

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SILVANA REGINA DE SOUZA

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR AO RAQUITISMO DA
SOQUEIRA (*Leifsonia xily* subsp. *xyl*), MÉTODOS DE DETECÇÃO E EFEITO DE
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

CURITIBA
2011

SILVANA REGINA DE SOUZA

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR AO RAQUITISMO DA
SOQUEIRA (*Leifsonia xily* subsp. *xyl*), MÉTODOS DE DETECÇÃO E EFEITO DE
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal. Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciências Agrárias.

Orientador: Professor Dr. Edelclaiton Daros

Co-orientadora: Professora Dra Lucimeris Ruaro

CURITIBA
2011

TERMO DE APROVAÇÃO

*A Deus,
Às minhas saudosas Avós: Maria Conceição e
Verônica (in memorium)
À minha mãe querida que nunca mediu esforços
para apoiar minha formação*

Dedico

*Ao meu querido companheiro pelo apoio,
carinho e dedicação que foi tão importante no
fim dessa jornada: José Luis,
À minha amada família, aos meus queridos pais
José Caetano e Maria Dias
Aos meus irmãos Simone, Jorge, Junior e Maria
Silvia e às suas famílias, cunhados (as) e
sobrinhos (as) do coração.*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela experiência de vida, pelos altos e baixos que me fizeram crescer como profissional e pessoa.

Ao Professor. Dr. Edelclaiton Daros pela orientação profissional.

À Professora Dra Lucimeris Ruaro pela co-orientação neste trabalho, pela dedicação, tempo, paciência e amizade muito valiosos.

Ao Dr. Heroldo Weber pela dedicação e apoio.

À Fundação da Universidade do Paraná (FUNPAR) pela concessão da bolsa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realizar este estudo.

Aos técnicos: Santana, Wellington, Alexandre, Ailton, Alessandro, Fabinho, Luiz Carlos e José primo e aos funcionários: Alexandre, Gláucio, Ismair, Benega e Neca. da FUNPAR e Msc. Pedro Buzo, que fizeram do trabalho no campo mais leve e descontraído.

Aos professores da Pós-Graduação pela contribuição na minha formação profissional.

Aos funcionários Gilnei, Cléia e Virginia pela cooperação.

À Suellem, funcionária do Laboratório Marcos Enrietti.

À Dra Regina Zonta de Carvalho pelas valiosas contribuições, amizade, carinho e dedicação.

À minha querida amiga Patrícia e aos colegas da Universidade Estadual de Maringá: Jaqueline, Marco, Taise e Marcelo.

Ao Dr. Milton Luiz da Paz Lima pelas contribuições.

À Dra Luíza Araújo.

Ao Msc. Tiago Souza pelas dicas e contribuições.

Ao Professor Dr. Eliezer Rodrigues de Souto da Universidade Estadual de Maringá por gentilmente ceder equipamento para análises e pela colaboração.

Ao Professor Dr. João Carlos Bessalho Filho pelas contribuições.

Ao colega Marcos Dolinski pela força nos momentos de dúvida.

Aos amigos: Maria Ilza, Fernando Martins, Janaína, Fernanda, Vanessa, Lucy, Marco, Giselda, Giovanni, Yohanna, Valéria, Prof^a. Dra Louise Larissa e Patrícia Fernandes.

Ao filho-estagiário Reginaldo Batista Fragoso pela sua dedicação e amizade.

Aos queridos amigos: Christtianno Rolemberg e Andressa Giovannini Costa pela amizade sincera e momentos de descontração, apoio e carinho.

RESUMO GERAL

O raquitismo da soqueira (“ratoon stunting disease” - RSD) é uma das principais doenças da cana-de-açúcar em todo o mundo e ainda não foram identificadas variedades resistentes ao RSD, sendo necessária a avaliação permanente da reação de genótipos à bactéria causadora do raquitismo, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, visando seu controle, assim como a busca de novas alternativas, como o biocontrole utilizando microrganismos antagônicos. O objetivo da primeira parte deste trabalho foi avaliar a reação de 20 genótipos à inoculação de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. O segundo foi comparar a eficiência de três métodos de detecção da bactéria, o Dot blot, a PCR e o EB-ELISA. A terceira e última parte, teve como objetivo avaliar o potencial adverso causado pelas bactérias diazotrófica e endofítica de cana-de-açúcar: *Azospirillum brasiliense* estirpe: AbV5 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpes SmR1 e HCC 103, na colonização de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, utilizando como referencial componentes de produção. E a avaliação da eficiência destas bactérias como inoculantes biológicos, no incremento da produção da cana-de-açúcar. Na avaliação da eficiência das variedades a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, os resultados confirmaram como imunes os seguintes genótipos: RB965518, RB965517, RB72454 e RB975932. Os genótipos RB946016, RB935744, RB956911, RB966928, RB845210, RB965902, RB925211, RB965911, RB965602, RB835054, RB925345, RB946903 e RB976933 foram classificados como resistentes e os genótipos RB937570, RB935621 e RB986419 foram classificados como suscetíveis ao ataque de *L. xyli* subsp. *xyli*. Na comparação dos três métodos de detecção da bactéria, o método EB-ELISA, apresentou o maior percentual de detecção, seguido próximo pelo Dot blot. A PCR, embora seja considerado o método de detecção mais sensível, foi o que apresentou o menor percentual de detecção. Quanto ao efeito antagônico das bactérias diazotróficas e endofíticas, a *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1, mostrou-se como controlador biológico potencial à colonização de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, baseando-se em evidências indiretas, como no aumento da massa dos colmos e com tendência a maiores rendimentos de produção. Aparentemente a bactéria *Azospirillum brasiliense* estirpe: AbV5 não causou efeitos detectáveis nos componentes de produção dos genótipos de cana-de-açúcar avaliados.

Palavras chave: *Saccharum* sp, resistência, dot blot, EB-ELISA, PCR, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasiliense*.

ABSTRACT GENERAL

Ratoon stunting ("ratoon stunting disease" - RSD) is a major disease of cane sugar in the world and have not been identified resistant varieties RSD, requiring the ongoing assessment of genotypes reaction to the bacteria causing of rickets, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, aiming their control, as the search for new alternatives, such as biocontrol using antagonistic microorganisms. The goal of the first part of this study was to evaluate the reaction of 20 genotypes to inoculation with *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. The second was the comparison of three methods of detecting the bacteria, Dot blot, PCR and EB-ELISA. The third and final part, aimed to evaluate the potential adverse caused by bacteria and diazotrophic endophyte of sugar cane: *Azospirillum brasiliense* strain: AbV5 and *Herbaspirillum seropedicae* strains SMR1 and HCC 103, the colonization of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, using as a benchmark yield components. And the evaluation of the efficiency of these bacteria as biological inoculants, in increasing the production of sugarcane. In assessing the efficiency of the varieties *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, the results were immune to the following genotypes: RB965518, RB965517, RB72454 and RB975932. Genotypes RB946016, RB935744, RB956911, RB966928, RB845210, RB965902, RB925211, RB965911, RB965602, RB835054, RB925345, RB946903 and RB976933 were classified as resistant genotypes RB937570, RB935621 and RB986419 and were classified as susceptible to attack by *L. xyli* subsp. *xyli*. Comparing the three methods for detecting bacteria, the EB-ELISA method, showed the largest percentage of detection, followed next by Dot blot. PCR, although it is considered the most sensitive detection method, showed the smallest percentage of detection. Regarding the antagonistic effect of endophytic diazotrophs and the *Herbaspirillum seropedicae* SMR1 strain, showed potential as biological control of colonization *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, based on indirect evidence, such as increasing the mass of stalks and a tendency to higher production yields. Apparently the bacteria *Azospirillum brasiliense* strain: AbV5 caused no detectable effects on yield components of the genotypes of sugar cane evaluated.

Key-words: *Saccharum* sp, RSD, tolerance, detection, endophytic bacteria

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Preparo do inóculo e inoculação de toletes com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. (A) Obtenção do fluido vascular de colmos da variedade SP77-5181 infectada; (B) fluido contaminado; (C) colmos em sacos plásticos perfurados em suspensão do inóculo na proporção 1/5 em água por dez minutos e (D) campo onde foram plantados os colmos já inoculados..... 50
- Figura 2** – Balanço hídrico mensal de maio de 2007 a abril de 2008, de cana planta. Estação experimental de Paranaíba. Paranaíba, PR.2010..... 54
- Figura 3** – Balanço hídrico mensal de maio de 2008 a abril de 2009, de cana soca. Estação experimental de Paranaíba. Paranaíba, PR.2010..... 57

CAPÍTULO 2

- Figura 1** – Preparo do inóculo e inoculação de toletes com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. (A) Obtenção do fluido vascular de colmos da variedade SP77-5181 infectada; (B) fluido contaminado; (C) colmos em sacos plásticos perfurados em suspensão do inóculo na proporção 1/5 em água por dez minutos e (D) campo onde foram plantados os colmos já inoculados..... 81
- Figura 2** – Extração tecido fibrovascular das amostras de cana-de-açúcar: (A) amostra de colmo de cana-de-açúcar e extrator tipo furador de rolhas. (B) Extração do tecido fibrovascular. (C) Amostra acondicionada em microtubo. 83
- Figura 3** – Coleta de amostras do fluido vascular de colmos para a detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* por meio dos métodos Dot Blot, EB-ELISA e PCR. A - limpeza do colmo com pano úmido em hipoclorito; B - feixe de cana identificado; C - colmo cortado em bisel; D - compressor de baixa compressão adaptado de teteira de borracha (tipo ordenhadeira); E - extração e acondicionamento do fluido em microtubo; F - adição de duas gotas de solução estabilizadora de digluconato de clorexidina a 0,02%..... 85
- Figura 4** – Membrana de nitrocelulose evidenciando reações soro-positivas para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (RB925345 e RB975932 tratamento inoculado e RB946903 tratamento controle) em amostras de fluido vascular de 20 genótipos de cana-de-açúcar com duas repetições, amostras coletadas em 2008..... 89
- Figura 5** – Membranas de nitrocelulose evidenciando reações soro-positivas (azuis) para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em amostras do fluido vascular de genótipos de cana-de-açúcar com 10 repetições, coletadas em 2009. 91

Figura 6 – Amplificação de amostras de DNA genômico extraído de células de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> contidas no fluido vascular de genótipos de cana-de-açúcar de cana-planta em 2008.....	94
Figura 7 – Amplificação de amostras de DNA genômico extraído de células de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> contidas no fluido vascular de genótipos de cana-de-açúcar de cana-soca em 2009.....	95
Figura 8 - A – Porcentagem de genótipos positivos para a presença de <i>Lxx</i> ; B – Porcentagem de amostras positivas para a presença de <i>Lxx</i> avaliados pelos métodos de detecção: Dot blot, EB-ELISA e PCR.	99

CAPÍTULO 3

Figura 1 – (A) Plântulas de cana-de-açúcar com 50 dias; (B) Inoculação de plântula de cana-de-açúcar com as bactérias <i>Azospirillum brasiliense</i> estirpes AbV5 e SF0 e <i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpes: SmR1 e HCC 103 para o controle do raquitismo das soqueiras causado por <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	113
--	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	- Genótipos de cana-de-açúcar avaliados quanto à reação ao raquitismo-das-soqueiras, seus parentais e fase de exploração agrônômica. Paranavaí, PR.	47
Tabela 2	- Resultados de toneladas de cana por hectare (TCH), massa de um colmo (M1C) e número de colmos por metro (NCM) de 20 genótipos de cana-de-açúcar para os tratamentos controle (sem inoculação) e inoculado (inoculado com <i>Lxx</i>) em cana planta (2007/2008). Estação experimental de Paranavaí, PR.....	56
Tabela 3	- Resultados de toneladas de cana por hectare (TCH), massa de um colmo (M1C) e número de colmos por metro (NCM) de 20 genótipos de cana-de-açúcar para os tratamentos controle (sem inoculação) e inoculado (inoculado com <i>Lxx</i>) em cana soca (2008/2009). Estação experimental de Paranavaí, PR.....	59
Tabela 4	- Resultados de estatura, diâmetro, POL cana e teor de fibra de 20 genótipos de cana-de-açúcar para os tratamentos controle (sem inoculação) e inoculado (inoculado com <i>Lxx</i>) em cana planta (2008/2009). Estação experimental de Paranavaí, PR.....	61
Tabela 5	- Níveis de infecção de <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> em 20 genótipos de cana-de-açúcar em cana soca (2008/2009) e classificação quanto ao nível de resistência.....	64

CAPÍTULO 2

Tabela 1	- Genótipos de cana-de-açúcar avaliados quanto à reação ao raquitismo-das-soqueiras, seus parentais e fase de exploração agrônômica. Paranavaí, PR.....	80
Tabela 2	- Absorbância medida pelo teste EB-ELISA em amostras de fluido vascular de 20 genótipos de cana-de-açúcar e um genótipo de cana-de-açúcar micropropagado para obtenção do valor crítico (VC - valor da amostra livre do patógeno multiplicado por dois) para comparação e obtenção de amostras positivas para a presença de <i>Lxx</i> nos tratamentos controle e inoculado pela bactéria em cana planta (2007/2008) e cana soca (2008/2009).....	93
Tabela 3	- Incidência de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> em 10 amostras do fluido vascular de 20 genótipos e padrão suscetível SP77-5181 de cana-de-açúcar analisadas pelos métodos de PCR, EB-ELISA e Dot blot, em 2009	97

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Componentes de produção de toneladas de cana por hectare (TCH), toneladas de POL por hectare (TPH), POL, teor de fibra (%), diâmetro de colmos (DC), massa de um colmo (M1C) e estatura de colmos (EC) de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP77-5181 pré inoculadas com bactérias endofíticas e pós inoculadas com <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> . Município de Paranaíba/PR, 2010	118
Tabela 2 – Incidência de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (%) e densidade de talos bacterianos (n° células/gramas de massa fresca ⁻¹ de raiz) das bactérias endofíticas, estimada pelo número mais provável (NMP), em meio semi-seletivo, avaliadas em plantas de cana-de-açúcar da variedade SP77-5181 pré inoculadas com bactérias endofíticas e pós inoculadas com <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> . Município de Paranaíba/PR.....	120

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 ORIGEM, DESCRIÇÃO E IMPORTÂNCIA DA CULTURA	4
2.2 O RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS	5
2.2.1 História e importância	5
2.2.2 Etiologia	6
2.2.3 Transmissão e colonização	7
2.2.4 Sintomas	8
2.2.5 Diagnose	9
2.2.5.1 Técnicas de detecção com base na coloração do xilema	9
2.2.5.2 Técnicas moleculares	11
2.2.5.3 Técnicas sorológicas	12
2.2.6 Controle	15
2.3 RESISTÊNCIA DA CANA-DE-AÇÚCAR AO RAQUITISMO	16
2.4 CONTROLE BIOLÓGICO	20
2.4.1 Bactérias diazotróficas	23
2.4.1.1 Gênero <i>Azospirillum</i>	25
2.4.1.2 Gênero <i>Herbaspirillum</i>	27
REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO 1 - REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR AO RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS	40
RESUMO	41
ABSTRACT	42
1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL	45
2.2 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO	45
2.3 GENÓTIPOS AVALIADOS	46
2.4 AVALIAÇÕES	47

2.5 PREPARO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO DOS TOLETES	48
2.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	51
2.7 COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE DETECÇÃO DO PATÓGENO.....	51
2.8 ANÁLISE DE DETECÇÃO DO PATÓGENO	52
2.9 CLASSIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS QUANTO À REAÇÃO AO RAQUITISMO-DAS-SOQUEIRAS.....	53
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.1 CANA PLANTA (2007/2008)	54
3.1.1 Análise dos componentes de produção	55
3.1.2 Análise de detecção do patógeno	56
3.2 CANA SOCA (2008/2009)	57
3.2.1 Análise dos componentes de produção	58
3.2.2 Análise de detecção do patógeno	61
3.3 CLASSIFICAÇÃO QUANTO A TOLERÂNCIA DOS GENÓTIPOS.....	63
4 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68
CAPÍTULO 2 - MÉTODOS DE DETECÇÃO DE <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	72
RESUMO	73
ABSTRACT	74
1. INTRODUÇÃO	75
2. MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL	78
2.2 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO	78
2.3 GENÓTIPOS AVALIADOS	79
2.4 PREPARO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO DOS TOLETES	80
2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	82
2.6 COLETAS DE AMOSTRAS PARA ANÁLISES DE DETECÇÃO DO PATÓGENO	82
2.7 ANÁLISES DE DETECÇÃO DO PATÓGENO	85
2.7.1 Análise pelo método Dot blot EIA	85
2.7.2 Análise pelo método EB-ELISA	86
2.7.3 Análise pelo método de PCR	87
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	89

3.1 ANÁLISES DE DETECÇÃO DO PATÓGENO	89
3.1.1 Análise pelo método Dot blot	89
3.1.2 Análise pelo método EB-ELISA	91
3.1.3 Análise pelo método de PCR	94
3.1.4 Comparação entre os métodos de detecção	96
4 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS	103

CAPÍTULO 3 - EFEITO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NOS COMPONENTES DE PRODUÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR INFECTADAS PELO RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS	106
RESUMO	107
ABSTRACT	108
1 INTRODUÇÃO	109
2 MATERIAL E MÉTODOS	111
2.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL.....	111
2.2 PREPARO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO DAS PLÂNTULAS	111
2.3 TRATAMENTOS	113
2.4 AVALIAÇÕES DOS COMPONENTES DE PRODUÇÃO.....	114
2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	115
2.6 COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE DETECÇÃO DO PATÓGENO	115
2.7 ANÁLISES DE DETECÇÃO DO PATÓGENO	116
2.8 ESTIMATIVA DA DENSIDADE DE TALOS BACTERIANOS DAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS.....	117
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
3.1 ANÁLISES DOS COMPONENTES DE PRODUÇÃO	118
3.2 ANÁLISES DE DETECÇÃO DO PATÓGENO E ESTIMATIVA DA DENSIDADE DE TALOS BACTERIANOS DAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS.....	119
4 CONCLUSÕES	123
REFERÊNCIAS	124

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) e suas lavouras estão em expansão no país. A área de cana-de-açúcar colhida destinada à atividade sucroalcooleira está estimada em 8.033,6 mil hectares, distribuídas em todos estados produtores. Em relação a área total, o Paraná está em terceiro lugar com 7,25% (582,32 mil hectares). A previsão nacional do total de cana que será moída na safra 2010/11 é de 624.991 mil ton, com incremento de 3,4% em relação à safra 2009/10 e a produtividade média brasileira está estimada em 79 ton/ha segundo estimativa da Conab (2010).

O cultivo da cana-de-açúcar está sujeito ao ataque de diversos patógenos, entre eles estão: a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, que é o agente causal do raquitismo-da-soqueira (RSD – “Ratoon Stunting Disease”). O RSD é considerada uma das doenças mais importantes em todo o mundo, podendo causar prejuízos de 5 a 30% na produtividade. A doença causa danos à cultura nas principais regiões do mundo onde a agroindústria sucroalcooleira está presente (DAVIS *et al.*, 1994). *L. xyli* subsp. *xyli* está classificada no grupo de bactérias corineformes, sendo gram-positiva, aeróbica, pleomórfica e fastidiosa (GILLASPIE *et al.*, 1981; CARDOSO, 1986). A agressividade da doença varia em função de fatores ambientais, principalmente estresse hídrico (TOKESHI; RAGO, 2005; ROS, 2004; GILLASPIE, 1978). Ela não é facilmente reconhecida no campo por sintomas externos, uma vez que podem ser confundidos por vários outros fatores abióticos, incluindo práticas culturais, umidade inadequada e deficiência nutricional (COMSTOCK; LENTINI, 2002). Nas variedades mais suscetíveis pode-se observar internamente, na parte mais velha de colmos maduros, na altura do nó, vasos com a coloração alterada variando de alaranjado-claro e vermelho-escuro, podendo-se observar “vírgulas” e traços ou pontos localizados preferencialmente nas partes mais profundas do colmo. A ausência de sintomas internos não indica sanidade do material, e que a mesma está incubada, pois a maioria das variedades suscetíveis não exhibe sintomas internos e externos (TOKESHI; RAGO, 2005).

A principal forma do controle de RSD é por meio de resistência varietal utilizando o princípio de exclusão como medida de controle. O uso de mudas sadias para o plantio (COMSTOCK *et al.*, 1997) através do tratamento térmico de toletes

(50,5 °C por 2 h ou 52 °C por 30 min) Comstock e Lentini (2002). A transmissão da bactéria por máquinas colheitadeiras é bastante significativa. Todos os equipamentos usados para corte da cana-de-açúcar devem ser desinfetados, e o procedimento de desinfestação pode ser realizado através de calor (chama, vapor ou água quente) ou produtos químicos (GILLASPIE; TEAKLE, 1989) inclusive por meio de colhedora de cana-de-açúcar.

Assim como para o raquitismo e para outras doenças da cana-de-açúcar também são utilizadas operações de rouguing como monitoramento de viveiros, termoterapia das mudas associadas ao uso de fungicidas sistêmicos (MATSUOKA, 1984, COMSTOCK *et al.*, 1996). Um método alternativo de controle do RSD considerado como mais uma ferramenta de manejo, pode ser o controle biológico, por meio da inoculação com bactérias endofíticas, as quais são capazes de colonizar os tecidos da planta hospedeira.

O controle biológico utilizando bactérias endofíticas pode ser uma alternativa, tendo em vista sua capacidade de habitar o interior da planta, sem incitar sintomas visíveis de parasitismo aparente, competindo ainda, pelos mesmos sítios de colonização com o patógeno. Ademais, a colonização por endófitas pode induzir resistência, acionar os mecanismos pré e pós formados do hospedeiro, produzindo bacteriocinas danosas ao patógeno (antibiose), tornando os agentes de biocontrole extremamente vantajosa (OLIVARES; REIS; FAÇANHA, 2000).

Na cultura da cana-de-açúcar, as principais bactérias endofíticas diazotróficas são: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp. e *Azospirillum* spp (JAMES; OLIVARES, 1997; BALDANI *et al.*, 1997; JAMES 2000). Apesar da constatação da capacidade de fixação do nitrogênio do ar e colonização do interior dos vasos do xilema da planta, apenas um autor avaliou o potencial de bactérias diazotróficas endofíticas no controle do raquitismo da soqueira (CARNEIRO Jr, 2006).

Os objetivos do trabalho foram: Avaliar a reação de vinte genótipos de cana-de-açúcar ao raquitismo-das-soqueiras, comparar a eficiência de três métodos: Dot blot, PCR e EB-ELISA na detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e avaliar o efeito antagônico ao desenvolvimento de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* avaliado indiretamente pelos componentes de produção de plantas de cana-de-açúcar pré-inoculadas com as bactérias diazotróficas endofíticas de cana-de-açúcar: *Azospirillum*

brasiliense estirpe AbV5 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpes SmR1 e HCC 103 e pós-inoculadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ORIGEM, DESCRIÇÃO E IMPORTÂNCIA DA CULTURA

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae e é utilizada pelo homem há milhares de anos. Presume-se que seja originária da Ásia, numa região entre a Índia e a China e sua exploração, no início, era sobre a espécie *S. officinarum*. O surgimento de várias doenças e de uma tecnologia mais avançada exigiu a criação de novas variedades através do cruzamento interespecífico, as quais foram obtidas pelo cruzamento da *S. officinarum* com as outras quatro espécies do gênero *Saccharum*: *S. officinarum*, *S. sinensis*, *S. barberi* e *S. spontanium* e, posteriormente, através de retrocruzamentos com as ascendentes. A cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) é uma gramínea de grande porte e produz colmos suculentos devido ao armazenamento de sacarose. É propagada de forma vegetativa, sendo uma cultura perene e semi-perene no cultivo extensivo (MOZAMBANI *et al.*, 2006).

É cultivada principalmente nas regiões tropicais e sub-tropicais numa extensa área, compreendida entre os paralelos 35° de latitude Norte e Sul do Equador. O clima ideal é aquele que apresenta duas estações distintas, uma quente e úmida, para proporcionar a germinação, perfilhamento e desenvolvimento vegetativo, seguido de outra fria e seca, para promover a maturação e conseqüente acúmulo de sacarose nos colmos. Sua importância pode ser atribuída à sua múltipla utilização, podendo ser empregada *in natura*, sob a forma de forragem, para alimentação animal, ou como matéria prima para a fabricação de rapadura, melado, aguardente, açúcar e álcool. Com a crise energética, nova perspectiva foi aberta para o aproveitamento do bagaço da cana. Como a quantidade do bagaço produzida é muito elevada (aproximadamente 30% da cana moída), existe um grande potencial para geração de eletricidade para venda comercial. Estima-se um potencial de geração de eletricidade a partir de bagaço de cana em 4.000 MW utilizando-se tecnologias comercialmente disponíveis. As alterações nas regras do mercado de energia elétrica estão criando melhores condições para a oferta de energia por produtores independentes, podendo ser atrativas para o setor sucroalcooleiro (BALBO, 1990).

2.2 O RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS

2.2.1 História e importância

No mundo, a doença foi primeiramente assinalada no ano de 1944 no Estado de Queensland, Austrália, após uma primavera bastante seca, infectando a variedade Q28. Desde então se espalhou por todo os outros países. Foi descrita pela primeira vez no Brasil, em 1956 em Campos dos Goytacazes, RJ e já estava disseminada por todas as regiões canavieiras (TOKESHI, 1997). Frederico Veiga, observando plantas suspeitas em um lote de variedades importadas, concluiu estar diante do Raquitismo-da-Soqueira (RSD), e para comprovar as suspeitas inoculou o extrato do xilema daquelas plantas supostamente doentes em variedades locais e reproduziu os sintomas da doença (VEIGA, 1956).

Acreditava-se inicialmente que o agente causal do RSD, era um vírus, este fato ocorreu devido a dificuldade de isolamento do agente causal em meio axênico e também porque a doença era facilmente disseminada mecanicamente por meio de instrumentos de corte (MATSUOKA, 1971). Contudo, é causada pela bactéria *L. xyli* subsp. *xyli*, antes classificada no grupo das bactérias coneiformes, como *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (DAVIS; PURCEL; THONSON, 1980; EVTUSHENKO *et al.*, 2000).

O Brasil na década de 70 estava com aproximadamente 90% dos canaviais infectados por *L. xyli* subsp. *xyli* e nas décadas seguintes o problema persistiu, pois muitas unidades produtoras deixaram de utilizar o tratamento térmico, que tinha função de extinguir ou diminuir o patógeno das mudas, conjuntamente a utilização de cultivares de cana-de-açúcar que não apresentavam imunidade à bactéria (CHAGAS, 1996; SANGUINO, 1987; RUAS; MATSUOKA; GHELLER, 1987). Na década de 80, Davis e colaboradores conseguiram isolar pela primeira vez a bactéria associada ao RSD em meio de cultura. Os testes de patogenicidade foram feitos com oito isolados da bactéria em cultura pura provenientes de plantas de cana-de-açúcar doentes de diferentes países: Brasil, Japão, Estados Unidos e África do Sul. Todos os isolados causaram sintomas da doença em plantas da variedade CP 44-101 e foram re-isolados posteriormente.

No estado de São Paulo, Giglioti (1997), estimou que o raquitismo das soqueiras (RDS) ocasionou redução da lucratividade em mais de U\$ 2 bilhões nos últimos 30 anos. Em experimento em Macaé-RJ, onde seis variedades de mudas de cana-de-açúcar (CB 46-364, CB 45-3, CB 49-260, CO 421, CP 51-22 e NA 56-79) foram tratadas termicamente e comparadas com mudas inoculadas com *Lxx* observaram-se reduções significativas de produtividade variando de 4 a 14 t.ha⁻¹ (CHAGAS; MATSUOKA, 1988).

2.2.2 Etiologia

A bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, classificada no grupo corineiforme, é gram-positiva, aeróbica, pleomórfica e fastidiosa. As células bacterianas têm forma bastonete retilíneo ou levemente curva e ocasionalmente inchada nas extremidades ou na região mediana da célula são pleomórficas, possuem 0,25-0,25 x 1-4 µm de dimensões. Produz *in vitro* colônias minúsculas, translúcidas e circulares, com um diâmetro variando de 0,1 a 0,3 mm, após 14 dias de cultivo em meio SC “Soybean Corn” (CARDOSO, 1986; TEAKLE; APPLETON; STEINDL, 1978).

A exemplo de outros membros do gênero *Leifsonia*, o patógeno não forma esporos, e é caracterizado pela presença de ácido 2-4 diaminobutírico em sua parede celular, ausência de ácidos micolíticos e predominância de metaquinonas com 9 ou 10 cadeias de carbono (YOUNG; TOKIKAWA; GARDAN, 1992; DAVIS, 1986; DAVIS; GILLASPIE Jr.; VIDAVER, 1984). Variação em patogenicidade e virulência entre estirpes de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* não tem sido identificados, sendo os isolados de diferentes regiões do mundo muito similares quando comparados quanto à morfologia, serologia e bioquímica (DAVIS; GILLASPIE Jr.; VIDAVER, 1984; DAVIS; PURCEL; THOMSON, 1980).

O genoma da bactéria é composto de um cromossomo circular com 2,6 milhões de pares de bases e 13% dos genes são na verdade, pseudogenes: 307 dos 2.351 genes estão truncados e incompletos (MONTEIRO-VITORELLO, 2004).

2.2.3 Transmissão e colonização

A dificuldade de se identificar a doença no campo faz com que a bactéria se dissemine facilmente através dos instrumentos e outros implementos utilizados durante a operação de corte da cana-de-açúcar (GILLASPIE; TEAKLE, 1989). Essa característica da cultura aliada à natureza do patógeno de ser habitante de vasos condutores do xilema faz com que sua disseminação ocorra exclusivamente pelo homem, seja durante os tratos culturais ou pelo plantio toletes infectados (COMSTOCK *et al.*, 1996).

Comstock e Lentini (2002) afirmaram ainda que a transmissão da bactéria por máquinas colheitadeiras é bastante significativa, existem registros de que o patógeno sobreviva no solo após a colheita. A bactéria também pode ser disseminada por meio de ferramentas contaminadas utilizadas no manejo. A introdução primária em campo é feita por mudas infectadas, como os principais sintomas não são muito evidentes, a disseminação do patógeno através do plantio de material infectado é facilitada. Este tipo de disseminação tem sido de extrema importância, pois havendo cultivo com material infectado a doença será facilmente disseminada (GILLASPIE; TAEKLE, 1989). Segundo Cardoso (1986), considera-se que a ausência de sintomas externos característicos nas socas e sua ausência na cana-planta sejam os motivos da disseminação da doença de modo universal.

A exploração econômica da cana-de-açúcar é caracterizada pela monocultura (continuidade espacial) e sobreposição de cultivos (continuidade seqüencial). Sendo assim, a bactéria sobrevive durante todo o ciclo, colonizando sistematicamente os vasos condutores (xilema e floema) dos colmos da cana-de-açúcar, durante toda a entressafra. A sobrevivência é garantida pela presença de bactérias na coroa das soqueiras que permanecem no solo após o corte da cana (ROS, 2004). Na ausência da cultura, a bactéria pode permanecer infectiva em restos de toletes, sendo necessário deixar transcorrer entre três e seis meses antes de um novo plantio (TOKESHI; RAGO, 2005).

2.2.4 Sintomas

Os sintomas não são facilmente reconhecidos no campo, uma vez que podem ser confundidos por vários fatores, incluindo práticas culturais, umidade inadequada e deficiência nutricional (COMSTOCK; LENTINI, 2002). Em época de seca, quando há pouca água disponível, a cana-de-açúcar, como a maioria das plantas, lança mão de um expediente para garantir sua sobrevivência: pára de crescer. Os sintomas em campo mais comuns associados a essa doença são: crescimento irregular e raquitismo das plantas; afinamento e encurtamento dos internódios; sintomas de deficiência hídrica em períodos de veranico e, conseqüentemente, baixa produtividade. Internamente, os colmos maduros podem apresentar descoloração dos feixes vasculares (TOKESHI; RAGO, 2005). Para minimizar os efeitos do estresse hídrico, permanece quase dormente e desencadeia uma série de mecanismos de auto-defesa. Fecham-se, por exemplo, os estômatos de suas folhas, que funcionam como poros responsáveis pela entrada e saída de gases e água da planta. Os sintomas externos podem ser aumentados como mascarados pela disponibilidade de água para a cultura, por isso, alguns cultivares, sob condições de umidade apropriada, podem suportar alta densidade populacional da bactéria, sem mostrar qualquer sintoma visível (TOKESHI; RAGO, 2005). Externamente, observam-se colmos mais finos e internódios curtos causando a redução da produtividade agrícola. As touceiras doentes, em períodos mais secos, mostram sintomas de falta de água e enrolamento de folhas (TOKESHI, 1997).

No entanto, todos esses sintomas podem diferir em função da variedade, idade da planta e tipo de solo, sendo facilmente confundidos com outras doenças bióticas e abióticas (GRISHAM, 2004). A doença manifesta-se de modo mais claro nas soqueiras de variedades mais suscetíveis, onde podemos observar internamente, na parte mais velha dos colmos maduros vasos com a coloração modificada variando de alaranjado-claro a vermelho-escuro. De acordo com a posição dos vasos e sentido dos cortes, pode-se observar “vírgulas” e traços ou pontos localizados, preferencialmente, nas partes mais profundas do colmo. (TOKESHI, 1997; CARDOSO, 1986). A coloração vascular na região nodal é resultado da reação da planta à presença de organismos estranhos e não específica para o agente de raquitismo. Experimentalmente é possível obter este tipo de reação com inoculações de *Xanthomonas albilineans*, *Acidovorax avenae*

subsp. *avenae*, *Erwinia herbicola*, *Fusarium moniliforme*, todos agentes causais de estrias cloróticas em plantas (TOKESHI; RAGO, 2005).

2.2.5 Diagnose

Desde os anos 70, quando a bactéria foi descrita como agente causal da doença, técnicas de microscopia de contraste de fase ou imunoflorescência estavam sendo utilizadas para o diagnóstico de RSD (STEINDL, 1976). Com os avanços da pesquisa nessa área, novas técnicas têm sido utilizadas para a detecção do patógeno e classificação dos clones quanto à resistência ao RSD, como o teste de EB-ELISA (“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”), EB-EIA (“Evaporative-Binding Enzyme-linked Immunoassay”) (CROFT, 2002; GILLASPIE, 1978), PCR (“Polimerase Chain Reaction”) (PAN; GRISHAM; BURNER, 1998) e Dot Blot (“Dot Blot Enzyme Immunoassay”) (HARRISON; DAVIS, 1986). Geralmente há uma boa ligação entre populações bacterianas dentro dos extratos do xilema e a resistência do cultivar (HARRISON; DAVIS, 1988). A escala de população microbiana é de 10^5 a 10^9 , havendo relação entre a incidência e o número de feixes vasculares colonizados, entretanto, alguns cultivares tem elevada população bacteriana e sofrem pouca perda de rendimento (DAVIS; DEAN; HARRISON, 1988).

