

FERNANDA SANTOS MARCUZ

**LEVANTAMENTO DA OCORRÊNCIA DO
RAQUITISMO-DA-SOQUEIRA EM CANA-DE-AÇÚCAR
CAUSADA POR *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* NO NOROESTE DO
PARANÁ**

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2007

FERNANDA SANTOS MARCUZ

**LEVANTAMENTO DA OCORRÊNCIA DO
RAQUITISMO-DA-SOQUEIRA EM CANA-DE-AÇÚCAR
CAUSADA POR *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* NO NOROESTE DO
PARANÁ**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2007

FERNANDA SANTOS MARCUZ

**LEVANTAMENTO DA OCORRÊNCIA DO
RAQUITISMO-DA-SOQUEIRA EM CANA-DE-AÇÚCAR
CAUSADA POR *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* NO NOROESTE DO
PARANÁ**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 6 de Fevereiro de 2007

Prof. Dr. Edelclaiton Daros

Prof. Dr. João Batista Vida

Prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto
(Orientador)

***Aos meus pais LAURENTINO e SONIA, por
todo amor, apoio e confiança, sem eles eu
nada seria ou teria.
À minha irmã SONAYRA, pela preocupação,
carinho e atenção.
DEDICO***

***À minha avó ZENAIDE
Com carinho
OFEREÇO***

**"MELHOR QUE TUDO É APRENDER; O
DINHEIRO PODE SER PERDIDO OU
ROUBADO, A SAÚDE E A FORÇA PODEM
FALTAR, MAS AQUILO QUE VOCÊ COLOCA
NA SUA MENTE SERÁ PARA SEMPRE SEU".
*Louis L'Amour***

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre iluminar meus passos para que eu conseguisse vencer mais esta etapa tão sonhada em minha vida.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, pela formação profissional.

Ao Prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto pela orientação, dedicação, compreensão nos momentos difíceis e sem dúvida, por muita motivação dada durante este aprendizado.

Aos gerentes agrícolas das usinas pelo auxílio na coleta das amostras de cana-de-açúcar.

Ao Prof. Dr. Dauri José Tessmann e à Prof. Dra. Kátia Regina F. S. Estrada, da área de Fitopatologia – UEM, pelo apoio.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos funcionários do PGA, Érica e Ruy que sempre estiveram nos apoiando.

Ao Engenheiro Agrônomo Ricardo Augusto de Oliveira da UFPR pelo apoio na condução dos primeiros ensaios de “Dot Blot”.

Ao Eng. Agrônomo Josil de Barros Carneiro da UFRRJ pelo fornecimento de anti-soro.

Ao Eng. Agrônomo Paulo Gagliardi da UFSCar pelo fornecimento de anti-soro e oligonucleotídeos, e ao Dr. Álvaro Sanguino do CTC pelo fornecimento de controles positivos.

Ao Dr. Clandio Medeiros, que foi a primeira pessoa a me ajudar no laboratório de Biotecnologia Vegetal/UEM.

Aos estagiários Rafael e Marco, acadêmicos do curso de Agronomia, que estiveram presentes desde o início do projeto, fazendo o trabalho “pesado”.

Aos meus avós e todos familiares, pelo apoio, incentivo e carinho.

Ao Darlan, por toda atenção, carinho, companheirismo, muita paciência e compreensão, principalmente quando me vi confusa e repleta de dúvidas.

Às amigas “irmãs” de república, Eliane e Andressa, pela força, amizade e companheirismo durante toda a jornada. Vocês se tornaram pessoas especiais em minha vida.

Ao Professor Dr. João Vida e sua esposa Marilda, amiga e companheira de curso, pela amizade e incentivo.

Ao Antônio Augusto, meu “meio irmão”, amigo querido, me ajudando e ensinando, sempre presente.

Às amigas, Ronilda, Franciele, Rosa Gabriela, Fran Angelotti, Bárbara, Letícia e Tatiane e aos amigos, Ricardo e Jefferson, presentes em muitos desafios e, claro, em muitas risadas.

À Solange M. Bonaldo, por sempre estar disposta a me ajudar.

