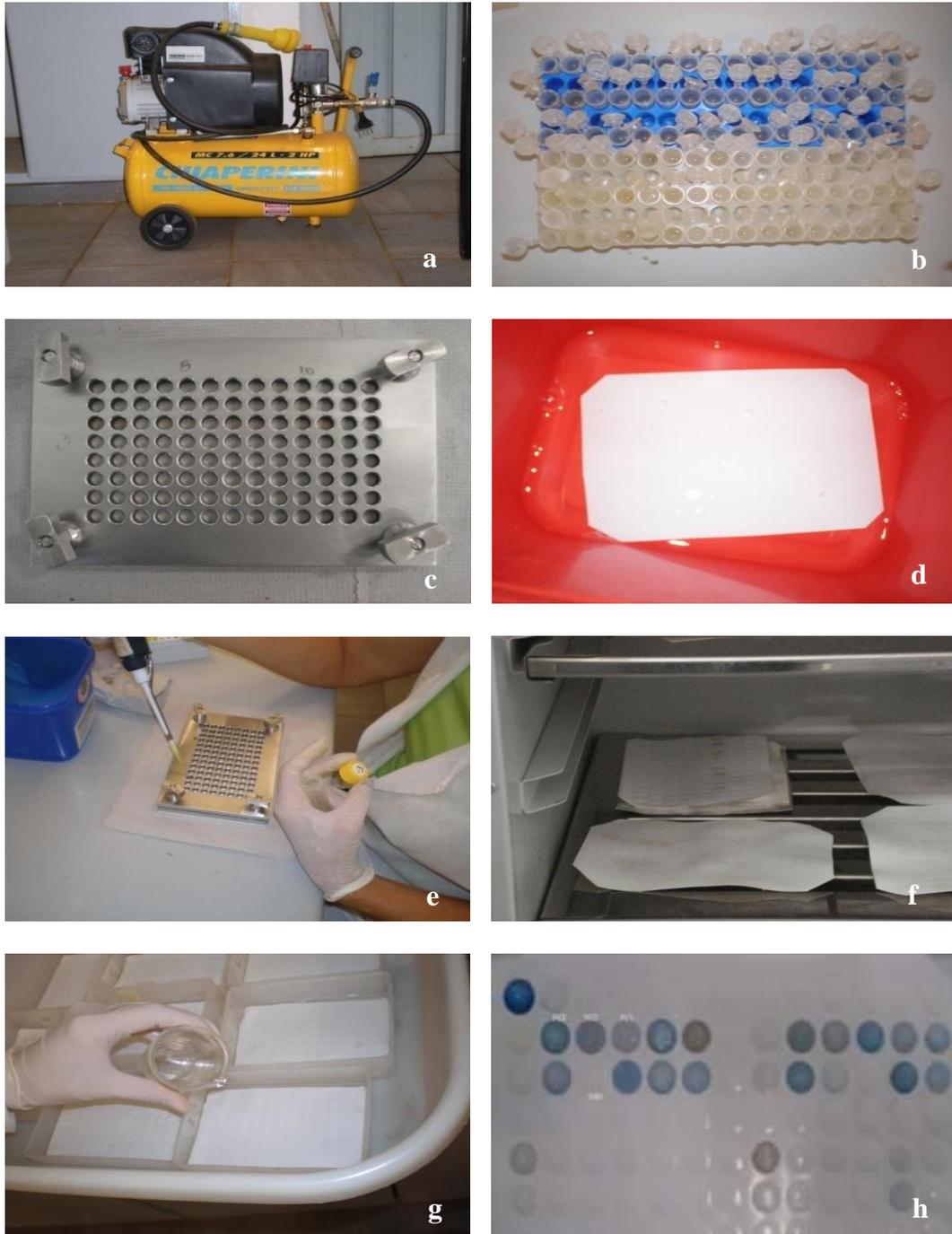


e



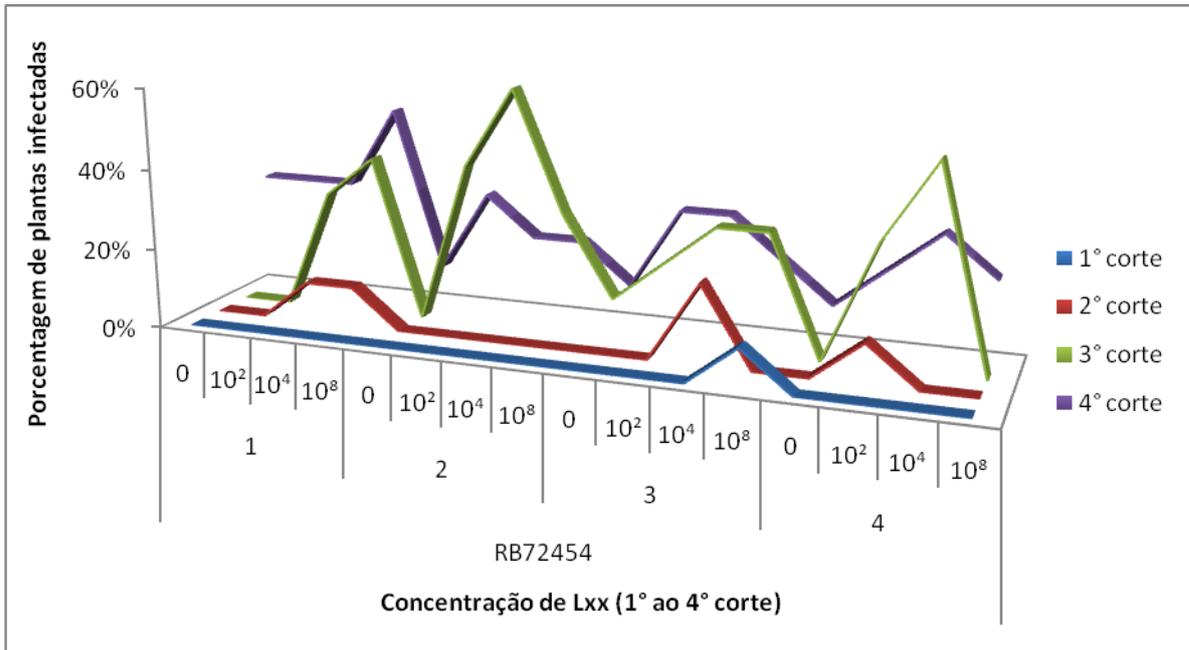
f

**C2.**Coleta de dados em campo. **a e b** medição dos colmos (metros) e do diâmetro (centímetros) com auxílio de trena e paquímetro; **c**, limpeza da guilhotina utilizada para preparar os toletes para retirada do caldo; **d**, corte dos toletes; **e**, imagem dos toletes cortados, a extremidade do tolete deve ser cortado em bisel; **f**, o corte em bisel do tolete auxilia no escoamento do caldo.

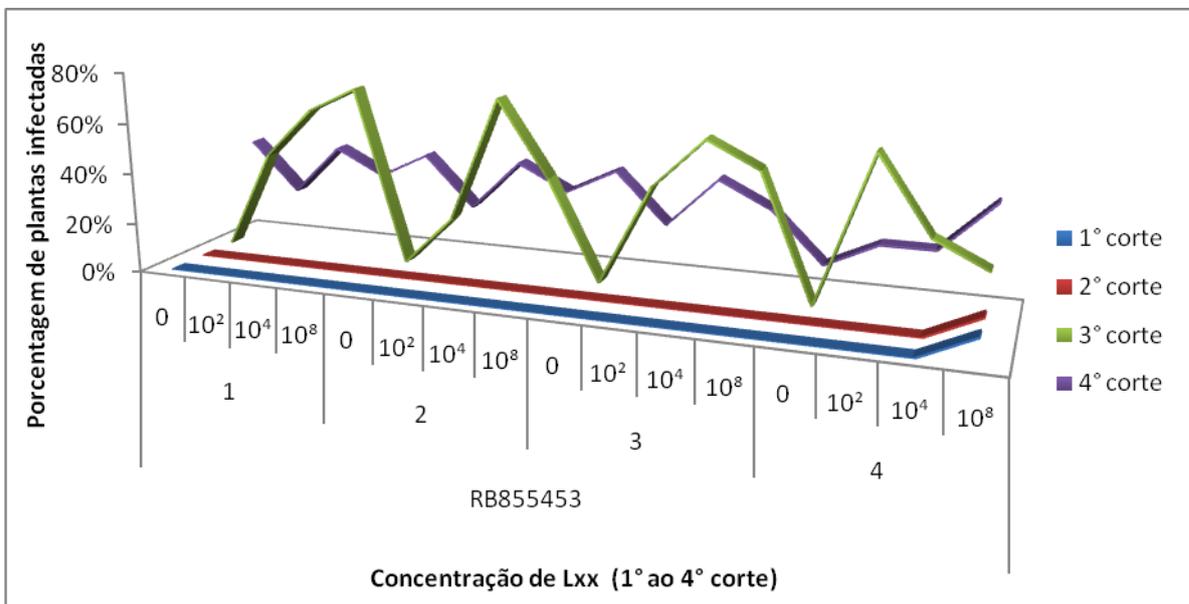


**C3.** Etapas da análise de “Dot Blot”. **a**, bomba de vácuo usada na extração; **b**, caldo acondicionado em microtubos; **c**, aparato de metal usado na extração; **d**, membrana de nitrocelulose sendo hidratada; **e**, aplicação de caldo no aparato; **f**, secagem da membrana em estufa; **g**, lavagem da membrana; **h**, membrana de “Dot Blot” revelada.