A diagnose da doença só pode ser feita pela detecção do patógeno e constitui-se em um dos maiores problemas para as pesquisas com raquitismo-da-soqueira, para se avaliar a sanidade das mudas de cana-de-açúcar. Por muitos anos, houve a falta de um método preciso para diagnóstico da doença, uma vez que os sintomas não são específicos (CARDOSO, 1986; SANGUINO; MORAES; SANTOS FILHO, 1984).

2.2.5.1 Técnicas de detecção com base na coloração do xilema

Valarini e Tokeshi (1981) desenvolveram um método para determinar a resistência ao RSD através da determinação do fluxo de água em colmos sadios e doentes de cana-de-açúcar, mas foi verificado que alguns fatores como pressão de

vácuo, posições do nó no colmo e dias de armazenamento dos colmos podem interferir na avaliação.

Ensaio utilizados em situações para assegurar que o viveiro estivesse livre da bactéria, incluíram a AIMA (“Autofluorescence alcalino-induzide metaxilema” (DAMANN, 1988) e ensaios sorológicos. No ensaio de AIMA, a autofluorescência é induzida sob condições alcalinas em plantas contaminadas, mas não em plantas saudáveis.

Para Chagas e Tokeshi (1994), a precisão do método de Coloração do Xilema pelo Fluxo Transpiratório pode ser aplicada na seleção de variedades resistentes ao raquitismo da soqueira. Este método consiste na utilização do fluxo transpiratório natural do colmo para promover a translocação de uma solução corante a base de safranina-O, para avaliação do número de vasos funcionais (coloridos) no colmo. Perez, Matos e Figueiredo (2001), utilizaram este método para avaliar a sanidade de cultivares de cana-de-açúcar e encontraram boa correlação entre peso de colmos e percentagem de vasos funcionais para colmos tratados e inoculados.

Davis, Dean e Harrison (1988), em experimento, descreveram que a classificação quanto a resistência seria melhor observada se fossem utilizadas variedades mais resistentes ao RSD, ou seja, menor quantidade do patógeno. Alguns trabalhos mostram que a resistência de uma dada variedade ao RSD tem correlação negativa com o número de vasos xilemáticos colonizados pela bactéria, isto é, quanto menor for o percentual de vasos colonizados, mais resistência tem a variedade e menor será a perda de produtividade causada pela doença (HARRISON; DAVIS, 1988; DAVIS; DEAN; HARRISON, 1988). Ros (2004) conseguiu classificar as variedades SP81-3250, SP80-1816, SP80-1842, RB867515, SP83-2847 e RB855113 como intermediárias considerando o número de vasos do xilema colonizados pela bactéria.

Carneiro Jr. *et al.* (2003) produziram anticorpo policlonal específico contra *L. xyli* subsp. *xyli* e visando utilizá-lo em método sorológico para detecção do patógeno, conseguiram estimar o nível de detecção do método a partir de suspensão bacteriana em 2×10^6 células.mL⁻¹.

2.2.5.2 Técnicas moleculares

Foi desenvolvido o método de Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar *L. xyli* subsp. *xyli* na cultura, sendo sensível para detecção, porém, não é favorável quando trata-se de um grande número de amostras (FEGAN; CROFT; TEAKLE, 1998; PAN; GRISHAM; BURNER, 1998). Os ensaios de PCR demonstraram ser os mais sensíveis e podem ser utilizados em situações de necessidade de quarentena.

Pan, Grisham e Burner (1998), publicaram protocolo para detecção de *L. xyli* subsp. *xyli* para técnica de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia), esta técnica é altamente sensível para detecção da bactéria, ela permite a análise não só de DNA puro da bactéria como também de células de extratos de planta, conteúdo líquido dos vasos condutores e colônias em placa ou meio de cultura líquido.

A comparação de três metodologias de diagnose (microscopia de contraste de fase, Dot-blot e PCR) para a detecção de *Lxx* e sua utilização em análises rotineiras foi realizada por Gagliardi, Pace e Ferreira (2006) e os resultados indicaram a técnica de diagnose por PCR como método mais sensível, detectando o nível de 10^1 células/mL⁻¹. O Dot-blot permitiu diferenciar, quantitativamente, as concentrações dos níveis acima de 10^3 células/mL⁻¹ e a microscopia de contraste de fase apenas a partir de 10^6 células/mL⁻¹. De acordo com os resultados obtidos, a utilização da técnica de Dot-blot atende as necessidades de diagnoses rotineiras.

A análise por PCR , permite a análise não só de DNA puro da bactéria, como também de células de extratos de planta, conteúdo líquido dos vasos condutores e colônias em placa ou meio de cultura líquido (SCHNEIDER; BRUJUN, 1996). Taylor *et al.* (2003) publicaram protocolo para detecção de *L. xyli* subsp. *xyli* por PCR, sendo esta altamente sensível para detecção da bactéria, mas embora sensível, não é uma técnica utilizada rotineiramente (TOKESHI; RAGO, 2005).

A técnica de PCR pode sofrer algumas modificações que visam reduzir contaminações como, por exemplo, no caso do Nested-PCR ou então para quantificação do patógeno em menor tempo de análise utilizando-se o PCR em Tempo Real (qPCR). Semelhante ao PCR convencional, o qPCR está sendo cada vez mais utilizado para diagnosticar e quantificar patógenos de plantas (SHAAD *et al.*, 2003; GAO *et al.*, 2004; KOKKINOS; CLARK, 2006; SAYLER; CARTWRIGHT; YANG, 2006), sua sensibilidade é maior (LEKANNE-DEPREZ *et al.*, 2002; BALAJI;

BUCHOLTZ; ANDERSON, 2003; KOKKINOS; CLARK, 2006) e é um método menos trabalhoso que o PCR convencional, pois não há necessidade de nova amplificação (RIRIE; RASMUSSEN; WITTEWER, 1997; WONG; MEDRANO, 2005). No qPCR, o produto é amplificado, monitorado e incorporado progressivamente moléculas fluorescentes na reação. A intensidade de fluorescência é correlacionada à produção do produto do PCR (WONG; MEDRANO, 2005). A principal vantagem apresentada pelo qPCR é a de que o diagnóstico da doença pode ser realizado antes dos nove meses de idade nas plantas de cana-de-açúcar como o usual para o PCR convencional e com maior sensibilidade. Além de diagnosticar a presença ou não da bactéria, esse novo método de diagnose também quantifica a presença da bactéria na amostra, facilitando assim o diagnóstico em mudas anteriormente ao plantio e assim diminuindo o inóculo da doença no campo (GRISHAM, 2004).

2.2.5.3 Técnicas sorológicas

No Instituto Biológico em Campinas, estão sendo desenvolvidas metodologias para diagnóstico por meio de técnicas sorológicas que poderão ser usadas no Programa Cana IAC para seleção de clones resistentes a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (SANTOS, 2003).

A técnica de Dot Blot EIA (“dot blot enzyme immunoassay”) consiste em fixar o extrato de cana-de-açúcar em membrana de nitrocelulose, e incubá-la com anticorpo específico contra a bactéria (*L. xyli* subsp. *xyli*), onde faz-se lavagens e em seguida incubá-se com anticorpo específico conjugado com a enzima fosfatase alcalina ou peroxidase. Após novas lavagens, a membrana é submetida a uma solução indicadora, que contém o substrato da enzima. Na presença da bactéria obter-se-á mudança de coloração nos locais onde a seiva foi fixada (HARRISON; DAVIS, 1986). A intensidade da cor é proporcional ao número de bactérias presentes na amostra. O nível de detecção deste método foi estimado em 2×10^6 células bacterianas/mL⁻¹. Esta técnica é barata e apresenta como vantagem o fato da leitura dos resultados ser rápida e direta, sem a necessidade de equipamentos especiais. Apesar de a técnica ser pouco sensível comparada à imunofluorescência e ao PCR, ela é suficientemente sensível para orientar a necessidade do tratamento térmico do material propagativo (CARNEIRO Jr. *et al.*, 2004).

Harrison e Davis (1988), após muitas pesquisas, procurando um método eficaz para identificar genótipos resistentes ao RSD, apresentaram a técnica TB-EIA (“Tissue Blot enzyme immunoassay”), que permite contar o número de tubos vasculares colonizados pela bactéria em impressões de toletes ou nervuras de folhas em membrana de nitrocelulose, hoje é de grande utilidade em programas de melhoramento de cana-de-açúcar para quantificar a colonização de tecidos vasculares por *Lxx*. Este processo é constituído por diversas etapas. Cilindros de tecido da região central dos entrenós de colmos de cana-de-açúcar são amostrados, este tecido é centrifugado de maneira a coletar o suco de cada feixe vascular em membrana de nitrocelulose. Após o processamento sorológico, feixes vasculares colonizados por *Lxx* são identificados na membrana pela coloração azulada quando observados através de microscópio estereoscópico. Depósitos coloridos de dimensões similares à de um metaxilema individualizado podem ser observados em membranas processadas. Com o TB-EIA foi demonstrado que a resistência de variedades de cana-de-açúcar estava associada com uma redução na colonização dos tecidos vasculares do colmo por *L. xyli* subsp. *xyli*.

O método por TB-EIA (HARRISON; DAVIS, 1988) é similar ao método de Dot Blot EIA. A diferença é que a seiva é extraída diretamente por centrifugação de um cilindro do colmo sobre a membrana de nitrocelulose, imprimindo-se nesta, em baixo relevo, os vasos do metaxilema.

A detecção sorológica da bactéria *L. xyli* subsp. *xyli* consitiui no método da diagnose do raquitismo mais utilizado para orientar a renovação de viveiros e de áreas comerciais de cana, de monitorar a sua disseminação e comprovar a real necessidade da utilização do tratamento térmico (GAGLIARDI; PACE; FERREIRA, 2006).

Para detecção de *L. xyli* subsp. *xyli* por métodos sorológicos faz-se necessária a produção de anticorpo específico contra o patógeno. A maioria dos trabalhos que empregam sorologia para a diagnose do RSD enfoca mais a comparação de técnicas sorológicas do que a produção e a qualidade do anti-soro produzido (GILLASPIE, 1978; HARRISON; DAVIS, 1986, 1990; GUZMÁN; VICTORIA, 1993). Os ensaios sorológicos incluem o Dot blot, “evaporative-binding enzyme immunoassay” (EB-EIA) (GILLASPIE, 1978; CROFT *et al.*, 1994) e “Tissue blot enzyme immunoassay” (HARRISON; DAVIS, 1988). Eles utilizam anticorpo

específico contra *L. xyli* subsp. *xyli* que os liga especificamente ao patógeno, estes ensaios detectam populações de *L. xyli* subsp. *xyli* em 10^5 células por mL⁻¹.

Cada método tem vantagens e desvantagens distintas como o custo, exatidão, e facilidade do processamento de um grande número amostras. Uma vantagem do Dot blot e do EB-EIA para os ensaios são que a seiva do xilema pode ser coletada em locais remotos e mandada para análise. Para análise através de "Tissue blot immunoassay" exige-se que a amostra do colmo seja encaminhada a uma central com laboratório para ser então processada. Esta técnica obteve o resultado mais exato quando comparados a outros ensaios acima mencionados (HOY; GRISHAM; DAMANN, 1999).

A detecção sorológica de *L. xyli* subsp. *xyli* constitui o método de diagnose do raquitismo-das-soqueiras mais utilizado para orientar na renovação de viveiros e de áreas comerciais de cana, de monitorar a sua disseminação e comprovar a real necessidade da utilização do tratamento térmico (GAGLIARDI; PACE; FERREIRA, 2006).

O teste ELISA ("Enzyme Linked Imunosorbent Assay") tem diversas aplicações e vem sendo utilizado por mais de 25 anos. Esta técnica consiste em fixar a bactéria a partir da adição do extrato de cana-de-açúcar em cavidades de placas de poliestireno, previamente cobertos por anticorpos específicos e fixados. Após lavagem, adiciona-se o anticorpo específico ligado a enzima (fosfatase alcalina) e, após nova lavagem, adiciona-se uma solução cuja coloração pode ser alterada pela enzima. Na presença da bactéria no extrato, ocorrerá sua fixação na placa, bem como a fixação da enzima ligada ao anticorpo que promoverá a alteração de cor da solução. Com base no teste ELISA, em que a intensidade do desenvolvimento da coloração está diretamente relacionada com o número de bactérias presentes na amostra, foi sugerido um método de seleção para resistência ao RSD em grande escala, detectando em torno de 4×10^6 células/mL⁻¹ ou em torno de 3 bactérias por campo de microscópio de contraste de fase (HARRIS, GILLASPIE JR., 1978). Ela tem como vantagens a sua robustez, simplicidade, rapidez na obtenção dos resultados e como principal desvantagem o limite de detecção (acima de 10^4 a 10^5 células mL⁻¹) (SILVA; REIS, 2005).

Em trabalho realizado por Gao *et al.* (2008) onde foram comparados três métodos de detecção sendo eles: PCR, ELISA e Dot blot, foram encontrados como resultados que os métodos que apresentaram maior sensibilidade para a detecção

da bactéria foram o ELISA e o Dot blot com níveis acima de 90% de detecção e o PCR apresentou 61% de incidência da bactéria. A detecção por PCR foi rápida e econômica, porém, menos sensível.

Técnicas sorológicas são eficazes somente quando as amostras são retiradas de plantas em que as bactérias encontram-se em altas concentrações. Em geral, a detecção é limitada a 10^{4-5} UFC/mL por FADCF, 10^6 UFC/mL pela técnica TB-EIA (HARRISON; DAVIS, 1988) e 10^6 Unidades formadoras de colônias(UFC)/mL pela técnica de EB-EIA (CROFT *et al.*, 1994).

2.2.6 Controle

A principal forma de controle dessa doença é por meio de resistência varietal, no entanto, a maior dificuldade consiste na seleção de variedades resistentes em função da dificuldade no diagnóstico rápido e eficiente da doença (COMSTOCK; LENTINI, 2002).

Devido à impossibilidade de controle da doença uma vez instalada, o único método eficiente de controle no campo é a exclusão, com o plantio de toletes livres do patógeno. Atualmente, duas são as técnicas empregadas para essa finalidade: uso de cultura de meristema, alternativa de saneamento para plantio de viveiros primários (TOKESHI; RAGO, 2005; HOY *et al.*, 2003).

O tratamento térmico é uma forma eficiente de controle da enfermidade para o estabelecimento de viveiros e campos comerciais livres da doença (SANGUINO, 1998). O processo deve ser bem criterioso, pois qualquer variação pode resultar em sérios prejuízos. No tratamento térmico, trabalha-se o binômio tempo-temperatura. Os toletes-sementes são submetidos à imersão em água quente por um determinado tempo, na tentativa de destruir as proteínas e enzimas da bactéria, sem injuriar em demasia as proteínas e enzimas das gemas dos toletes. Duas combinações são empregadas atualmente no Brasil: 52°C por 30 minutos (COPERSUCAR, 1989) ou 50°C por 2 horas (DAMANN; BENDA, 1983). Dessas, a primeira é a preferencialmente empregada pelas unidades produtoras por demorar menos e permitir o tratamento de um número maior de toletes. Ambas não conseguem a eliminação completa da bactéria, apresentando escapes que servem como fonte de inóculo (BENDA, 1994). Em ambos os casos, para que ocorra a

destruição total das células bacterianas, há necessidade de repetições do tratamento térmico dos materiais previamente tratados (STEINDL, 1974), constituindo-se numa operação trabalhosa e custosa, nem sempre seguida pelos produtores.

Por ser facilmente transmitida mecanicamente, a desinfecção é um importante método para prevenção da doença. Todos os equipamentos usados para corte da cana devem ser desinfectados por produtos químicos ou mesmo calor. É indispensável associar à termoterapia a prática do “rouging”, que consiste em eliminar plantas doentes. A presença de plantas doentes nos viveiros obriga a repetição do processo até a limpeza total das mudas. É necessário planejamento global, prevendo as necessidades futuras, preparando os viveiros com anos de antecedência, levando em consideração fatores como: em média 50% das gemas tratadas não germinam, com um hectare de viveiro tratado termicamente são necessárias 20 a 30 toneladas de mudas, os canaviais comerciais devem ser instalados a partir de viveiro secundário ou socas de viveiros primários (TOKESHI; RAGO, 2005).

Devido ao residual de bactérias que causam o raquitismo em cana após o tratamento térmico e a alta infectividade do caldo de colmos doentes, a doença apresentará uma rápida evolução para áreas vizinhas (evolução temporal). Os programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar estão, se não envolvidos, pelo menos preocupados com a execução de atividade de rotina para a obtenção de variedades resistentes ou tolerantes ao RSD (GIGLIOTI, 1997), visando encontrar variedades com a capacidade de limitar a frequência de infecções, a intensidade da colonização de seus tecidos por *L. xyli* subsp. *xyli* e as perdas decorrentes deste ataque.

2.3 RESISTÊNCIA DA CANA-DE-AÇÚCAR AO RAQUITISMO

A resistência varietal e o tratamento térmico não são suficientes para combater o raquitismo-da-soqueira, persistindo resíduo de bactérias ativas dentro dos colmos tratados. Devido à presença desse residual e à alta infectividade do caldo de colmos doentes haverá uma rápida evolução da doença para áreas vizinhas ou dentro do talhão, para as soqueiras subseqüentes. Assim a única forma

que resta de controle da doença é o uso de variedades resistentes com capacidade de limitar a frequência de infecções, intensidade de colonização dos tecidos e perdas ocasionadas pelo ataque da bactéria (HARRISON; DAVIS, 1988).

Gillaspie Jr., Davis e Worley (1973) na tentativa de desenvolver um método de identificação de variedades resistentes com base na densidade populacional da bactéria do RSD, estimaram a quantidade de células bacterianas em suco extraído de colmos de quatro variedades através de moagem dos colmos com seis meses de idade e a contagem de talos bacterianos no suco obtido com auxílio de microscópio de contraste de fase. Eles concluíram que a parte basal dos colmos continha mais bactéria, que as amostras poderiam ser conservadas em baixas temperaturas até duas semanas, e que a observação não necessita ser imediatamente após a extração. Encontraram também que o número de bactérias não foi igual nas diferentes variedades e entre as plantas do mesmo cultivar, sendo que canas que apresentavam sintomas típicos da doença continham mais bactérias do que aquelas que não apresentavam sintomas.

Conceitos de Tolerância e Resistência:

Os termos tolerância e resistência são empregados por pesquisadores, técnicos e produtores para classificar a reação das variedades em resposta à infecção por patógenos, esses termos são empregados como forma equivalente e até mesmo como sinônimos. Em fitopatologia há diferenças importantes para os conceitos de tolerância e resistência.

Segundo Caldwell *et al.* (1958) tolerância “é a capacidade das plantas suportarem a doença sem perdas severas em produtividade ou qualidade”. A partir dessa definição outras foram sendo formadas como a de Camargo (1995), onde refere-se à tolerância como capacidade inerente ou adquirida de uma planta em suportar a infecção por patógeno (fungo, vírus, nematóides, bactérias etc) sem que ocorram danos significativos em sua produção. Agrios (2005) define como a habilidade das plantas produzirem uma boa colheita, mesmo quando infectadas por um patógeno. Ribeiro do Vale, Parlevliet e Zambolim (2004) definem tolerância como a habilidade de uma cultivar, em relação a outra, com mesmo potencial produtivo, de ser menos afetada na produção com a mesma intensidade (incidência ou severidade) de doença. Cabe esclarecer que incidência é uma medida de intensidade de doença normalmente quantificada pela porcentagem de plantas

doentes numa área. A severidade é outra forma de medir intensidade de doença, porém, com base na porcentagem de tecido vegetal afetado pelo agente causal (patógeno).

Os conceitos apresentados anteriormente enfatizam que a produção ou rendimento e a intensidade de doença são as variáveis mais importantes a serem avaliadas quando se deseja quantificar a tolerância. Tolerância envolve algum grau de compensação do dano causado pela doença. As plantas podem tolerar infecção pelo patógeno de diferentes maneiras, principalmente, com o aumento de atividades ou processos como: a concentração de clorofila das folhas; tamanho de folhas novas; número de novos ramos; período em que folhas infectadas permanecem aderidas à planta e a captação de nutrientes - processos esses envolvidos diretamente na produção. Plantas tolerantes produzem mais que plantas não tolerantes ou menos tolerantes, sob a mesma intensidade de doença. Entretanto, embora as plantas tolerantes possam apresentar bons rendimentos quando doentes, maiores produções são alcançadas quando as plantas estão sadias (AGRIOS, 2005).

Assim, quando se emprega o termo tolerância é necessário considerar o potencial produtivo das plantas, a intensidade de doença e a quantidade produzida. Plantas tolerantes são afetadas pelo patógeno, mas, geralmente o dano é menor do que o constatado em plantas não tolerantes. Contudo, ainda não se conhece exatamente como o processo de tolerância é determinado. A genética da tolerância às doenças ainda não está devidamente compreendida (AGRIOS, 2005) e isso dificulta o desenvolvimento de cultivares tolerantes.

Quanto à resistência, os efeitos qualitativos ou quantitativos podem ter, respectivamente, herança do tipo mono ou oligogênica (um ou poucos genes envolvidos) ou poligênica (vários genes expressando o caráter). Outro fundamento generalizado é que a expressão gênica para qualquer caráter, inclusive o de resistência a agentes bióticos, pode ser por ação intra-alélica (recessiva, dominante ou semidominante) ou inter-alélica (complementar, aditiva ou epistática). Segundo Fry (1982), resistência é a característica de uma planta que restringe o desenvolvimento do patógeno e da doença. Strange (2003) define como o retardo da infecção e crescimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro e Parlevliet (1997) conceitua resistência como a habilidade da planta em suprimir, retardar ou prevenir

a entrada ou a subsequente atividade do patógeno (crescimento e desenvolvimento) em seus tecidos.

Conforme as definições anteriormente citadas observa-se que não há menção sobre os efeitos da resistência sobre a produção da planta. Dois processos determinam a resistência da cultivar na maioria dos fitopatógenos: a resistência do tipo não-hospedeira e a resistência verdadeira, onde a primeira refere-se que a resistência a certos patógenos se deve ao fato da espécie da planta pertencer a um grupo taxonômico que é naturalmente imune ao patógeno e o segundo tipo refere-se ao fato da planta possuir genes para resistência contra o patógeno (AGRIOS, 2005). A resistência verdadeira é geneticamente controlada pela presença de um, poucos ou muitos genes para resistência, portanto é característica herdável. Com isso, o hospedeiro e o patógeno podem ser incompatíveis em maior ou menor grau, seja devido à falta de reconhecimento químico entre os dois, ou seja porque a planta hospedeira se defende da infecção causada pelo patógeno (AGRIOS, 2005).

Segundo Vanderplank (1968), há dois tipos conhecidos de resistência: resistência específica ou vertical e resistência geral ou horizontal. A Resistência específica ou vertical é somente contra alguns biotipos de espécies de pragas ou de patógenos; sendo governada por um ou poucos genes, conferem grande resistência específica, porém é de pouca estabilidade e pode se facilmente incorporada em novas cultivares pela adoção dos retrocruzamentos dirigidos. Resistência geral ou horizontal que é expressa igualmente contra todos os biotipos de espécie de pragas ou patógenos. Apresenta maior estabilidade por ser controlada por inúmeros genes, dessa forma encontra-se maior dificuldade para sua incorporação nas futuras cultivares.

Teoria gene-a-gene de Flor

Flor foi o primeiro cientista a determinar uma interação entre planta e patógeno. Segundo a hipótese de Flor, *“para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro existe um gene complementar no patógeno que condiciona a avirulência”*. De acordo com o conhecimento atual da interação gene a gene, o alelo de avirulência (V) codifica uma molécula elicitora que é reconhecido por um receptor específico (codificado pelo alelo R) na planta hospedeira. O reconhecimento da molécula elicitora inicia uma rota de transdução de sinais que ativam genes envolvidos na resposta de hipersensibilidade. Por outro lado, se o patógeno não possuir o gene de avirulência, este não será reconhecido pelo

hospedeiro, resultando em interação compatível (suscetibilidade). A resistência só ocorre quando o hospedeiro possui o gene de resistência (R) e o patógeno o gene de avirulência (V) correspondente. Qualquer outra situação resulta em susceptibilidade (FLOR, 1942).

Quando diferentes isolados de um patógeno são inoculados em diferentes indivíduos de um hospedeiro, pode ou não ocorrer uma interação significativa. Na ausência de interação, a resistência é do tipo horizontal, e os isolados diferem quanto à agressividade. Entretanto, se ocorrer interação diferencial, a resistência é vertical, e os patógenos diferem quanto à virulência. A presença de interação indica que há especialização do patógeno em nível intra-específico do hospedeiro e, portanto, os isolados são classificados em raças, de acordo com seus espectros de virulência diante de uma série de hospedeiros diferenciais, conforme Camargo e Bergamin Filho (1995).

2.4 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico de doenças de plantas iniciou-se como ciência em 1926, quando B.B. Sanford publicou um trabalho sobre fatores que afetavam a patogenicidade de *Streptomyces scabies*, agente causal da sarna comum da batata. Em 1931, Sanford e W.C. Broadfoot empregaram pela primeira vez o termo “controle biológico”, em um artigo sobre o mal-do-pé do trigo, causado por *Gaeumannomyces graminis var. tritici*.

A definição de controle biológico de doenças de plantas inclui “a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, através de um ou mais organismos”. Nesta definição, as atividades determinantes da doença envolvem crescimento, infectividade, agressividade, virulência e outras qualidades do patógeno ou processos que determinam infecção, desenvolvimento dos sintomas e reprodução. Os organismos incluem indivíduos ou populações avirulentas ou hipovirulentas dentro das espécies patogênicas e antagonistas dos patógenos. O termo antagonista é empregado para designar agentes biológicos com potencial para interferir nos processos vitais dos fitopatógenos, estando estas raças ou espécies adaptadas ecologicamente ao mesmo tecido das plantas que os ocupados pelos patógenos, mas sendo apatogênicas às mesmas, enquanto que o termo

"formas de antagonismo" designa os mecanismos pelos quais os antagonistas agem sobre os patógenos (BETTIOL; GHINI, 1995).

O controle biológico de pragas e doenças de plantas pelo uso de bactérias endofíticas pode ser uma promissora linha de pesquisa, tendo em vista sua capacidade de habitar o interior da planta, sem incitar sintomas visíveis de doença aparentes, competindo ainda, pelos mesmos sítios de colonização com o patógeno. Ademais, a colonização por endófitas pode induzir resistência, acionar os mecanismos de resistências do hospedeiro, produzir bacteriocinas danosas ao patógeno (antibiose), isto torna a aplicação de endófitos como agentes de biocontrole extremamente vantajosa (OLIVARES; REIS; FAÇANHA, 2000).

A perspectiva do biocontrole do RSD por bactérias endofíticas, presumivelmente possibilita estender os efeitos benéficos do tratamento térmico e da cultura de meristema por um maior número de ciclos da cultura. O que resultaria em maior produtividade e menor custo para os produtores, justificando assim, o investimento em mudas saudáveis. Ademais, a possibilidade do uso das endófitas como forma de controle do RSD, possibilitará que variedades com baixa resistência à doença, mas com grande potencial produtivo, sejam aproveitadas pelos programas de melhoramento e produtores.

Na cultura da cana-de-açúcar, já foram descritas sete espécies de bactérias endofíticas, colonizando raízes, colmos e folhas (BALDANI *et al.*, 1997). Todas são bactérias capazes de fixar nitrogênio do ar (diazotróficas) e algumas colonizam o interior dos vasos do xilema da planta, podendo ocupar provavelmente um mesmo "nicho" que bactérias fitopatogênicas, como é o caso de *L. xyli* subsp. *xyli* (OLIVARES; REIS; FAÇANHA, 2000).

Para evidenciar o potencial da inoculação com *H. seropedicae* trabalhos como de Olivares, Reis e Façanha (2000), em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, demonstraram o efeito de promoção do crescimento pela inoculação de estirpes selecionadas de *H. seropedicae*, com incrementos na biomassa radicular entre 50 e 350% em relação ao controle não inoculado. Também em cana-de-açúcar e de acordo com o autor, Marques Jr. *et al.* (2008) avaliando o efeito do uso de ácidos húmicos e *Herbaspirillum seropedice* em cana-de-açúcar encontraram promoção significativa do crescimento radicular de toletes tratados termicamente, ocasionando incremento de massa ao redor de 120% e com estímulo médio na ordem de 60% no comprimento radicular das plântulas em relação às plantas-

controle. Canuto *et al.* (2003), com o objetivo de avaliar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) por diferentes estirpes de *H. seropedicae* inoculadas em plantas de cana-de-açúcar originadas de semente, cultivadas em solo não estéril e mantidas ao ar livre, encontraram maiores contribuições da FBN com a inoculação. Esses resultados fortalecem a importância da continuação do estudo da eficiência de *H. seropedicae* no rendimento da cultura e no controle da bactéria em cana soca, pois, a tendência é que a concentração do patógeno nas plantas na próxima safra esteja maior (DAVIS; DEAN; HARRISON, 1988). Bactérias endofíticas possuem, da mesma forma que os fitopatógenos, a capacidade de penetrar na planta e colonizar sistematicamente o hospedeiro podendo habitar o apoplasto, vasos condutores e ocasionalmente o meio intra celular (KLOEPER, 1978). É concebível que dentro das plantas existe interações entre comunidades microbianas, as interações microbianas incluem a competição por nutriente, antagonismo causado por antibióticos, sideróforos e bacteriocinas. A promoção do crescimento vegetal se dá principalmente pela produção de fitormônios como as auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno pelas bactérias endofíticas. A produção desses fitormônios já foi relatada em bactérias como *Gluconoacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (KUKLINSKY-SOBRAL, 2004). O ácido indol acético é uma auxina importante de ocorrência natural que possui efeitos fisiológicos na planta, como aumento do crescimento apical.

Segundo Harrison e Davis (1988) os vasos do xilema são o habitat natural de *L. xyli* subsp. *xyli*, sendo que internódios basais o local de maior concentração de *L. xyli* subsp. *xyli* principalmente no estágio fisiológico de maturação. A dinâmica populacional de *L. xyli* subsp. *xyli* facilita a disseminação na colheita. Entretanto, a dinâmica populacional das bactérias endofíticas e do patógeno são diferentes, enquanto o patógeno aumenta a população com a maturação há uma tendência natural das bactérias endofíticas diminuírem (COSTA; RUSCHEL, 1981). Este comportamento associado às características da cultura da cana-de-açúcar (aumento do teor de sacarose associado ao período de colheita) promove a colonização dos vasos do xilema por *L. xyli* subsp. *xyli* no final do ciclo, o que facilita a disseminação do raquitismo da soqueira durante a colheita. Devido a esse fato Carneiro Jr. (2006), acredita que mecanismos devem ser criados na colheita ou pós-colheita para que a população das bactérias endofíticas seja re-estabelecida, já que encontraram-se baixa a população no período de colheita.

O controle biológico pode se constituir em importante medida de controle, Carneiro Jr., Silveira e Ponte (2006), avaliou o efeito de bactérias endofíticas na sanidade e vigor de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar e inoculadas com *Leifsonia xyli* subsp *xyli* e os resultados de cana planta mostraram que nos tratamentos combinados de endofitas/patógeno ocorreu uma indução de tolerância ao raquitismo, pois se detectou reações soropositivas ao patógeno e melhoria no rendimento agrônomo.

2.4.1 Bactérias diazotróficas

As bactérias diazotróficas associadas à cultura da cana-de-açúcar são: *Beijerinckia fluminensis*, *Azospirillum lipofereum*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani *et al.*, 1986), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, 1986), *Burkholderia tropica* (REIS *et al.*, 2004), *Burkholderia unamae*, *Burkholderia silvatlantica*, *Erwinia*, *Azotobacter*, *Derrxia* e *Enterobacter* (PURCHASE, 1980). O uso de rizobactérias é muitas vezes um fator impactante para a produção agrícola, devido a sua influência na produção e supressão a doenças, isolados de bactérias endo e ectofíticos podem contribuir para o crescimento e desenvolvimento de mudas de plantas (GRACIOLLI; FREITAS; RUSCHEL, 1983; GOMES; REIS; BALDANI, 2005).

Bactérias promotoras de crescimento vegetal são benéficas às plantas e possuem capacidade de colonizar as raízes e outros tecidos internos do vegetal, sem causar sintomas de doenças. Este estímulo ao crescimento se dá através de diferentes mecanismos, tais como a fixação biológica de nitrogênio e a produção de hormônios de crescimento como auxinas e geberilinas, que favorecem o crescimento vegetal principalmente das raízes e que atuam na maior absorção de nutrientes e água (LIN *et al.*, 1983). Elas também podem agir no crescimento vegetal de forma indireta, protegendo a planta de fungos patogênicos do solo ou de bactérias patogênicas através de vários mecanismos como a produção de sideróforos, antibiose, chitinases e glucanases que podem lisar células bacterianas (WHIPPS, 1997).

As bactérias diazotróficas associadas a plantas não leguminosas podem ser agrupadas em três categorias: microrganismos rizosféricos, endofíticos facultativos e endofíticos obrigatórios (BALDANI *et al.*, 1997). Na primeira categoria estão agrupadas as espécies que colonizam a porção superficial das raízes. Na segunda categoria estão aquelas capazes de colonizar tanto internamente quanto externamente as raízes, enquanto que no terceiro grupo, tido como de maior importância, estão as bactérias que colonizam o interior de raízes e porções aéreas das plantas. Segundo Kloepper *et al.* (1992), o termo endofítico refere-se às bactérias presentes dentro dos tecidos internos da epiderme. A vantagem dos microrganismos endofíticos está no potencial para fixar nitrogênio em níveis máximos, pois estes estão situados em nichos mais protegidos do oxigênio e de outros fatores inibitórios, tal como a competição microbiana.

Alguns resultados positivos foram obtidos no controle de patógenos de solo com o uso de bactérias endofíticas. O fato das bactérias endofíticas colonizarem o interior da planta, competindo pelos mesmos sítios de colonização do patógeno, sem incitar sintomas aparentes, aliado ao menor impacto de flutuações abióticas no interior da planta, torna a aplicação de endófitos como agentes de biocontrole potencialmente vantajosa comparada à utilização de microrganismos rizosféricos (OLIVARES, 2000).