Aos amigos conquistados ao longo do curso, Júnior, Mauro, Sônia, Rudimar e Gisele, pela amizade e companheirismo durante todo tempo.

As minhas eternas amigas Aline, Larissa, Fabiana Lucio, Paloma, Geovana, Franciele Sonccine e Janaína pelos conselhos e momentos de descontração.

Aos meus professores da graduação Rosana, Simone e Henrique pelo incentivo e confiança depositados em mim.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

BIOGRAFIA

FERNANDA SANTOS MARCUZ, filha de Laurentino Marcuz e Sonia Medeiros Santos Marcuz, nascida em Cianorte, Estado do Paraná, aos 26 dias do mês de Agosto de 1982.

Graduada em Ciências Biológicas com habilitação em Licenciatura plena e Bacharelado em Março de 2004, pela Universidade Paranaense (UNIPAR), no Estado do Paraná.

Especialista em Biologia: bases morfológicas e fisiológicas da integração do organismo com o meio ambiente em Agosto de 2005, pela Universidade Estadual e Maringá (UEM), no Estado do Paraná.

Em março de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia na área de Proteção de Plantas, pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), no Estado do Paraná.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Cultura da Cana-de-açúcar	3
2.1.1 Classificação botânica, origem e evolução	3
2.1.2 A cana-de-açúcar no Brasil e no mundo	4
2.1.3 A cana-de-açúcar no estado do Paraná	6
2.1.4 Principais doenças da cana-de-açúcar	8
2.2 História, distribuição e importância do Raquitismo-da-Soqueira (RSD) .	10
2.3 Sintomas do Raquitismo-da-Soqueira	13
2.4 Transmissão	14
2.5 Diagnose	15
2.6 Métodos de detecção do patógeno	16
2.7 Métodos de controle	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Caracterização do Local	22
3.2 Solo	22
3.3 Clima	22
3.4 Descrição das variedades e clones analisados	24
3.4.1 RB72454	24
3.4.2 RB835089	25
3.4.3 RB855536	25
3.4.4 RB835486	25
3.4.5 RB835054	26
3.4.6 RB845257	26
3.4.7 RB855156	26
3.4.8 SP77-5181	27

3.4.9 CL RB94690	27
3.4.10 CL RB956911	27
3.5 Extração da Seiva	27
3.6 Ensaio Sorológico.....	28
3.7 Obtenção do DNA Genômico	30
3.8 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÕES	39
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação de oito variedades e dois clones de cana-de-açúcar cultivadas no noroeste do Paraná e amostradas para avaliação de incidência de *L. xyli* subsp. *xyli* 24

Tabela 2: Relação das variedades amostradas e resultados das análises “Dot Blot” nas áreas de produção de duas usinas do noroeste do Paraná 33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Dados climatológicos de temperatura média e precipitação no período de Abril a Dezembro de 2006..... 23
- Figura 2: Método de extração da seiva das amostras de cana-de-açúcar 28
- Figura 3: Seleção de amostras infectadas por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* para uso nos ensaios “Dot Blot” com cana-de-açúcar do noroeste do Paraná. 29
- Figura 4: Resultado de um dos experimentos “Dot Blot” com amostras de cana-de-açúcar do noroeste do Paraná (RB72454 e SP77-5181)..... 37
- Figura 5: Resultados de ensaios de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* com amostras da SP77-5181..... 38

RESUMO

MARCUZ, Fernanda Santos. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2007. **Levantamento da ocorrência do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar causada por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* no noroeste do Paraná.** Professor Orientador: Dr. Eliezer Rodrigues de Souto.

O raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar é considerado como uma das mais importantes doenças na cultura, desde sua descrição na Austrália em 1950. No Paraná, a área plantada vem aumentando significativamente nos últimos anos, e levantamentos sobre a ocorrência de patógenos na cultura é de extrema importância para a adoção de medidas de controle visando o incremento da produção. Neste trabalho foi realizado um levantamento em áreas de produção de duas usinas do noroeste do Paraná, utilizando o método de detecção sorológica “Dot Blot”, para se verificar a incidência da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causadora do raquitismo-da-soqueira. As amostras foram obtidas em 32 propriedades, em 50 talhões, cultivados com 8 variedades e 2 clones, a partir de plantas em diferentes épocas de corte, perfazendo um total de 1395 amostras. A presença da bactéria na região foi constatada através da sua detecção na variedade SP77-5181 com uma incidência de 23% na área examinada. Através dos ensaios de PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos, a presença da bactéria nessa variedade foi confirmada. Os resultados obtidos indicam que *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* está presente no noroeste do Paraná, e aparentemente, não está amplamente disseminada.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar, raquitismo-da-soqueira, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, “Dot-Blot”

ABSTRACT

MARCUZ, Fernanda Santos. Universidade Estadual de Maringá, February 2007. **Detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, the causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane in the northwest region of Paraná state.** Advisor professor: Eliezer Rodrigues de Souto, PhD.

Ratoon stunting disease is one of the most important worldwide diseases of sugarcane since its first report in Australia in 1950. In the last few years there is an increment in the sugarcane production in the state of Paraná, and surveys regarding the pathogen incidence in this crop are extremely important for controlling measures to increase the production. In this work a survey was conducted in two sugarcane production areas of two sugarcane processing plants in the northwest region of Paraná. To detect the incidence of the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* the method of diagnosis used was the serological detection of the pathogen on xylem extracts by Dot Blot assay with the specific polyclonal antiserum against the bacterium. A total of 1395 samples were collected in 32 production areas cultivated with 10 sugarcane varieties, obtained from plants with different harvest time. The bacterium was detected in the area cultivated with the variety SP77-5181 in a 23% rate of incidence, and PCR assays also confirmed the bacterium incidence in this variety, with specific primers for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. These results are an indication of the incidence of the bacterium in the northwest region of Paraná, despite of apparently not being widely disseminated.

Keywords: Sugarcane, ratoon stunting disease, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, Dot-Blot

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) tem seu centro de origem no sudeste da Ásia e foi introduzida no Brasil em 1533, estabelecendo-se de forma definitiva nas regiões Centro-Sul e Nordeste (ALCOPAR, 2006).

O parque sucroalcooleiro brasileiro possui 304 indústrias em atividade, sendo 227 na região Centro-Sul e 77 na região Norte-Nordeste, as quais sustentam mais de 1.000 municípios brasileiros, sendo responsável por cerca de 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos, congregando mais de 70 mil agricultores (JORNAL DA CANA, 2006).

O Paraná é um dos maiores produtores de cana-de-açúcar do Brasil, e sua maior safra foi colhida no período 2004/2005 – 29.059.588 toneladas, obtidas em 363.843 hectares cultivados. A produção tem acompanhado as necessidades da indústria sucroalcooleira, através de investimentos na ampliação da área de cultivo e no volume de cana-de-açúcar produzida, além do aumento da produtividade e da melhoria da qualidade da matéria-prima. No momento, 27 unidades produtoras de açúcar e álcool, estão em atividade no Estado, com impacto econômico sobre 126 municípios, onde são proporcionados 74 mil empregos diretos. A cultura é altamente rentável porque, depois de processada pela indústria sucroalcooleira, seus subprodutos, a exemplo do bagaço, podem se destinados à geração de energia calorífera em unidades termoelétricas, além de constituir suplemento para a engorda do gado (ALCOPAR, 2006).

De acordo com o Departamento de Economia Rural (Deral), da Secretaria Estadual de Agricultura e Abastecimento (Seab), a safra de cana do Estado do Paraná cresceu 20,04% em relação à safra passada. Até o mês de setembro, foram processadas 25,39 milhões de toneladas, gerando 1,74 milhão de toneladas de açúcar e 1,04 bilhão de litros de álcool (Jornal da Cana, 2006).

Dentre os fatores que afetam negativamente a produtividade da cana-de-açúcar, estão a deficiência hídrica, o cultivo de variedades ultrapassadas e a ocorrência de pragas e de doenças. Dentre as doenças, destaca-se o raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar (do inglês: Ratoon Stunting Disease - RSD), causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* - Lxx (DAVIS et

al., 1980, 1984; EVTUSHENKO et al., 2000).