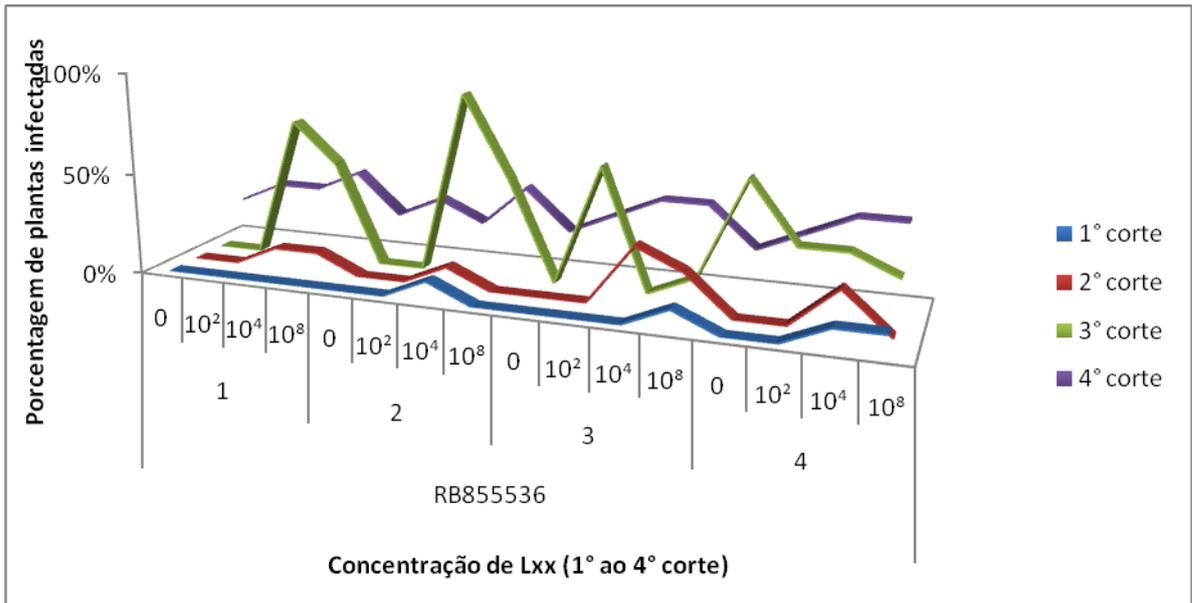
## APÊNDICE D - Gráficos Dot Blot



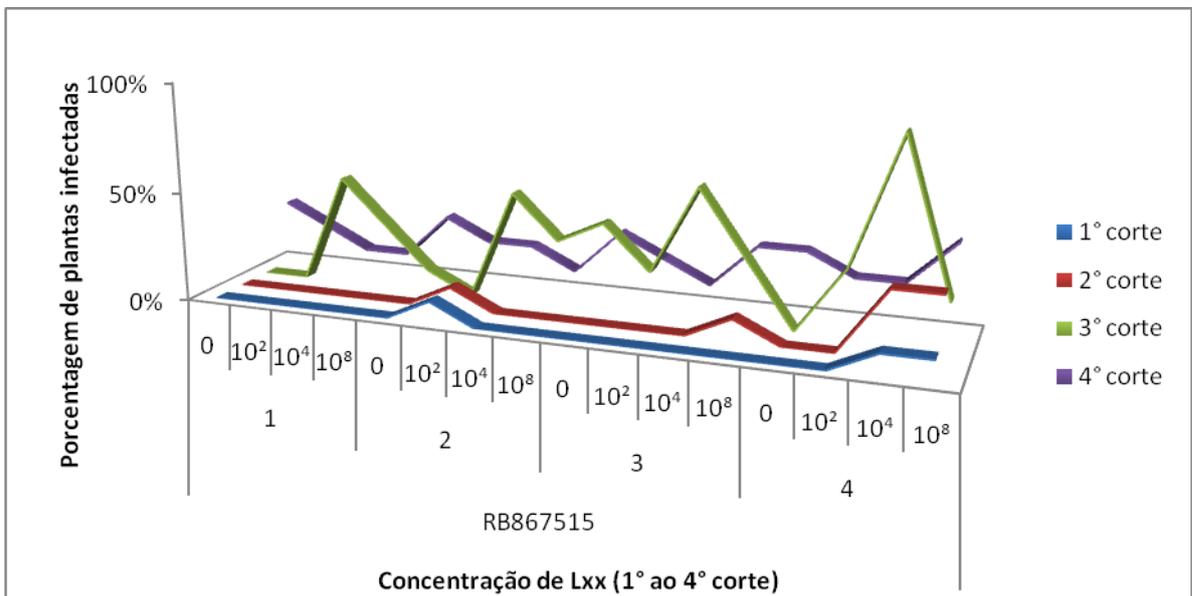
**D 1.** Porcentagem (%) de plantas da variedade RB72454 infectadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* nos quatro anos de corte com diferentes concentrações inoculadas.



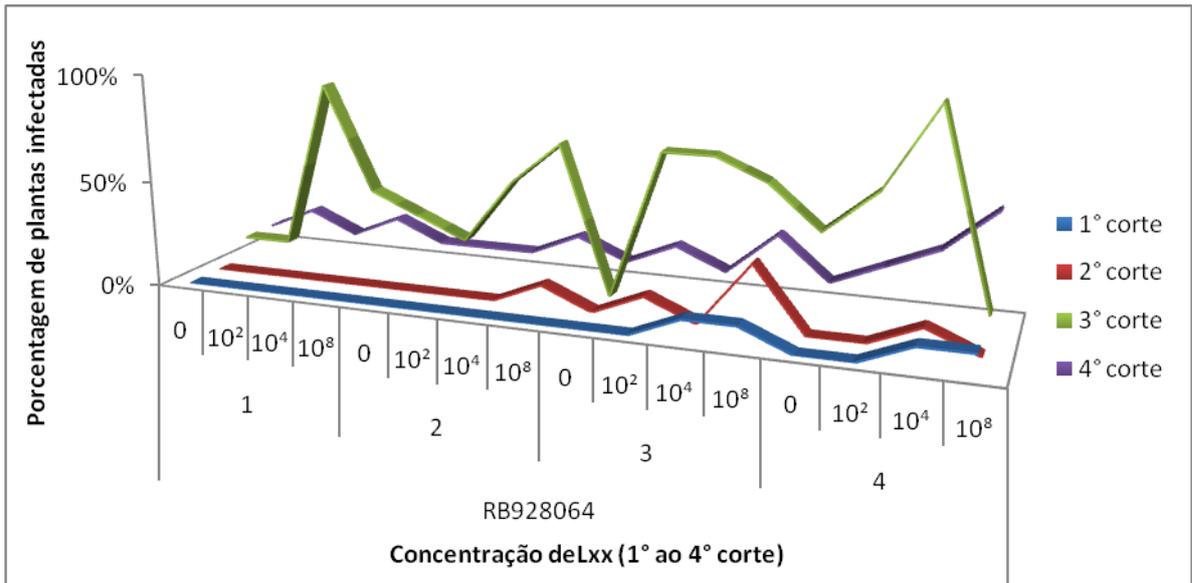
**D 2.** Porcentagem (%) de plantas da variedade RB855453 infectadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em quatro anos de corte com diferentes concentrações inoculadas.