A estreita relação entre microrganismos endofíticos e seus hospedeiros faz com que sejam candidatos naturais a serem usados como agentes de controle de doenças. Por ocuparem um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por patógenos, os microrganismos endofíticos apresentam potencial para o controle biológico (HALLMANN *et al.*, 1997). Este controle pode ser resultante de diversos mecanismos, como competição por espaço e nutrientes na planta hospedeira, produção de compostos antimicrobianos (STROBEL, 2003) e indução de resistência sistêmica.

A grande vantagem que os endófitas têm em colonizar as plantas é que os tecidos internos proporcionam um ambiente protegido das adversidades do meio, tais como raio ultravioleta, chuvas e flutuações de temperatura, bem como maior disponibilidade de nutrientes, evitando assim competição com outros microrganismos, como a microflora rizosférica (MCINROY; KLOEPPER, 1995). Logo, endofitismo pode ser visto como uma forma de sobrevivência destes microrganismos.

Na década de 50, a microbiologista Johana Döbereiner e sua equipe pesquisaram bactéria endofíticas fixadoras de nitrogênio para a cultura da cana-de-açúcar, bactérias diazotróficas da cana-de-açúcar como *Erwinia* sp, *Azotobacter* sp, *Dexia* sp, *Azospirillum* sp, *Enterobacter* sp e bactérias anaeróbicas como *Clostridium* sp e *Klebsiella* spp (PURCHASE, 1980; GRACIOLLI; FREITAS; RUSCHEL, 1983) foram encontradas. Verificou-se ainda que um grande número de bactérias fixadoras de nitrogênio colonizava naturalmente o interior de tecidos de plantas de cana-de-açúcar, sendo designadas de bactérias diazotróficas endofíticas (DÖBEREINER, 1992).

2.4.1.1 Gênero *Azospirillum*

Azospirillum spp. fazem parte do grupo de bactérias Gram negativas, curvas, móveis e de várias origens geográficas e foi descrita como bactérias diazotróficas associadas a raízes de gramíneas. A temperatura ótima de crescimento varia entre 28 e 41 °C, dependendo da espécie (ECKERT *et al.*, 2001). As bactérias do gênero *Azospirillum* são microrganismos capazes de crescer utilizando nitrogênio atmosférico como fonte única de nitrogênio (diazotróficos), aeróbios, que se associam com raízes de diversas plantas de importância agrícola como o milho, trigo, sorgo e arroz (DÖBEREINER; DAY, 1976; ECKERT *et al.*, 2001). Algumas estirpes podem colonizar não só a rizosfera mas também o interior de raízes. Estas bactérias já foram isoladas de raízes de mais de 100 espécies de plantas, podendo também ser aplicadas com sucesso a raízes de plantas que não apresentam histórico de colonização com *Azospirillum*. Bactérias deste gênero são classificadas como colonizadores de raízes de ampla faixa hospedeira (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004).

O gênero *Azospirillum* pertence à subdivisão α das Proteobactérias (YOUNG, 1992) e comporta oito espécies: *Azospirillum brasilense*, *lipoferum* (TARRAND; KRIOG; DOBEREINER, 1978), *halopraeferans* (REINHOLD *et al.*, 1987), *amazonense* (MAGALHÃES *et al.*, 1983), *irakense* (KHAMMAS *et al.*, 1989), *largimobile*, *doebereineriae* (ECKERT *et al.*, 2001) e *oryzae* (XIE; YOKOTA, 2005), dentre estas espécies, a mais estudada é *A. brasilense*.

As fontes de carbono preferencialmente utilizadas por *Azospirillum* spp. são ácidos orgânicos como malato, lactato, succinato e piruvato. Carboidratos como D-frutose e D-glucose podem ser utilizados por algumas espécies (DÖBEREINER; PEDROSA, 1987). O metabolismo de nitrogênio é bastante versátil, podendo ser utilizados como fonte de nitrogênio: amônio, nitrato, nitrito, aminoácidos e nitrogênio atmosférico (DÖBEREINER; PEDROSA, 1987). Todas as espécies de *Azospirillum* são diazotróficas, quando cultivadas em meio semi-sólido isento de nitrogênio fixado formam uma película de crescimento característica (DÖBEREINER; DAY, 1976). Esta película é formada por células que se deslocam para regiões do meio onde a concentração de oxigênio é compatível com a síntese e atividade da nitrogenase (DÖBEREINER; DAY, 1976).

Bactérias do gênero *Azospirillum* colonizam a rizosfera de gramíneas, apresentando propriedades como quimiotaxia, aerotaxia, acumulação de substâncias de reserva (como polihidroxitirato), produção de promotores de crescimento vegetal, fixação de nitrogênio atmosférico e formação de cistos. Estudos têm demonstrado que a inoculação com *Azospirillum* spp. incrementa o rendimento de cereais no campo em mais de 30%, e rendimentos ainda maiores foram obtidos em condições de câmara de crescimento (OKON; LABANDERAGONZALEZ, 1994). Uma melhor compreensão da interação *Azospirillum* planta poderia melhorar a eficácia de inoculantes que utilizam este microrganismo e permitir sua aplicação em larga escala no campo (DOBBELAERE *et al.*, 2001). A fixação biológica de nitrogênio por bactérias diazotróficas em leguminosas é evidenciada pela formação de nódulos.

Um aumento significativo no rendimento da produção de grãos é observado com a inoculação de *Azospirillum* spp., juntamente com um aumento no conteúdo de fósforo, potássio e de nitrogênio total das plantas (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004). O aumento na produção e crescimento após a inoculação com estirpes de *Azospirillum* spp. tem sido atribuído principalmente a um efeito geral no crescimento das raízes e uma conseqüente melhora na capacidade de assimilação de nutrientes pela planta. A teoria mais aceita é de que o efeito benéfico da associação com *Azospirillum* ocorra devido a uma soma de múltiplos mecanismos (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004). As bactérias do gênero *Azospirillum* podem produzir vários fitormônios (tais como giberilinas, ácido indolacético e etileno) e fixam nitrogênio em associação com plantas, porém a transferência de nitrogênio

fixado para a planta associada parece ser limitada e nem sempre é detectada (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004). Becker *et al.* (2002) demonstraram que plantas de tomate, crescidas em meio livre de nitrogênio fixado, e inoculadas com *A. brasilense* são capazes de induzir a expressão de um gene envolvido no transporte de amônio no tomateiro. Este resultado não foi observado quando o mesmo experimento foi conduzido com uma estirpe de *A. brasilense* incapaz de fixar nitrogênio, sugerindo que o amônio produzido pela bactéria pode ser sensoriado e, possivelmente, utilizado pela planta associada como fonte de nitrogênio.

O mecanismo exato da interação planta-*Azospirillum* spp. não é conhecido. Acredita-se que a adesão do *A. brasilense* a rizosfera ocorra em duas etapas distintas: uma etapa inicial reversível mediada pelo flagelo polar, seguida de uma etapa irreversível de aderência mediada por polissacarídeos secretados pela bactéria (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004).

2.4.1.2 Gênero *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* foi descoberto durante um levantamento realizado no estado do Rio de Janeiro sobre a ocorrência de novas espécies bacterianas presentes na rizosfera e no interior das raízes de cereais. Baldani (1984) obteve isolados que, apesar de serem menores e menos móveis, assemelhavam-se com as espécies anteriormente redescobertas e descritas do gênero *Azospirillum* (DÖBEREINER; DAY, 1975). Tendo como base algumas características fisiológicas, de crescimento em meio semi-sólido (NFb malato), do conteúdo de guanina e citosina (G+C) da seqüência de DNA e de ensaios de hibridização DNA-RNA ribossomal, os novos isolados indicaram um possível parentesco com os gêneros *Azospirillum* e *Aquaspirillum*; proposta que chegou a ser feita por Baldani *et al.* (1984). No entanto, tal hipótese foi posteriormente descartada pelos resultados obtidos através dos experimentos de hibridização RNA-RNA realizados por Falk *et al.* (1986), que mostraram baixos níveis de complementaridade de RNA (menos que 25 %) quando 2 isolados foram comparados com 3 espécies do gênero *Azospirillum*. Deste modo, foram propostos o gênero *Herbaspirillum* (do latim *herba*: planta herbácea portadora de sementes; *spirillum*: pequena espiral) e a espécie

Herbaspirillum seropedicae; sendo que o segundo nome se refere a cidade de Seropédica (RJ), Brasil, local onde a bactéria foi inicialmente isolada (BALDANI *et al.*, 1986).

O *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, com forma geralmente vibrióide e algumas vezes helicoidal. A célula possui diâmetro de 0,6 a 0,7 μm e comprimento que pode variar de 1,5 – 5 μm dependendo do meio no qual é cultivada. Pode apresentar de 1 a 3 flagelos em um dos pólos, ou 1 flagelo em ambos os pólos e possui grande mobilidade em ambientes ricos em oxigênio. É positiva para catalase, oxidase e urease. Cresce bem com N_2 como única fonte de nitrogênio e tolera ampla faixa de pH (5,3 – 8,0), com temperatura de 35 °C. Coloniza os espaços intercelulares das células do córtex das raízes. No tecido vascular coloniza os meatos celulares e o interior das células do parênquima vascular, invadindo o xilema e provavelmente, translocando-se via fluxo transpiratório. A população no interior da planta é estimada em torno de 10^4 células g^{-1} (OLIVARES *et al.*, 1996).

Possui capacidade de oxidar diversas fontes de carbono e fixa nitrogênio atmosférico em ambientes microaerófilos (BALDANI *et al.*, 1986). Difere das espécies do gênero *Azospirillum* pelo seu menor tamanho, por apresentar mais de 1 flagelo, pela maior tolerância ao pH (5,3 a 8,0) e pela atividade nitrogenase mais tolerante ao oxigênio (pO_2 de até 3% contra 2% das espécies de *Azospirillum*), e por ter um conteúdo de G+C inferior em comparação com as bactérias do gênero *Azospirillum* (BALDANI *et al.*, 1986).

A modificação dos componentes do meio semi-sólido NFb em relação ao pH, presença de vitaminas e a concentração de fosfatos, facilitou o isolamento do *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1992). Com base na homologia de rRNA, característica atual vigente para classificação dos microrganismos, o *Herbaspirillum seropedicae* é classificado como membro pertencente à subdivisão β das Proteobactérias (YOUNG, 1992).

Trabalhos realizados como o de Baldani *et al.* (1997) cita que *Herbaspirillum seropedicae* coloniza os vasos do xilema em pequenas densidades de células, por isso, dificilmente causam sintomas, enquanto, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* colonizam os vasos em altas concentrações, isto em variedades suscetíveis causando estria mosqueada (OLIVARES, 1997). Reis (2000) relatou que há uma

redução da população de *Gd* no final do ciclo da cultura, a partir dos 15 meses, não sendo observado o mesmo para *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Já Costa & Ruschel (1981), estudando a flutuação populacional de microrganismos em cana-de-açúcar observou que há uma influência direta da época do ano e do estado fisiológico da cultura na população de bactérias diazotróficas.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington, MA: Elsevier Academic, 2005.
- BALAJI, B.; BUCHOLTZ, D. B.; ANDERSON, J. M. *Barley yellow dwarf virus* and *Cereal yellow dwarf virus* quantification by real-time polymerase chain reaction in resistant and susceptible plants. **Phytopathology**, v.93, p.1386-1392, 2003.
- BALBO J. M. Geração de energia elétrica a partir da utilização do bagaço de canade-açúcar. **Usina Açucareira São Francisco**. SP. 1990.
- BALDANI, J.I. *et al.* Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.86-93, 1986.
- BALDANI, V.L.D. *et al.* Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, 13:65-73, 1992.
- BALDANI, J.I. *et al.* A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **An. Acad. Bras. Cien.** vol.56, p.365, 1984.
- BALDANI, J. I. *et al.* Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 911-922, May/June, 1997.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Can. J Microbiol.** v. 50, p. 521-577, 2004.
- BENDA, G. T. A. Serial hot-water treatment for sugarcane disease control. In: RAO GP, GILLASPIE JR AG, UPADHYAYA PP, BERGAMIN FILHO A, AGNIHOTRI VP, CHEN CT (Eds.) **Current trends in sugarcane pathology**. New Delhi. International Books and Periodicals Supply Service, 1994. p. 297-310.
- BECKER, D. *et al.* Expression of the NH_4^+ transporter gene LEAMT1;2 is induced in tomato roots upon association with N_2 -fixing bacteria. **Planta**, v. 215, p. 424-429, 2002.
- BETTIOL W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.717-727.
- CALDWELL, R.; COMPTON, L.; PATTERSON, F. Tolerance to cereal leaf rusts. **Science**, n. 128, p.714-715, 1958.
- CAMARGO, L.E.A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**., v.1, 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.470-492.

CAMARGO, L.E.A.; BERGAMIN FILHO A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. v.1, 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.729-758.

CANUTO, E. L. *et al.* Evaluation of the biological nitrogen fixation contribution in sugarcane plants originated from seeds and inoculation with nitrogen-fixing endophytes. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 34, p.62-64, 2003.

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

CARNEIRO JR., J.B. *et al.* **Método de extração de seiva do xilema de cana-de-açúcar e detecção sorológica por Dot blot de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. In: 8º Encontro de Iniciação Científica, 3º Mostra de Pós-Graduação e 1ª Mostra de Extensão, p.116-117, 2003.

CARNEIRO JR., J.B. *et al.* Especificidade de anti-soro policlonal à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Fitopatologia Brasileira**, n.29, p.614-619, 2004.

CARNEIRO JR., J.B.; SILVEIRA, S.F.; PONTE, E.C.; Sanidade e vigor de mudas de cana-de-açúcar infectadas por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e tratadas por termoterapia. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.s 183, suplemento, agosto de 2006.

CAVALCANTE, V.A; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23-21, 1988.

CHAGAS, P. R. R. **Raquitismo da soqueira: severidade dos sintomas no xilema e quantificação dos danos agro-industriais**. 161 f. Tese (Doutorado) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiróz – ESALQ/USP, 1996.

CHAGAS, P. R. R.; TOKESHI, H. Comparison between methods for diagnosis of ratoon stunting disease: I water flow, flow staining and staining by transpiration. In: RAO, G. P. *et al.* (Ed.). **Current trends in sugarcane pathology**, New Dehli: Internacional Books & Periodicals Supply Service, 1994, p.163-171.

CHAGAS, P. R. R.; MATSUOKA, S. Medidas de controle do raquitismo da soqueira. **Brasil açucareiro**, v. 106, p.40-44, 1988.

COMSTOCK, J.C.; LENTINI, R.S. **Sugarcane mosaic virus disease**. Agronomy Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. SS-AGR-209, 2002.

COMSTOCK, J.C. *et al.* Relationship between resistance to *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* colonization in sugarcane and spread of ratoon stunting disease in the field. **Plant disease**., n. 80, p. 704-708. 1996.

COMSTOCK, J. C. *et al.* Ratoon stunting disease in Florida sugarcane fields: relationship between disease incidence and cultivar resistance. **Journal American of Sugarcane Technologists**, n.17, p.95-101. 1997.

CONAB. (2010) **Estimativa de produção de cana-de-açúcar safra 2010/2011**, UDOP. ARAÇATUBA. SP. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos>. Acesso dez./2010.

COPERSUCAR. **Binômio tempo x temperatura no controle do raquitismo da soqueira (RSD) da cana-de-açúcar, pelo processo de termoterapia em gemas isoladas**. São Paulo SP. Cadernos COPERSUCAR. Série Melhoramento, n.25, 1989.

COSTA, J.M.T.; RUSCHEL, A.P. Seasonal variation in the microbial populations of sugar-cane plants. In:VOSE,P.B., RUSCHEL,A.P.(Eds) **CRC**. n.2, p.109-118, 1981.

CROFT, B.J. *et al.* RSD diagnosis and varietal resistance screening in sugarcane using the EBEIA technique. **Austral. Soc. Sugar Cane Technol.**, n.16, p.143-151, 1994.

CROFT, B.J. A method of rating sugarcane cultivars for resistance to ratoon stunting disease based on an enzyme-linked immunoassay. **Australasian Plant Pathology**, n.31, p.63-66, 2002.

DAMANN, K. E.; BENDA, G. T. A. Evaluation of commercial heat-treatment methods for control of ratoon stunting disease of sugarcane. **Plant Disease**, n. 67, p. 966-967. 1983.

DAMANN, K. E. Alkaline-induced metaxylem autofluorescence: A diagnostic symptom of ratoon stunting disease of sugarcane. **Phytopathology** n.78, p. 233-236, 1988.

DAVIS, M.J.; DEAN J.L.; HARRISON, N.A. Quantitative variability of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* populations in sugarcane cultivars differing in resistance to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, n.78, p.462–468, 1988.

DAVIS, M. J.; GILLASPIE JR. A. G.; VIDAVER, A. K. *Clavibacter* a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. Sp. Nov. subsp. Nov and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. Nov; pathogens that causa ratoon stunting disease of sugarcane and Bermuda grass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 107-117, 1984.

DAVIS, M. J.; PURCEL, A. H.; THOMSON, S. V. Isolation media for the pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v. 30, p. 425-429, 1980.

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

DAVIS, M. J. *et al.* A method to screen for resistance to ratoon stunting disease of sugarcane. **Sugar cane**, n 6. p.9-15, 1994.

DOBBELAERE, S. *et al.* Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*, **Aust. J. Plant Physiol**, n.28, p.871–879, 2001.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grass: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: **international symposium on N₂ fixation**, v.1., 1976, Washington. Proceeding. Pullman: Washington State University, 1976. p. 518-537.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In **International Symposium On Nitrogen Fixation**, v.1 (W.E. Newton and C.J. Nyman, Eds). Pullman Proceedings Washington, Washington State University. 1975. p. 518-538.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. **Science Tech Publishers/Springer-Verlag**, 1987.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions, endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e cultura**, v. 44, n. 5, 1992.

ECKERT, B. *et al.* A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, n.51, p.17–26, 2001.

EVTUSHENKO, L. *et al.* *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of *Corynebacterium aquaticum* Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (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., com. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* n.50, p.371-380, 2000.

FALK, E. C. *et al.* Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.36, p.80-85, 1986.

FEGAN, M.; CROFT, B. J.; TEAKLE, D. S. 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**, v. 4, n.7, p. 495-504, 1998.

FLOR, H.H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, v.32, p.653-669, 1942.

FRY, W.E. Epidemiology: dynamics of interacting pathogen and host populations. IN: FRY, W.E. (ED.). **Principles of plant management**. New York, academic press. 1982. p.43-65.

GAGLIARDI, P.R.; PACE, F.A.. FERREIRA, A.J. Comparação de três métodos de diagnose para a detecção da *Leifsonia xyli* subsp *xyli*, agente casual do raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, suplemento, agosto de 2006.

GAO, S. J. *et al.* Quick detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by PCR and nucleotide sequence analysis of PCR amplicons from Chinese *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* isolates. **Sugar Tech**, n. 10, p. 334-340, 2008.

GAO, X. *et al.* Detection and quantification of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in soybean roots with real-time quantitative polymerase chain reaction. **Plant Disease**. v.88, p.1372-1380, 2004.

GILLASPIE, A. G. *et al.* Isolation and pathogenicity of the ratoon stunting disease bacterium. **Internatioal Sugar Journal**, New Orleans, n.83, p.324-326, 1981.

GILLASPIE JR., A. G. Ratoon stunting disease of sugarcane: Serology. **Phytopathology**, n. 68, p. 529-532, 1978.

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**, St Paul, n. 60, p. 573-576, 1973.

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

GOMES, A. A.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.40, n.11, p.1105-1113, nov. 2005.

GRACIOLLI, L.A.; FREITAS, J.R.; RUSCHEL, A.P. Bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar (*saccharum* sp.). **Revista Microbiológica**. São Paulo. n.14, p.191-196, 1983.

GRISHAM, M. P. Ratoon stunting disease. in: **Sugarcane Pathology**, v. III: Bacterial and Nematode Diseases. G. P. Rao, A. S. Saumtally, and P. Rott, eds. Science Publishers, Inc., Enfield, NH. 2004, p. 77-96

GUZMAN, M.L.; VICTORIA, K.J.I. Empleo del metodo de inmunofluorescencia directa en la detección del raquitismo de la soca (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) **Fitopatologia Colombiana**. Palmira, n.17, p. 21-30, 1993.

HALMMAN *et al.* Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.** V. 43, p. 895-914, 1997.

HARRIS, R. W.; GILLASPIE, A. G., JR. Immunofluorescent diagnosis of ratoon stunting disease. **Plant Disease**. Rep. n.62, p.193-196, 1978.

HARRISON, N. A.; DAVIS, M. J. Infectivity titrations of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Plant disease**. n. 70, p. 556-558, 1986.

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

HARRISON, N. A.; DAVIS, M. J. Comparison of serological techniques for diagnosis of ratoon stunting disease. **Sugarcane**, 1990. Port Talbot: 5-9 (Resumo em CAB Abstracts on CD-ROM, 3^a:1990-91).

HOY, J.W. *et al.* Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. **Euphytica**, n.129, p.237-240, 2003.

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

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v. 65, p. 197-209, 2000.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 1, p. 77-119, 1997.

KHAMMAS, K.M. *et al.* *Azospirillum irakense* sp. nov. a nitrogenfixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, n.140, v.679-693, 1989.

KLOEPPER, J. W. *et al.* Proposed elimination of the term Endorhizosphere. **Phytopathology**, v.82, p.726-727, 1992.

KLOEPPER J.W.; SCHROTH M.N. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: **Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Proceedings...** Angers, France. V.2, p. 879-882, 1978.

KOKKINOS, C. D.; CLARK, C. A. Realtime PCR assays for detection and quantification of sweetpotato viruses. **Plant Disease**, n.90, p.783-788, 2006.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. *et al.* Isolation and characterization of soybeab-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

LEKANN-DEPREZ, R. H. *et al.* Sensitivity and accuracy of quantitative realtime polymerase chain reaction using SYBR green depends on cDNA conditions. **Anal. Biochem.** n.307, p.63-69, 2002.

MAGALHÃES, F.M.M. *et al.* A new acid- tolerant *Azospirillum* species. **Anais...** Academia Brasileira de Ciências, 1983. n.55, p.417-430.

MARQUES JR., R. B. *et al.* Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. **R. Bras. Ci. Solo**, n.32, p.1121-1128, 2008.

MCINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, n.173, p.337-343, 1995.

MATSUOKA, S. Incidência do vírus do raquitismo da soqueira em canas provenientes de material propagativo tratado termicamente. **Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, n. 4, p. 63-64, 1971.

MATSUOKA, S. Longevidade do efeito do tratamento térmico em canas infectadas pelo raquitismo da soqueira. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, n.2, p.57-59.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; CALHEIROS, G.G. Hibridação em cana-de-açúcar. Borém, A. (ed). Hibridação artificial de plantas. UFV, 1999. p. 221-254.

MONTEIRO-VITORELLO, C.B.M. *et al.* The genome sequence of the Grampositive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Mol. Plant Microbe Interact.** n.17, p.827-836, 2004.

MOZAMBANI, A.E. *et al.* História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V. *et al.* **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Cadernos Planalsucar. 2006. p.11-18.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years of word-wide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry** n.26, v.1591-1601, 1994.

OLIVARES, F. L. **Avaliação do potencial de bactérias endofíticas visando a promoção de crescimento e ao controle biológico de doenças da cultura da cana-de-açúcar**. Projeto FAPERJ, 35, 1997.

OLIVARES, F. L. *et al.* Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. In roots, stems and leaves, predominantly of Gramineae. **Biol. Fertil. Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.

OLIVARES, F.L.; REIS, V.M.; FAÇANHA, A.R. The role of endophytic diazotrops in sugarcane rootmorphogenesis and development. In: FINAN, T.M.; O'BRIAN, M.R.; LAYZELL, D.B., VESSEY, J.K. & NEWTON. W., eds. **Nitrogen fixation: Global perspectives**. Oxon, CAB International, 2000. p.476-477.

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 sugarcane ratoon stunting disease. **Plant disease**, n.82, v.3, p.285-290, 1998.

PARLEVLIT, J.E. Present concepts in breeding for disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.7-15, 1997. Suplemento

PEREZ, J. R.; MATOS, M.; FIGUEIREDO, Y. Estudio de la resistencia de variedades comerciales de la cana de azucar al raquitismo de los retonos empleando el metodo de tincion por transpiracion. **Cultivos Tropicales**, v. 2, n.22, p39-42, 2001.

PURCHASE, B.S. (1980). **Nitrogen fixation associated with sugar cane**. Proc. S. Afr. Sugar Technol. Assoc. June, pp. A3-A6.

REINHOLD, B. T. *et al.* *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **Int. J. Syst. Bacteriol**, n.37, p.43–51, 1987.

REIS, V. M. Biological Dinitrogen Fixation in Gramineae and Palm Trees. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 19, n.3, p. 227-247, 2000.

REIS, V. *et al.* *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n.54, p.2155–2162, 2004.

RIBEIRO DO VALE, F.X.; PARLEVLIT, J.E.; ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, n.26, p.577-589, 2004.

RIRIE, K. M.; RASMUSSEN, R. P.; WITTEWER, C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during polymerase chain reaction. **Anal. Biochem.** n.245, p.154-160, 1997.

ROS, P.B. **Avaliação da resistência de variedades de cana-de-açúcar ao raquitismo-da-soqueira com base na taxa de colonização dos colmos por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 58 f. Dissertação (mestrado). Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, Piracicaba SP, 2004.

RUAS, D. G.; MATSUOKA, S.; GHELLER, A. C. A. Situação do uso do equipamento de tratamento térmico no centro-sul na safra 1985/86. **Brasil açucareiro**, v.105, n.1, p.13-16, 1987.

SANGUINO, A.; MORAES, V.A.; SANTOS FILHO, O.T. D. Diagnóstico do raquitismo da soqueira em colmos de cana-de-açúcar. **Anais...** Seminário de Tecnologia Agrônômica, 2, Piracicaba, 1984. p. 250-253.

SANGUINO, A. **Principais moléstias da cana-de-açúcar**. In: **Paranhos, S. B. Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargil. 1987. p.741-757.

SANGUINO, A. **Diagnóstico e controle do raquitismo da soqueira causado pela bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli***. STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos, 1998. p. 17-26 (Resumo).

SANGUINO, A.; MORAES, V.A.; SANTOS FILHO, O.T.D. Diagnóstico do raquitismo da soqueira em colmos de cana-de-açúcar. **Anais...** Seminário de Tecnologia Agrônômica, 1984. n.2, p.250-253.

SANTOS, A. S. Doenças causadas por fungos e bactérias em cana-de-açúcar. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, IX. Catanduva. **Anais...** Catanduva – São Paulo : Instituto Biológico – Cana-de-açúcar, 2003.

SAYLER, R. J.; CARTWRIGHT, R. D.; YANG, Y. Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a newly emerging bacterial pathogen of rice in the United States. **Plant Dis.** n.90, p.603-610, 2006.

SCHAAD, N. W. *et al.* Advances in molecular based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. **Annu. Rev. Phytopathol.**, n.41, p.305-324, 2003.

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

SILVA, M.F.; REIS, V.M. **Técnica de adsorção para obtenção de soro policlonal estirpe específico de bactérias diazotróficas.** EMBRAPA, *comunicado técnico*, abril, 2005.

STEINDL, D.R.L. **The use of phase contrast microscopy in the identification of ratoon stunting disease.** Proceedings of the Conference of Queensland Society of Sugarcane Technologists, 1976. p.71-72.

STEINDL, D.R.L.; TEAKLE, D. L. **Recent developments in the identification of ratoon stunting disease.** Proceedings of the Queensland Society of Sugarcane Technology, 1974. n. 43, p. 71-72.

STRANGE, R. N. **Introduction on plant Pathology.** England, University College, 2003. 479 p.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v.67, n. 4, p.491-502, 2003.

TARRANT, J.J.; KRIEG, N.R.; DOBEREINER, J. A taxonomy study of the *Spirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense sp.nov.* **Canadian Journal of Microbiology**, n.24, p.967-980, 1978.

TAYLOR, P.W.J. *et al.* Development of PCR-based markers for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in fibrovascular fluid of infected sugarcane plants. **Australasian Plant Pathol**, n.32, p.367-375, 2003.

TEAKLE, D. S.; APPLETON, J. M.; STEINDL, D. R. L. An anatomical basis for resistance of sugarcane to ratoon stunting disease. **Physiol. Plant Pathol.**, n. 12, p. 12-83, 1978.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.). In: **Manual de fitopatologia**, v. 2 – Doenças das plantas cultivadas. 4ª.Ed. São Paulo SP. Ceres. 2005.

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

VALARINI, P. J.; TOKESHI, H. Evaluation of ratoon stunting disease resistance by water flow of sugarcane stalks. **Summa Phytopathol.**, n. 7, p. 45-50, 1981.

VANDERPLANK, J.E. **Disease resistance in plants**. Academic Press, New York, 1968, 206p.

VEIGA, F. M. Notas sobre o raquitismo das socas em Campos. **Brasil açucareiro**, p. 81-83, 1956.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Realtime PCR for mRNA quantification. **BioTechniques**. n.39, p.75-85, 2005.

XIE, C.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n.55, v.1435-1438, 2005.

YOUNG, J.M.; TOKIKAWA, Y.; GARDAN, L. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, n.30, p.67-105, 1992.

CAPÍTULO 1

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR AO RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS

RESUMO

O raquitismo das soqueiras (Runtint Stunting Disease - RSD) da cana-de-açúcar, causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é considerada uma das doenças mais importantes da cultura podendo causar prejuízos superiores a 30% na produtividade. O RSD é uma das doenças bacterianas mais difícil de ser controlada, existe pouca informação disponível sobre a resistência dos genótipos e as medidas fitossanitárias para o controle são pouco eficazes. O objetivo do trabalho foi avaliar a reação de genótipos de cana-de-açúcar ao RSD. O ensaio foi conduzido na Estação Experimental de Paranavaí, no período de 2007 a 2009. Os genótipos avaliados foram: RB965902, RB966928, RB946903, RB956911, RB72454, RB835054, RB925345, RB925211, RB976933, RB975932, RB965518, RB845210, RB965517, RB946016, RB937570, RB965602, RB935744, RB986419, RB965911 e RB935621. O delineamento utilizado foi de parcela subdividida, com duas repetições, os dados resultantes foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). E as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5%. Foram realizadas as avaliações de: massa (M1C), número de colmos por metro (NCM) e estatura de colmos, toneladas de cana por hectare (TCH) para cada genótipo e a detecção do patógeno foi realizada pelo método Dot blot. Em cana planta e cana soca não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos controle e inoculado, verificou-se diferenças somente entre os genótipos para as variáveis: TCH em cana planta e estatura, POL cana e teor de fibra em cana soca. Houve variação quanto aos níveis de infecção por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* nas amostras dos genótipos diagnosticadas positivas pelo teste de Dot blot. Na classificação sugerida para os genótipos quanto à reação ao raquitismo utilizando-se os níveis de infecção, por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, os genótipos RB965518, RB965517, RB72454 e RB975932 como imunes, os genótipos RB946016, RB935744, RB956911, RB966928, RB845210, RB965902, RB925211, RB965911, RB965602, RB835054, RB925345, RB946903 e RB976933 foram classificados como resistentes e os genótipos RB937570, RB935621 e RB986419 como suscetíveis ao raquitismo das soqueiras. Sugere-se que a classificação aqui obtida possa ser útil e considerada nas condições em que o experimento foi realizado.

Palavras-chave: *Saccharum* sp., *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, resistência.

ABSTRACT

The Ratoon Stunting Disease (RSD), caused for the *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) bacterium, is considered one of the disease most important of the culture causing damages superior to 30% in productivity. The RSD is one of the most difical bacterial diseases to be controlled, there is little information available about the resistance of the genotypes and measures to phytosanitary control are ineffective. The objective was to evaluate the reaction of genotypes of sugarcane to Ratoon Stunting Disease. The test was conducted at the Experimental Station Paranavaí in the period 2007 to 2009. The genotypes were: RB965902, RB966928, RB946903, RB956911, RB72454, RB835054, RB925345, RB925211, RB976933, RB975932, RB965518, RB845210, RB965517, RB946016, RB937570, RB965602, RB935744, RB986419, RB965911 and RB935621. The design was a split plot with two replications, the resulting data were subjected to analysis of variance ($p \leq 0.05$) using the Software SISVAR 5.3 and the averages compared by the Scott Knott test at 5%. Evaluations were made of: mass (M1C), number (MCN) and height of culms, tons of cane per hectare (TCH) for each genotype and pathogen detection was performed by Dot blot. In plant cane and ratoon cane no significant differences were found for any of the variables. There was variation in the levels of infection *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in samples of genotypes dignostic positive by dot blot test. The ranking of genotypes for tolerance using the variables of TCH, M1C and NCM coincided only for genotypes RB72454, RB835054, RB935744, RB965517, RB965902, RB966928 RB976933 and where they were classified as tolerant, RB935744, RB965902, RB966928 and RB976933 and genotypes RB72454, RB835054 and RB965517 were classified as susceptible to attack by *Lxx*. It is thought premature to nominate the genotypes evaluated by comparing them in different classes of tolerance to the disease, since many of them may not have expressed their productive potential because they are not recommended in production environments. And that the classification obtained here can be considered useful and the conditions under which the experiment was conducted.

Key-words: *Saccharum* sp, Ratoon Stunting Disease, tolerance.

1 INTRODUÇÃO

Há diversos fatores que afetam a produtividade da cana-de-açúcar, entre eles estão a deficiência hídrica, o cultivo de variedades em ambientes desfavoráveis e a ocorrência de pragas e doenças. Dentre as doenças, destaca-se o raquitismo das soqueiras, também conhecido como RSD (“Ratoon Stunting Disease”), causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (DAVIS; PURCEL; THOMSON, 1980; DAVIS; GILLASPIE Jr.; VIDAVER, 1984; EVTUSHENKO *et al.*, 2000), classificação confirmada por Young *et al.*, (2006). Esta doença é considerada uma das mais importantes da cultura podendo causar prejuízos superiores a 30% (JAMES, 1996). É encontrada na maioria das áreas cultivadas com cana-de-açúcar, caracteriza-se por sobreviver nos colmos de cana-de-açúcar e nas touceiras, de um ciclo para outro da cultura. A *L. xyli* subsp. *xyli* consegue colonizar outros hospedeiros como milho, sorgo e outras espécies de gramíneas, no entanto esta colonização só foi observada mediante inoculação artificial (TEAKLE, 1989; MATSUOKA, 1972).