Esta doença foi constatada no Brasil pela primeira vez no município de Campos dos Goytacazes-RJ, por Frederico Veiga, em 1956. O raquitismo-da-soqueira é uma importante doença da cultura da cana-de-açúcar, trazendo prejuízos não somente para o Brasil, mas também para outros países como a Austrália e os Estados Unidos (FEGAN et al., 1998; DEAN & DAVIS, 1989).

As perdas decorrentes dessa doença podem ser superiores a 50% em cultivares suscetíveis em condições conducentes à interação hospedeiro-patógeno (DAVIS & BAILEY, 2000). Dentre as medidas de controle de doenças na cultura de cana-de-açúcar, destaca-se a utilização de variedades resistentes e o plantio de mudas saudáveis.

Para a diagnose do raquitismo, atualmente, utilizam-se técnicas de detecção do patógeno na seiva do xilema, tais como microscopia de contraste de fase (STEINDL, 1976), técnicas sorológicas (GILLASPIE, 1978) e, a Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (PAN et al., 1998).

O presente trabalho teve como objetivo utilizar o método de detecção sorológica “Dot Blot” e o método de detecção molecular, baseado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para um levantamento da ocorrência da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* causadora do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar, nos plantios comerciais, de duas unidades produtoras do noroeste do Paraná.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura da Cana-de-açúcar

2.1.1 Classificação botânica, origem e evolução.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* L. híbridos interespecíficos), é uma planta alógama, pertencente à divisão Magnoliophyta, Classe Liliopsida, da família *Gramineae* (*Poaceae*), tribo *Andropogoneae*, gênero *Saccharum* (Matsuoka et al., 1999). Neste gênero (*Saccharum*) ocorrem seis espécies: *S. officinarum* L.; *S. robustum* Brandes e Jeswiet ex Grassl; *S. barberi* Jeswiet; *S. sinense* Roxb.; *S. spontaneum* L. e, *S. edule* Hassk (DANIELS & ROACH, 1987).

As cultivares modernas são híbridos complexos oriundos de cruzamentos entre *S. officinarum* (cana-de-açúcar nobre), *S. barberi* (cana-de-açúcar da Índia), *S. sinense* (cana-de-açúcar chinesa), e de duas espécies selvagens, *S. spontaneum* e *S. robustum*, sendo a última restrita a poucas cultivares do Havai (STEVENSON, 1965), seguidos de retrocruzamentos usando *S. officinarum* como espécie parental recorrente.

Os genes de acúmulo de sacarose provêm de *S. officinarum*, *S. barberi* e *S. sinense*, enquanto o genoma da espécie selvagem *S. spontaneum* tem auxiliado para introdução de genes de resistência a doenças, tolerância aos estresses ambientais e a produção de biomassa (SREENIVASAN et al., 1987).

Como resultando tem-se um germoplasma com elevado nível de ploidia, de complexo comportamento meiótico e que pode possuir até 5 a 10% do genoma das espécies parentais doadoras (LU et al., 1994). Embora exista um considerável número de variedades e clones com boas características agrícolas, limitações como suscetibilidade às doenças, alta porcentagem de floração e outras características indesejadas, tornam grande parte das variedades obsoletas; isso porque a correção desses problemas através de retrocruzamentos é extremamente difícil (SILVA et al., 1993).