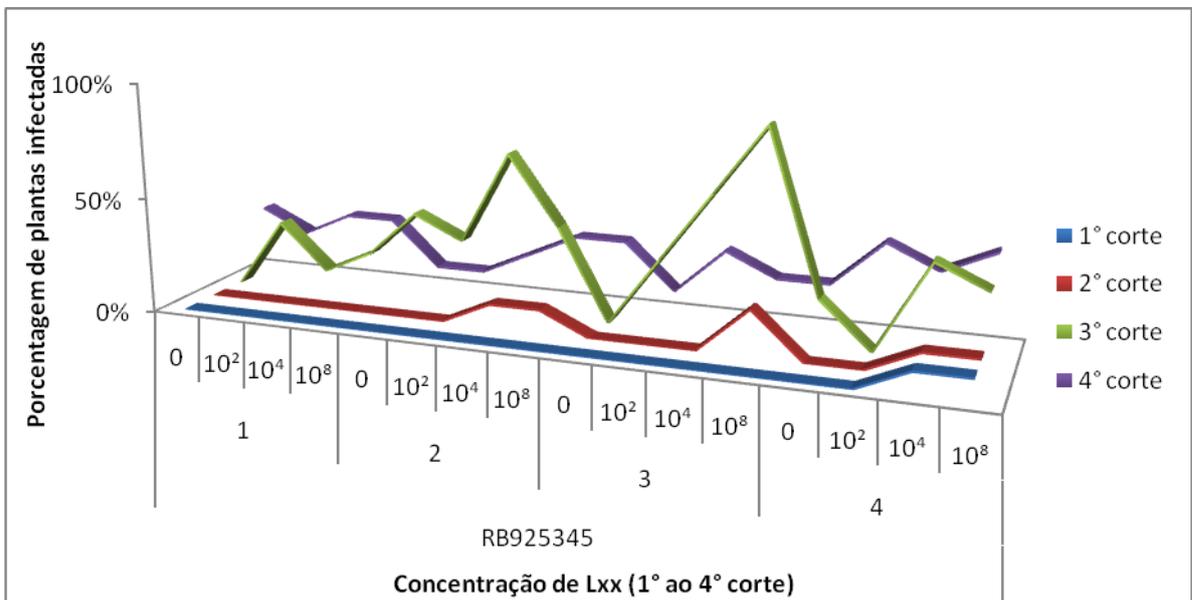
**D 3.** Porcentagem (%) de plantas da variedade RB855536 infectadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em quatro anos de corte com diferentes concentrações inoculadas.



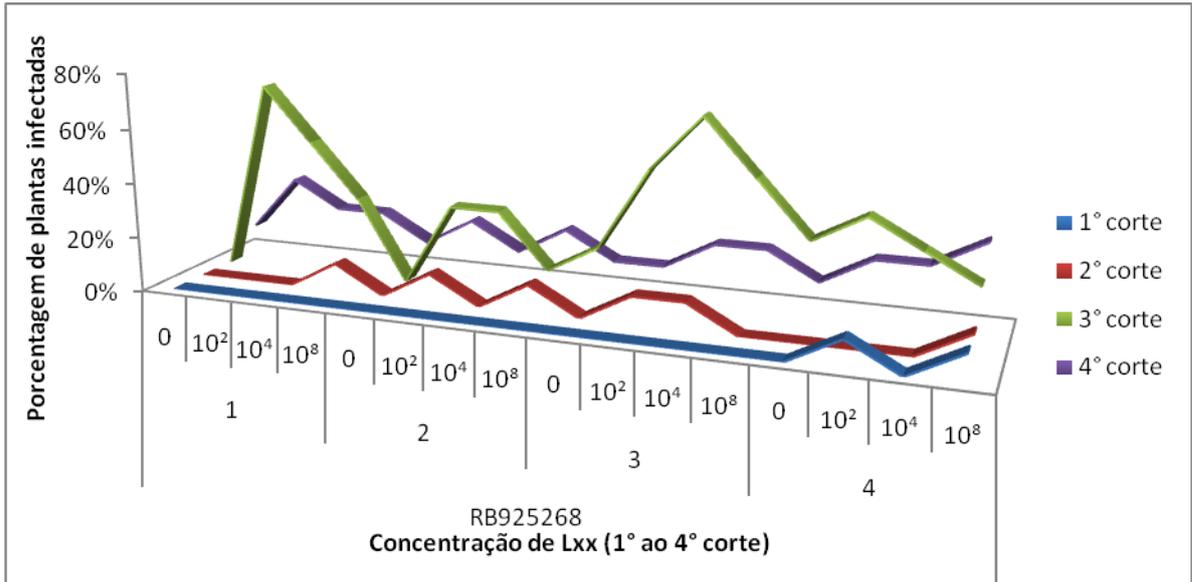
**D.4.** Porcentagem (%) de plantas da variedade RB867515 infectadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em quatro anos de corte com diferentes concentrações inoculadas.



**D 5.** Porcentagem (%) de plantas da variedade RB928064 infectadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em quatro anos de corte com diferentes concentrações inoculadas.



**D 6.** Porcentagem (%) de plantas da variedade RB925345 infectadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em quatro anos de corte com diferentes concentrações inoculadas.



**D 7.** Porcentagem (%) de plantas da variedade RB925268 infectadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em quatro anos de corte com diferentes concentrações inoculadas.

## APÊNDICE E - Análise de variância

**E1.** Análise de variância para os valores calculados de PBU (peso do bolo úmido) em plantas inoculadas com diferentes concentrações de Lxx em um delineamento em parcelas subdivididas.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	P
<b>Blocos</b>	3	403,4	134,47	2,0	0,114
<b>Variedades(V)</b>	6	7615,6	1269,3	19,3	0,000
<b>Concentrações (C)</b>	3	60,83	20,277	0,32	0,811
<b>Interação VxC</b>	18	949,02	52,724	0,80	0,695
<b>Resíduo a</b>	81	5325	65,74		
<b>Anos (A)</b>	3	42504	14168	231,4	0,000
<b>Interação AxV</b>	18	5401,6	300,09	4,9	0,000
<b>Interação AxC</b>	9	186,43	20,714	0,34	0,961
<b>Interação AxCxV</b>	54	3377,3	62,542	1,02	0,445
<b>Resíduo b</b>	252	15429	61,228		
<b>Total</b>	447	81252			

Coeficiente de variação (resíduo a) = 6,21% e coeficiente de variação (resíduo b) = 6%

**E2.** Média dos efeitos principais calculadas para PBU em variedades comerciais de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes concentrações de Lxx durante os quatro anos do experimento.

Blocos		Variedades		Concentrações		Anos	
Repetições	Médias	Variedades	Médias	Conc.	Médias	Cortes	Médias
1	128,9	RB72454	125,8 <sup>d</sup>	10 <sup>0</sup>	130,4 <sup>a</sup>	1	120,3 <sup>c</sup>
2	130,9	RB855453	131,4 <sup>b</sup>	10 <sup>2</sup>	131,1 <sup>a</sup>	2	121,5 <sup>c</sup>
3	131,2	RB855536	128,4 <sup>c</sup>	10 <sup>4</sup>	130,2 <sup>a</sup>	3	137,8 <sup>b</sup>
4	131,0	RB867515	128,3 <sup>c</sup>	10 <sup>8</sup>	130,4 <sup>a</sup>	4	142,4 <sup>a</sup>
		RB928064	128,9 <sup>bc</sup>				
		RB925345	139,6 <sup>a</sup>				
		RB925268	131,2 <sup>bc</sup>				
LSD(5%)	2,2	LSD(5%)	2,8	LSD(5%)	2,2	LSD(5%)	2,0

Médias seguidas de letras iguais indicam ausência de significância estatística ao nível de 5% de probabilidade.