Nas variedades mais suscetíveis pode observar-se internamente, na base de colmos maduros, vasos com a coloração variando de alaranjado-claro a vermelho-escuro, podendo-se observar “vírgulas” e traços ou pontos nas partes mais profundas do colmo (STEINDL, 1961). A ausência de sintomas internos não indica sanidade do material, esses sintomas só podem ser observados em variedades suscetíveis (TOKESHI; RAGO, 2005) e os sintomas externos podem ser confundidos por vários fatores, incluindo práticas culturais, estresse hídrico e deficiência nutricional (GILLASPIE; TEAKLE, 1989). A falta de sintomas característicos e específicos foi o principal motivo para a disseminação de *L. xyli* subsp. *xyli* em todas as regiões canavieiras do mundo (CARDOSO, 1986) e pelo mesmo motivo, a diagnose da doença só pode ser feita por métodos de detecção do patógeno (SANGUINO, 1998).

O método clássico recomendado na tentativa de controle da doença é o tratamento térmico do material propagativo (CARNEIRO Jr. *et al.*, 2004), porém sem erradicar o patógeno, apenas diminui o número de células bacterianas viáveis (GILLASPIE; TEAKLE, 1989). A resistência genética de cultivares à doença constitui-se na medida mais desejada. Croft (2002) relatou que a resistência não é um método preliminar de controle da doença e sim uma forma de evitar que a

doença se espalhe para novos cultivares e amplie a quantidade de inóculo inicial (X_0) nos subseqüentes anos de cultivo. Deve ser utilizada por produtores que já estão sofrendo prejuízos com a doença, é um método simples e relativamente barato. Na cultura da cana-de-açúcar não há genótipos conhecidamente resistentes à *L. xyli* subsp. *xyli*, experimentos foram realizados na tentativa de encontrá-los (GAGLIARDI, 2008; LIMA, 2008), porém com número reduzido de genótipos.

Em fitopatologia há diferenças importantes associadas à tolerância e a resistência de plantas ao ataque de fitopatógenos, não há um consenso quanto às definições e conceitos, segundo Fry (1982) resistência é a característica de uma planta em restringir o desenvolvimento do patógeno e da doença e a definição mais recente é a de Strange (2003) que define a resistência como o retardo da infecção e crescimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro, ambas as definições não mencionam os efeitos da resistência sobre a produção da planta. Já a definição clássica de tolerância é segundo Caldwell, Compton, e Patterson (1958) a capacidade das plantas suportarem a doença sem perdas severas em produtividade ou qualidade e a definição mais recente é a segundo Agrios (2005) que a define como a habilidade das plantas produzirem uma boa colheita, mesmo quando infectadas por um patógeno.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a reação de vinte genótipos de cana-de-açúcar inoculados com *Leifsonia xylii* subsp. *xyli* agente causal do raquitismo das soqueiras.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL

O experimento foi conduzido a campo, nos anos agrícolas de 2007/2008 e 2008/2009 na Estação Experimental de Paranaíba, do Setor de Ciências Agrárias (SCA), da UFPR localizada no município de Paranaíba, PR, região Noroeste do Estado, entre as coordenadas 23°50'05 de latitude Sul e 52°26' de longitude Oeste, com altitude média de 470 m.

O local apresenta clima tipo Cfa, conforme classificação de Köppen, subtropical, com temperatura média no mês mais frio inferior a 18°C (mesotérmico) e temperatura média no mês mais quente acima de 22°C, com verões quentes, geadas pouco freqüentes e tendência de concentração das chuvas nos meses de verão, contudo sem estação seca definida e precipitação média anual de 1.300 a 1.400 mm (IAPAR, 1994).

O experimento foi instalado em solo tipo Latossolo Vermelho Distrófico (LVd-1), com relevo suave ondulado. São solos muito profundos, formados a partir de materiais derivados de arenitos, com seqüência de horizontes A, B, C pouco diferenciados, coloração vermelha escura, porosos, muito friáveis, fortemente drenados, baixa fertilidade natural, ácidos, mas de baixo a médio teor de alumínio trocável e saturação de bases baixa (EMBRAPA, 1999).

Os dados para comporem os balanços hídricos foram obtidos da estação meteorológica do IAPAR/SIMEPAR, no município de Paranaíba, PR, entre os períodos de maio de 2007 a abril de 2009.

2.2 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

Cada parcela experimental foi constituída por genótipos dispostos em dois sulcos de 5 metros de comprimento, 1,40 metros entre sulcos, profundidade de 20 a 25 cm.

O plantio dos genótipos de cana-de-açúcar foi realizado em maio de 2007 e as amostras para análise de detecção do patógeno pelo método Dot blot foram colhidas em maio de 2008 e junho de 2009.

No preparo do solo, foram realizadas duas gradagens, sendo a primeira realizada com grade aradora e a segunda, com grade niveladora. Em seguida foi feito o sulcamento para o plantio dos colmos. A adubação utilizada foi 20 kg ha⁻¹ de N, 100 kg ha⁻¹ de K₂O e 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅.

O plantio foi manual (convencional), onde os toletes com três gemas foram distribuídos dentro dos sulcos, sendo colocadas 18 gemas por metro linear e entre os genótipos analisados foi plantada uma linha intercalar do padrão suscetível SP77-5181.

2.3 GENÓTIPOS AVALIADOS

Os genótipos utilizados, seus parentais e a fase de exploração agrônômica estão relacionados na Tabela 1. A escolha desses genótipos foi baseada nos resultados de produtividades anteriormente obtidas pelo Programa de Melhoramento Genético de cana-de-açúcar (PMGCA), da Universidade Federal do Paraná.

TABELA 1 - Genótipos de cana-de-açúcar avaliados quanto à reação ao raquitismo-das-soqueiras, seus parentais e fase de exploração agrônômica. Paranaíba, PR.

	Genótipo	Famílias*		Fase de exploração agrônômica
		Feminino	Masculino	
1	RB946903	RB765418	X RB72454	Variedade liberada pela RIDESA
2	RB956911	RB855206	X RB855035	Variedade liberada pela RIDESA
3	RB965902	RB855536	X RB855453	Variedade liberada pela RIDESA
4	RB966928	RB855156	X RB815690	Variedade liberada pela RIDESA
5	RB975932	SP80-165	X RB855206	Genótipo em fase de experimentação
6	RB976933	RB855176	X RB735200	Genótipo em fase de experimentação
7	RB937570	RB72454	X SP70-1143	Variedade liberada pela RIDESA
8	RB965518	RB855536	X NA73-1454	Genótipo em fase de experimentação
9	RB965517	RB835089	X ?	Genótipo em fase de experimentação
10	RB965602	RB855536	X RB855063	Genótipo em fase de experimentação
11	RB946016	RB855511	X RB855077	Genótipo em fase de experimentação
12	RB72454	CP53-76	X ?	Variedade liberada pela PLANALSUCAR
13	RB835054	RB72454	X NA56-79	Variedade liberada pela RIDESA
14	RB925345	H59-1966	X ?	Variedade liberada pela RIDESA
15	RB925211	RB855206	X ?	Variedade liberada pela RIDESA
16	RB845210	RB72454	X SP70-1143	Variedade liberada pela RIDESA
17	RB935744	RB835089	X RB765418	Variedade liberada pela RIDESA
18	RB986419	RB72454	X RB835486	Genótipo em fase de experimentação
19	RB965911	RB855546	X ?	Genótipo em fase de experimentação
20	RB935621	RB835089	X SP70-1143	Genótipo em fase de experimentação
21	SP77-5181	H40-1184	X ?	Variedade liberada pela COPERSUCAR

* Genitores femininos e masculinos utilizados nos cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar.

2.4 AVALIAÇÕES

Em cana planta foram realizadas avaliações de massa de 1 colmo (M1C), número de colmos por metro (NCM) e toneladas de cana por hectare (TCH), descritos em seguida:

- M1C: foi calculado em função da média de três pesagens de dez (10) colmos por parcela (kg), obtido por $M10C/10$.
- NCM: foi obtido em cada parcela contando o número de colmos das duas linhas centrais, dividindo-se pelo número de metros lineares.
- TCH: estimado em função da massa média de um colmo da parcela, em kg, o número total de colmos presentes nas respectivas parcelas e um fator que é em função do espaçamento de plantio, conforme evidencia a seguinte fórmula: $TCH = (M1C \times NCM) \times 7,148/1,40$. Sendo que 1,00

refere-se a um metro linear de sulco e 1,40 (m), ao espaçamento entre sulcos.

Em cana soca, além das avaliações de M1C, NCM e TCH foram realizadas avaliações de tonelada de POL por hectare (TPH), POL, teor de fibra, estatura e diâmetro descritas a seguir:

- TPH: determinado em função da tonelada de cana por hectare e o teor de POL cana, conforme descreve a fórmula a seguir: $TPH = (TCH \times POL) / 100$.
- POL: o teor de POL na cana foi obtido por meio da seguinte fórmula: $Pol = (a/c + 1 - 0,01 \times Fib_d)$, em que $a=1000g$ H₂O, $c=500g$ de cana, s refere-se ao pol no extrato do digestor, onde, $s = L_d \times (0,2605 - 0,001 \times b)$ e L_d corresponde à leitura sacarimétrica do extrato e b ao brix % extrato do digestor, Fib_d ao teor de fibra da cana obtida pelo método do digestor.
- Teor de fibra – O teor de fibra, que é a matéria insolúvel em água contida na cana-de-açúcar, foi determinada a partir da pesagem do bolo de bagaço úmido (PBU) obtido após a prensagem de uma amostra de cana desfibrada para a extração da seiva, utilizando a seguinte fórmula: $F=0,08 \times PBU + 0,876$, onde o PBU é o peso de bagaço úmido da prensa em gramas (CONSECANA, 1998).
- Estatura – foi obtida medindo-se 10 colmos por tratamento, da base até a altura da folha + 1.
- Diâmetro – foi obtido pela medição de 10 amostras de colmos na porção mediana da planta com o auxílio do paquímetro.

2.5 PREPARO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO DOS TOLETES

A inoculação dos toletes foi feita com suspensão bacteriana obtida à partir da seiva extraída de plantas infectadas da variedade SP77-5181 (padrão suscetível) diluída em água na proporção 1:5. Testes preliminares indicaram que este tipo de inoculação foi mais eficiente quando comparada com à inoculação com suspensão bacteriana à partir de colônias produzidas em laboratório e aplicada pelo método de

corte de folhas de Kauffman *et al.* (1973). Os toletes foram colocados em sacos plásticos perfurados e permaneceram mergulhados na solução durante 10 minutos (Figura 1), após esse período foram plantados no campo segundo metodologia descrita por Ros (2004).

Nas entre linhas foram colocadas intercaladas linhas com o genótipo SP77-5181, de forma que durante a colheita houve reinoculação das parcelas por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.



FIGURA 1 – Preparo do inóculo e inoculação de toletes com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. (A) Obtenção do fluido vascular de colmos da variedade SP77-5181 infectada; (B) fluido contaminado; (C) colmos em sacos plásticos perfurados em suspensão do inóculo na proporção 1/5 em água por dez minutos e (D) campo onde foram plantados os colmos já inoculados.

2.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento utilizado foi de blocos ao acaso em parcela subdividida, com duas repetições. Os tratamentos foram constituídos de 20 genótipos inoculados e sem inoculação (controle). Os resultados das avaliações foram submetidos à análise de variância, utilizando para isso o programa estatístico SISVAR[®]. Quando estes dados foram significativos, ao nível de 5% e 1% de probabilidade, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade (FERREIRA, 2000).

2.7 COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE DETECÇÃO DO PATÓGENO

Os ensaios foram instalados em maio de 2007 e as amostras para análise de detecção do patógeno pelo método Dot blot foram colhidas em maio de 2008 e junho de 2009.

Na colheita da cana planta em junho de 2008, foram coletadas duas amostras compostas, formadas por sub amostras retiradas de 10 colmos de cada genótipo nas plantas inoculadas e não inoculadas com *L. xyli* subsp. *xyli*, através da quebra das canas na base. Após a coleta, os colmos foram levados para o Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Estadual de Maringá (UEM) para realização das análises de detecção de *L. xyli* subsp. *xyli*, por meio do método Dot blot. Com auxílio de um furador foi retirado, da região central do colmo, o tecido fibrovascular na forma de segmentos cilíndricos, do terceiro internódio basal, com 1 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento. Estes segmentos foram acondicionados em microtubos de 1,5 mL, centrifugados por 5 minutos, a 12.000 rpm em microcentrífuga Hsiangtai[®] e o extrato resultante foi congelado e armazenado à temperatura de -20° C (CARNEIRO Jr. *et al.*, 2003).

Em junho de 2009 em cana soca foi realizada a coleta de amostras para detecção do patógeno através da coleta de 10 amostras simples do fluido vascular de 10 colmos de cada genótipo dos tratamentos com e sem inoculação por *L. xyli* subsp. *xyli*, totalizando 400 amostras simples. Devido à dificuldade de extração de fluido vascular em quantidade suficiente, apresentada na coleta realizada em 2008,

nessa ocasião foi utilizado o seguinte procedimento para a coleta: os colmos foram coletados através da quebra das canas na base, em seguida foram limpos com pano úmido, e devidamente identificados, sendo realizado um corte em bisel na parte superior e um corte transversal na parte inferior, para facilitar o encaixe do colmo e o escorrimento do fluido vascular para o microtubo. Logo após foi imediatamente iniciada a extração de aproximadamente 1000 µL de fluido vascular entre o segundo e terceiro entrenó da base para o ápice com auxílio de um compressor de baixa pressão, adaptado com uma teteira de borracha (tipo ordenhadeira) na extremidade da mangueira a fim de facilitar o procedimento de extração. A coleta foi realizada no campo e o conteúdo foi acondicionado em microtubos de 1500 µL contendo duas gotas de solução estabilizadora de digluconato de clorexidina a 0,02 %, acondicionados em isopor com gelo e posteriormente o conteúdo foi levado para o Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Paraná.

2.8 ANÁLISE DE DETECÇÃO DO PATÓGENO

Foi utilizado anti-soro policlonal específico contra *L. xyli* subsp. *xyli* produzido por Carneiro Jr. *et al.* (2004). Antes da fixação dos extratos nas membranas de nitrocelulose de 0,2 µm, os mesmos foram descongelados a temperatura ambiente. Cada membrana recebeu um total de 40 amostras, os padrões consistiram de suspensões de bactérias *L. xyli* subsp. *xyli*, seiva de cana-de-açúcar doente da variedade SP77-5181 cuja presença da bactéria foi confirmada em ensaio sorológico prévio e seiva de cana-de-açúcar doente diluída 10 vezes em água destilada e somente água destilada (controle negativo).

O ensaio sorológico iniciou-se com a hidratação da membrana de nitrocelulose (Sigma®) em água ultra pura (Mili-Q) por 10 minutos. Foram aplicadas as amostras (duas repetições para cada amostra) na membrana montada sobre suporte utilizando bomba de vácuo e incubada a 80 °C durante 1 hora e após foram colocados os padrões (positivos e negativos). Em seguida, bloqueou-se a membrana sob agitação por 60 min em solução tampão TS (Tris 100 mM, NaCl 1,5 M, Tween-[20] 0,5 % pH 7,4) com 0,1 % de leite desnatado em pó (Molico®). Na sequência a membrana foi lavada em solução TS, três vezes, por 10 min cada e após a membrana foi incubada por 60 min em solução do anti-soro primário diluído (1:

20.000 em tampão TS com [0,1 %] de leite). Após esse período, lavou-se a membrana em tampão TS, por três vezes, durante 10 min cada. Em seguida a membrana foi incubada por 120 min na presença de anti-soro secundário de cabra contra IgG de coelho, diluído 1:20.000 em solução tampão TS com [0,1 %] de leite em pó. A membrana foi lavada por três vezes em solução TS por 10 minutos e por 15 minutos em solução tampão PBS fosfato 1M salino (NaCl [0,8 %]). O processo sorológico foi finalizado incubando-se (no escuro) a membrana por 20 min em solução reveladora (0,3 g Naphthol-as-phosphate, 5 mL N Dimethyl formamide, 24 g Tris-base, 0,1 g Fast blue pH 9,1). Após a incubação, a membrana foi lavada em água corrente e com hipoclorito de sódio (2 %) por 20 min para remoção de manchas residuais. Todo o processo sorológico foi conduzido sob agitação (60 rpm), à temperatura ambiente (HARISSON; DAVIS, 1986, modificada conforme CARNEIRO JR. *et al.*, 2004).

2.9 CLASSIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS QUANTO À REAÇÃO AO RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS

Para a análise dos níveis de infecção de *L. xyli* subsp. *xyli* as amostras, controles contendo concentrações conhecidas das células da bactéria foram adicionados, com os níveis assim distribuídos: Presença da bactéria não detectada: abaixo de 10^3 células bacterianas mL^{-1} de seiva vascular; N1 – baixo: ocorrência de 10^4 a 10^6 células bacterianas mL^{-1} de seiva vascular; N2 - médio: ocorrência de 10^7 a 10^9 células bacterianas. mL^{-1} de seiva vascular; N3 - alto: acima de 10^9 células bacterianas. mL^{-1} de seiva vascular, conforme Gagliardi (2008).

Os genótipos foram classificados quanto suas reações à doença como: imune, resistente e suscetível ao ataque de *L. xyli* subsp. *xyli*. Foram considerados imunes, aqueles em que a presença da bactéria não foi detectada (abaixo de 10^3 células bacterianas. mL^{-1} de seiva vascular). Como resistentes aqueles que apresentaram menor nível de infecção pelo patógeno comparados ao padrão suscetível (SP77-5181), com variações desde N1 até N2. Como suscetíveis aqueles que apresentaram níveis de infecção igual ou superior à N3 comparados ao padrão de suscetibilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CANA PLANTA (2007/2008)

A ocorrência de deficiência hídrica após o plantio da cana, apresentado na Figura 2, causou redução na emissão dos perfilhos (GASHO; SHIH, 1983; BEZUIDENHOUT *et al.*, 2003) e afetou diretamente o seu desenvolvimento foliar. O período de perfilhamento é fundamental para o seu número de colmos e é uma fase sensível da cana-de-açúcar à deficiência hídrica.

Pode-se observar ainda que após o mês de outubro, as precipitações foram responsáveis pela reposição de água no solo, quando a cana retomou seu crescimento, sendo este fato traduzido no componente de produção, massa de um colmo (M1C) e na sua tonelada de cana por hectare (TCH).

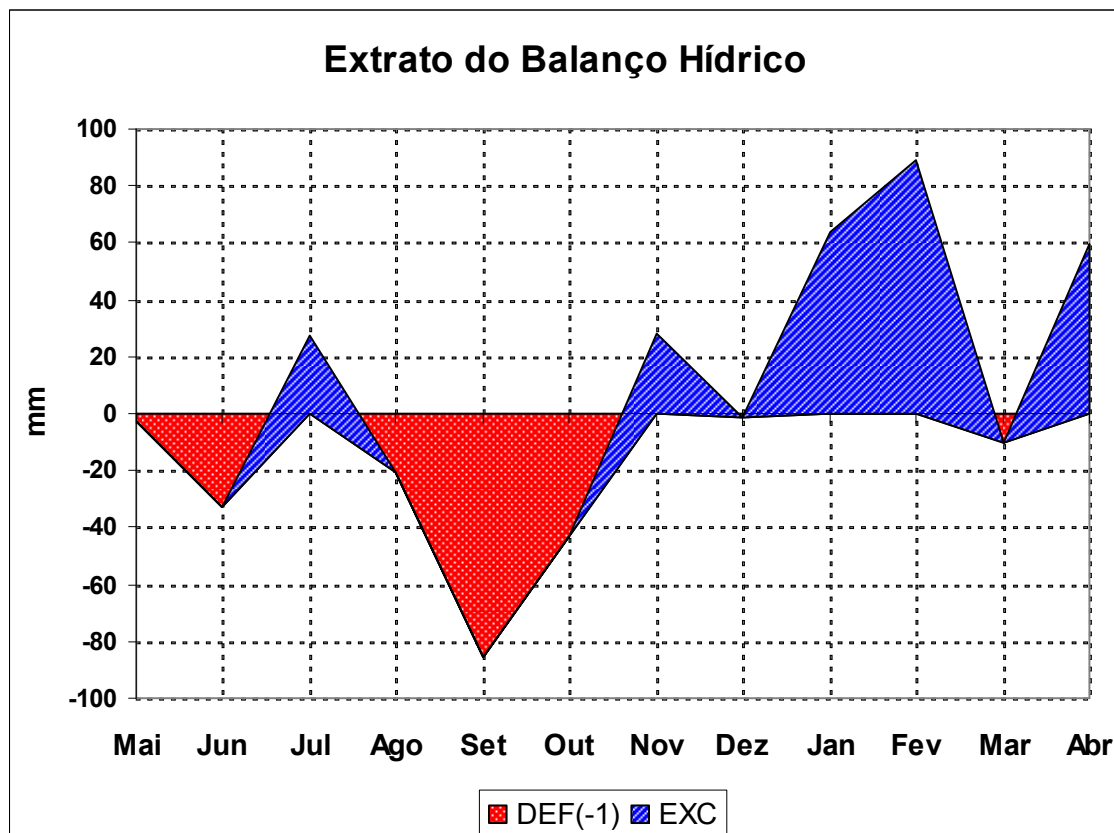


FIGURA 2 - Balanço hídrico mensal de maio de 2007 a abril de 2008, de cana planta. Estação experimental de Paranaíba. Paranaíba, PR, 2010.

3.1.1. Análise dos componentes de produção

Nos resultados obtidos de TCH, M1C e NCM para cana planta, relacionados na Tabela 2, pode-se verificar que não houve diferença significativa para nenhuma das variáveis analisadas entre os tratamentos controle e inoculados por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

A recomendação de cultivo para os genótipos RB925345 e RB835054 é de evitar plantio em ambientes com baixo potencial de produtividade (RIDESA, 2010), eles apresentaram valores de TCH baixos, o primeiro genótipo apresentou valor de TCH de 83,01 ton.ha⁻¹ no tratamento inoculado e 78,09 ton.ha⁻¹ no tratamento controle e o genótipo RB835054 apresentou produtividade de 77,96 ton.ha⁻¹ no tratamento inoculado e 86,27 ton.ha⁻¹ no tratamento controle, esses genótipos necessitam de ambiente que auxiliem na expressão do alto potencial produtivo. O ambiente em que foi conduzido o experimento apresenta solo com baixa fertilidade e aliado à ocorrência de deficiência hídrica após o plantio, pode ser o fator que causou redução da produtividade. Os valores de TCH no tratamento inoculado foram significativamente maiores nos genótipos RB845210, RB925211, RB935621, RB935744, RB937570, RB956911, RB965518, RB965911, RB966928, RB975932 e RB986419, com 114,01; 102,16; 100,14; 116,65; 110,95; 104,46; 102,27; 103,96; 109,15; 107,41 e 132,28 ton.ha⁻¹ e os genótipos do tratamento controle não apresentaram diferença significativa para nenhuma das variáveis analisadas.

Segundo Carneiro (1998) e Borém (1997) a interação Genótipo x Ambiente refere-se à alteração no desempenho relativo dos genótipos em virtude das diferenças de ambiente, os resultados das avaliações dos genótipos no presente estudo demonstraram que não houve interferência do patógeno na produtividade, e sim, um reflexo das condições do ambiente produtivo. A recomendação de manejo para o genótipo RB935744 é de boa adaptação em ambientes de médio a bom potencial produtivo, RB845210 apresenta adaptação boa em ambientes intermediários de textura arenosa, RB937570 deve ser conduzido em ambientes que propiciem bom potencial produtivo, RB966928, RB956911 e o genótipo RB965911 devem ser conduzidos em ambientes de médio a alto potencial produtivo (RIDESA, 2010), esses genótipos apresentaram os maiores valores de produção mesmo em solo que apresenta condições desfavoráveis.

TABELA 2 - Resultados de toneladas de cana por hectare (TCH), massa de um colmo (M1C) e número de colmos por metro (NCM) apresentados por 20 genótipos de cana-de-açúcar nos tratamentos controle (sem inoculação) e inoculado (inoculado com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) em cana planta (2007/2008). Estação experimental de Paranaíba, PR.

Genótipo	TCH – (Ton.ha ⁻¹) ^{ns}		M1C (kg) ^{ns}		NCM ^{ns}	
	Inoculado	Controle *	Inoculado *	Controle *	Inoculado *	Controle *
RB72454	90,43 a	99,30	1,32	1,31	9,60	11,02
RB835054	77,96 a	86,27	1,28	1,35	8,57	8,92
RB845210	114,01 b	109,29	1,42	1,42	11,23	10,80
RB925211	102,16 b	81,85	1,27	1,14	11,25	10,10
RB925345	83,01 a	78,09	1,40	1,36	8,32	8,10
RB935621	100,14 b	111,98	1,44	1,38	9,78	11,40
RB935744	116,65 b	106,22	1,61	1,58	10,18	9,45
RB937570	110,95 b	116,24	1,36	1,46	11,45	11,20
RB946016	100,28 a	114,09	1,46	1,33	9,60	12,07
RB946903	84,36 a	107,03	1,23	1,48	9,68	10,00
RB956911	104,46 b	105,58	1,55	1,49	9,50	9,98
RB965517	90,19 a	98,03	1,35	1,44	9,42	9,50
RB965518	102,27 b	109,64	1,46	1,45	9,78	10,56
RB965602	90,66 a	121,98	1,10	1,35	11,55	12,65
RB965902	96,99 a	98,56	1,28	1,39	10,83	9,95
RB965911	103,96 b	100,40	1,63	1,43	8,90	9,88
RB966928	109,15 b	126,67	1,45	1,47	10,57	12,10
RB975932	107,41 b	121,57	1,55	1,50	9,75	11,32
RB976933	89,81 a	96,89	1,35	1,38	9,32	9,85
RB986419	132,28 b	140,65	1,76	1,68	10,49	11,78
C.V.% (entre colunas)	7,93	12,11	6,32	10,04	8,16	9,28
C.V.% (entre linhas)	10,94	14,42	8,69	9,59	9,66	10,12

ns – não significativo entre os tratamentos controle e inoculado pelo teste Scott kmott $P \leq 0,05$ (entre colunas: inoculado e controle); * valores seguidos de mesma letra na linha do tratamento inoculado não diferem entre si pelo teste Scott kmott $p \leq 0,05$; ** não significativo na linha para o tratamento controle.

3.1.2. Análise de detecção do patógeno

Na avaliação da cana-planta para a detecção de *L. xyli* subsp. *xyli* pelo teste de Dot blot, pode-se constatar que dois genótipos do tratamento inoculado (RB925345 e RB975932) e um genótipo do tratamento controle (RB946903) apresentaram resultado positivo para *L. xyli* subsp. *xyli*. Esse resultado pode ser decorrente das baixas concentrações da bactéria em cana planta, abaixo do limite de detecção do teste Dot bot.

3.2. CANA SOCA (2008/2009)

O balanço hídrico de maio de 2008 até abril de 2009 está apresentado na Figura 3, a qual apresenta as boas condições de disponibilidade hídrica no solo para a cultura da cana-de-açúcar.

No início do desenvolvimento da soqueira, não houve deficiências hídricas no solo, permitindo uma boa brotação e o seu perfilhamento. De julho de 2008 até fevereiro de 2009, época que coincidiu com o período de grande desenvolvimento da cana-de-açúcar (MACHADO, 1981), as condições de disponibilidade de água no solo foram favoráveis ao crescimento da cultura (BEZUIDENHOUT *et al.*, 2003), o que contribuiu para se obter boas produtividades nesse período.

A redução da água disponível no solo de março até a data da colheita não representa risco de queda de produtividade, e é ideal para a maturação da cana, pois resulta na redução de crescimento, e ocasiona maior concentração de sacarose nos colmos (SCARPARI, 2002), o que irá resultar em maiores valores de Pol cana.

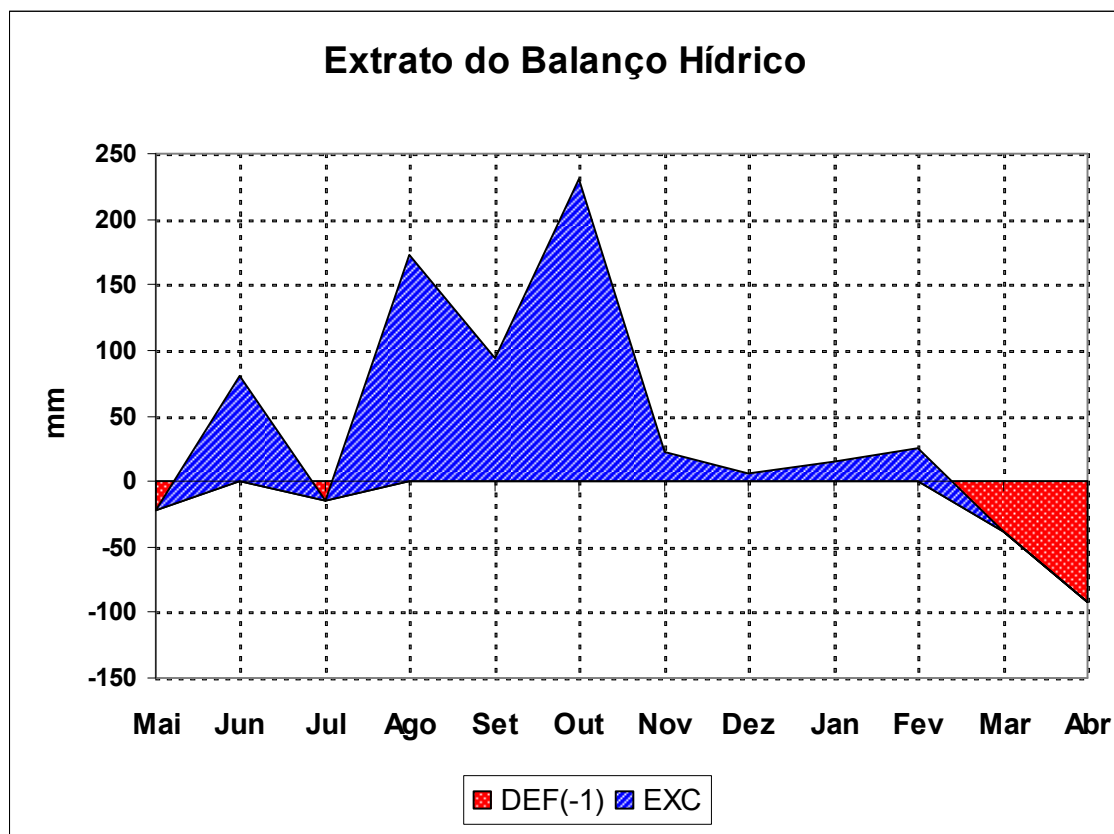


FIGURA 3 - Balanço hídrico mensal de maio de 2008 a abril de 2009, de cana soca. Estação experimental de Paranaíba, PR, 2010.

3.2.1. Análise dos componentes de produção

Analisando os dados dos componentes de produção para cana soca de TCH, M1C e NCM (Tabela 3), novamente não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos inoculado com a bactéria e controle (sem inoculação), porém pode-se observar que houve tendência de maior produtividade dos genótipos do tratamento controle RB835054, RB937570, RB946016, RB956911, RB966928 e RB965518 com 10,59; 10,64 ; 30,75; 15,23; 11,95 e 18,17 ton.ha⁻¹ a mais do que no tratamento inoculado. Enquanto que os genótipos RB946903, RB925211, SP77-5181, RB965517 e RB845210 do tratamento inoculado apresentaram maior produtividade com 17,45; 15,65; 14,92; 13,58 e 10,91 ton.ha⁻¹ a mais que no tratamento controle. O genótipo SP77-5181 tem alta exigência de solo e apresentou baixa produtividade, com 69,70 ton.ha⁻¹ no tratamento inoculado e 54,78 ton.ha⁻¹ no tratamento controle.

TABELA 3 - Resultados de toneladas de cana por hectare (TCH), massa de um colmo (M1C) e número de colmos por metro (NCM) apresentados por 20 genótipos de cana-de-açúcar nos tratamentos controle (sem inoculação) e inoculado (inoculado com *L. xyli* subsp. *xyli*) em cana soca (2008/2009). Estação experimental de Paranavaí, PR.

Genótipo	TCH – (Ton.ha-1) ^{ns}		M1C (kg) ^{ns}		NCM ^{ns}	
	Inoculado ^{ns}	Controle ^{ns}	Inoculado ^{ns}	Controle ^{ns}	Inoculado ^{ns}	Controle ^{ns}
RB72454	88,05	87,10	1,02	1,06	12,15	11,55
RB835054	73,97	84,56	0,83	1,09	12,55	10,98
RB845210	112,82	101,91	1,19	1,26	13,25	11,35
RB925211	76,55	60,89	0,95	0,96	11,30	8,85
RB925345	82,95	84,83	1,07	1,16	10,95	10,21
RB935621	99,88	106,79	1,21	1,30	11,60	11,55
RB935744	95,44	102,42	1,14	1,29	11,75	11,14
RB937570	95,41	106,05	1,28	1,40	10,56	10,60
RB946016	77,28	108,03	0,97	1,29	11,16	11,65
RB946903	85,45	68,00	1,10	1,05	10,95	9,15
RB956911	78,19	93,42	1,16	1,28	9,45	10,45
RB965517	86,89	73,31	1,05	1,31	11,65	10,95
RB965518	107,02	125,19	1,37	1,46	11,00	12,00
RB965602	97,78	90,17	1,11	1,14	13,40	11,05
RB965902	105,69	96,12	1,12	1,15	11,95	11,70
RB965911	109,91	100,35	1,38	1,44	11,15	9,78
RB966928	98,28	110,23	1,13	1,25	12,20	12,35
RB975932	82,35	88,57	1,09	1,40	10,60	8,90
RB976933	93,00	93,50	1,06	1,29	12,35	10,15
RB986419	95,22	97,90	1,24	1,49	10,76	9,21
SP77-5181	69,70	54,78	0,91	0,90	10,55	8,50
C.V.% (colunas)	9,87	11,89	6,18	8,68	9,56	11,80
C.V.% (linhas)	19,03	24,50	9,67	11,72	12,70	18,93

ns – não significativo entre os tratamentos controle e inoculado (colunas) e entre genótipos (linhas) pelo teste Scott kmott $P \leq 0,05$.

Em cana soca, não foram encontradas diferenças significativas para as variáveis estatura e diâmetro de colmos, pol cana e teor de fibra entre os tratamentos controle e inoculado. Pode-se observar que os genótipos: RB72454, RB835054, RB925211, RB935621, RB935744, RB937570, RB946903 e RB956911 do tratamento inoculado apresentaram maior estatura, com valores de 2,00; 1,98; 1,99; 2,09; 2,13; 1,98; 2,13 e 2,05 cm e no tratamento controle os maiores valores foram apresentados pelos genótipos: RB72454, RB835054, RB965517, RB965911 e

RB975932, com 2,11; 1,98; 2,00; 2,17 e 2,08 cm respectivamente. Os genótipos do tratamento inoculado: RB946016, RB956911, RB965517 e RB965911 apresentaram diferença significativa dos demais genótipos com: 2,83; 2,85; 2,72 e 2,77 cm respectivamente. No tratamento controle os maiores valores foram apresentados pelos genótipos: RB935744, RB946016, RB956911, RB965517, RB965518, RB975932, RB976933 e RB986419 com 2,84; 2,84; 2,85; 2,67; 2,70; 2,72 e 2,96 cm respectivamente (Tabela 4).

Quanto aos valores de POL cana, verifica-se que os genótipos RB835054, RB925211, RB925345, RB937570, RB946903, RB956911, RB965517, RB965902, RB965911, RB966928 e RB986419 apresentaram os maiores valores com 14,56; 16,72; 14,92; 14,95; 14,82; 14,89; 15,16; 15,36; 14,50; 15,27 e 14,88. Estes resultados foram semelhantes àqueles do tratameto controle, em que os mesmos genótipos apresentaram os maiores valores, com exceção dos genótipos RB965911 e RB946903 que apresentaram menores valores de POL cana no tratamento controle. Para a variável teor de fibra no tratamento inoculado, apenas o genótipo RB935621 foi significativamente maior que os demais tratamentos e no tratamento controle os genótipos: RB835054, RB925211, RB925345, RB935621, RB956911, RB965517, RB975932 e RB986419 apresentaram maiores valores com: 13,10; 13,38; 14,25; 14,17; 13,22; 14,04; 13,54 e 13,82 (Tabela 4).

TABELA 4 - Resultados de estatura, diâmetro, POL cana e teor de fibra apresentados por 20 genótipos de cana-de-açúcar nos tratamentos controle (sem inoculação) e inoculado (inoculado com *L. xyli* subsp. *xyli*) em cana planta (2008/2009). Estação experimental de Paranaíba, PR.

Genótipo	Estatura (cm) ^{ns}		Diâmetro ^{ns}		POL cana ^{ns}		Teor de Fibra % ^{ns}	
	Inoculado*	Controle*	Inoculado*	Controle*	Inoculado*	Controle*	Inoculado*	Controle*
RB72454	2,00 c	2,11 b	2,47 a	2,58 a	14,03 a	12,41 a	12,40 a	11,38 a
RB835054	1,98 c	1,98 b	2,37 a	2,32 a	14,56 b	14,50 b	12,94 a	13,10 b
RB845210	1,83 b	1,98 a	2,55 a	2,55 a	13,18 a	13,61 a	12,97 a	12,38 a
RB925211	1,99 c	1,80 a	2,43 a	2,45 a	16,72 b	15,87 b	13,01 a	13,38 b
RB925345	2,22 d	1,83 a	2,37 a	2,58 a	14,92 b	14,57 b	15,85 a	14,25 b
RB935621	2,09 c	1,78 a	2,40 a	2,60 a	13,35 a	13,24 a	14,50 b	14,17 b
RB935744	2,13 c	1,83 a	2,53 a	2,84 b	12,78 a	12,58 a	13,00 a	12,04 a
RB937570	1,98 c	1,85 a	2,55 a	2,63 a	14,95 b	15,69 b	13,00 a	12,63 a
RB946016	1,73 b	1,88 a	2,83 b	2,84 b	13,80 a	13,80 a	12,87 a	12,96 a
RB946903	2,13 c	1,92 a	2,57 a	2,59 a	14,82 b	13,01 a	12,55 a	12,38 a
RB956911	2,05 c	1,87 a	2,85 b	2,85 b	14,89 b	14,45 b	13,61 a	13,22 b
RB965517	1,83 b	2,00 b	2,72 b	2,67 b	15,16 b	14,21 b	13,63 a	14,04 b
RB965518	1,87 b	1,79 a	2,42 a	2,70 b	13,69 a	13,23 a	12,52 a	12,25 a
RB965602	1,88 b	1,86 a	2,39 a	2,50 a	13,87 a	13,76 a	13,08 a	12,58 a
RB965902	2,04 c	1,87 a	2,41 a	2,64 a	15,36 b	14,82 b	12,33 a	12,52 a
RB965911	2,37 d	2,17 b	2,77 b	2,50 a	14,50 b	13,69 a	12,47 a	12,02 a
RB966928	2,34 d	1,95 a	2,40 a	2,39 a	15,27 b	15,29 b	12,70 a	12,99 a
RB975932	2,30 d	2,08 b	2,59 a	2,76 b	14,12 a	13,45 a	13,40 a	13,54 b
RB976933	2,07 c	1,90 a	2,45 a	2,72 b	13,98 a	13,52 a	13,69 a	12,61 a
RB986419	1,81 b	1,81 a	2,51 a	2,96 b	14,88 b	15,11 b	13,90 a	13,82 b
SP77-5181	1,49 a	1,79 a	2,37 a	2,59 a	13,84 a	14,34 b	13,14 a	12,73 a
C.V.% (colunas)	9,43	8,95	9,41	9,01	4,36	5,16	4,29	3,71
C.V.% (linhas)	11,35	6,70	9,28	9,41	4,70	4,73	3,96	4,09

ns – não significativo entre os tratamentos controle e inoculado pelo teste Scott kmott $p \leq 0,05$ (entre colunas);

* valores seguidos de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste Scott kmott $p \leq 0,05$.

3.2.2. Análise de detecção do patógeno

Em cana soca, houve resultado positivo para a detecção da bactéria em 16 dos 20 genótipos avaliados. Não foi detectada a presença da bactéria nos genótipos: RB965518, RB965517, RB72454 e RB975932. Em RB835054, RB925345, RB946903 e RB976933 foi detectada *L. xyli subsp. xyli* em 100% das amostras analisadas. Nos demais genótipos observou-se a seguinte incidência: RB946016 - 10%; RB935744 - 20%, RB956911, RB966928 e RB845210 - 30%; RB937570 -

50%; RB965902, RB935621 e RB986419 – 70%; RB925211 – 80% e nos genótipos RB965911, RB965602 - 90%.

Os níveis de infecção por *L. xyli subsp. xyli* verificados foram: RB965518, RB965517, RB72454 e RB975932 – não detectada (abaixo de 10^3 células bacterianas.mL⁻¹); RB937570, RB935621 e RB986419 – médio a alto (de 10^7 a 10^9 células bacterianas.mL⁻¹) e nos genótipos RB946016, RB956911, RB966928, RB845210, RB965902, RB925211, RB956911, RB965602, RB925345, RB946903 e RB976933 a concentração da bactéria ficou em torno de 10^7 a 10^9 células bacterianas.mL⁻¹ de seiva vascular. O genótipo RB935744 apresentou baixa concentração da bactéria (10^4 a 10^6 células bacterianas.mL⁻¹) e RB835054 com concentração variando entre baixa a média. O genótipo SP77-5181 considerado padrão suscetível, apresentou valores de infecção que variaram entre médio a alto, este foi utilizado para a comparação com os demais genótipos na classificação quanto à resistência/suscetibilidade.

Os níveis de infecção e a incidência da bactéria de cana planta para cana soca foram crescentes neste trabalho. O aumento observado pode em parte ser atribuído ao modo de sobrevivência da bactéria, a qual permanece nas soqueiras de um ciclo para o outro (GIGLIOTTI,1997). Assim, o inóculo inicial em cana soca foi maior que em cana planta inoculada. Estes resultados foram semelhantes aos de Carneiro Jr (2006) os quais verificaram aumento de cana planta para a soca de 30,71% de incidência da doença. Semelhantes ainda, aos de Steib (1957) que relatou um aumento da doença de 16%, em cana planta, para 47%, em cana soca e de Damann e Olliver (1991), que analisando vários cultivares chegaram a um aumento anual médio na incidência de colmos doentes de 10%. Além do modo de sobrevivência da bactéria, pode ter contribuído para o aumento da incidência e dos níveis de infecção observados no presente trabalho o fato de na colheita ter sido realizado corte com facão, inicialmente na linha intercalar do padrão suscetível SP77-5181 e na sequência nas linhas dos genótipos avaliados. Segundo Josil Carneiro Jr. (comunicação pessoal), o facão permanece infectivo por até 80 metros, garantindo assim a disseminação e reinfestação pelo patógeno.

Houve baixa incidência de *L. xyli subsp. xyli* em cana planta, o resultado esperado era que nas socas subseqüentes a colonização por *L. xyli subsp. xyli* aumentasse e assim também os danos. A concentração do patógeno nas amostras aumentou substancialmente de um ciclo para o outro, porém não foram observadas

diferenças entre os genótipos com e sem inoculação em relação às características agrônômicas. Geralmente há um bom relacionamento entre populações bacterianas dentro de extratos do xilema e tolerância da cultivar (HARRISON; DAVIS, 1988), porém aliando-se esse dado da população de *L. xyli subsp. xyli* com os dados de produtividade tem-se que alguns genótipos com elevada população bacteriana podem sofrer pouca perda de rendimento exibindo comportamento de tolerância ao patógeno e outros com baixa concentração do patógeno podem sofrer elevada perda de rendimento, exibindo comportamento de suscetibilidade (CROFT, 2002).

Diferentes níveis de incidência e infecção em genótipos distintos foram também encontrados pelo Laboratório de Genética Molecular da Universidade de São Carlos, em 118.826 amostras recebidas do estado de São Paulo, no período de 2005 a 2007, utilizando a metodologia de Dot blot, encontrou-se que 4,2% das amostras foram diagnosticadas positivas. Os três genótipos com maior incidência de *Leifsonia xyli subsp. xyli* foram: RB867515 com 15,3%, SP81-3250 com 6,5% e RB72454 com 4%. Nesses genótipos encontrou-se diferenças nos níveis de infecção. O genótipo RB867515 apresentou 85% de nível 1 de infecção (10^3 UFC/mL), 14% de nível 2 (10^6 UFC/mL) e 1% de nível 1 (acima de 10^8 UFC/mL), o genótipo SP81-3250 foi a que apresentou maior índice de nível 3, com 9%. Esses resultados sugerem que as variedades podem variar quanto ao grau de resistência (GANEM; GAGLIARDI; URASHIMA, 2007).

Semelhante ao verificado no presente trabalho, Gagliardi (2008) não detectou a presença da bactéria no primeiro corte no genótipo RB72454 e nos genótipos RB835486, RB855156, RB855456, RB855536, RB867515, RB928064, RB925211, RB925345, RB925268 e CB49-260 ocorreram reações soropositivas com média a alta concentração do patógeno, no segundo ano avaliado todos os genótipos apresentaram variações quanto ao grau de colonização da bactéria.

3.3 CLASSIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS QUANTO A RESISTÊNCIA

Conforme os níveis de infecção apresentados pelos genótipos e comparados com o nível do padrão suscetível SP77-5181, os genótipos RB965518, RB965517, RB72454 e RB975932 foram classificados como imunes, pois não foi detectada a presença do patógeno em nenhuma das amostras, ou apresentaram nível de

infecção abaixo de 10^3 células bacterianas mL^{-1} de seiva vascular. Os genótipos RB946016, RB935744, RB956911, RB966928, RB845210, RB965902, RB925211, RB965911, RB965602, RB835054, RB925345, RB946903 e RB976933 apresentaram nível de infecção entre 10^7 a 10^9 células bacterianas. mL^{-1} de seiva vascular e foram classificados como resistentes e os genótipos RB937570, RB935621 e RB986419 foram classificados como suscetíveis ao ataque de *L. xyli* subsp. *xyli*, pois apresentaram nível de infecção acima de 10^9 células bacterianas. mL^{-1} de seiva vascular, (Tabela 5).

TABELA 5 – Níveis de infecção de *L. xyli* subsp. *xyli* em 20 genótipos de cana-de-açúcar em cana soca (2008/2009) e classificação quanto ao nível de resistência.

Genótipos	Níveis de infecção (células bacterianas mL^{-1})	Nível de resistência
RB965518	Bactéria não detectada	Imune
RB965517	Bactéria não detectada	Imune
RB72454	Bactéria não detectada	Imune
RB975932	Bactéria não detectada	Imune
RB946016	10^7 a 10^9	Resistente
RB935744	10^4 a 10^6	Resistente
RB956911	10^7 a 10^9	Resistente
RB966928	10^7 a 10^9	Resistente
RB845210	10^7 a 10^9	Resistente
RB937570	acima de 10^9	Suscetível
RB965902	10^7 a 10^9	Resistente
RB935621	acima de 10^9	Suscetível
RB986419	acima de 10^9	Suscetível
RB925211	10^7 a 10^9	Resistente
RB965911	10^7 a 10^9	Resistente
RB965602	10^7 a 10^9	Resistente
RB835054	10^4 a 10^9	Resistente
RB925345	10^7 a 10^9	Resistente
RB946903	10^7 a 10^9	Resistente
RB976933	10^7 a 10^9	Resistente
SP77-5181	acima de 10^9	Suscetível

Os níveis de infecção foram sugeridos para a classificação dos genótipos baseado nos conceitos de resistência. O clássico é o de Fry (1982), no qual resistência é a característica de uma planta que restringe o desenvolvimento do patógeno e da doença. Strange (2003) define como o retardo da infecção e crescimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro e Parlevliet (1997) conceitua resistência como a habilidade da planta em suprimir, retardar ou prevenir a entrada ou a subsequente atividade do patógeno (crescimento e desenvolvimento) em seus tecidos.

Na tentativa de classificação dos genótipos acima, quanto à resistência à doença, há que se considerar que o ambiente tem capital importância no comportamento produtivo de cada genótipo. E conforme descrito anteriormente, o local do experimento não é o ambiente de produção recomendado para a expressão do potencial de alguns dos genótipos avaliados e, portanto, para alguns deles a classificação pode não refletir sua reação característica à doença.

Sabe-se que a cana-de-açúcar desenvolveu naturalmente, ao longo de sua evolução, a resistência do tipo horizontal para a maioria das suas doenças (MATSUOKA; GARCIA; CALHEIROS. 1999), também conhecida como raça não específica, quantitativa, poligênica (vários genes de efeito menor), não diferencial e incompleta. O ponto marcante é que este tipo de resistência tem como característica ser afetada pelo ambiente, e neste quesito tem-se novamente a questão dos ambientes de produção apropriados para cada genótipo que poderiam interferir no seu comportamento frente à doença. Além disso, este tipo de resistência leva a planta a ter certo grau de doença e é dependente da interação de várias raças do patógeno *versus* o cultivar do hospedeiro.

A classificação quanto à resistência de genótipos de cana-de-açúcar à *L. xyli* subsp. *xyli* verificada neste trabalho, ora concordam, ora divergem dos resultados daqueles obtidos por outros autores. Lima (2008) correlacionando a incidência média da doença com valores de peso médio e diâmetro de colmos e Ros (2004) utilizando o parâmetro de porcentagem de vasos colonizados por *L. xyli* subsp. *xyli* classificaram o genótipo RB845210 como suscetível, essa classificação não condiz com o resultado do presente estudo para esse genótipo, porém, foram utilizados os parâmetros de estatura e diâmetro de colmos. O genótipo RB72454 foi classificado por Lima (2008) como menos tolerante ao ataque da bactéria, pois apresentou peso próximo à média, diâmetro de colmo menor que a média e incidência de *L. xyli*

subsp. *xyli* acima de 80% e Gagliardi (2008) considerando o percentual de redução de produtividade associado à incidência, classificou esse mesmo genótipo como suscetível à *L. xyli* subsp. *xyli* obtendo redução de produtividade de 20,7% em três anos avaliados.

O fato de não ter sido detectada a bactéria nos genótipos RB965518, RB965517, RB72454 e RB975932 poderia ser atribuído à possível resistência do genótipo à entrada do patógeno ou a baixa concentração da bactéria nas plantas em cana planta e soca, não sendo possível a detecção pelo teste Dot Blot. De acordo com Comstock *et al* (1996), variedades resistentes possuem uma população menor do patógeno, consequentemente menor fonte de inóculo para disseminar a doença nos viveiros e canaviais.

Baseado nos níveis de infecção, o genótipo RB925211 foi classificado nesse estudo como resistente à *L. xyli* subsp. *xyli*, Gagliardi (2008) discordando desse resultado o classificou como suscetível ao ataque do patógeno, porém utilizando a variável redução de produtividade, que foi de 15,2% em três safras da cultura.

Levando-se em conta o ambiente de produção pode-se observar que o genótipo RB72454 tem baixa exigência em fertilidade de solo, como é o caso do local onde foi instalado o experimento e mesmo assim teve baixa produtividade, estatura e diâmetro, fato indicativo de comportamento de suscetibilidade mesmo em caso de baixa concentração de *L. xyli* subsp. *xyli*. Já a recomendação para o genótipo RB946903 é que o mesmo deve ser conduzido em ambiente com médio a alto potencial produtivo, então a sua baixa produtividade e diâmetro de colmos não podem ser atribuídas apenas à presença ou ausência da bactéria, deve também ser considerado o ambiente impróprio.

Existem variedades modernas descritas como resistentes ao RSD e em sua região de origem tem apresentado comportamento suscetível (PONTE, 2006), fato que evidencia a importância da correlação dos resultados de características agrônomicas com características edafoclimáticas locais.

Em futuros experimentos, recomenda-se implantar ensaios semelhantes em ambientes com diferentes potenciais de produção ou somente utilizar genótipos adaptados ao ambiente em questão e os genótipos devem ser submetidos a ensaios para avaliar o efeito dos níveis de infecção na produtividade.

4 CONCLUSÕES

Na classificação sugerida para os genótipos quanto à reação ao raquitismo utilizando-se os níveis de infecção, por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, os genótipos RB965518, RB965517, RB72454 e RB975932 como imunes, os genótipos RB946016, RB935744, RB956911, RB966928, RB845210, RB965902, RB925211, RB965911, RB965602, RB835054, RB925345, RB946903 e RB976933 foram classificados como resistentes e os genótipos RB937570, RB935621 e RB986419 como suscetíveis ao raquitismo das soqueiras.

Houve variação quanto aos níveis de infecção por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* nas amostras dos genótipos diagnosticadas positivas pelo teste de Dot blot.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington, MA: Elsevier Academic, 2005.
- BEZUIDENHOUT, C. N.; O'LEARY, G. J.; SINGELS, A.; BAJIC, V. B. A process-based model to simulate changes in tiller density and light interception of sugarcane crops. **Agricultural Systems**, v.76, n.2, p.589-599, 2003.
- BORÉM, A. *Melhoramento de plantas*. Viçosa: UFV, 1997.
- CALDWELL, R.; COMPTON, L.; PATTERSON, F. Tolerance to cereal leaf rusts. **Science**, n. 128, p.714-715, 1958.
- CARDOSO, C.O.N. **Isolamento da bactéria do raquitismo (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) no Brasil**. Boletim Técnico COPERSUCAR, n.34, p.48-52, 1986.
- CARNEIRO JR., J.B. *et al.* **Método de extração de seiva do xilema de cana-de-açúcar e detecção sorológica por Dot blot de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 8º Encontro de Iniciação Científica, 3º Mostra de Pós-Graduação e 1ª Mostra de Extensão, 2003. p.116-117.
- CARNEIRO JR. J.B. *et al.* Especificidade de anti-soro policlonal à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Fitopatologia Brasileira**, n.29, p.614-619, 2004.
- CARNEIRO JR., J.B.; SILVEIRA, S.F.; PONTE, E.C.; Sanidade e vigor de mudas de cana-de-açúcar infectadas por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e tratadas por termoterapia. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.s 183, suplemento, agosto de 2006.
- CARNEIRO, P.C.S. **Novas metodologias de análise da adaptabilidade e estabilidade de comportamento**. 168 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.
- COMSTOCK, J.C. *et al.* Relationship between resistance to *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* colonization in sugarcane and spread of ratoon stunting disease in the field. **Plant dis.**, n. 80, p. 704-708. 1996.
- CROFT, B.J. A method of rating sugarcane cultivars for resistance to ratoon stunting disease based on an enzyme-linked immunoassay. **Australasian Plant Pathology**, n.31, p.63-66, 2002.
- DAMMAN, K. E. Jr.; OLLIVER, C. A. Distribution and incidence of ratoon stunting disease in Louisiana sugarcane. **Plant disease**, n.75, p.568-571, 1991.
- DAVIS, M. J.; GILLASPIE JR. A. G.; VIDAVER, A. K. *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 causa ratoon stunting disease of sugarcane and Bermuda grass

stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.34, p.107-117, 1984.

DAVIS, M. J.; PURCEL, A. H.; THOMSON, S. V. Isolation media for the pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v.30, p.425-429, 1980.

EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, 1999. 412 p.

EVTUSHENKO, L. *et al.* J. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of *Corynebacterium aquaticum* Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (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., com. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, n.50, p.371-380, 2000.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, n.45, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCAR, p.255-258.

FRY, W.E. Epidemiology: dynamics of interacting pathogen and host populations. IN: FRY, W.E. (ED.). **Principles of plant management**. New York, academic press. 1982. p.43-65.

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**. 119 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

GANEM JR, E. J.; GAGLIARDI, P. R.; URASHIMA, A. S. Incidência e severidade de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar em viveiros comerciais do estado de São Paulo. CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, Campinas, Anais... **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, n.77, supl., p.s31, 2008.

GASHO, G. J.; SHIH, S. F. Sugarcane. In: TEARE, J. D., PEET, M. M., ED. **Crop-Water Reactions**, New York, 1983, p.455-479.

GIGLIOTI, E. **Conciliação dos métodos de STM e TBIA para determinação de resistência de genótipos de cana-de-açúcar RSD**. 119 f. Tese (Doutorado) Piracicaba SP. Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 1997.

GILLASPIE JR, A.G.; TEAKLE. D.S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD. C. *et al.* **Diseases of sugarcane: major diseases**, 1989.

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**, n.78, p.722-727, 1988.

HARRISON, N.A.; DAVIS, M.J. Infectivity titrations of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Plant disease**, v.6, n.70, p.556-558, 1986.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Cartas Climáticas do Estado do Paraná 1994**. Londrina, 1994, 49 p. (IAPAR. Documento, 18)

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

KAUFFMAN, H.E. *et al.* An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. **Plant Disease**, v.57, n.6, p.537-541, 1973.

LIMA, R.M.P. **Caracterização de variedades de cana-de-açúcar quanto à resistência e tolerância ao raquitismo-da-soqueira**. 56 f. Dissertação (Mestrado). Campos dos Goytacazes RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008.

MACHADO, E. C. **Um modelo matemático-fisiológico para simular o acúmulo de matéria seca na cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 115 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biologia. UNICAMP: Campinas, 1981.

MATSUOKA, S. **Raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar: diagnose da moléstia e estudos sobre o agente causal**. 77 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; CALHEIROS, G.G. **Hibridação em cana-de-açúcar**. Borém, A. (ed). Hibridação artificial de plantas. UFV, 1999. 221-254 p.

PARLEVLIT, J.E. Present concepts in breeding for disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.7-15, 1997. Suplemento

PONTE, E. C. **Incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em áreas de multiplicação de cana-de-açúcar no Espírito Santo, sul da Bahia e oeste mineiro e determinação do tamanho da amostra para detecção sorológica**. 52 f. Tese (mestrado) – Campos – Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro UENF, 2006.

RIDESA, Rede interuniversitária para o desenvolvimento do setor sulcraolcooleiro. **Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar**. Curitiba: Ajir, março, 2010. 136p.

ROS, P.B. **Avaliação da resistência de variedades de cana-de-açúcar ao raquitismo-da-soqueira com base na taxa de colonização dos colmos por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 58 f. Dissertação (mestrado). Piracicaba SP. Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 2004.

SANGUINO, A. Diagnóstico e controle do raquitismo da soqueira causado pela bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, In: STAB, **Açúcar, Álcool e Subprodutos**, p.17:26, 1998 (Resumo).

SCARPARI, M. S. **Modelos para a previsão da produtividade da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) através de parâmetros climáticos**. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

STEIB, F. J.; FORBES, I. L.; CHILTON, S. J. P. A report on further studies on ratoon stunting disease of sugarcane in Louisiana. **Journal Sugar**, n.19, p.35-37, 1957.

STEINDL, D.R.L. Ratoon stunting disease. **Plate XX, Internal symptoms of ratoon stunting disease**. Amsterdam, n.20, p.433-453, 1961.

STRANGE, R. N. **Introduction on plant Pathology**. England, University College, 2003.

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. chap 11, 1989. p. 247-257.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum spp.*). In: **Manual de fitopatologia**, v. 2 – Doenças das plantas cultivadas. 4ª.Ed. São Paulo SP. Ceres, 2005.

VANDERPLANK, J.E. **Disease resistance in plants**. Academic Press, New York, 1968.

YOUNG, J.M.; *et al.* Genetic Uniformity of international isolates of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p.503-511, 2006.

CAPÍTULO 2

MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

RESUMO

Um dos maiores problemas para as pesquisas e controle do raquitismo das soqueiras é a detecção da bactéria para avaliação dos cultivares quanto suas reações à doença. Na maioria das vezes a doença não apresenta sintomas externos específicos, necessitando de testes complementares para a detecção da bactéria. O objetivo deste trabalho foi comparar os métodos de Dot blot, PCR e EB-ELISA na detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. O ensaio foi conduzido na Estação Experimental de Paranavaí, nos anos agrícolas de 2007/2008 e 2008/2009. Os genótipos avaliados foram: RB965902, RB966928, RB946903, RB956911, RB72454, RB835054, RB925345, RB925211, RB976933, RB975932, RB965518, RB845210, RB965517, RB946016, RB937570, RB965602, RB935744, RB986419, RB965911 e RB935621, inoculados e não inoculados com *L. xyli* subsp. *xyli*. O delineamento utilizado foi de parcela subdividida, com duas repetições. A coleta das amostras do fluido vascular foi realizada em 2008, por meio da centrifugação de cilindros centrais extraídos dos colmos e em 2009 o fluido foi coletado com a utilização de bomba de vácuo adaptada a uma teteira, na qual foi acoplado o colmo de cana, cortado entre terceiro e quarto internódio basal. O fluido vascular foi acondicionado em microtubos e congelados a -20 °C até o momento da utilização. Foram realizados testes para a detecção do patógeno pelos métodos: PCR, Dot blot e EB-ELISA. Na comparação dos três métodos de detecção da bactéria, o método EB-ELISA, apresentou o maior percentual de detecção, seguido próximo pelo Dot blot. A PCR, embora seja considerado o método de detecção mais sensível, foi o que apresentou o menor percentual de detecção. Dos genótipos avaliados, foram diagnosticados positivos para a presença da bactéria: pelo método EB-ELISA 73%, pelo método de Dot blot 55% e pelo método de PCR 15%. Do total de amostras analisadas 3% apresentaram-se positivas pelo teste de PCR, 33% pelo teste de Dot blot e o mesmo valor de 33% pelo teste de EB-ELISA. O método EB-ELISA foi considerado nas condições do experimento o que apresentou maior sensibilidade, podendo atender aos trabalhos de avaliação de genótipos ao raquitismo das soqueiras, seguido pelo Dot Blot, o qual apresenta facilidade na execução podendo atender as necessidades rotineiras de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* para fins de monitoramento e controle da doença em campo.

Palavras-chave: *Saccharum* sp., raquitismo-das-soqueiras, PCR, Dot blot, EB-ELISA.

ABSTRACT

One of the biggest problems for research and control of ratoon stunting disease is the detection of bacteria for evaluation of cultivars for their reactions to the disease. In most cases the disease shows no outward symptoms specific, requiring additional tests for the detection of bacteria. The aim of this study was to compare the methods of Dot blot, PCR and EB-ELISA in detecting of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. The test was conducted at the Experimental Station Paranavaí in the agricultural years 2007/2008 and 2008/2009. The genotypes were: RB965902, RB966928, RB946903, RB956911, RB72454, RB835054, RB925345, RB925211, RB976933, RB975932, RB965518, RB845210, RB965517, RB946016, RB937570, RB965602, RB935744, RB986419, RB965911 and RB935621 inoculated and not inoculated with *L. xyli* subsp. *xyli*. The design was a split plot with two replications. The sample collection was the vascular fluid were conducted in 2008 through the spin of cylinders taken from the central stalk in 2009 and the fluid was collected using a vacuum pump adapted to a liner, which was attached to the stalk of sugarcane, cut between the third and fourth basal internode. The vascular fluid was placed in microtubes and frozen at -20 °C until use. Tests were conducted to detect the pathogen by methods: PCR, Dot blot and EB-ELISA. Comparing the three methods for detecting bacteria, the EB-ELISA method, showed the largest percentage of detection, followed next by Dot blot. PCR, although it is considered the most sensitive detection method, showed the smallest percentage of detection. Genotypes evaluated were diagnosed as positive for the presence of bacteria: EB-ELISA method by 73%, by dot blot method 55% and by PCR 15%. Of the total 3% of samples were positive by PCR test, 33% by dot blot test and the same value of 33% by EB-ELISA test. The EB-ELISA method was considered under the experimental conditions had the highest sensitivity, being able to work in evaluating the genotypes of ratoon stunting disease, followed by Dot Blot, which provides ease of application and can meet the needs routine detection *L. xyli* subsp. *xyli* for monitoring and controlling the disease in the field.

Key-words: *Saccharum* sp., Ratoon Stunting Disease, PCR, Dot blot, EB-ELISA.

1 INTRODUÇÃO

O raquitismo-das-soqueiras da cana-de-açúcar causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (DAVIS; PURCEL; THOMSON, 1980, DAVIS; GILLASPIE Jr.; VIDAVER, 1984; EVTUSHENKO *et al.*, 2000) é considerada uma das mais importantes da cultura (JAMES, 1996). É encontrada na maioria das áreas cultivadas com cana-de-açúcar. O agente causal caracteriza-se por sobreviver nos colmos de cana-de-açúcar e nas touceiras, de um ciclo para outro da cultura.

Nas variedades mais suscetíveis podem-se observar internamente, na base de colmos maduros, vasos com a coloração variando de alaranjado-claro a vermelho-escuro, podendo-se observar “vírgulas” e traços ou pontos nas partes mais profundas do colmo (STEINDL, 1961). A ausência de sintomas internos não indica sanidade do material, esses sintomas só podem ser observados em variedades suscetíveis (TOKESHI; RAGO, 2005) e os sintomas externos podem ser confundidos por vários fatores, incluindo práticas culturais, estresse hídrico e deficiência nutricional (GILLASPIE; TEAKLE, 1989). A falta de sintomas característicos e específicos foi o principal motivo para a disseminação de *L. xyli* subsp. *xyli* em todas as regiões canavieiras do mundo (CARDOSO, 1986) e pelo mesmo motivo, a diagnose da doença só pode ser feita pela detecção do patógeno (SANGUINO; MORAES; SANTOS FILHO, 1984; SANGUINO, 1998).

Um dos maiores problemas para as pesquisas e controle do raquitismo-das-soqueiras é o diagnóstico preciso (SANGUINO, 1998). A avaliação dos materiais genéticos baseada em sintomas visuais em campo pode conduzir a falsos resultados uma vez que a expressão dos sintomas externos depende de vários fatores, principalmente das condições ambientais. Há necessidade de testes de detecção precisos do patógeno para auxiliar no processo de avaliação de clones e ou genótipos resistentes ou tolerantes à doença, e para orientar na adoção de medidas de controle.

O diagnóstico confiável e preciso é dependente da sensibilidade do método utilizado e da coleta correta das amostras no local onde a bactéria encontra-se em maior concentração na planta (GRISHAN, 2004; HOY; GRISHAM; DAMANN, 1999). Com os avanços da pesquisa nessa área, algumas técnicas têm sido utilizadas para a detecção do patógeno e classificação dos clones quanto a resistência ao RSD;

como: microscopia de contraste de fase (BAILEY, 1977), contagem direta de anticorpo fluorescente (fluorescent-antibody-direct-count-FADC) em filtros (DAVIS, 1985), através de marcação imunoenzimática pelo método TB-EIA (Tissue-blot enzyme immunoassay) (HARRISON; DAVIS, 1988) que é a técnica mais comumente utilizada para monitoramento na Louisiana, ela permite contar o número de tubos vasculares colonizados pela bactéria em impressões de toletes ou nervuras de folhas em membrana de nitrocelulose (DAVIS *et al.*, 1994, HOY; GRISHAM; DAMANN, 1999), contudo são metodologias difíceis e demoradas. Mais recentemente ou as técnicas estão sendo usadas: EB-ELISA (evaporative-binding enzyme-linked immunoassay) que é o ensaio de evaporação de ligação imunoenzimática direta (GILLASPIE, 1978; CROFT *et al.*, 1994; HOY; GRISHAM; DAMANN, 1999; CROFT, 2002;), Dot blot (“Dot blot enzyme immunoassay”) (HARRISON; DAVIS, 1986; HARRISON; DAVIS, 1988; HOY; GRISHAM; DAMANN, 1999). Hoy, Grisham e Damann (1999) consideraram o método TB-EIA como o mais exato Dot blot e EB-EIA como os menos sensíveis e o método de autofluorescência alcalino-Induzido do metaxilema (AIMA) como menos exato para a detecção de *L. xyli* subsp. *xyli*. Há também o método de Reação em Cadeia de Polimerase - PCR (PAN; GRISHAM; BURNER, 1998) que utiliza iniciadores específicos derivados da região 16S e 23S do rRNA (FEGAN; CROFT; TEAKLE, 1998) e a mais recente técnica de detecção testada que foi o PCR em tempo real (GRISHAM; PAN; RICHARD, 2007) e que pode detectar e quantificar a bactéria em extratos de folhas das plantas anteriormente à formação de colmos.

Dentre os métodos de detecção estudados, o teste ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tem diversas aplicações e vem sendo utilizado por mais de 25 anos, utiliza anticorpos contra a bactéria (LIMA, 2008), sendo considerado o teste mais sensível e, portanto bastante eficaz. Esta técnica tem como vantagens a sua simplicidade e rapidez na obtenção dos resultados (SILVA; REIS, 2005). Além da detecção, por meio desta técnica também possível quantificar a bactéria nos tecidos vegetais. A especificidade dessa prova é garantida principalmente pela qualidade do antígeno adsorvido à placa (MADRUGA; ARAÚJO; SOARES, 2001).