**E3.** Análise de variância para os valores calculados de Brix em plantas inoculadas com diferentes concentrações de Lxx em um delineamento de parcelas subdivididas.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	P
<b>Blocos</b>	3	45,996	15,332	1,5	0,229
<b>Variedades (V)</b>	6	92,525	15,421	14,77	0,000
<b>Concentrações (C)</b>	3	0,4583	0,15277	0,15	0,929
<b>Interação VxC</b>	18	12,424	0,69022	0,66	0,840
<b>Resíduo a</b>	81	84,568	1,044		
<b>Anos (A)</b>	3	1022,4	340,81	283,91	0,000
<b>Interação AxV</b>	18	66,571	36,984	3,08	0,000
<b>Interação AxC</b>	9	12,241	13,601	1,13	0,342
<b>Interação AxCxV</b>	54	50,578	0,93664	0,78	0,863
<b>Resíduo b</b>	252	302,5	12,004		
<b>Total</b>	447	1648,9			

Coefficiente de variação (resíduo a) = 5,74% e coeficiente de variação (resíduo b) = 6,28%

**E4.** Média dos efeitos principais calculadas para Brix em variedades comerciais de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes concentrações de Lxx durante os quatro anos do experimento.

Blocos		Variedades		Concentrações		Anos	
Repetições	Médias	Variedades	Médias	Níveis	Médias	Cortes	Médias
1	19,00	RB72454	18,75 <sup>cb</sup>	10 <sup>0</sup>	19,13 <sup>a</sup>	1	16,71 <sup>a</sup>
2	19,14	RB855453	20,01 <sup>a</sup>	10 <sup>2</sup>	19,11 <sup>a</sup>	2	19,29 <sup>b</sup>
3	19,00	RB855536	19,1 <sup>b</sup>	10 <sup>4</sup>	19,05 <sup>a</sup>	3	19,49 <sup>b</sup>
4	19,24	RB867515	18,84 <sup>cb</sup>	10 <sup>8</sup>	19,09 <sup>a</sup>	4	20,89 <sup>c</sup>
		RB928064	18,59 <sup>c</sup>				
		RB925345	19,45 <sup>b</sup>				
		RB925268	18,92 <sup>cb</sup>				
LSD(5%)	0,3	LSD(5%)	0,4	LSD(5%)	0,3	LSD(5%)	0,3

Médias seguidas de letras iguais indicam ausência de significância estatística ao nível de 5% de probabilidade.

**E5.** Análise de variância para os valores calculados de Pol (porcentagem aparente de sacarose) em plantas inoculadas com diferentes concentrações de Lxx em um delineamento em parcelas subdivididas.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	P
<b>Blocos</b>	3	2,0662	0,68872	0,6	0,644
<b>Variedades(V)</b>	6	111,7	18,616	15,11	0,000
<b>Concentrações (C)</b>	3	2,4085	0,80282	0,65	0,585
<b>Interação VxC</b>	18	16,336	0,90757	0,74	0,760
<b>Resíduo a</b>	81	99,79	1,232		
<b>Anos (A)</b>	3	1186,7	395,57	269,0	0,000
<b>Interação AxV</b>	18	106,13	5,8962	4,01	0,000
<b>Interação AxC</b>	9	15,94	1,7711	1,20	0,295
<b>Interação AxCxV</b>	54	58,025	1,0745	0,73	0,917
<b>Resíduo b</b>	252	370,63	1,4708		
<b>Total</b>	447	1969,7			

Coefficiente de variação (resíduo a) = 6,54% e coeficiente de variação (resíduo b) = 7,15%.

**E6.** Média dos efeitos principais calculados para Pol em variedades comerciais de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes concentrações de Lxx durante os quatro anos do experimento.

Blocos		Variedades		Concentrações		Anos	
Repetições	Médias	Variedades	Médias	Níveis	Médias	Cortes	Médias
1	16,93	RB72454	16,56 <sup>c</sup>	10 <sup>0</sup>	17,00 <sup>a</sup>	1	14,38 <sup>a</sup>
2	17,04	RB855453	17,94 <sup>a</sup>	10 <sup>2</sup>	17,06 <sup>a</sup>	2	17,31 <sup>b</sup>
3	16,89	RB855536	16,84 <sup>c</sup>	10 <sup>4</sup>	16,86 <sup>a</sup>	3	17,34 <sup>b</sup>
4	17,04	RB867515	16,80 <sup>c</sup>	10 <sup>8</sup>	16,98 <sup>a</sup>	4	18,87 <sup>c</sup>
		RB928064	16,50 <sup>c</sup>				
		RB925345	17,51 <sup>b</sup>				
		RB925268	16,68 <sup>c</sup>				
LSD(5%)	0,3	LSD(5%)	0,4	LSD(5%)	0,3	LSD(5%)	0,3

Médias seguidas de letras iguais indicam ausência de significância estatística ao nível de 5% de probabilidade.

E7. Análise de variância para os valores calculados de Pureza em plantas inoculadas com diferentes concentrações de Lxx em um delineamento em parcelas subdivididas.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	P
<b>Blocos</b>	3	17,209	5,7363	1,4	0,246
<b>Variedades (V)</b>	6	252,12	42,019	10,34	0,000
<b>Concentrações(C)</b>	3	28,341	9,447	2,32	0,081
<b>Interação VxC</b>	18	73,808	4,1005	1,01	0,046
<b>Resíduo a</b>	81	329,29	4,0653		
<b>Anos (A)</b>	3	1295,2	431,75	97,9	0,000
<b>Interação AxV</b>	18	438,92	24,384	5,53	0,000
<b>Interação AxC</b>	9	62,639	6,9599	1,58	0,121
<b>Interação AxCxV</b>	54	209,54	3,8804	0,88	0,708
<b>Resíduo b</b>	252	1111,3	4,4101		
<b>Total</b>	447	3818,4			

Coefficiente de variação (resíduo a) = 2,27% e coeficiente de variação (resíduo b) = 2,37%.

E8. Média dos efeitos principais calculadas para Pureza em variedades comerciais de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes concentrações de Lxx durante os quatro anos do experimento.

Blocos		Variedades		Concentrações		Anos	
Repetições	Médias	Variedades	Médias	Níveis	Médias	Cortes	Médias
1	88,88	RB72454	88,15 <sup>b</sup>	10 <sup>0</sup>	88,68 <sup>a</sup>	1	85,85 <sup>d</sup>
2	88,81	RB855453	89,49 <sup>a</sup>	10 <sup>2</sup>	89,04 <sup>a</sup>	2	89,64 <sup>b</sup>
3	88,64	RB855536	87,80 <sup>b</sup>	10 <sup>4</sup>	88,32 <sup>a</sup>	3	88,92 <sup>c</sup>
4	88,37	RB867515	89,01 <sup>ab</sup>	10 <sup>8</sup>	88,67 <sup>a</sup>	4	90,29 <sup>a</sup>
		RB928064	88,51 <sup>b</sup>				
		RB925345	89,89 <sup>a</sup>				
		RB925268	87,89 <sup>b</sup>				
LSD(5%)	0,5	LSD(5%)	0,7	LSD(5%)	0,5	LSD(5%)	0,5

Médias seguidas de letras iguais indicam ausência de significância estatística ao nível de 5% de probabilidade.

**E9.** Análise de variância para os valores calculados de Fibras em plantas inoculadas com diferentes concentrações de Lxx em um delineamento em parcelas subdivididas .

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	P
<b>Blocos</b>	3	2,5021	0,83404	2,0	0,122
<b>Variedades(V)</b>	6	49,003	8,1671	19,5	0,000
<b>Concentrações</b>	3	0,41465	0,13822	0,33	0,804
<b>Interação VxC</b>	18	6,0175	0,33431	0,8	0,695
<b>Resíduo a</b>	81	33,902	0,41855		
<b>Anos (A)</b>	3	273,55	91,183	231,1	0,000
<b>Interação AxV</b>	18	34,912	1,9396	4,91	0,000
<b>Interação AxC</b>	9	1,0681	0,11867	0,30	0,974
<b>Interação AxCxV</b>	54	21,663	0,40116	1,02	0,445
<b>Resíduo b</b>	252	99,451	0,39465		
<b>Total</b>	447	522,48			

Coefficiente de variação (resíduo a) = 5,72% e coeficiente de variação (resíduo b) = 5,55%.

**E10.** Média dos efeitos principais calculadas para Fibras em variedades comerciais de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes concentrações de Lxx durante os quatro anos do experimento.