A análise por PCR é um método de amplificação rápida de fragmentos-alvo específicos no DNA, permite análise não só de DNA puro da bactéria como também de células de extratos de planta, conteúdo líquido dos vasos condutores e colônias em placa ou meio de cultura líquido. É altamente sensível, conseguem detectar nível de

10¹ células/ml (GAGLIARDI; PACE; FERREIRA, 2006), mas não é uma técnica utilizada rotineiramente (TOKESHI; RAGO, 2005; FEGAN; CROFT; TEAKLE, 1998; PAN; GRISHAM; BURNER, 1998). Ensaios de PCR demonstraram ser mais sensíveis e podem ser utilizados em situações de necessidade de quarentena.

Para o método de detecção por Dot blot (Dot blot enzyme immunoassay) faz-se necessária a produção de anticorpo específico que os liga especificamente ao patógeno. Este método tem nível de detecção estimado em 2 x 10⁶ células bacterianas/ml, é barata e apresenta como vantagem o fato da leitura dos resultados ser rápida e direta, sem a necessidade de equipamentos especiais, a seiva do xilema pode ser coletada em locais distantes do local da análise. É o método de diagnose do raquitismo-das-soqueiras mais utilizado para orientar na renovação de viveiros, para monitorar a disseminação em áreas comerciais de cana no Brasil e comprovar a necessidade da utilização do tratamento térmico (GAGLIARDI; PACE; FERREIRA, 2006). Apesar de a técnica ser pouco sensível comparada à imunofluorescência e ao PCR, ela é suficientemente sensível para orientar a necessidade do tratamento térmico do material propagativo (CARNEIRO Jr. *et al.*, 2004).

O objetivo deste trabalho foi comparar os métodos de Dot blot, PCR e EB-ELISA na detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL

O experimento foi conduzido a campo, nos anos agrícolas de 2007/2008 e 2008/2009 na Estação Experimental de Paranaíba, do Setor de Ciências Agrárias (SCA), da UFPR localizada no município de Paranaíba, PR, região Noroeste do Estado, entre as coordenadas 23°50'05 de latitude Sul e 52°26' de longitude Oeste, com altitude média de 470 m.

O local apresenta clima tipo Cfa, conforme classificação de Köppen, subtropical, com temperatura média no mês mais frio inferior a 18°C (mesotérmico) e temperatura média no mês mais quente acima de 22°C, com verões quentes, geadas pouco freqüentes e tendência de concentração das chuvas nos meses de verão, contudo sem estação seca definida e precipitação média anual de 1.300 a 1.400 mm (IAPAR, 1994).

O experimento foi instalado em solo tipo Latossolo Vermelho Distrófico (LVd-1), com relevo suave ondulado. São solos muito profundos, formados a partir de materiais derivados de arenitos, com seqüência de horizontes A, B, C pouco diferenciados, coloração vermelha escura, porosos, muito friáveis, fortemente drenados, baixa fertilidade natural, ácidos, mas de baixo a médio teor de alumínio trocável e saturação de bases baixa (EMBRAPA, 1999).

Os dados para comporem os balanços hídricos foram obtidos da estação meteorológica do IAPAR/SIMEPAR, no município de Paranaíba, PR, entre os períodos de maio de 2007 a abril de 2009.

2.2 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

Os genótipos foram dispostos em dois sulcos de 5 metros de comprimento, 1,40 metros entre sulcos, profundidade de 20 a 25 cm.

O plantio dos genótipos de cana-de-açúcar foi realizado em maio de 2007 e as amostras para análise de detecção do patógeno pelo método Dot blot foram coletadas em maio de 2008 e junho de 2009.

No preparo do solo, foram realizadas duas gradagens, sendo a primeira realizada com grade aradora e a segunda, com grade niveladora. Em seguida foi feito o sulcamento para o plantio dos colmos. A adubação utilizada foi 20 kg ha⁻¹ de N, 100 kg ha⁻¹ de K₂O e 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅.

O plantio foi manual (convencional), onde os toletes com três gemas foram distribuídos dentro dos sulcos, sendo colocadas 18 gemas por metro linear. Entre os genótipos analisados foi plantada uma linha intercalar do padrão suscetível SP77-5181.

2.3 GENÓTIPOS UTILIZADOS

Os genótipos utilizados, seus parentais e a fase de exploração agrônômica estão relacionados na Tabela 1. A escolha desses genótipos foi baseada nos resultados de produtividades anteriormente obtidas pelo Programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar (PMGCA), da Universidade Federal do Paraná.

TABELA 1 - Genótipos de cana-de-açúcar avaliados quanto à reação ao raquitismo-das-soqueiras, seus parentais e fase de exploração agrônômica. Paranaíba, PR.

	Genótipo	Famílias*		Fase de exploração agrônômica
		Feminino	Masculino	
1	RB946903	RB765418	X RB72454	Variedade liberada pela RIDESA
2	RB956911	RB855206	X RB855035	Variedade liberada pela RIDESA
3	RB965902	RB855536	X RB855453	Variedade liberada pela RIDESA
4	RB966928	RB855156	X RB815690	Variedade liberada pela RIDESA
5	RB975932	SP80-165	X RB855206	Genótipo em fase de experimentação
6	RB976933	RB855176	X RB735200	Genótipo em fase de experimentação
7	RB937570	RB72454	X SP70-1143	Variedade liberada pela RIDESA
8	RB965518	RB855536	X NA73-1454	Genótipo em fase de experimentação
9	RB965517	RB835089	X ?	Genótipo em fase de experimentação
10	RB965602	RB855536	X RB855063	Genótipo em fase de experimentação
11	RB946016	RB855511	X RB855077	Genótipo em fase de experimentação
12	RB72454	CP53-76	X ?	Variedade liberada pela PLANALSUCAR
13	RB835054	RB72454	X NA56-79	Variedade liberada pela RIDESA
14	RB925345	H59-1966	X ?	Variedade liberada pela RIDESA
15	RB925211	RB855206	X ?	Variedade liberada pela RIDESA
16	RB845210	RB72454	X SP70-1143	Variedade liberada pela RIDESA
17	RB935744	RB835089	X RB765418	Variedade liberada pela RIDESA
18	RB986419	RB72454	X RB835486	Genótipo em fase de experimentação
19	RB965911	RB855546	X ?	Genótipo em fase de experimentação
20	RB935621	RB835089	X SP70-1143	Genótipo em fase de experimentação
21	SP77-5181	H40-1184	X ?	Variedade liberada pela COPERSUCAR

* Genitores femininos e masculinos utilizados nos cruzamentos biparentais de cana-de-açúcar.

2.4 PREPARO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO DOS TOLETES

A inoculação dos toletes foi feita com suspensão bacteriana obtida à partir da seiva extraída de plantas infectadas da variedade SP77-5181 (padrão suscetível) diluída em água na proporção 1:5. Testes preliminares indicaram que este tipo de inoculação foi mais eficiente quando comparada com à inoculação com suspensão bacteriana à partir de colônias produzidas em laboratório e aplicada pelo método de corte de folhas de Kauffman *et al.*, 1973. Os toletes foram colocados em sacos plásticos perfurados e permaneceram mergulhados na solução durante 10 minutos (Figura 1), após esse período foram plantados no campo segundo metodologia descrita por Ros (2004).



FIGURA 1 – Preparo do inóculo e inoculação de toletes com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. (A) Obtenção do fluido vascular de colmos da variedade SP77-5181 infectada; (B) fluido contaminado; (C) colmos em sacos plásticos perfurados em suspensão do inóculo na proporção 1/5 em água por dez minutos e (D) campo onde foram plantados os colmos já inoculados.

2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento utilizado foi de blocos ao acaso em parcela subdividida, com duas repetições. Os tratamentos foram constituídos de 20 genótipos inoculados e sem inoculação (controle).

2.6 COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE DETECÇÃO DO PATÓGENO

Na colheita da cana planta em junho de 2008, foram coletadas duas amostras compostas, formadas por sub amostras retiradas de 10 colmos de cada genótipo nos tratamentos: controle e inoculado, através da quebra das canas na base. Após a coleta os colmos foram levados para o Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Estadual de Maringá (UEM) para realização das análises de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, por meio dos métodos: Dot blot, EB-ELISA e PCR. Com auxílio de um furador (Figura 2A) foi retirado, da região central do colmo, o tecido fibrovascular na forma de segmentos cilíndricos, do terceiro internódio basal, com 1 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento. Estes segmentos foram acondicionados em microtubos de 1,5 mL (Figura 2C), centrifugados por 5 minutos, a 12.000 rpm em microcentrífuga Hsiangtai®. e o extrato resultante foi congelado e armazenado à temperatura de -20° C (CARNEIRO Jr. *et al.*, 2003).

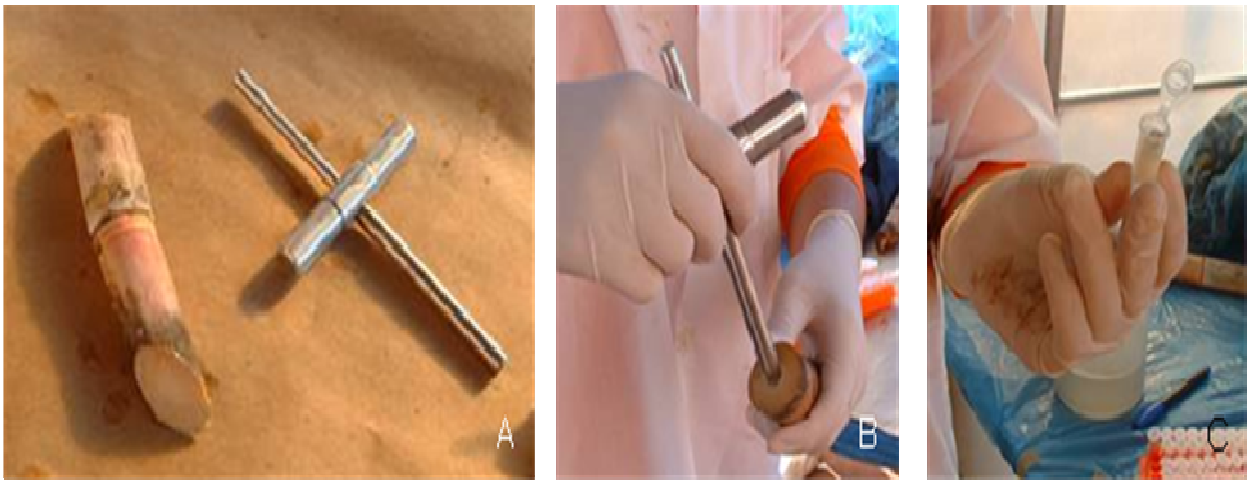


FIGURA 2 – Extração tecido fibrovascular das amostras de cana-de-açúcar: (A) amostra de colmo de cana-de-açúcar e extrator tipo furador de rolhas. (B) Extração do tecido fibrovascular. (C) Amostra acondicionada em microtubo.

Em junho de 2009 em cana soca foi realizada a coleta de amostras para detecção do patógeno através da coleta de 10 amostras simples do fluido vascular de 10 colmos de cada genótipo dos tratamentos controle e inoculado, totalizando 400 amostras simples.

Devido à dificuldade de extração de fluido vascular em quantidade suficiente para os três métodos de detecção, apresentada na coleta realizada em 2008, em junho de 2009 foi utilizado o seguinte procedimento para a coleta: os colmos foram coletados através da quebra das canas na base e limpos com pano úmido (Figura 3A), e devidamente identificados (Figura 3 B), sendo realizado um corte em bisel na parte superior e um corte transversal na parte inferior, para facilitar o encaixe do colmo e o escoamento do fluido vascular para o microtubo (Figura 3C), logo após foi iniciada a extração de aproximadamente 1000 μ L de fluido vascular entre o segundo e terceiro entrenó da base para o ápice com auxílio de um compressor de baixa pressão, adaptado com uma teteira de borracha (tipo ordenhadeira) na extremidade da mangueira afim de facilitar o procedimento de extração (Figura 3D). A coleta foi realizada no campo e o conteúdo foi acondicionado em microtubos contendo duas gotas de solução estabilizadora de digluconato de clorexidina a 0,02% (Figura 3F) e acondicionados em isopor com gelo.

Posteriormente o conteúdo foi dividido em três partes iguais (400 amostras/método de detecção), acondicionadas em microtubos de 1500 µL e encaminhadas para o Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM) para realização do teste de EB-ELISA, para a realização do teste de Dot blot para o laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Paraná e as amostras para a realização do teste de PCR foram encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti. Até a realização dos testes de Dot blot, EB-ELISA e PCR as amostras permaneceram armazenadas a -20° C.

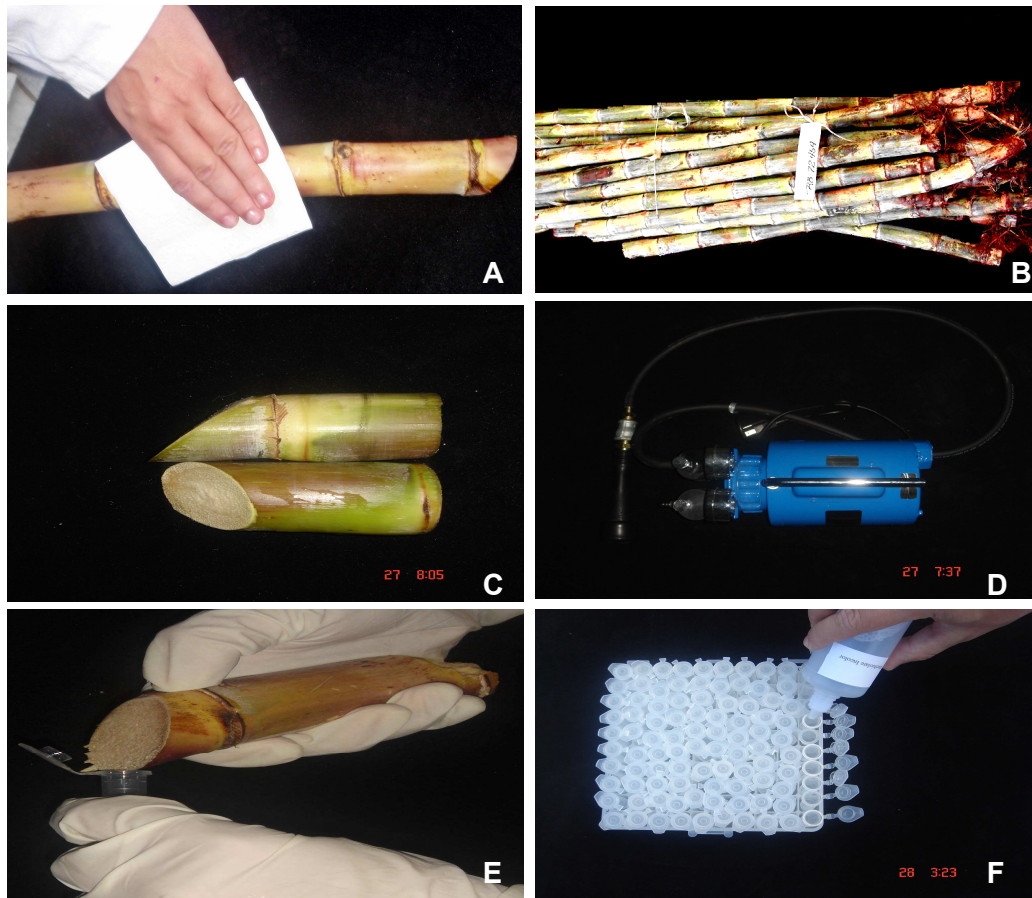


FIGURA 3 – Coleta de amostras do fluido vascular de colmos para a detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* por meio dos métodos Dot Blot, EB-ELISA e PCR. A - limpeza do colmo com pano úmido em hipoclorito de sódio [HClO]; B - feixe de cana identificado; C - colmo cortado em bisel; D - compressor de baixa compressão adaptado de teteira de borracha (tipo ordenhadeira); E - extração e acondicionamento do fluido em microtubo; F - adição de duas gotas de solução estabilizadora de digluconato de clorexidina a 0,02%.

2.7 ANÁLISES DE DETECÇÃO DO PATÓGENO

2.7.1 Análise pelo método Dot blot

Foi utilizado anti-soro policlonal específico contra *L. xyli* subsp. *xyli* produzido por Carneiro Jr. *et al.* (2004). Antes da fixação dos extratos nas membranas de nitrocelulose de 0,2 μm , os mesmos foram descongelados a temperatura ambiente. Cada membrana recebeu um total de 40 amostras, os padrões consistiram de suspensões de bactérias *L. xyli* subsp. *xyli*, seiva de cana-de-açúcar doente da

variedade SP77-5181 cuja presença da bactéria foi confirmada em ensaio sorológico prévio e seiva de cana-de-açúcar doente diluída 10 vezes em água destilada e para o controle negativo somente água destilada.

O ensaio sorológico iniciou-se com a hidratação da membrana de nitrocelulose (Sigma®) em água ultra pura (Mili-Q) por 10 min. Foram aplicadas as amostras (duas repetições para cada amostra) na membrana montada sobre suporte utilizando bomba de vácuo e incubada a 80 °C durante 1 hora e após foram colocados os padrões (positivos e negativos). Em seguida, bloqueou-se a membrana sob agitação por 60 min em solução tampão TS (Tris 100 mM, NaCl 1,5 M, Tween-20 0,5% pH 7,4) com 0,1 % de leite desnatado em pó (Molico®). Na sequência a membrana foi lavada em solução TS, 10 min/3vezes e após a membrana foi incubada por 60 min em solução do anti-soro primário diluído (1: 20.000 em tampão TS com 0,1% de leite). Após esse período, lavou-se a membrana em tampão TS, 10 min/3vezes. Em seguida a membrana foi incubada por 120 min na presença de anti-soro secundário de cabra contra IgG de coelho, diluído 1:20.000 em solução tampão TS com 0,1% de leite em pó. A membrana foi lavada por 10 min/3vezes em solução TS e por 15 minutos em solução tampão PBS fosfato 1M salino (NaCl 0,8%). O processo sorológico foi finalizado incubando-se (no escuro) a membrana por 20 min em solução reveladora (0,3 g Naphthol-as-phosphate, 5 mL N Dimethyl formamide, 24 g Tris-base, 0,1 g Fast blue pH 9,1). Após a incubação, a membrana foi lavada em água corrente e com hipoclorito de sódio (2%) por 20 min para remoção de manchas residuais. Todo o processo sorológico foi conduzido sob agitação (60 rpm), à temperatura ambiente (HARISSON; DAVIS, 1986, modificada conforme CARNEIRO Jr. *et al.*, 2004).

2.7.2 Análise pelo método EB-ELISA

O fluído obtido do colmo da cana-de-açúcar foi centrifugado a 3000 rpm por 30 minutos, após foi ressuspendido o pellet em 300 µL de tampão Na₂CO₃ (pH 9,6) e adicionado em placas de Elisa. Foi realizada a aplicação de 100 µL em cada orifício com três repetições deixando-se três orifícios sem amostra para aplicar, somente o tampão Na₂CO₃ (controle negativo) e a placa foi centrifugada a 3000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 200 µl de tampão Na₂CO₃ (pH

9,6) ao pellet que foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e colocado 24 horas de incubação para então fazer o procedimento do ELISA Indireto.

Para a realização do ELISA Indireto foram feitas três lavagens da placa com tampão PBS-Tween com intervalos de 2 minutos, a placa foi seca batendo-a no papel toalha. Foi aplicado 100 µl de anti-soro primário (diluído em tampão PBS 1 X) em cada orifício. Foi então incubado a 38° C por 2 horas em câmara úmida e após, foi repetida a lavagem. Em cada orifício foi aplicado 100 µl de anti-soro secundário (diluído em tampão PBS 1 X) e lavado conforme citado anteriormente adicionando-se substrato enzimático, inclusive no controle. A leitura foi realizada em equipamento Flex Station 3®, com intervalo de 20 minutos e comprimento de onda de 405 nm.

Para a determinação da presença de *L. xyli subsp. xyli* foi utilizado um valor crítico, que foi obtido do valor de absorbância da seiva extraída de cana micropropagada (livre do patógeno) multiplicado por dois. Para cada conjunto de amostras colocadas no equipamento Flex Station 3® obteve-se uma leitura e um valor crítico diferente para a comparação dos resultados das amostras de cada genótipo, quanto a presença ou ausência da bactéria. As amostras que apresentaram valor de absorbância acima do valor considerado crítico foram consideradas positivas para a presença de *L. xyli subsp. xyli*.

2.7.3 Análise pelo método de PCR

Obtenção do DNA genômico

O DNA genômico foi obtido através de centrifugação de 100 µl das amostras da seiva extraída do xilema por 10 minutos a 10.000 rpm, após o sobrenadante foi descartado. Ao ao pellet foi adicionado 100 µl de água Milli-Q e novamente centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm, sendo o sobrenadante novamente descartado, o pellet foi ressuspenso em 100 µl de água Milli-Q e as amostras foram novamente centrifugadas a a 10.000 rpm por 10 minutos, seguido de choque térmico a 100° C por dois minutos e em seguida deixadas por 10 minutos em gelo para então serem utilizadas ou congeladas a -20 °C até a sua utilização.

As amplificações das reações de PCR, foram realizadas utilizando o protocolo descrito por Taylor *et al.* (2003). Foi adicionado 3 µL de DNA (25 ng de concentração), em tubos de PCR contendo a mistura de 2,5 µL de tampão 10X, 2,5

μL de MgCl_2 50 mM, 4 μL de DNTPs 10 mM, 1 μL de Taq DNA polimerase, 2 μL de oligonucleotídeos *Lxx* C2F (5'–CGAGTTTGGGTTTCTGCCTGC-3'), 2 μL de *Lxx* C2R (5'–AGGTGGCAGCGACAACGGTGC - 3') e água Milli-Q para um volume final de 25 μL .

O termociclador foi configurado para desenvolver os seguintes ciclos: um ciclo inicial à 96 °C por 5', 35 ciclos de desnaturação à 94° C por 15'', hibridização à 57° C por 30'' e extensão à 72° C por 30'', com um ciclo final de extensão à 72° C durante 10'. A eficiência da amplificação e a quantificação da concentração e o tamanho do fragmento amplificado foi realizada em gel de agarose [3%] em cuba de eletroforese, marca Consort® e modelo E863. O gel de agarose foi mergulhado em tampão 3% e tampão TBE 1X (Tris-base 50 mM, ácido bórico 50 mM e EDTA 1 mM pH 8,5). A voltagem na cuba de eletroforese foi de 85 volts o gel foi corado com brometo de etídio (5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e fotografado utilizando transluminador, marca Vilber format. O tamanho dos fragmentos gerados foram estimados com base em comparações com marcador molecular 100 pb DNA *Ladder*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISES DE DETECÇÃO DO PATÓGENO

3.3.1 Análise pelo método de Dot blot

Na avaliação da cana-planta para a detecção de *L. xyli subsp. xyli* pelo teste de Dot blot, pode-se constatar que dois genótipos do tratamento inoculado (RB925345 e RB975932) e um genótipo do tratamento controle (RB946903) apresentaram resultado positivo para *L. xyli subsp. xyli* (Figura 4).

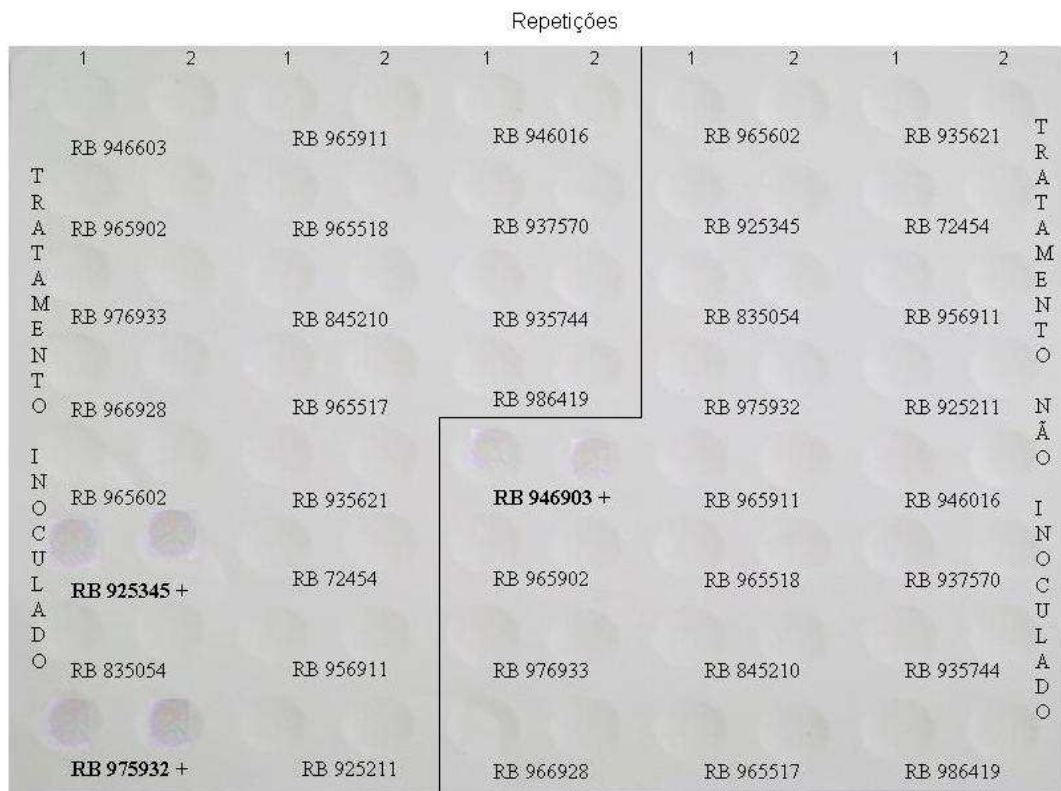


FIGURA 4 – Membrana de nitrocelulose evidenciando reações soro-positivas para *Leifsonia xyli subsp. xyli* (RB925345 e RB975932 tratamento inoculado e RB946903 tratamento controle) em amostras de fluido vascular de 20 genótipos de cana-de-açúcar com duas repetições, amostras coletadas em 2008.

Em cana soca, houve resultado positivo para a detecção da bactéria em 16 dos 20 genótipos avaliados, não foi detectada a bactéria nos genótipos: RB965518, RB965517, RB72454 e RB975932. Nos genótipos RB835054, RB925345, RB946903 e RB976933 foi detectada *L. xyli subsp. xyli* em 100% das amostras analisadas, nos demais genótipos a porcentagem de amostras positivas variou entre 10 e 90%.

A incidência de *L. xyli subsp. xyli* foi de 10% no genótipo RB946016, 20% no genótipo RB935744, 30% nos genótipos RB956911, RB966928 e RB845210, 50% no genótipo RB937570, 70% nos genótipos RB965902, RB935621 e RB986419, 80% no genótipo RB925211 e 90% nos genótipos RB965911, RB965602.

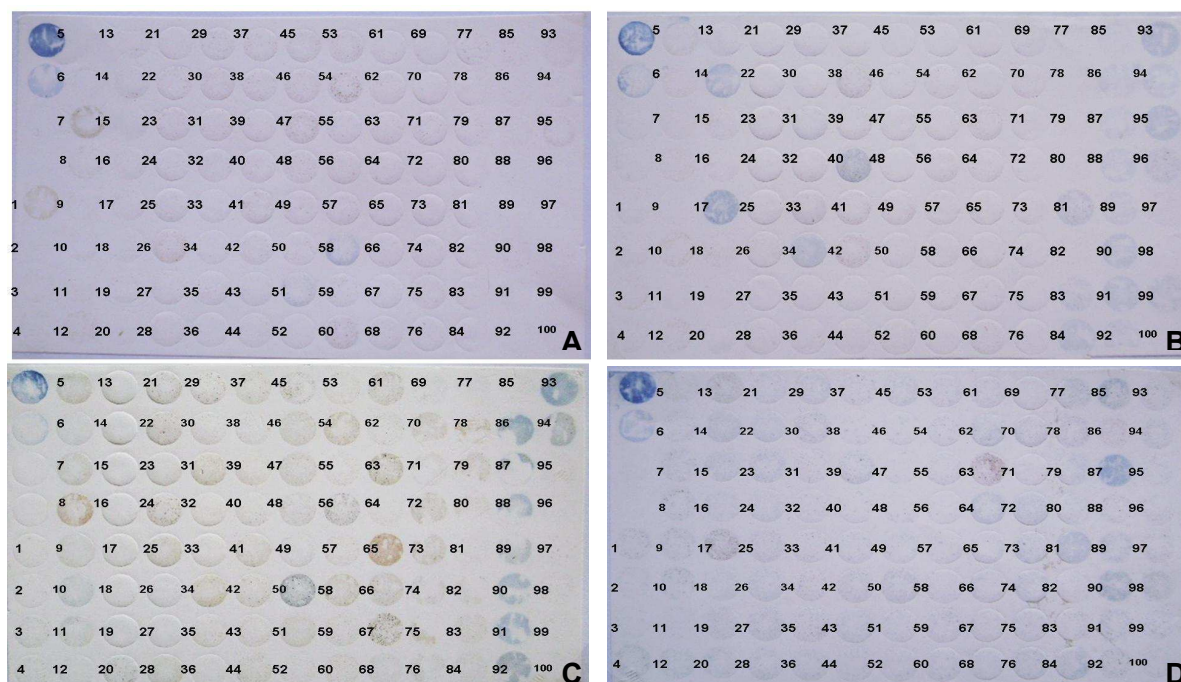


FIGURA 5 – Membranas de nitrocelulose evidenciando reações soro-positivas (azuis) para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em amostras do fluido vascular de genótipos de cana-de-açúcar com 10 repetições, coletadas em 2009. Amostras do tratamento controle 1-10: RB72454, 2-20: RB976933, 3-30: RB975932, 4-40: RB966928, 5-50: RB965911, 6-60: RB956911, 7-70: RB946903, 8-80: RB925345, 9-90: RB925211, 90-100: RB965902 (A); Amostras do tratamento inoculado 1-10: RB835054, 2-20: RB986419, 3-30: RB965602, 4-40: RB965518, 5-50: RB965517, 6-60: RB946016, 7-70: RB937570, 8-80: RB935621, 9-90: RB935744, 90-100: RB845210 (B); Amostras do tratamento inoculado 1-10: RB986419, 2-20: RB946016, 3-30: RB935744, 4-40: RB965518, 5-50: RB937570, 6-60: RB72454, 7-70: RB845210, 8-80: RB966928, 9-90: SP77-5181, 90-100: RB975932 (C); Amostras do tratamento inoculado 1-10: RB835054, 2-20: RB925345, 3-30: RB946903, 4-40: RB956911, 5-50: RB965902, 6-60: RB965911, 7-70: RB925211, 8-80: RB965602, 9-90: RB935621, 90-100: RB976933 (D).

3.3.2 Análise pelo método de EB-ELISA

Foram encontrados resultados soro-positivos para detecção de *L. xyli* subsp. *xyli* nas amostras coletadas nos dois anos agrícolas, nos tratamentos avaliados.

Em cana planta observou-se 13 resultados positivos no tratamento inoculado com *L. xyli* subsp. *xyli*: RB925211, RB925345, RB966928, RB965902, RB946016, RB935744, RB965517, RB937570, RB956911, RB986419, RB965911, RB965602 e

RB975932, no tratamento controle foram encontrados quatro resultados positivos: RB925211, RB965902, RB935744 e RB965518.

Em cana soca os genótipos RB965902, RB935744, RB946903, RB937570, RB956911, RB986419, RB965911, RB965602, RB975932, RB935621, RB72454 e RB976933 do tratamento inoculado e os genótipos RB925211, RB965517, RB986419, RB965602 e RB835054 do tratamento controle apresentaram reação positiva para a presença de *L. xyli subsp. xyli*. Os genótipos RB925345, RB965902 e RB965911 apresentaram valores de absorvância elevados (maior que o dobro do valor considerado crítico) no tratamento controle e no tratamento inoculado os genótipos RB925345, RB935744, RB946903, RB986419, RB986419, RB965602, RB835054 e RB976933 apresentaram elevado valor de absorvância em relação ao valor crítico, conseqüentemente também elevada incidência do patógeno nas amostras (Tabela 2).

TABELA 2 – Absorbância medida pelo teste EB-ELISA em amostras de fluido vascular de 20 genótipos de cana-de-açúcar e um genótipo de cana-de-açúcar micropropagado para obtenção do valor crítico (VC - valor da amostra livre do patógeno multiplicado por dois) para comparação e obtenção de amostras positivas para a presença de *Lxx* nos tratamentos controle e inoculado pela bactéria em cana planta (2007/2008) e cana soca (2008/2009).

Genótipo	Absorbância (nm) - cana planta 2007/2008				Absorbância (nm) - cana soca 2008/2009			
	Inoculado	VC	Controle	VC	Inoculado	VC	Controle	VC
RB925211	0,0620	0,0160 +	0,0200	0,0160 +	0,0834	0,0910 -	0,0690	0,0437 +
RB925345	0,0485	0,0160 +	0,0120	0,0160 -	0,0389	0,0143 +	0,0088	0,0459 -
RB966928	0,0465	0,0160 +	0,0090	0,0160 -	0,0288	0,0437 -	0,0008	0,0459 -
RB965902	0,0335	0,0160 +	0,0200	0,0160 +	0,1158	0,0370 +	0,0232	0,0550 -
RB946016	0,0370	0,0160 +	0,0070	0,0160 -	0,0067	0,0319 -	0,0000	0,0459 -
RB935744	0,0235	0,0160 +	0,0190	0,0160 +	0,1936	0,1072 +	0,0023	0,0459 -
RB946903	0,0150	0,0160 -	0,0060	0,0160 -	0,0182	0,0143 +	0,0062	0,0459 -
RB965517	0,0245	0,0160 +	0,0055	0,0160 -	0,0789	0,1042 -	0,0451	0,0370 +
RB965518	0,0020	0,0160 -	0,0260	0,0160 +	0,0896	0,1042 -	0,0154	0,0560 -
RB937570	0,0215	0,0160 +	0,0035	0,0160 -	0,1192	0,1072 +	0,0085	0,0319 -
RB956911	0,0160	0,0160 +	0,0050	0,0160 -	0,0037	0,0025 +	0,0180	0,0550 -
RB986419	0,0215	0,0160 +	0,0010	0,0160 -	0,0677	0,0437 +	0,1140	0,0370 +
RB965911	0,0205	0,0160 +	0,0000	0,0160 -	0,0565	0,0143 +	0,0122	0,0550 -
RB845210	0,0155	0,0160 -	0,0045	0,0160 -	0,0084	0,0560 -	0,0261	0,0560 -
RB965602	0,0165	0,0160 +	0,0000	0,0160 -	0,1042	0,1042 +	0,0540	0,0060 +
RB975932	0,0160	0,0160 +	0,0005	0,0160 -	0,1526	0,0910 +	0,0365	0,0881 -
RB835054	0,0135	0,0160 -	0,0030	0,0160 -	0,0622	0,0881 -	0,0519	0,0459 +
RB935621	0,0000	0,0160 -	0,0115	0,0160 -	0,1053	0,0910 +	0,0066	0,0459 -
RB72454	0,0075	0,0160 -	0,0000	0,0160 -	0,0028	0,0025 +	0,0086	0,0319 -
RB976933	0,0040	0,0160 -	0,0000	0,0160 -	0,0039	0,0025 +	0,0192	0,0459 -

VC – valor crítico para identificação de amostras soropositivas; + positivo para a presença da bactéria; - negativo para a presença da bactéria.