Blocos		Variedades		Concentração		Ano	
Repetições	Médias	Variedades	Médias	Níveis	Médias	Cortes	Médias
1	11,18	RB72454	10,93 <sup>bc</sup>	10 <sup>0</sup>	11,30 <sup>a</sup>	1	10,49 <sup>c</sup>
2	11,34	RB855453	11,38 <sup>b</sup>	10 <sup>2</sup>	11,36 <sup>a</sup>	2	10,59 <sup>c</sup>
3	11,36	RB855536	11,14 <sup>b</sup>	10 <sup>4</sup>	11,28 <sup>a</sup>	3	11,89 <sup>b</sup>
4	11,35	RB867515	11,14 <sup>b</sup>	10 <sup>8</sup>	11,30 <sup>a</sup>	4	12,27 <sup>a</sup>
		RB928064	11,17 <sup>b</sup>				
		RB925345	12,04 <sup>a</sup>				
		RB925268	11,37 <sup>b</sup>				
LSD(5%)	0,2	LSD(5%)	0,3	LSD(5%)	0,2	LSD(5%)	0,2

Médias seguidas de letras iguais indicam ausência de significância estatística ao nível de 5% de probabilidade.

**E11.** Análise de variância para os valores calculados de ATR em plantas inoculadas com diferentes concentrações de Lxx em um delineamento em parcelas subdivididas.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	P
<b>Blocos</b>	3	140,36	46,785	0,7	0,546
<b>Variedades(V)</b>	6	4137	694,51	10,61	0,000
<b>Concentrações(C)</b>	3	231,56	77,187	1,18	0,323
<b>Interação VxC</b>	18	1585	88,056	1,35	0,186
<b>Resíduo a</b>	81	5299,5	65,426		
<b>Anos (A)</b>	3	45668	15223	166,8	0,000
<b>Interação AxV</b>	18	3621,8	201,21	2,21	0,004
<b>Interação AxC</b>	9	668,05	74,227	0,81	0,607
<b>Interação AxCxV</b>	54	3202,6	59,308	0,65	0,970
<b>Resíduo b</b>	252	22993	91,241		
<b>Total</b>	447	87577			

Coefficiente de variação (resíduo a) = 5,80% e coeficiente de variação (resíduo b) = 6,84%.

**E12.** Média dos efeitos principais calculadas para ATR em variedades comerciais de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes concentrações de Lxx durante os quatro anos do experimento.

Blocos		Variedades		Concentração		Ano	
Repetições	Médias	Variedades	Médias	Níveis	Médias	Cortes	Médias
1	139,5	RB72454	137,4 <sup>bc</sup>	10 <sup>0</sup>	139,8 <sup>a</sup>	1	123,2 <sup>d</sup>
2	139,7	RB855453	146,2 <sup>a</sup>	10 <sup>2</sup>	140,1 <sup>a</sup>	2	143,2 <sup>b</sup>
3	138,6	RB855536	139,3 <sup>b</sup>	10 <sup>4</sup>	138,3 <sup>a</sup>	3	140,8 <sup>c</sup>
4	140,1	RB867515	138,3 <sup>b</sup>	10 <sup>8</sup>	139,7 <sup>a</sup>	4	150,8 <sup>a</sup>
		RB928064	136,1 <sup>bc</sup>				
		RB925345	140,8 <sup>b</sup>				
		RB925268	138,3 <sup>b</sup>				
LSD(5%)	2,2	LSD(5%)	2,8	LSD(5%)	2,2	LSD(5%)	2,5

Médias seguidas de letras iguais indicam ausência de significância estatística ao nível de 5% de probabilidade.

**E.13.** Análise de variância para os valores calculados de TCH (tonelada de cana por hectare) em plantas inoculadas com diferentes concentrações de Lxx em parcelas subdivididas.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	P
<b>Blocos</b>	3	874,15	291,38	1,1	0,354
<b>Varietades (V)</b>	6	30533	5088,8	19,21	0,000
<b>Concentrações (C)</b>	3	375,69	125,23	0,47	0,998
<b>Interação VxC</b>	18	2541,5	141,2	0,53	0,936
<b>Resíduo a</b>	81	21455	264,87		
<b>Anos (A)</b>	3	286934	95645	687,1	0,000
<b>Interação AxV</b>	18	18912	1050,7	7,55	0,000
<b>Interação AxC</b>	9	1073,5	119,28	0,86	0,562
<b>Interação AxCxV</b>	54	8202,3	151,9	1,09	0,326
<b>Resíduo b</b>	252	35079	139,2		
<b>Total</b>	447	405980			

Coefficiente de variação (resíduo a) = 15,74% e coeficiente de variação (resíduo b) = 11,41%.

**E14.** Média dos efeitos principais calculados para TCH em variedades comerciais de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes concentrações de Lxx durante os quatro anos do experimento.

Blocos		Variedades		Concentrações		Anos	
Repetições	Médias	Variedades	Médias	Níveis	Médias	Cortes	Médias
1	102,4	RB72454	103,3 <sup>b</sup>	10 <sup>0</sup>	103,8 <sup>a</sup>	1	147 <sup>a</sup>
2	101,8	RB855453	90,22 <sup>d</sup>	10 <sup>2</sup>	101,8 <sup>a</sup>	2	93,1 <sup>b</sup>
3	105,4	RB855536	107,1 <sup>ab</sup>	10 <sup>4</sup>	103,6 <sup>a</sup>	3	86,58 <sup>c</sup>
4	103,8	RB867515	98,10 <sup>b</sup>	10 <sup>8</sup>	104,2 <sup>a</sup>	4	86,83 <sup>c</sup>
		RB928064	97,47 <sup>bc</sup>				
		RB925345	116,3 <sup>a</sup>				
		RB925268	111,2 <sup>a</sup>				
LSD(5%)	4,3	LSD(5%)	5,7	LSD(5%)	4,3	LSD(5%)	3,1

Médias seguidas de letras iguais indicam ausência de significância estatística ao nível de 5% de probabilidade.

**E15.** Análise de variância para os valores calculados para comprimento de colmos em plantas inoculadas com diferentes concentrações de Lxx em um delineamento em parcelas subdivididas.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	P
<b>Blocos</b>	3	0,32348	0,10783	1,5	0,234
<b>Variedades(V)</b>	6	12,721	2,1202	28,5	0,000
<b>Concentrações(C)</b>	3	0,06784	0,02261	0,3	0,822
<b>Interação VxC</b>	18	1,1827	0,0657	0,88	0,599
<b>Resíduo a</b>	81	6,0229	0,07436		
<b>Anos (A)</b>	3	65,933	21,978	512,2	0,000
<b>Interação AxV</b>	18	1,9464	0,10813	2,52	0,001
<b>Interação AxC</b>	9	0,24453	0,02717	0,63	0,768
<b>Interação AxCxV</b>	54	2,227	0,04124	0,96	0,556
<b>Resíduo b</b>	252	10,813	0,04291		
<b>Total</b>	447	101,48			

Coefficiente de variação (resíduo a) = 10,30% e coeficiente de variação (resíduo b) = 7,82%.

**E16.** Média dos efeitos principais calculados para comprimento dos colmos em variedades comerciais de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes concentrações de Lxx durante os quatro anos do experimento.

Blocos		Variedades		Concentrações		Anos	
Repetições	Médias	Variedades	Médias	Níveis	Médias	Cortes	Médias
1	2,673	RB72454	2,56 <sup>bc</sup>	10 <sup>0</sup>	2,65 <sup>a</sup>	1	3,12 <sup>a</sup>
2	2,604	RB855453	2,40 <sup>d</sup>	10 <sup>2</sup>	2,66 <sup>a</sup>	2	2,91 <sup>b</sup>
3	2,648	RB855536	2,70 <sup>b</sup>	10 <sup>4</sup>	2,63 <sup>a</sup>	3	2,39 <sup>c</sup>
4	2,665	RB867515	2,76 <sup>b</sup>	10 <sup>8</sup>	2,65 <sup>a</sup>	4	2,16 <sup>d</sup>
		RB928064	2,53 <sup>bc</sup>				
		RB925345	2,96 <sup>a</sup>				
		RB925268	2,63 <sup>b</sup>				
LSD(5%)	0,07	LSD(5%)	0,09	LSD(5%)	0,07	LSD(5%)	0,05

Médias seguidas de letras iguais indicam ausência de significância estatística ao nível de 5% de probabilidade.

E17. Análise de variância para os valores calculados para diâmetro dos colmos em plantas inoculadas com diferentes concentrações de Lxx em um delineamento em parcelas subdivididas.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	P
<b>Blocos</b>	3	0,2947	0,09823	0,8	0,472
<b>Variedades (V)</b>	6	9,3553	1,5592	13,46	0,000
<b>Concentrações (C)</b>	3	0,19659	0,06553	0,57	0,639
<b>Interação VxC</b>	18	2,0849	0,11583	1	0,469
<b>Resíduo a</b>	81	9,3852	0,11587		
<b>Anos(A)</b>	3	14,179	4,7264	40,2	0,000
<b>Interação AxV</b>	18	3,7202	0,20668	1,76	0,031
<b>Interação AxC</b>	9	0,93775	0,10419	0,88	0,539
<b>Interação AxCxV</b>	54	5,1644	0,09564	0,81	0,818
<b>Resíduo b</b>	252	29,658	0,11769		
<b>Total</b>	447	74,977			

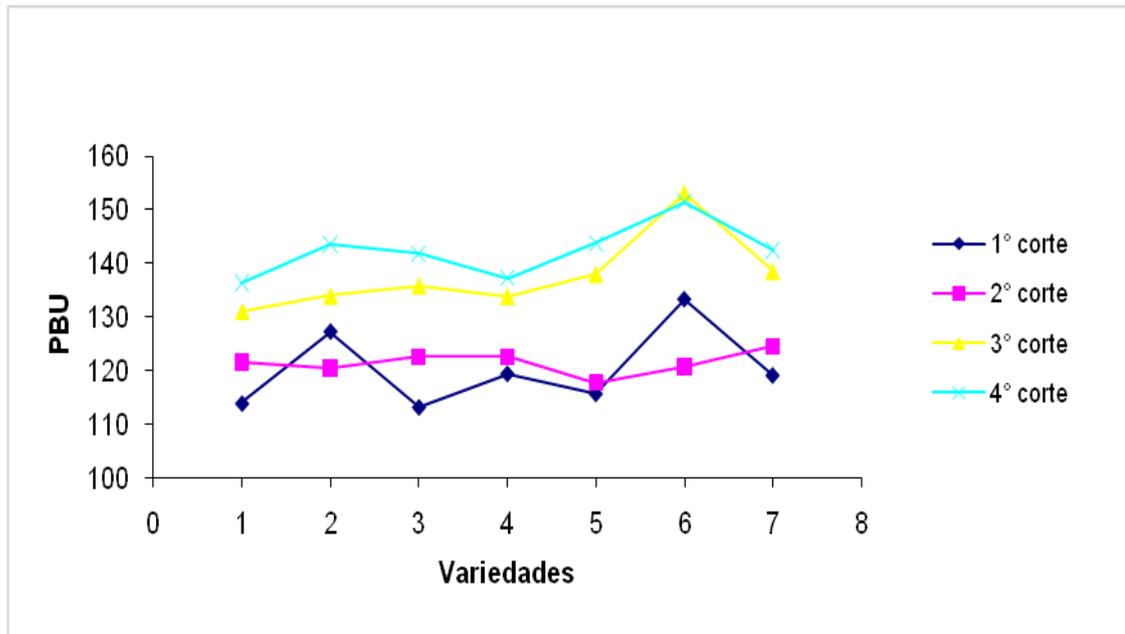
Coefficiente de variação (resíduo a) = 12,38% e coeficiente de variação (resíduo b) = 12,47%.

E18. Média dos efeitos principais calculados para diâmetro dos colmos em variedades comerciais de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes concentrações de Lxx durante os quatro anos do experimento.

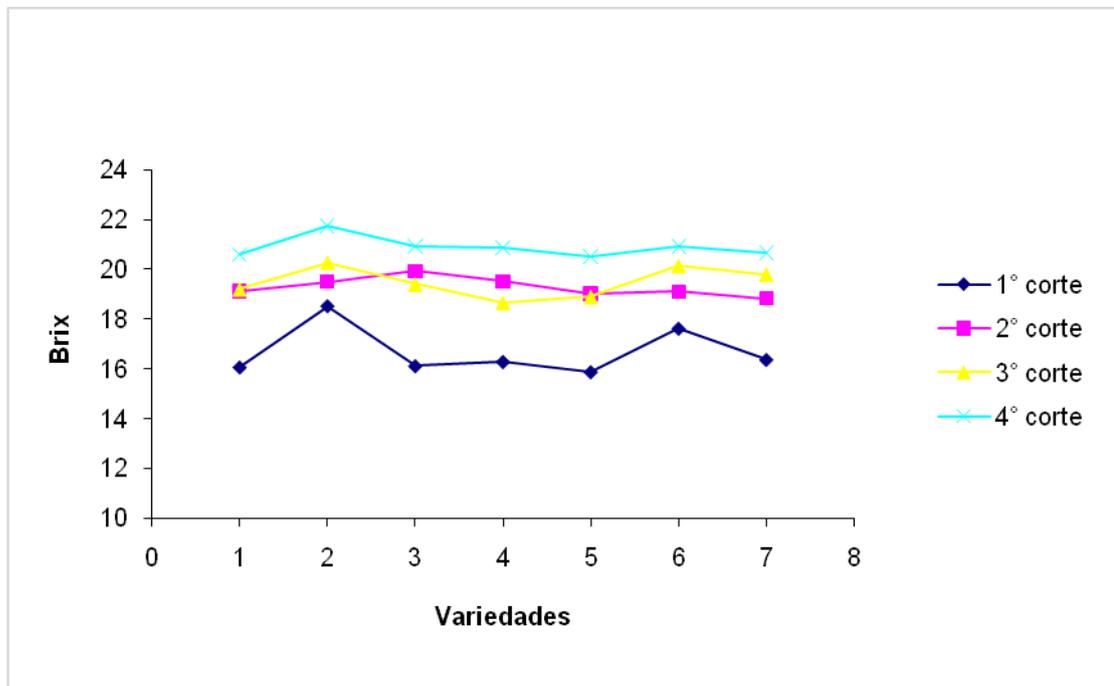
Blocos		Variedades		Concentração		Ano	
Repetição	Média	Variedades	Média	Nível	Média	Cortes	Média
1	2,775	RB72454	2,743 <sup>ab</sup>	10 <sup>0</sup>	2,715 <sup>a</sup>	1	2,85 <sup>a</sup>
2	2,717	RB855453	2,948 <sup>a</sup>	10 <sup>2</sup>	2,767 <sup>a</sup>	2	2,92 <sup>a</sup>
3	2,775	RB855536	2,783 <sup>a</sup>	10 <sup>4</sup>	2,766 <sup>a</sup>	3	2,78 <sup>ab</sup>
4	2,731	RB867515	2,854 <sup>a</sup>	10 <sup>8</sup>	2,750 <sup>a</sup>	4	2,45 <sup>b</sup>
		RB928064	2,744 <sup>ab</sup>				
		RB925345	2,443 <sup>c</sup>				
		RB925268	2,730 <sup>b</sup>				
LSD(5%)	0,1	LSD(5%)	0,12	LSD(5%)	0,1	LSD(5%)	0,09

Médias seguidas de letras iguais indicam ausência de significância estatística ao nível de 5% de probabilidade.