Esse teste é caracterizado não apenas pela sua capacidade qualitativa de detectar a presença do patógeno, ele também tem capacidade de quantificar a presença de *L. xyli subsp. xyli* nas amostras fornecendo o valor de absorbância, sendo assim, quanto maior o valor de absorbância, maior é a concentração da bactéria nas amostras.

3.3.3 Análise pelo método de PCR

Pela análise por PCR em 2008, semelhante ao verificado com o uso de Dot blot, constatou-se que dois genótipos do tratamento inoculado (RB925345 e RB975932) e um genótipo do tratamento controle (RB946903) apresentaram resultado positivo para *L. xyli* subsp. *xyli* (Figura 6).

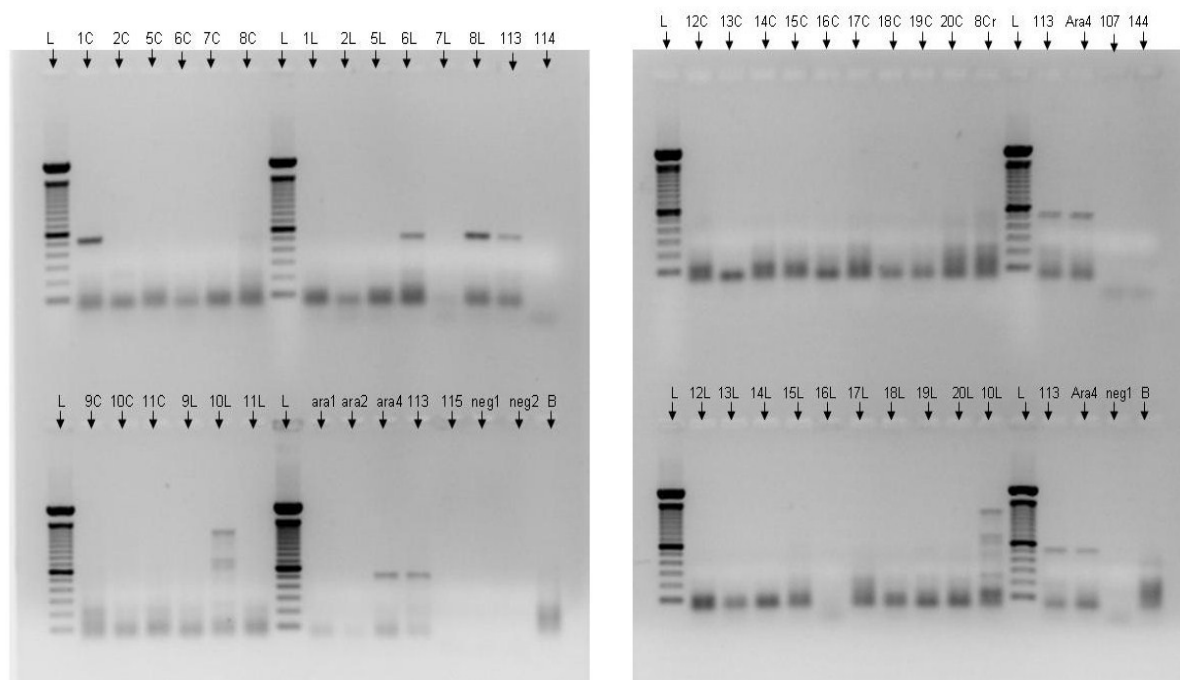


FIGURA 6 – Amplificação de amostras de DNA genômico extraído de células de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* contidas no fluido vascular de genótipos de cana-de-açúcar de cana-planta em 2008. Amostras do tratamento controle: 1C - RB946903; 2C - RB966928; 5C - RB835054; 6C - RB925345; 7C - RB965911; 8C - RB975932; 9C - RB956911; 10C - RB976933; 11C - RB937570; 12C - RB986419; 13C - RB845210; 14C - RB935744; 15C - RB72454; 16C - RB965602; 17C - RB965517; 18C - RB935621; 19C - RB946016 e 20C - RB965518. Os genótipos do tratamento inoculado apresentaram a mesma sequencia do tratamento controle (1 a 20L); L – Ladder (marcador de tamanho); B – Branco; 113 e Ara 4 - Controles positivos e Neg 1 e 2 - Controles negativos.

Em cana soca, no tratamento inoculado, foram encontradas amostras positivas nos genótipos RB965517, RB946016, RB937570, RB965902 e RB925211. As amostras que apresentaram resultado positivo formaram banda na mesma altura do fragmento de 600 pb gerado pelo marcador molecular 100 pb DNA *Ladder*, sendo que o fragmento amplificado para a detecção de *L. xyli subsp. xyli* é de aproximadamente 520 pb (Figura 7).

No tratamento controle, verificou-se resultado positivo para a presença da bactéria somente no genótipo RB925211.

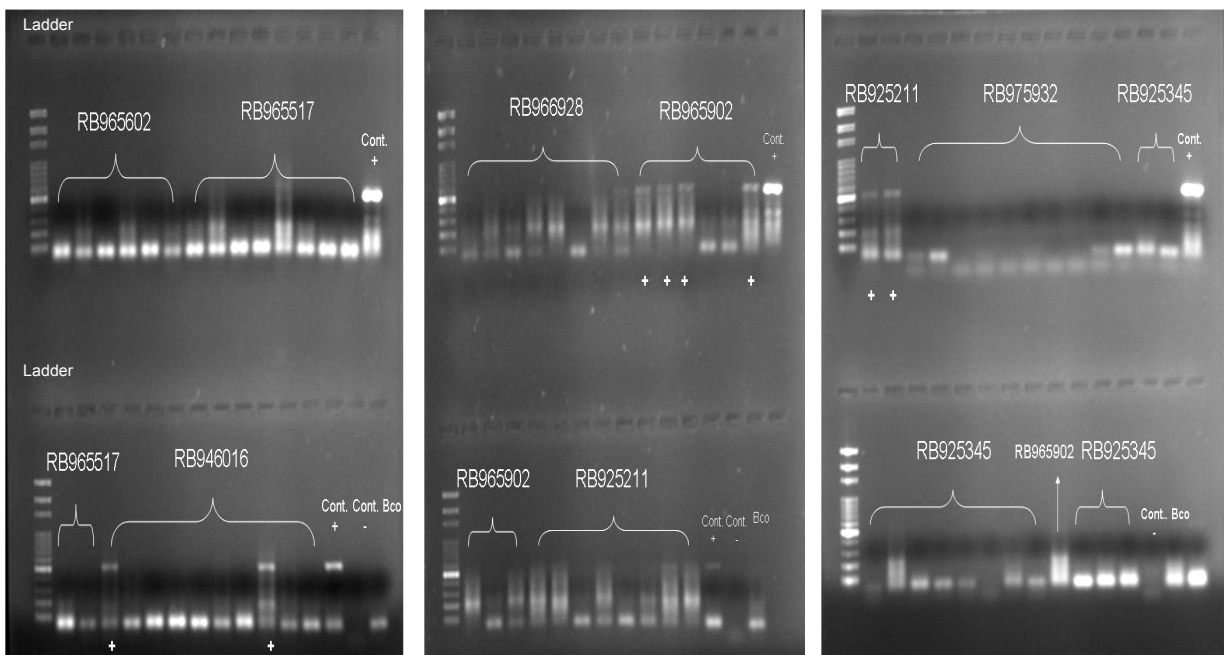


FIGURA 7 – Amplificação de amostras de DNA genômico extraído de células de *Leifsonia xyli subsp. xyli* contidas no fluido vascular de genótipos de cana-de-açúcar de cana-soca em 2009. Amostras do tratamento controle: RB965602, RB965517 e RB946016 (A); Amostras do tratamento controle: RB966928, RB965902 E RB925211 (B); Amostras do tratamento controle: RB925211, RB925345, RB965902 e tratamento inoculado: RB975932 (C). Bco – Branco; Cont. +: Controle positivo e cont.: Controle negativo.

3.3.4 Comparação entre os métodos de detecção

Considerando-se os resultados das análises pelos três métodos de detecção, das 10 amostras coletadas de cada um dos 20 genótipos, verificou-se que pelo teste de EB-ELISA no tratamento inoculado os genótipos RB925345 e RB965911 apresentaram-se com 80% de incidência de *L. xyli subsp. xyli*, RB935744, RB975932 e RB946903 com 70%; RB937570 com 60%; RB986419, RB965517, RB976933, e RB956911 com 40%, RB835054, RB965602, RB935621 e RB965902 com 30%; RB72454 com 25%; RB965518 e RB925211 e com 20%; RB946016 e RB966928 com 10% de incidência da bactéria e o genótipo RB845210 não apresentou incidência de *L. xyli subsp. xyli*. Os genótipos RB986419, RB965602, RB965517, RB976933 e RB925211 não inoculados com *L. xyli subsp. xyli* apresentaram-se com maior porcentagem de incidência do que no tratamento inoculado pela bactéria (Tabela 4).

A PCR, embora seja considerado o método de detecção mais sensível, foi o que apresentou o menor percentual de detecção. Concordando com esse resultado Gao *et al.*, (2008) utilizando os métodos de detecção por PCR, Dot blot e EB-ELISA, encontraram que o Dot blot e o EB-ELISA apresentaram acima de 90% de detecção da bactéria com 90,3 e 93,5% respectivamente, contra 61% pelo PCR.

Pelo teste de Dot blot constatou-se que os genótipos RB835054, RB925345, RB946903 e RB976933 apresentaram 100% das amostras soro-positivas para a presença de *L. xyli subsp. xyli*, as amostras dos genótipos RB956911 e RB965602 estavam com 90% e o genótipo RB925211 com 80% de incidência de *L. xyli subsp. xyli*, seguido pelos genótipos RB965902, RB935621 e RB986419 com 70%, RB937570 com 50%, RB956911, RB966928 e RB845210 com 30%, RB935744 com 20%, RB946016 com 10% de incidência e os genótipos RB965518, RB965517, RB72454 e RB975932 não apresentaram incidência de *L. xyli subsp. xyli*. Três genótipos do tratamento controle apresentaram resultado positivo para a presença da bactéria, sendo eles: RB946016, RB966928 e RB925211 (Tabela 3).

TABELA 3 – Incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em 10 amostras do fluido vascular de 20 genótipos e padrão suscetível SP77-5181 de cana-de-açúcar analisadas pelos métodos de PCR, EB-ELISA e Dot blot, em 2009.

Genótipos	PCR (%)		Elisa (%)		Dot Blot (%)	
	Controle	Inoculado	Controle	Inoculado	Controle	Inoculado
RB835054	0	0	70	30	0	100
RB986419	0	0	100	40	0	70
RB965602	0	0	80	30	0	90
RB965518	0	0	0	20	0	0
RB965517	0	10	50	40	0	0
RB946016	0	20	20	10	40	10
RB937570	0	10	0	60	0	50
RB935621	0	0	0	30	0	70
RB935744	0	0	0	70	0	20
RB845210	0	0	20	0	0	30
RB72454	0	0	0	25	20	0
RB976933	0	0	60	40	20	100
RB975932	0	0	0	70	0	0
RB966928	0	0	0	10	60	30
RB965911	0	0	40	80	0	90
RB965902	0	40	10	30	70	70
RB956911	0	0	0	40	0	30
RB946903	0	0	0	70	0	100
RB925345	0	0	0	80	0	100
RB925211	10	20	40	20	90	80
SP77-5181	20	30	70	100	80	100

Foram encontrados resultados positivos para a presença da bactéria também no tratamento controle, pelo método de EB-ELISA detectou-se sete genótipos com maior incidência da bactéria no tratamento controle do que no tratamento inoculado, esse resultado foi inesperado já que não foi realizado inoculação nesse tratamento. Uma explicação para esse fato pode ser a ocorrência de reações falso positivas. A técnica de detecção pelo método EB-ELISA é considerada sensível na detecção de diversos patógenos, porém pode apresentar resultados falso-positivos como encontrados por Hoy, Grisham e Damann (1999) que comparando cinco métodos de detecção (AIMA – autofluorescência alcalina induzida do metaxilema, EB-EIA, exame microscópico da seiva do xilema, Dot blot e TB-EIA – “tissue blot enzyme immunoassay”) para sensibilidade e exatidão em oito cultivares de cana-de-açúcar,

encontraram resultados falso positivos em todos os testes, variando de 3 a 21% pelo teste de Dot blot e de 2 a 6% para EB-EIA., 8 a 49% pelo teste AIMA, sendo que este apresentou menor acurácia. Estes autores concluíram que o método TB-EIA foi o melhor método, pois apresentou maior acurácia com baixo índice de falso positivo. O genótipo RB925345 além de apresentar maior incidência de genótipos positivos para a presença da bactéria no tratamento inoculado, apresentou também maior concentração do patógeno nas amostras e os genótipos RB835054, RB986419, RB965602 e RB976933 apesar de apresentarem menor incidência de genótipos positivos para a presença da bactéria, apresentaram maior intensidade de *L. xyli subsp. xyli* nas amostras positivas, com alto valor de absorvância.

Pelo método PCR, no tratamento inoculado o genótipo que apresentou maior incidência do patógeno foi o RB965902 com 40%, seguido pelos genótipos RB946016 e RB925211 com 20% e RB937570 e RB965517 com 10% de amostras com incidência, o restante dos genótipos não apresentaram incidência de fragmentos de DNA do patógeno. Dos genótipos não inoculados, verificou-se que somente o RB925211 apresentou resultado positivo para a presença da bactéria (Tabela 4).

O método EB-ELISA, apresentou o maior percentual de detecção com 73% dos genótipos diagnosticados positivos,, seguido próximo pelo Dot blot com 55%. A PCR, embora seja considerado o método de detecção mais sensível, foi o que apresentou o menor percentual de detecção com 15%. dos genótipos diagnosticados positivos (Figura 8 A). Do total de amostras analisadas apenas 3% apresentaram-se positivas quando analisadas pelo teste de PCR, 33% pelo teste de Dot blot e 33% pelo teste de EB-ELISA (Figura 8 B).

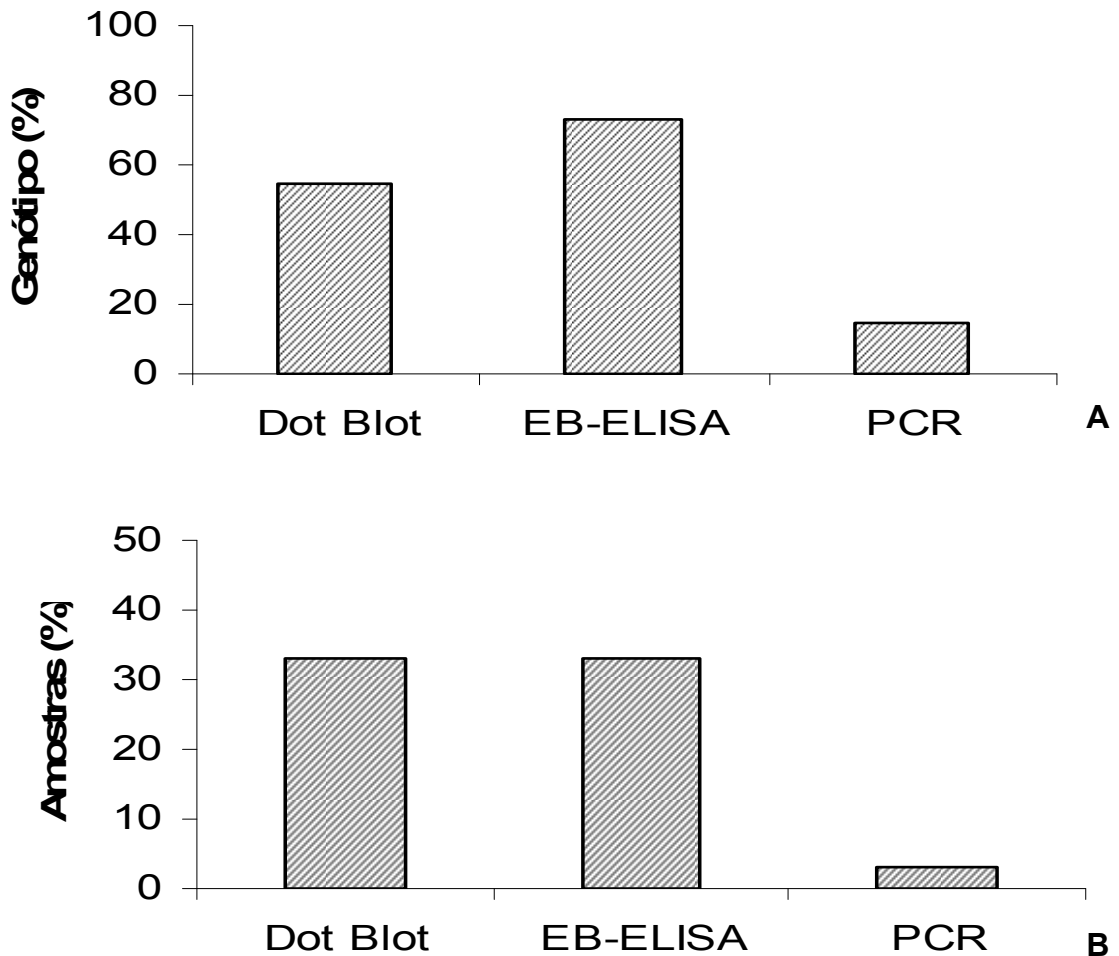


FIGURA 8 – Incidência de reações positivas nos genótipos e nas amostras analisadas. A - Porcentagem de genótipos positivos para a presença de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; B – Porcentagem de amostras positivas para a presença de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* avaliados pelos métodos de detecção: Dot blot, EB-ELISA e PCR.

Quando comparados os resultados dos testes EB-ELISA com o PCR e o Dot blot, verificou-se neste trabalho que o primeiro método detectou a bactéria em maior número de genótipos e amostras analisadas. Resultados diferentes foram observados por Taylor *et al.* (2003), em experimento comparando os métodos de detecção por PCR, EB-ELISA e microscopia de contraste de fase verificaram que o teste de diagnóstico por PCR foi mais sensível que a técnica de EB-ELISA, sendo que dois resultados de EB-ELISA para plantas infectadas deram a absorvância entre 0.13 e 0.07 nm, as quais estavam abaixo do valor crítico para presença de *L. xyli*

subsp. *xyli*, porém esses resultados foram confirmados positivos por meio de PCR e microscopia de contraste de fase demonstrando maior sensibilidade destas técnicas.

Ao comparar métodos de diagnose (microscopia de contraste, dot-blot e PCR) Gagliardi, Pace e Ferreira (2006), concluiu que a detecção por Dot blot permitiu diferenciar quantitativamente as concentrações dos níveis acima de 10^3 células/mL, resultado semelhante ao do presente trabalho, e o PCR no nível aproximado de 10^1 células/mL, resultado que indica que o Dot blot atende as necessidades de diagnose apenas rotineiras e o PCR como método mais sensível. Entretanto no presente trabalho o número de resultados positivos para a bactéria obtidos pelo teste de Dot blot foi maior do que o teste de PCR, resultado indicativo de sua considerável sensibilidade para as condições estudadas.

A presença de inibidores no fluido vascular da cana-de-açúcar pode ser uma das razões pela qual amostras diagnosticadas positivas pelos métodos de Dot blot e EB-ELISA não o foram pelo PCR (PAN; GRISHAM; BURNER, 1998). Como já citado anteriormente Taylor *et al.* (2003) encontraram maior sensibilidade pelo teste de PCR em comparação com EB-ELISA. O método de coleta utilizado pelos autores foi também pela pressão positiva sobre os feixes vasculares dos colmos, com a diferença que no presente trabalho foram adicionadas duas gotas de solução estabilizadora de digluconato de clorexidina a 0,02% às amostras, recomendada no protocolo de coleta de amostras para o Dot Blot, a qual pode ter interferido no resultado por PCR.

O teste EB-ELISA foi o que detectou maior número de resultados positivos nos genótipos dos tratamentos controle e inoculado, além do possível efeito da coleta da amostra que para os três métodos de detecção foi realizada em uma única operação, seguindo-se o protocolo de coleta de amostras para análise pelo Dot Blot, Hoy, Grisham e Damann (1999) afirmam que no teste EB-ELISA podem ocorrer resultados falso-positivos, contudo os autores não explicam as razões. O método de PCR é considerado bastante sensível na detecção de patógenos (TOKESHI; RAGO, 2005), o que não foi confirmado no presente trabalho. Também utilizando os métodos de PCR e ELISA para a avaliação da resistência à *Xylella fastidiosa* em germoplasma de tangerina e híbridos introduzidos da Itália e Córsega, foram encontradas 30 variedades positivas no teste de Elisa e 18 variedades positivas no teste de PCR, entretanto, as variedades que foram detectadas positivas para o

patógeno pelo teste ELISA e não pelo PCR não foram contadas como suscetíveis e, sim, como falsos positivos.

O método que apresentou maior percentual de detecção da bactéria foi o EB-ELISA, este foi considerado nas condições do experimento o que apresentou maior sensibilidade, podendo atender aos trabalhos de avaliação de genótipos ao raquitismo das soqueiras, seguido pelo Dot Blot que apresenta facilidade na execução podendo atender as necessidades rotineiras de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Além disso, o Dot Blot possui protocolo de coleta de amostras testado por outros autores como Gagliardi (2008) e Gao *et al.* (2008) com facilidades de coleta de amostras a campo.

Sugere-se que na continuidade da pesquisa possa ser utilizado o qPCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction, PCR em tempo real) que segundo Grisham, Pan e Richard (2007) foi mais sensível que o PCR tradicional e pode ser utilizado em plantas jovens, anteriormente à formação de colmos.

4 CONCLUSÕES

O método EB-ELISA, apresentou o maior percentual de detecção com 73% dos genótipos diagnosticados positivos, seguido pelo Dot blot com 55%. A PCR, embora seja considerado o método de detecção mais sensível, foi o que apresentou o menor percentual de detecção com 15% dos genótipos diagnosticados positivos.

O método EB-ELISA foi considerado nas condições do experimento o que apresentou maior sensibilidade, podendo atender aos trabalhos de avaliação de genótipos ao raquitismo das soqueiras, seguido pelo Dot Blot, o qual apresenta facilidade na execução podendo atender as necessidades rotineiras de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* para fins de monitoramento e controle da doença em campo.

REFERÊNCIAS

- BAILEY, R. A. **The systemic distribution and relative occurrence of bacteria in sugarcane varieties affected by ratoon stunting disease.** Proceedings of the South African Technologists Association, v.6, n.9. p.466-467, 1977.
- CALIJA, V. *et al.* An operations research approach to the problem of the sugarcane selection. **Annals of Operations Research: Netherlands**, n.108, p.123-142, 2001.
- CARDOSO, C.O.N. **Isolamento da bactéria do raquitismo (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) no Brasil.** Boletim Técnico COPERSUCAR, n.34, p.48-52, 1986.
- CARNEIRO JR. *et al.* **Método de extração de seiva do xilema de cana-de-açúcar e detecção sorológica por Dot blot de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.** In: 8º Encontro de Iniciação Científica, 3º Mostra de Pós-Graduação e 1ª Mostra de Extensão, p.116-117, 2003.
- CARNEIRO JR. J.B. *et al.* Especificidade de anti-soro policlonal à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Fitopatologia Brasileira**, n.29, p.614-619, 2004.
- CROFT, B.J. A method of rating sugarcane cultivars for resistance to ratoon stunting disease based on an enzyme-linked immunoassay. **Australasian Plant Pathology**, n.31, p.63-66, 2002.
- CROFT, B.J. *et al.* RSD diagnosis and varietal resistance screening in sugarcane using the EBEIA technique. **Austral. Soc. Sugar Cane Technol.**, n.16, p.143-151, 1994.
- DAVIS, M. J. *et al.* A method to screen for resistance to ratoon stunting disease of sugarcane. **Sugar Cane**, Manchester, v.6, p.9-16, 1994.
- DAVIS, M.J. Direct-count techniques for enumerating *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* which cause ratoon stunting disease of sugarcane. **Phytopathol.**, n.75, p.1226-1231, 1985.
- DAVIS, M. J.; GILLASPIE JR. A. G.; VIDAVER, A. K. *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 Systematic Bacteriology**, v.34, p.107-117, 1984.
- DAVIS, M. J.; PURCEL, A. H.; THOMSON, S. V. Isolation media for the pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v.30, p.425-429, 1980.
- EMBRAPA, **Centro Nacional de Pesquisa de Solos.** Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília, 1999. 412 p.

EVTUSHENKO, L. *et al.* *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of *Corynebacterium aquaticum* Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (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., com. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, n.50, p.371-380, 2000.

FEGAN, M. *et al.* 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**, v. 4, n.7, p. 495-504, 1998.

GAGLIARDI, P.R.; PACE, F.A.; FERREIRA, A.J. Comparação de três métodos de diagnose para a detecção da *Leifsonia xyli* subsp *xyli*, agente casual do raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, suplemento, agosto de 2006.

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.** 119 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba. 2008.

GAO, S. J. *et al.* Quick detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by PCR and nucleotide sequence analysis of PCR amplicons from Chinese *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* isolates. **Sugar Tech**, v.10, n.4, p.334-340, 2008.

GILLASPIE JR, A.G. Ratoon stunting diseaseserology. **Phytopathology**, n.68, p.529-532, 1978.

GILLASPIE JR, A.G., TEAKLE. D.S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD. C., EGAN, B.T., GILLASPIE JR. A.G et al. **Diseases of sugarcane: major diseases**, 1989.

GRISHAM, M. P. Ratoon stunting disease. in: **Sugarcane Pathology**, v. III: Bacterial and Nematode Diseases. G. P. Rao, A. S. Saumtally, and P. Rott, eds. Science Publishers, Inc., Enfield, NH. 2004, p. 77-96

GRISHAM, M.P.; PAN, Y.-B.; RICHARD, JR., E.P. Early detection of *Leifsonia xyli* subsp *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. **Plant Disease**, 2007.n.91, p. 430-434.

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

HARRISON, N. A.; DAVIS, M. J. Infectivity titrations of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Plant disease**, v.6, n.70, p.556-558, 1986.

HOY, J. W.; GRISHAM, M. P.; DAMANN, K. E., Jr. Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. **Plant Disease**. 83:1170-1175, 1999.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Cartas Climáticas do Estado do Paraná** 1994. Londrina, 1994, 49 p. (IAPAR. Documento, 18)

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

KAUFFMAN, H.E. *et al.* An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. **Plant Disease**, v.57, n.6, p.537-541, 1973.

LIMA, R.M.P. **Caracterização de variedades de cana-de-açúcar quanto à resistência e tolerância ao raquitismo-da-soqueira**. 56 f. Dissertação (Mestrado). Campos dos Goytacazes RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 2008.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. In: **Imunodiagnóstico em medicina Veterinária**. Editores :Madruga, C.R., Araújo, F.R., Soares, C.O., EMBRAPA gado de corte (Campo Grande- Mato Grosso do Sul- Brasil), 2001. p.145-175.

PAN, Y.B. *et al.* Polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. **Plant disease**, v.3, n.82, p.285-290, 1998.

ROS, P.B. Avaliação da resistência de variedades de cana-de-açúcar ao raquitismo-da-soqueira com base na taxa de colonização dos colmos por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. 58 f. Dissertação (mestrado). Piracicaba SP. Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 2004.

SANGUINO, A. Diagnóstico e controle do raquitismo da soqueira causado pela bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, In: **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, 1998. p.17-26 (Resumo).

SANGUINO, A., MORAES, V.A. & SANTOS FILHO, O.T.D. Diagnóstico do raquitismo da soqueira em colmos de cana-de-açúcar. **Anais...** Seminário de Tecnologia Agrônômica. 1984. n.2, p.250-253.

SILVA, M.F.;REIS, V.M. **Técnica de adsorção para obtenção de soro policlonal estirpe específico de bactérias diazotróficas**. EMBRAPA, comunicado técnico, abril, 2005.

STEINDL, D.R.L. **Ratoon stunting disease**. Plate XX, Internal symptoms of ratoon stunting disease. Amsterdam, 1961. n.20, p. 433-453.

TAYLOR, P.W.J. *et al.* Development of PCR-based markers for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in fibrovascular fluid of infected sugarcane plants. Austral. **Plant Pathology**, n.32, p.367–375, 2003.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.). In: **Manual de fitopatologia**, v. 2 – Doenças das plantas cultivadas. 4ª.Ed. São Paulo SP. Ceres. 2005.

CAPÍTULO 3

EFEITO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NOS COMPONENTES DE PRODUÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR INFECTADAS PELO RAQUITISMO DAS SOQUEIRAS

RESUMO

A doença raquitismo das soqueiras da cana-de-açúcar (RSD) pode ser considerada como uma das mais importantes na cultura. Um método alternativo de controle pode ser o controle biológico por meio de bactérias endofíticas, as quais são capazes de colonizar os tecidos da planta hospedeira, competindo pelos mesmos sítios de colonização ou produzindo substâncias capazes de acionar os mecanismos de resistência do hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial adverso causado pelas bactérias diazotrófica e endofíticas de cana-de-açúcar: *Azospirillum brasiliense* estirpe: AbV5 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpes SmR1 e HCC 103, na colonização de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, utilizando como referencial componentes de produção. E a avaliação da eficiência destas bactérias como inoculantes biológicos, no incremento da produção da cana-de-açúcar. O ensaio foi conduzido na Estação Experimental de Paranavaí, em cana de primeiro corte no ano de 2010. Os tratamentos foram constituídos de plantas do genótipo SP77-5181 inoculadas com: 1. *Azospirillum brasiliense* estirpe AbV5 + Lxx; 2. *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1 + Lxx; 3. *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HCC103 + Lxx; 4. Lxx; 5. Todas bactérias (*A. brasiliense* estirpe AbV5 + *H. seropedicae* estirpes SmR1 e HCC103 + Lxx); 6. Testemunha sem inoculação. Foram realizadas as avaliações de: POL (pol cana), toneladas de POL por hectare (TPH), teor de fibra, massa de 1 colmo (M1C), número de colmos por metro (NCM), estatura, diâmetro de colmos e toneladas de cana por hectare (TCH) para cada tratamento e a detecção do patógeno foi realizada pelo método Dot blot. O delineamento utilizado foi de blocos ao acaso, com três repetições e os resultados foram submetidos à análise de variância. Quanto ao efeito antagônico, a *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1, mostrou-se como controlador biológico potencial à colonização de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, baseando-se em evidências indiretas, como no aumento da massa dos colmos e com tendência a maiores rendimentos de produção. Aparentemente a bactéria *Azospirillum brasiliense* estirpe: AbV5 não causou efeitos detectáveis nos componentes de produção do genótipo de cana-de-açúcar avaliados.

Palavras-chave: *Saccharum* sp, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasiliense*, bactérias endofíticas.

ABSTRACT

Of ratoon stunting disease of sugar cane (RSD) can be considered as one of the most important in the culture. An alternative method of control may be the biological control by endophytic bacteria, which are able to colonize the tissues of host plants, competing for the same sites of colonization or producing substances capable of activating the mechanisms of host resistance. The aim of this study was to evaluate the potential adverse caused by bacteria and diazotrophic endophytic sugarcane: *Azospirillum brasiliense* strain: AbV5 and *Herbaspirillum seropedicae* strains SMR1 and HCC 103, the colonization of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, using as a benchmark yield components. And the evaluation of the efficiency of these bacteria as biological inoculants, in increasing the production of cane sugar. The test was conducted at the Experimental Station Paranaíba cane in the first cut in 2010. The treatments consisted of plants of genotype SP77-5181 inoculated with: 1. *Azospirillum brasiliense* strain AbV5 + Lxxl; 2. *Herbaspirillum seropedicae* strain SMR1 + Lxx; 3. *Herbaspirillum seropedicae* strain HCC103 + Lxx; 4. Lxx; 5. All bacteria (*A. brasiliense* strain AbV5 + *H. seropedicae* HCC103 and SMR1 strains + Lxx), 6. Non inoculated treatment. Evaluations were made of: POL (POL cane), tons of POL per hectare (TPH), fiber content, weight of a culm (M1C), number of stems per meter (NCM), height, stalk diameter and tons of cane per hectare (TCH) for each treatment and detection of the pathogen were analyzed by Dot blot. The design was a randomized block design with three replications and the results were subjected to analysis of variance. Regarding the antagonistic effect, the *Herbaspirillum seropedicae* SMR1 strain, showed potential as biological control of colonization *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, based on indirect evidence, such as increasing the mass of stalks and a tendency to higher production yields. Apparently the bacteria *Azospirillum brasiliense* strain: AbV5 caused no detectable effects on yield components of the genotypes of sugar cane evaluated.

Key-words: *Saccharum* sp., *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasiliense*, endophytic bacteria.

1 INTRODUÇÃO

Dentre os patógenos mais importantes que atacam a cultura da cana-de-açúcar está a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (DAVIS; PURCEL; THOMSON, 1980; DAVIS; GILLASPIE Jr.; VIDAVER, 1984; EVTUSHENKO *et al.*, 2000), classificação confirmada por Young *et al.*, (2006), que corresponde à bactéria causadora do raquitismo-da-soqueira (RSD – “Ratoon Stunting Disease”). Classificada no grupo corineforme, é gran-positiva, aeróbica, pleomorfica e fastidiosa, têm forma reta ou levemente curva e ocasionalmente inchada na ponta ou no meio, são bastonetes pleomórficas de 0,25-0,25 µm por 1-4 µm (TEAKLE; APPLETON; STEINDL, 1978).