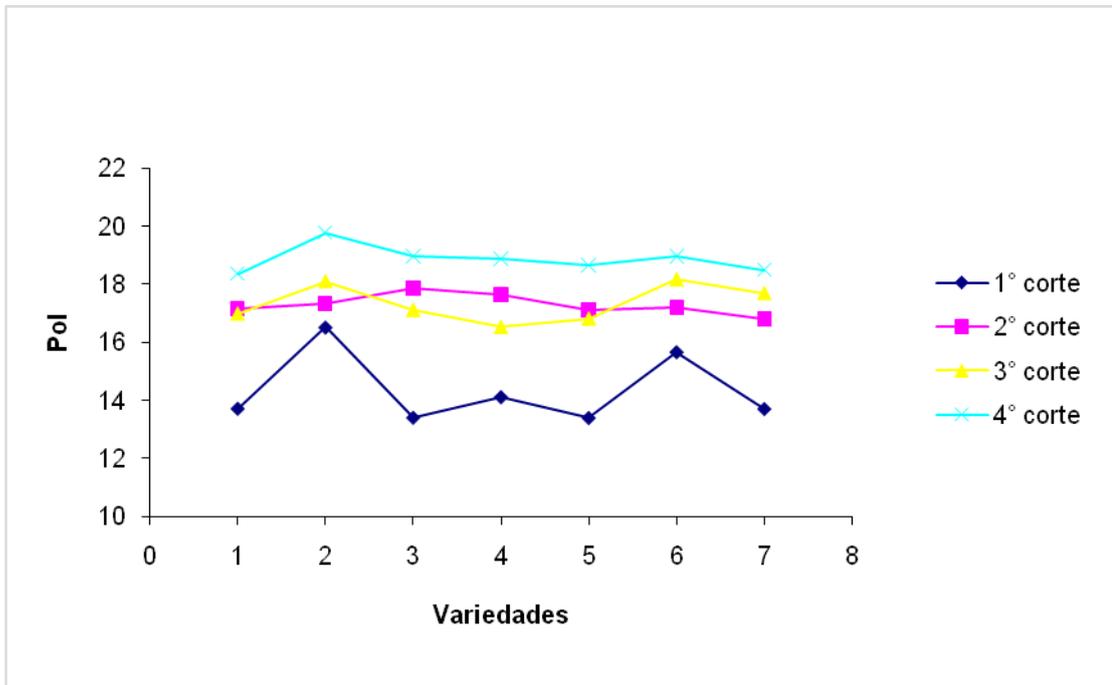
## APÊNDICE F - Gráficos de variância



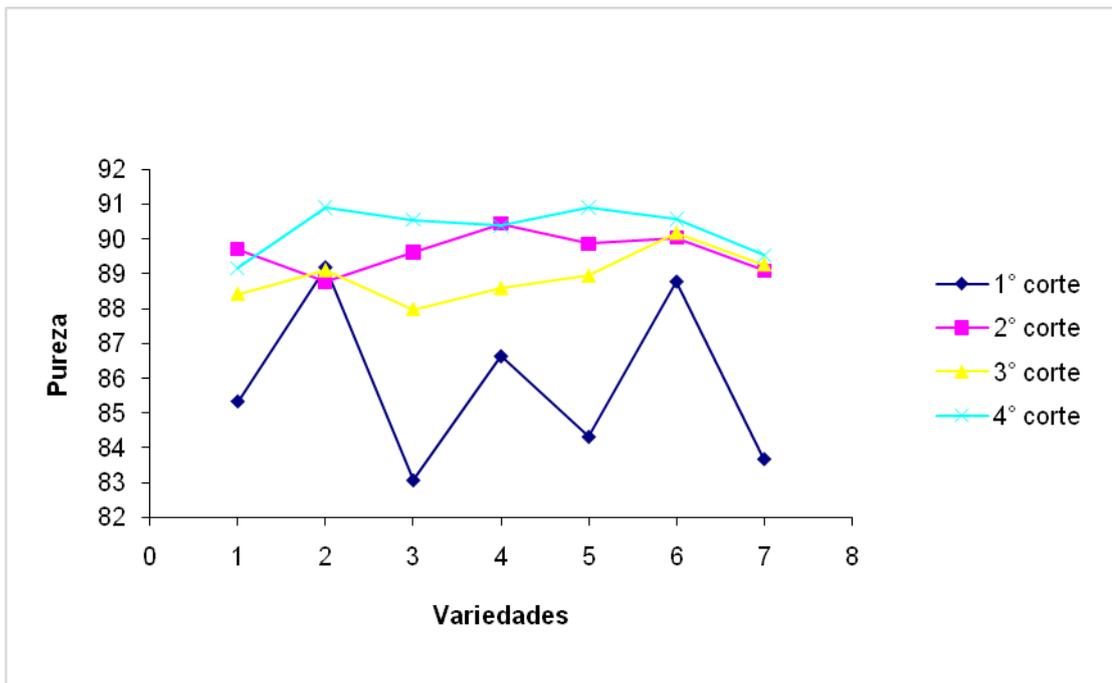
**F1.** Interação Anos x variedades para determinação do PBU



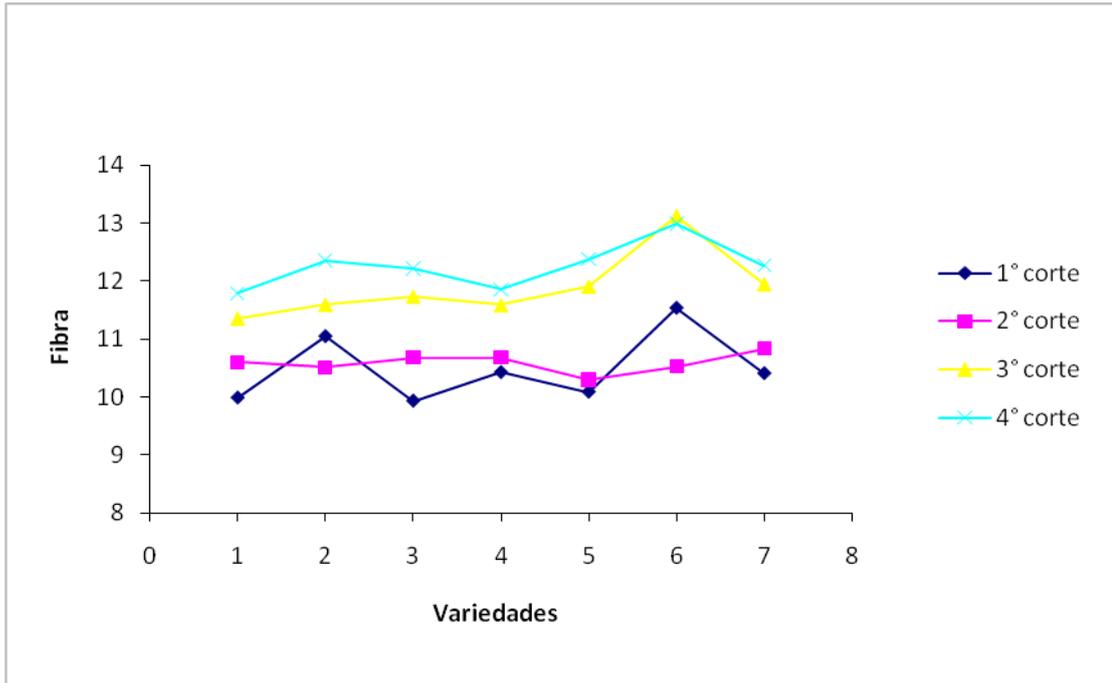
**F2.** Interação Anos x Variedades para a determinação de Brix



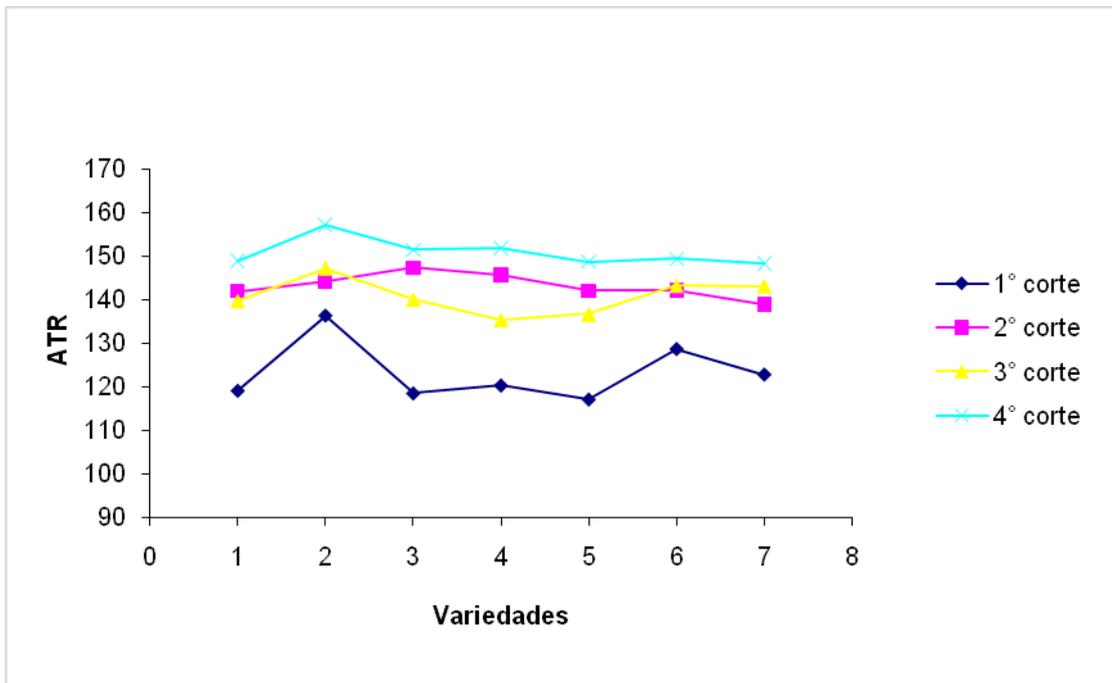
**F3.** Interação Anos x Variedades para a determinação de Pol