As estratégias de controle do RSD visam evitar a entrada do inóculo inicial (X_0) nas áreas de produção. A principal medida é por meio de resistência varietal (COMSTOCK *et al.*, 1997) e o emprego do tratamento térmico de toletes ou minitoletes durante 50,5 °C por 2 h ou 52 °C por 30 min (MATSUOKA, 1971). Esta prática possui algumas limitações que desestimulam os produtores a empregá-la, tais como: custos do equipamento e da mão-de-obra; perdas de gemas ocasionando falhas na germinação, manutenção de viveiros primários com sistemas adequados de irrigação e, principalmente, o reduzido efeito residual do tratamento que permite uma nova reinfestação da doença, já na primeira colheita. O raquitismo da soqueira aumenta sua incidência numa mesma área de cana planta para soca em até 31% (STEIB; FORBES; CHILTON, 1957), sendo o acréscimo na incidência de colmos infectadas em média 10% ao ano (DAMANN; OLLIER, 1991). Em áreas tratadas termicamente, estima-se que após cinco ou seis cortes a incidência de raquitismo seja semelhante aos níveis iniciais de infecção (MATSUOKA, 1971, 1984). Outra forma de controle do RSD, é por meio da produção de mudas sadias por cultura de meristema (LEE, 1988). Este método apresenta como vantagens: a qualidade sanitária das mudas, a facilidade no transporte, a homogeneidade do plantio e o rápido acesso a cultivares recém-lançadas. Apesar dessas características positivas, o plantio de mudas micropropagadas é relativamente baixo, devido ao custo elevado das mudas e necessidade de manutenção de viveiros primários.

Um método alternativo de controle do RSD pode ser o controle biológico, por meio de bactérias endofíticas, as quais são capazes de colonizar os tecidos da planta hospedeira, competindo pelos mesmos sítios de colonização com o patógeno. Podem também induzir resistência ou produzir bacteriocinas danosas ao patógeno, isto torna a aplicação de endofíticos como agentes de biocontrole vantajosa, possibilitando estender os efeitos benéficos do tratamento térmico e que variedades com baixa resistência a doença, mas com grande potencial produtivo, sejam aproveitadas pelos programas de melhoramento e produtores (OLIVARES; REIS; FAÇANHA, 2000).

Na cultura da cana-de-açúcar, já foram descritas várias espécies de bactérias diazotróficas, essas bactérias são capazes de fixar nitrogênio do ar e algumas colonizam o interior dos vasos do xilema da planta, podendo ocupar provavelmente os mesmos sítios de colonização que bactérias fitopatogênicas, como é o caso de *L. xyli* subsp. *xyli* (OLIVARES; REIS; FAÇANHA, 2000). Apesar da constatação da capacidade de fixação do nitrogênio do ar e colonização do interior dos vasos do xilema da planta, apenas Carneiro Jr. (2006) avaliou o potencial de bactérias diazotróficas endofíticas no controle do raquitismo da cana-de-açúcar.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial adverso causado pelas bactérias diazotrófica e endofíticas de cana-de-açúcar: *Azospirillum brasiliense* estirpe: AbV5 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpes SmR1 e HCC 103, na colonização de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, utilizando como referencial componentes de produção. E a avaliação da eficiência destas bactérias como inoculantes biológicos, no incremento da produção da cana-de-açúcar

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL

O experimento foi conduzido a campo, nos anos agrícolas de 2009/2010 na Estação Experimental de Paranaíba, do Setor de Ciências Agrárias (SCA), da UFPR localizada no município de Paranaíba, PR, região Noroeste do Estado, entre as coordenadas 23°50'05 de latitude Sul e 52°26' de longitude Oeste, com altitude média de 470 m.

O local apresenta clima tipo Cfa, conforme classificação de Köppen, subtropical, com temperatura média no mês mais frio inferior a 18 °C (mesotérmico) e temperatura média no mês mais quente acima de 22 °C, com verões quentes, geadas pouco freqüentes e tendência de concentração das chuvas nos meses de verão, contudo sem estação seca definida e precipitação média anual de 1.300 a 1.400 mm (IAPAR, 1994).

O experimento foi instalado em solo tipo Latossolo Vermelho Distrófico (LVd-1), com relevo suave ondulado. São solos muito profundos, formados a partir de materiais derivados de arenitos, com seqüência de horizontes A, B, C pouco diferenciados, coloração vermelha escura, porosos, muito friáveis, fortemente drenados, baixa fertilidade natural, ácidos, mas de baixo a médio teor de alumínio trocável e saturação de bases baixa (EMBRAPA, 1999).

2.2 PREPARO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO DAS PLÂNTULAS

Os isolados bacterianos endofíticos foram cedidos pelo Núcleo de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. Para o cultivo foi utilizado meio NFbHP semi-sólido, obtido misturando-se meio sólido e líquido na proporção 1/9 no momento do uso (PEDROSA; YATES, 1984).

Os toletes utilizados no experimento foram oriundos da variedade SP77-5181, tratados termicamente antes do plantio (1º corte), plantados em bandejas com substrato à base de vermiculita em abril de 2009 e mantidos em viveiro-telado (sombrite 50%). Decorridos 50 dias as plântulas foram inoculadas com as bactérias:

Azospirillum brasilense (estirpe AbV5) e *Herbaspirillum seropedicae* (estirpes SmR1 e HCC 103), com o uso de seringa contendo 0,5 ml do meio com o inóculo previamente padronizado quanto ao número mais provável (NMP) de colônias (concentração de 3×10^{10} ufc/mL), aplicado no colo das plântulas (Figura 1).

A bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (causadora do RSD) foi inoculada aos 140 dias do transplante, por meio da poda das folhas basais com tesoura pré-imersa em seiva contaminada da variedade SP77-5181, altamente suscetível e comprovadamente infectada por *Lxx*, pelo teste sorológico de Dot Blot (CARNEIRO JR., 2001).

Uma semana após a inoculação as plântulas foram transplantadas para o campo. O plantio foi realizado em sulcos de 5 metros de comprimento, 1,40 metros entre sulcos com profundidade de 20 a 25 cm e o espaçamento entre covas foi de 0,5 metro.

No preparo do solo, foram realizadas duas gradagens, sendo a primeira realizada com grade aradora e a segunda, com grade niveladora. Em seguida foi feito o sulcamento para o plantio das plântulas. A adubação utilizada foi 20 kg ha^{-1} de N, 100 kg ha^{-1} de K_2O e 100 kg ha^{-1} de P_2O_5 .

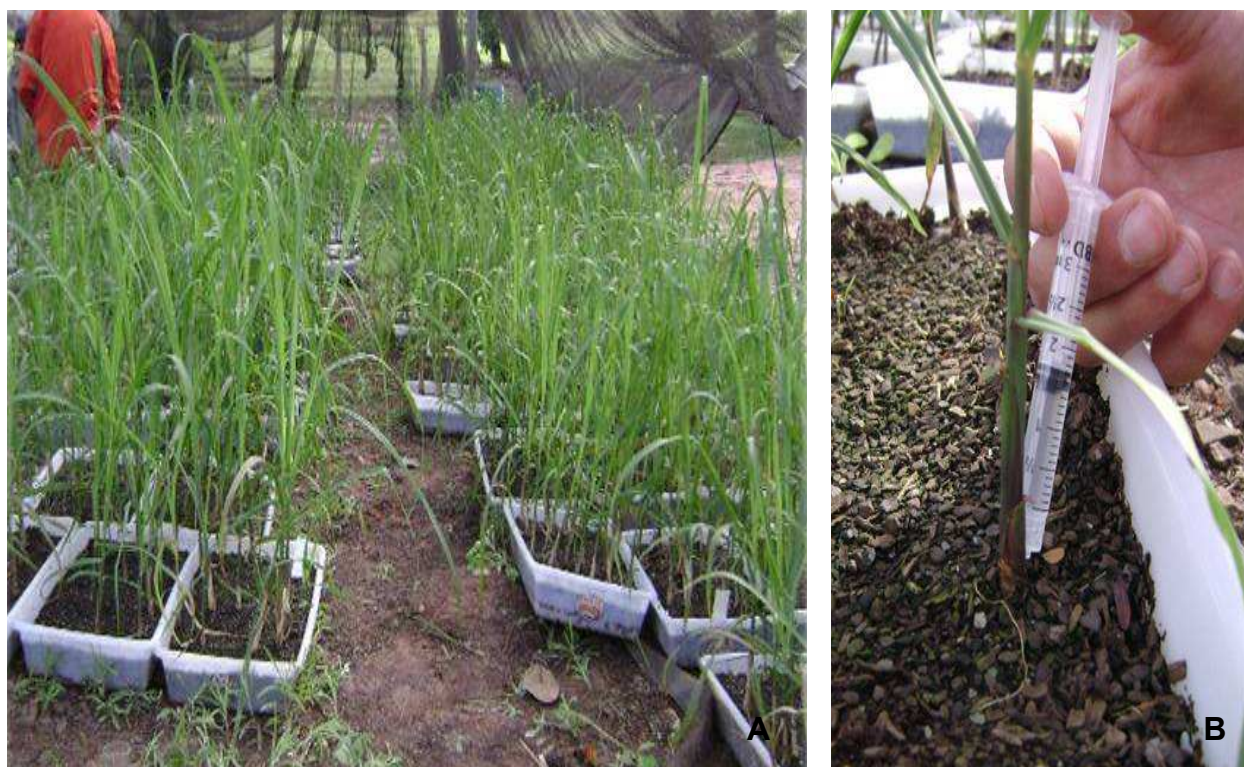


Figura 1 – (A) Plântulas de cana-de-açúcar com 50 dias; (B) Inoculação de plântula de cana-de-açúcar com as bactérias *Azospirillum brasilense* estirpes AbV5 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpes: SmR1 e HCC 103 para a avaliação do efeito na sanidade e nos componentes de produção causado por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

2.3 TRATAMENTOS

Os tratamentos foram constituídos de plantas da variedade SP77-5181 inoculadas com:

1. *Azospirillum brasilense* estirpe AbV5 + Lxx
2. *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1 + Lxx
3. *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HCC103 + Lxx
4. *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*
5. Todas bactérias: *Azospirillum brasilense* AbV5 + *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 + *Herbaspirillum seropedicae* HCC103 + Lxx
6. Testemunha sem inoculação (TE).

2.4 AVALIAÇÕES DOS COMPONENTES DE PRODUÇÃO

Foram avaliados POL (pol cana), toneladas de POL por hectare (TPH), teor de fibra (realizadas no Laboratório de análises tecnológicas da Usina Alto Alegre localizada no município de Colorado, PR), massa de 1 colmo (M1C), número de colmos por metro (NCM), estatura, diâmetro de colmos e toneladas de cana por hectare (TCH) descritos em seguida:

- POL: o teor de POL na cana foi obtido por meio da seguinte fórmula: $Pol = (a/c + 1 - 0,01 \times Fib_d)$, em que $a=1000g$ H₂O, $c=500g$ de cana, s refere-se ao pol no extrato do digestor, onde, $s = L_d \times (0,2605 - 0,001 \times b)$ e L_d corresponde à leitura sacarimétrica do extrato e b ao brix % extrato do digestor, Fib_d ao teor de fibra da cana obtida pelo método do digestor.
- TPH: determinado em função da tonelada de cana por hectare e o teor de POL cana, conforme descreve a fórmula a seguir: $TPH = (TCH \times POL) / 100$.
- Teor de fibra – O teor de fibra, que é a matéria insolúvel em água contida na cana-de-açúcar, foi determinada a partir da pesagem do bolo de bagaço úmido (PBU) obtido após a prensagem de uma amostra de cana desfibrada para a extração da seiva, utilizando a seguinte fórmula: $F = 0,08 \times PBU + 0,876$, onde o PBU é o peso de bagaço úmido da prensa em gramas (Consecana, 1998).
- M1C: foi calculado em função da média de três pesagens de dez (10) colmos por parcela (kg), obtido por $M10C / 10$.
- NCM: foi obtido em cada parcela contando o número de colmos das duas linhas centrais, dividindo-se pelo número de metros lineares.
- Estatura – foi obtida medindo-se 10 colmos por tratamento, da base até a altura da folha + 1.
- Diâmetro – foi obtido pela medição de 10 amostras de colmos na porção mediana da planta com o auxílio do paquímetro.
- TCH: estimado em função da massa média de um colmo da parcela, em kg, o número total de colmos presentes nas respectivas parcelas e um fator que é em função do espaçamento de plantio, conforme evidencia a seguinte fórmula: $TCH = (M1C \times NCM) \times 7,148 / 1,40$. Sendo que 1,00

refere-se a um metro linear de sulco e 1,10 (m), ao espaçamento entre sulcos.

2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento utilizado foi de blocos ao acaso, com três repetições e os dados resultantes foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) utilizando-se o Software SISVAR 5.3 (Ferreira, 2000) e as médias comparadas pelo teste de Scott knott a 5 %.

2.6 COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE DETECÇÃO DO PATÓGENO

O ensaio foi instalado em junho de 2009 e as amostras para análise de detecção da bactéria causadora do raquitismo foram colhidas das plantas aos 11 meses de idade em maio de 2010.

Os colmos coletados e limpos com pano úmido foram devidamente identificados, sendo realizado um corte em bisel na parte superior e um corte transversal na parte inferior, para facilitar o encaixe do colmo e o escoamento do fluido vascular para o microtubo, logo após, foi imediatamente iniciada a extração de aproximadamente 1000 μL de fluido vascular entre o segundo e terceiro entrenó da base para o ápice com auxílio de um compressor de baixa pressão, adaptado com uma teteira de borracha (tipo ordenhadeira) na extremidade da mangueira afim de facilitar o procedimento de extração. Foram coletadas 10 amostras para cada tratamento e retição, totalizando 180 amostras que foram acondicionadas em microtubos de 1500 μL , contendo duas gotas de solução estabilizadora de digluconato de clorexidina a 0,02%, acondicionados em isopor com gelo e posteriormente o conteúdo foi levado para o Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Paraná.

2.7 ANÁLISE DE DETECÇÃO DO PATÓGENO

Foi utilizado anti-soro policlonal específico contra *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* produzido por Carneiro Jr., Silveira e Souza Filho, (2006). Antes da fixação dos extratos nas membranas de nitrocelulose de 0,2 µm, os mesmos foram descongelados a temperatura ambiente. Cada membrana recebeu um total de 40 amostras, os padrões consistiram de suspensões de bactérias, seiva de cana-de-açúcar doente da variedade SP77-5181 cuja presença da bactéria foi confirmada em ensaio sorológico prévio e seiva de cana-de-açúcar doente diluída 10 vezes em água destilada e somente água destilada (controle negativo).

O ensaio sorológico iniciou-se com a hidratação da membrana de nitrocelulose (Sigma®) em água ultra pura (Mili-Q) por 10 min. Foram aplicadas as amostras (duas repetições para cada amostra) na membrana montada sobre suporte utilizando bomba de vácuo e incubada a 80 °C durante 1 hora e após foram colocados os padrões (positivos e negativos). Em seguida, bloqueou-se a membrana sob agitação por 60 min em solução tampão TS (Tris 100 mM, NaCl 1,5 M, Tween-20 0,5 % pH 7,4) com 0,1 % de leite desnatado em pó (Molico®). Na sequência a membrana foi lavada em solução TS, três vezes, por 10 min cada e após a membrana foi incubada por 60 min em solução do anti-soro primário diluído (1:20.000 em tampão TS com 0,1 % de leite). Após esse período, lavou-se a membrana em tampão TS, por três vezes, durante 10 min cada. Em seguida a membrana foi incubada por 120 min na presença de anti-soro secundário de cabra contra IgG de coelho, diluído 1:20.000 em solução tampão TS com 0,1 % de leite em pó. A membrana foi lavada por três vezes em solução TS por 10 minutos e por 15 minutos em solução tampão PBS fosfato 1M salino (NaCl 0,8 %). O processo sorológico foi finalizado incubando-se (no escuro) a membrana por 20 min em solução reveladora (0,3 g Naphthol-as-phosphate, 5 mL N Dimethyl formamide, 24 g Tris-base, 0,1 g Fast blue pH 9,1). Após a incubação, a membrana foi lavada em água corrente e com hipoclorito de sódio (2 % HClO) por 20 min para remoção de manchas residuais. Todo o processo sorológico foi conduzido sob agitação (60 rpm), à temperatura ambiente (HARISSON; DAVIS, 1988, modificada conforme CARNEIRO JR.; SILVEIRA; SOUZA FILHO, 2006).

2.8 ESTIMATIVA DA DENSIDADE DE TALOS BACTERIANOS DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

A coleta de amostras para o isolamento e quantificação da população das bactérias endofíticas foi realizada em junho de 2010. Foram coletadas raízes com solo na profundidade de aproximadamente 20 centímetros de comprimento, da raiz para o colmo de cada tratamento. Este material foi colocado em sacos plásticos, acondicionados em caixas de isopor com gelo e encaminhadas para o Laboratório da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Foi utilizado 1 g de amostra de raízes/tratamento, que foram lavadas em água corrente e parcialmente desinfestadas com algodão embebido com álcool. Após desinfestação as amostras de raízes foram trituradas em liquidificador, com solução salina por dois minutos. A solução das amostras, assim obtida, foi diluída em série (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-7}) e 100 μ l de cada diluição foi aplicada em meios semi sólidos JNFb para *Herbaspirillum* spp e NFb para *Azospirillum brasilense*, com três repetições para cada diluição. A ausência ou presença da película formada a 1 cm da superfície, no meio semi-sólido indicou de acordo com a Tabela de McCrady, o Número Mais provável (NMP) de células bacterianas por mL. A identificação foi confirmada pela visualização em microscópio ótico de contraste de fase, seguindo-se a caracterização das colônias em placas contendo o respectivo meio sólido (DÖBEREINER; BALDANI; REIS, 1995).

O meio NFb para *Azospirillum brasilense* apresenta a seguinte composição em g L⁻¹: ácido málico, 5; K₂HPO₄, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 0,2; NaCl, 0,1; CaCl₂.2H₂O, 0,02; KOH, 4,5; e em mL: solução de micronutrientes, 2; solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH), 2; solução de FeEDTA (solução 1,64%), 4; e solução vitaminas, 1; pH 6,5. O meio JNFb, para *Herbaspirillum* spp., contém em g L⁻¹, ácido málico, 5; K₂HPO₄, 0,6; KH₂PO₄, 1,8; MgSO₄.7H₂O, 0,2; NaCl, 0,1; CaCl₂.2H₂O, 0,02; KOH, 4,5; e em mL: solução de micronutrientes, 2; solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH), 2; solução de FeEDTA (solução 1,64%), 4; solução vitaminas, 1; e pH 5,8 (DÖBEREINER; BALDANI; REIS, 1995).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISES DOS COMPONENTES DE PRODUÇÃO

Foi verificada diferença significativa somente para diâmetro (DC) e massa colmos (M1C). O tratamento inoculado apenas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) apresentou menor diâmetro, com 2 cm, diferindo-se dos demais tratamentos. Os tratamentos Lxx e *Azospirillum brasilense* estirpe AbV5 + Lxx apresentaram os menores valores de massa de colmos com 0,81 kg e 0,72 kg respectivamente.

TABELA 1 – Componentes de produção de toneladas de cana por hectare (TCH), toneladas de POL por hectare (TPH), POL, teor de fibra (%), diâmetro de colmos (DC), massa de um colmo (M1C) e estatura de colmos (EC) de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP77-5181 pré inoculadas com bactérias endofíticas e pós inoculadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Município de Paranavaí/PR, 2010.

Tratamentos	TCH ^{ns}	TPH ^{ns}	Poi ^{ns}	Teor de fibra (%) ^{ns}	DC (cm)	M1C (kg)	NCM ^{ns}	EC (m) ^{ns}
Hs HCC 103 + Lxx	84,19	11,95	14,2	12,96	2,50 b	0,86 b	13,6	1,80
Hs SmR1 + Lxx	89,64	12,77	14,21	12,75	2,30 b	0,92 b	13,63	1,91
Ab AbV5 + Lxx	74,79	10,46	13,94	13,01	2,23 b	0,72 a	13,4	1,81
Lxx	80,9	11,32	13,99	13,3	2,00 a	0,81 a	13,93	1,88
Todas bactérias	89,71	13,05	14,53	12,82	2,30 b	0,93 b	13,4	1,96
Testemunha	89,29	12,57	14,05	12,93	2,36 b	0,91 b	13,73	1,91
C.V.%	6,95	11,06	5,9	6,99	4,15	6,87	4,77	9,73

ns – não significativo pelo teste Scott knott $P \leq 0,05$.

Hs HCC 103 - *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HCC 103

Hs SmR1 - *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1

Ab AbV5 - *Azospirillum brasilense* estirpe AbV5

Lxx - *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

O menor diâmetro de colmos observado nas plantas inoculadas somente com Lxx possivelmente expressa o efeito negativo na característica associada à massa de colmos, a qual também foi menor nestas plantas. Estes resultados confirmam os sintomas característicos da presença de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, que são colmos mais finos e internódios mais curtos (TOKESHI, 1997), porém não observou-se diferença significativa entre os tratamentos para estatura de colmos.

Os melhores resultados para massa de colmos foram apresentados pelos tratamentos com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1+Lxx, com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HCC 103+Lxx, na inoculação conjunta de todas as bactérias (inóculo mixto) e na testemunha. Também foram nestes tratamentos que *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 se apresentou com números populacionais altos comparados aos demais endófitos (Tabela 2). Apesar das diferenças não terem sido significativas, plantas inoculadas com *H. seropedicea* estirpe SmR1 + Lxx apresentaram incremento de 14,45 ton.ha⁻¹ em relação à *A. brasiliense* estirpe AbV5 + Lxx que apresentou menor produtividade.

O uso de todas as bactérias proporcionou melhor desempenho das plantas quanto aos componentes de produção observados na Tabela 1, poderia ser atribuído à ação conjunta das bactérias, pela competição por espaço, oxigênio e nutrientes com o patógeno. Carneiro Jr, (2006) também encontrou resposta positiva com a associação de bactérias endofíticas e *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans*), que foi positiva para a maioria dos componentes avaliados.

3.2 ANÁLISES DE DETECÇÃO DO PATÓGENO E ESTIMATIVA DA DENSIDADE DE TALOS BACTERIANOS DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Na avaliação para a detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, pode-se constatar que os tratamentos com uso de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 + Lxx e a testemunha apresentaram maior incidência de Lxx com 25% das amostras soropositivos, seguidos pelo tratamento inoculado com todas as bactérias com 20% de incidência. Os tratamentos com *Herbaspirillum seropedicae* HCC103 + Lxx e *Azospirillum brasiliense* AbV5 + Lxx apresentaram as menores incidências, com 10% das amostras soropositivos (Tabela 2).

Na quantificação das bactérias diazotróficas endofíticas verificou-se que *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1 apresentou números populacionais altos no tratamento em que foi inoculado em associação com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, em comparação aos demais tratamentos. Em segundo lugar, está *Herbaspirillum seropedicae* HCC 103 com números populacionais também elevados no tratamento em foi inoculado em associação com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, em comparação aos

demais tratamentos. Ao passo que *Azospirillum brasilense* AbV5 se apresentou com valores populacionais baixos no tratamento em que foi inoculado em associação com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e não detectado nos demais tratamentos, nem mesmo naquele onde todas as bactérias foram inoculadas (inóculo mixto) (Tabela 2).

TABELA 2 – Incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (%) e densidade de talos (DTB) bacterianos (n° células/gramas de massa fresca⁻¹ de raiz) das bactérias endofíticas, estimada pelo número mais provável (NMP), em meio semi-seletivo, avaliadas em plantas de cana-de-açúcar da variedade SP77-5181 pré inoculadas com bactérias endofíticas e pós inoculadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Município de Paranaíba/PR.

Tratamentos	Incidência Lxx (%)	DT (N° células.g raiz ⁻¹)	
		JNFb	NFb
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> HCC 103 + Lxx	10	4,5 x10 ³	nd ¹
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 + Lxx	25	6 x10 ⁵	nd ¹
<i>Azospirillum brasilense</i> AbV5 + Lxx	10	nd	1,5X10 ⁶
Todas as bactérias	20	1,5 x10 ³	nd ¹
Testemunha	25	nd ¹	nd ¹

Nota: Lxx: *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; nd: não detectada na diluição superior a 10⁻⁴; nd¹ não detectada na diluição superior a 10⁻².

JNFb meio seletivo para quantificação do NMP de *Herbaspirillum*

NFb meio seletivo para quantificação do NMP de *Azospirillum brasilense*

Era esperado que a inoculação com *Azospirillum brasilense* apresentasse efeito positivo na produção. Segundo Okon e Vanderleyden (1997) baseando-se em dados acumulados durante 22 anos de pesquisa com experimentos de inoculação a campo, concluíram que o gênero *Azospirillum* spp. promove ganhos em rendimento em importantes culturas nas mais variadas condições de clima e solo. Ao contrario do esperado, a inoculação com *A. brasilense* estirpe AbV5 + Lxx apresentou resultado negativo, diminuindo a produção e o diâmetro médio dos colmos. Esperava-se que *A. brasilense* colonizasse os vasos do xilema durante todo o ciclo da cultura da cana-de-açúcar e tivesse um efeito na redução da colonização de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e conforme pode ser observado na Tabela 2, seus níveis populacionais foram muito baixos e não detectados para a maioria dos tratamentos.

Entretanto, a dinâmica populacional das bactérias endofíticas e do patógeno são diferentes, enquanto o patógeno aumenta a população com a maturação (HARRISON; DAVIS, 1988) há uma tendência natural das bactérias endofíticas diminuírem (COSTA; RUSCHEL, 1981).

Resultados semelhantes foram obtidos por Lopes *et al.* (2008) inoculando *H. seropedicea* na cultura do milho safrinha, não encontrou diferença significativa entre os tratamentos, porém, verificou que as plantas inoculadas apresentaram produção de 444 (híbrido BRS 1030) e 540 (BR 106) kg a mais por hectare quando comparadas às plantas não inoculadas, o mesmo autor pode observar que a resposta do milho híbrido BRS 1030 na safra seguiu o caminho inverso, resultando em prejuízo à produtividade, esse fato demonstra que o resultado da inoculação com endofíticas pode ser dependente do genótipo da cultura estudada, assim também ocorreu em experimento com variedades de pepino, onde Liu, Kloepper e Tuzun (1995) testando rizobactérias (*P. putida* e *Serratia marcescens*) na indução de resistência em quatro variedades de pepino, sendo três suscetíveis e um resistente encontraram que *P. putida* induziu resistência nas três cultivares suscetíveis, mas *S. marcescens* em apenas duas, sendo que ambas não induziram mais resistência na cultivar resistente. Como todas colonizaram com eficiência o sistema radicular das cultivares em teste, uma colonização deficiente não explicaria os resultados. Pode-se observar que as diferentes estirpes apresentaram comportamentos direferenciados e as divergências nos resultados poderia ser atribuída ao genótipo da cultura, assim como nos resultados obtidos por Lopes *et al.* (2008) e Liu, Kloepper e Tuzun (1995).

Olivares (1997) relatou que ocorrem diferentes níveis de interação entre bactérias e espécies de plantas ou ainda uma afinidade entre estirpes e cultivares. Esse comportamento pode também ter ocorrido no presente trabalho, entre o genótipo SP77-5181 e *A. brasilense* AbV5, já que não há nenhum relato que relacione o efeito dos genótipos à influência de bactérias endofíticas. Porém, ao contrário do observado, Silva *et al.* (2004) utilizando *A. brasilense* na reação de resistência de sementes de trigo e cevada à *Bipolaris sorokiniana* e na promoção do crescimento, concluíram que as plantas tratadas com *A. brasilense* não apresentaram lesões típicas do patógeno e houve promoção do desenvolvimento da planta, demonstrando que a bactéria interferiu no metabolismo da planta e atuou como elicitador de resistência. Esse resultado foi obtido sem levar em conta condições

de clima e solo que foram controlados. É sabido que fatores edáficos como a disponibilidade de água é fundamental para qualquer processo biológico e deve ser colocado em primeiro plano (XAVIER, 2006).

Segundo Döbereiner e Pedrosa (1987), as condições ideais de pH para o crescimento de *Azospirillum brasilense* está entre 6,0 e 7,8 e para *H. seropedicae* o pH ideal para seu crescimento é variável entre 5,3 a 8,0. O pH encontrado nas plantas para todos os tratamentos ficou com valor médio de 5,5. Esse fato pode estar associado com os resultados obtidos neste trabalho, onde o tratamento *Azospirillum brasilense* AbV5 + Lxx não apresentou diferenças positivas para as variáveis avaliadas.

Novas avaliações devem ser conduzidas para a colheita de cana soca para confirmar os dados obtidos nesse estudo e aumentar o conhecimento sobre os efeitos da inoculação da cana-de-açúcar com as diferentes estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* que é carente de informações, principalmente oriundas de avaliações feitas a campo, onde uma bactéria que pode ser benéfica agindo no controle de determinada doença ou fixando nitrogênio atmosférico, pode também causar danos na produtividade como exemplo do resultado obtido por Olivares (1997) onde *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, foi descrito na cana-de-açúcar como agente causador de estria mosqueada.

4 CONCLUSÕES

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1, mostrou-se como controlador biológico potencial à colonização de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, baseando-se em evidências indiretas, como no aumento da massa dos colmos e com tendência a maiores rendimentos de produção.

Aparentemente a bactéria *Azospirillum brasiliense* estirpe: AbV5 não causou efeitos detectáveis nos componentes de produção dos genótipos de cana-de-açúcar avaliados.

REFERÊNCIAS

CARNEIRO JR. J.B. *et al.* Especificidade de anti-soro policlonal à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Fitopatologia Brasileira**, n.29, p.614-619, 2004.

CARNEIRO JR., J.B.; SILVEIRA, S.F.; PONTE, E.C.; Sanidade e vigor de mudas de cana-de-açúcar infectadas por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e tratadas por termoterapia. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.s 183, suplemento, agosto de 2006.

CARNEIRO, P.C.S. **Novas metodologias de análise da adaptabilidade e estabilidade de comportamento**. 168 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

CARNEIRO JR., J. B. **Obtenção e análise de especificidade de antissoro (policlonal) contra *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do RSD**. Campo dos Goytacazes. 139 f. Dissertação (mestrado em fitopatologia) – Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2001.

COMSTOCK, J.C.; PERDOMO, R., POWELL, G.; WANG, Z. Ratoon stunting disease in Florida sugarcane fields: relationship between disease incidence and cultivar resistance. **Journal American of Sugarcane Technologists**, n.17, p.95-101, 1997.

COSTA, J.M.T.; RUSCHEL, A.P.(1981) **Seasonal variation in the microbial populations of sugar-cane plants**. In:VOSE,P.B., RUSCHEL,A.P.(Eds) CRC. 1981. p.109-118.

DAMMAN, K. E. Jr.; OLLIVER, C. A. Distribution and incidence of ratoon stunting disease in Louisiana sugarcane. **Plant disease**, n.75, p.568-571, 1991.

DAVIS, M. J.; PURCEL, A. H.; THOMSON, S. V. Isolation media for the pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v.30, p.425-429, 1980.

DAVIS, M. J.; GILLASPIE JR. A. G.; VIDAVER, A. K. *Clavibacter* a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. Sp. Nov. subsp. Nov and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. Nov; pathogens that causa ratoon stunting disease of sugarcane and Bermuda grass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.34, p.107-117, 1984.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic in non-leguminous crops. In: **Azospirillum VI and related microorganisms** (Ed: I. Fendrik, M. del Gallo, J. Vanderleyden, M. Zamoroczy). Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p.3-14, 1995.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. **Science Tech Publishers/Springer-Verlag**, 1987.

EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, 1999. 412 p.

EVTUSHENKO, L. *et al.* *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of *Corynebacterium aquaticum* Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (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., com. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, n.50, p.371-380, 2000.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCAR, p.255-258.

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**, n.78, p.722-727, 1988.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Cartas Climáticas do Estado do Paraná 1994**. Londrina, 1994, 49 p. (IAPAR. Documento, 18)

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 1, p. 77-119, 1997.

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research** , v.65, p.197-209, 2000.

LANDELL, M. G. A.; SILVA, M. A. As estratégias de seleção da cana em desenvolvimento no Brasil. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v.1, p.18-23, 2004.

LEE, T.S.G. Produção de mudas sadias de cana-de-açúcar através da técnica de cultura de tecidos. **Alcool e Açúcar**, Piracicaba, n.45, p.20-29, 1988.

LIU, L.; KLOPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology** , n.85, p.695-698, 1995.

LOPES, A. A. C. *et al.* Efeito com a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sobre a produtividade do milho nos períodos de safra e safrinha. **Anais...** IX Simpósio Nacional Cerrado. II Simpósio Internacional Savanas Tropicais. 2008. Brasília.

MATSUOKA, S. Incidência do vírus do raquitismo da soqueira em canas provenientes de material propagativo tratado termicamente. **Instituto Agrônomo**. 1971.

MATSUOKA, S. Longevidade do efeito do tratamento térmico em canas infectadas pelo raquitismo da soqueira. **Anais...** CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, Piracicaba: STAB, v.3, 1984. p.244-249.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Am. Soc. Microbiol. News**, n.63, p.366–370, 1997.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytology**, n.135, p.723-737, 1997.

OLIVARES, F.L.; REIS, V.M.; FAÇANHA, A.R. The role of endophytic diazotrops in sugarcane rootmorphogenesis and development. In: FINAN, T.M.; O'BRIAN, M.R.; LAYZELL, D.B., VESSEY, J.K. & NEWTON. W., eds. **Nitrogen fixation: Global perspectives**. Oxon, CAB International, 2000. p.476-477.

OLIVARES, F.L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de cana-de-açúcar (*Saccharum sp. híbrido*) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. 328 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1997.

PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntrC* (*glnG*) type genes. **FEMS Microbiol. Lett** 1984.

SILVA, H. S. A. *et al.* Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, n. 29, p.288-295, 2004.

STEIB, F. J.; FORBES, I. L.; CHILTON, S. J. P. A report on further studies on ratoon stunting disease of sugarcane in Louisiana. **Journal Sugar**, n.19, p.35-37, 1957.

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

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

XAVIER, R.P. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável da cultura de cana-de-acucar. 71 f. Tese (Doutorado) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2006.

YOUNG, J.M. *et al.* Genetic Uniformity of international isolates of *Leifsonia xyl*i subsp. *xily*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p.503-511, 2006.