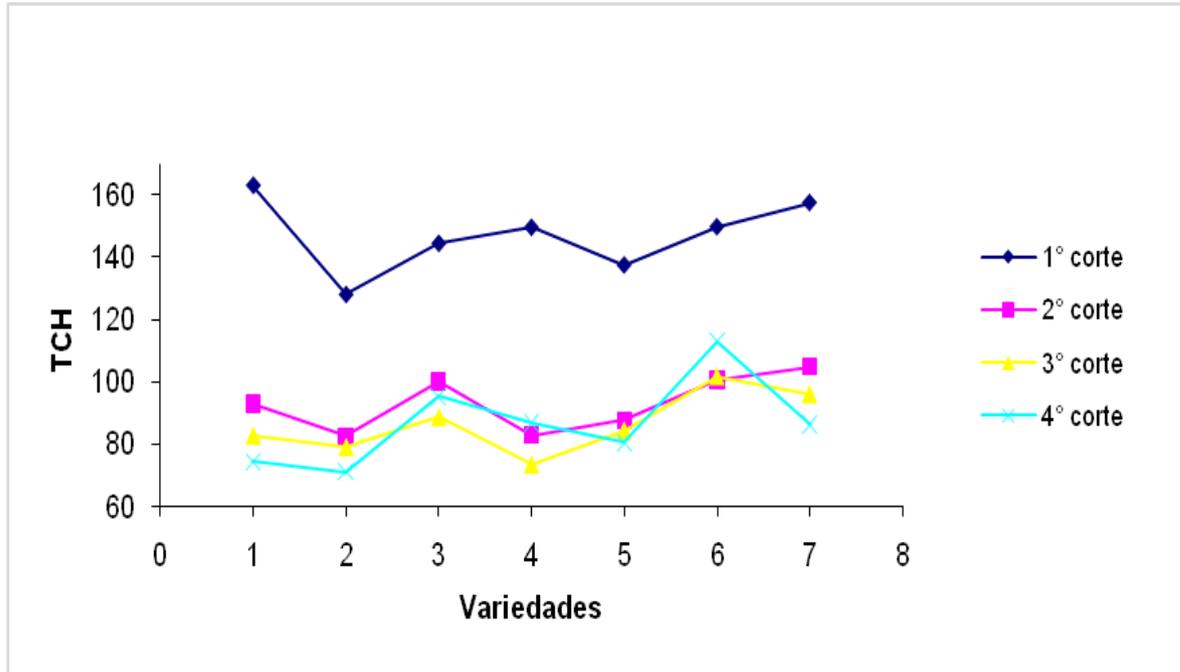
**F4.** Interação Anos x Variedades para a determinação de Pureza



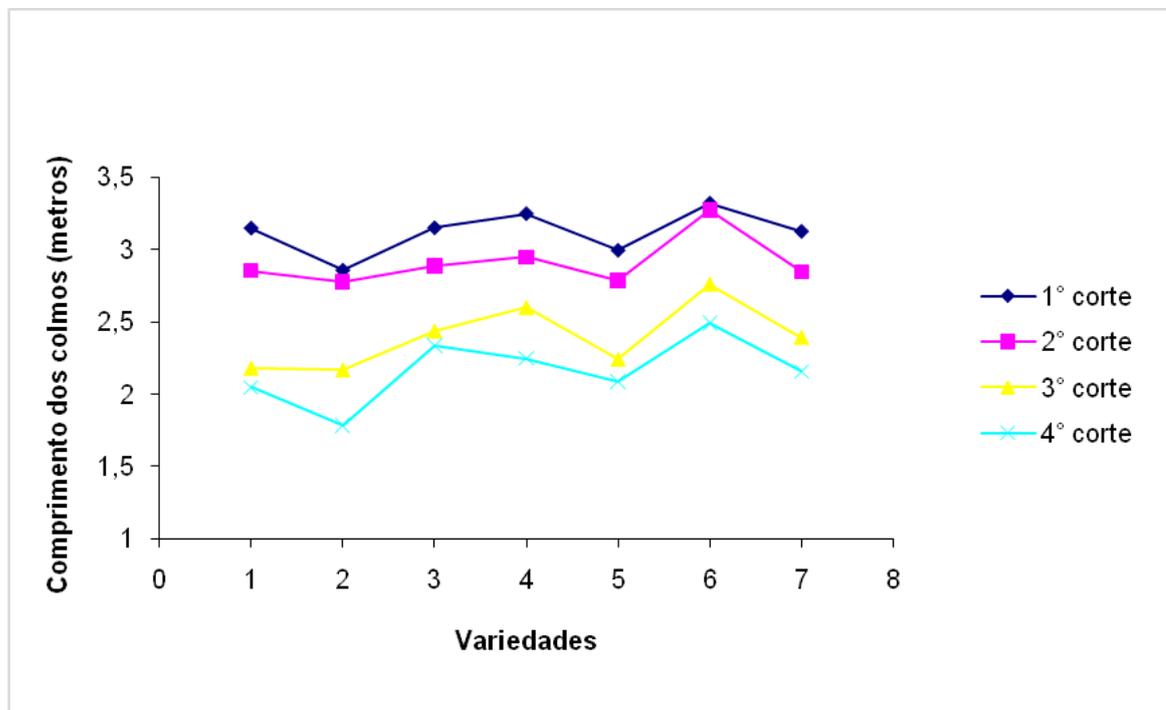
**F5.** Interação Anos x Variedades para a determinação de Fibra



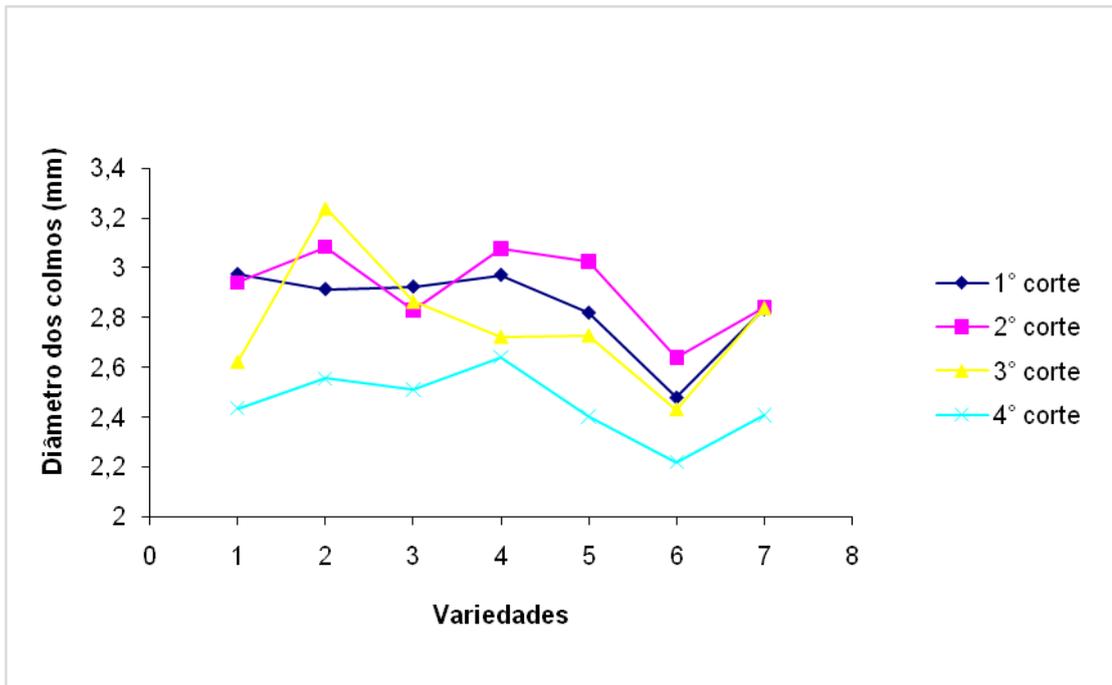
**F6.** Interação Anos x Variedades para a determinação de ATR



F7. Interação Anos x Variedades para a determinação de TCH



F8. Interação Anos x Variedades para a determinação de Comprimento



**F9.** Interação Anos x Variedades para a determinação de Diâmetro