2.1.2 A cana-de-açúcar no Brasil e no mundo

A cana-de-açúcar, no mundo é cultivada predominantemente em áreas subtropicais entre 15° e 30° de latitude, mas podendo se estender até 35° de latitude tanto norte quanto sul, sendo produzida comercialmente em mais de 70 países e territórios sendo os maiores produtores o Brasil, Cuba, Índia, México, China, Filipinas, Austrália, África do Sul, Estados Unidos da América, República Dominicana e Formosa (CASTRO et al., 2001). O Brasil atualmente é o maior produtor mundial, destacando-se os Estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Pernambuco, Alagoas e Goiás (ALCOPAR, 2006)

A trajetória da cana-de-açúcar para o Brasil iniciou-se na metade do século XVI, por volta do ano de 1532, através de Martim Afonso de Souza que a trouxe para a capitania de São Vicente (LUCCHESI, 2001). Os primeiros três séculos do cultivo de cana-de-açúcar no Brasil ficaram conhecidos como “ciclo da Creola”, devido ao predomínio deste genótipo, sendo substituída mais tarde pela Caiana, mais rica e produtiva (JUNQUEIRA & DANTAS, 1964; MIOCQUE & MACHADO Jr, 1977).

Com o passar do tempo novos genótipos foram sendo introduzidos como a Roxa, Salangor, Lousier e Kavangire, que tiveram seu cultivo encerrado devido à uma epidemia de mosaico na década de 20. Este fato abriu espaço para a entrada de genótipos japoneses (POJ) destacando-se POJ 36, POJ 213, POJ 2878 e POJ 2714, mais tarde genótipos importados de Coimbatore (Índia), Co281, Co290, Co331, Co419 e Co421. Mais uma vez, a ocorrência de uma doença, o carvão, prejudicou as lavouras de cana-de-açúcar, e novos genótipos foram necessários (MATSUOKA et al, 1999).

A partir de 1950, os genótipos CB desenvolvidos na Estação Experimental de Campos (RJ), passaram a ser amplamente cultivados nos canaviais brasileiros, destacando-se a CB41-76 até o começo de 1980, principalmente em São Paulo e CB45-3, na mesma época, na região oeste e Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e todo Norte – Nordeste. A CB45-3 juntamente com a Co331, representam genótipos do século passado ainda muito cultivados no Brasil (MATSUOKA et al, 1999).

Em meados da década de 70 a agroindústria canavieira sofreu uma revolução com a chegada da variedade NA56-79, importada por Azzi e

Paranhos. Na década de 80 já ocupava mais de 50% da área cultivada devido à sua produção, precocidade e uma excelente brotação de soqueiras. Mais uma vez a ocorrência de uma doença, o carvão associado aos danos causados pela ferrugem e o raquitismo-da-soqueira, causaram a condenação deste genótipo. Após esse período, os primeiros frutos obtidos pelos Programas de Melhoramento da Copersucar (variedades SP) e do IAA/Planalsucar (variedades RB), começavam a ser colhidos, personificados através de variedades como SP70-1143, SP71-1406 e RB72454 (MATSUOKA, 1991; 1999).

No Brasil, a cana-de-açúcar é destinada principalmente à produção de açúcar e de álcool, à fabricação de aguardente e à alimentação bovina. O país é líder na produção e exportação de derivados de cana-de-açúcar, bem como na utilização da planta como fonte de energia líquida renovável (MATSUOKA et al., 1999). A cultura é também relatada como promissora na geração de energia elétrica, a ser extraída do bagaço da cana-de-açúcar (OLIVEIRA & VASCONCELOS, 2001).

A produção nacional da safra de cana-de-açúcar em 2006/2007 está estimada em 469,8 milhões de toneladas. É a maior da história, superando em 8,9% a safra anterior (431,4 milhões/t). O crescimento se deve à ampliação e à abertura de novas usinas e destilarias para atender a fabricação de açúcar e álcool. Do total apurado, 423,4 milhões/t de cana serão destinados à indústria sucroalcooleira, sendo 237,1 milhões/t para a produção de açúcar. Já a industrialização total de álcool (hidratado, anidro e neutro) vai consumir 186,3 milhões/t de cana, gerando 17,8 bilhões de litros. O restante da produção (46,4 milhões/t) será destinado a outros fins, como cachaça, rapadura, ração animal e sementes para plantio. A área plantada na safra atual também aumentou em 5,4%, passando de 5,8 milhões de hectares em 2005/2006 para 6,2 milhões/h. O crescimento é resultado da ocupação de áreas antes usadas pela pecuária e pelo plantio de grãos (CONAB, 2007).

2.1.3 A cana-de-açúcar no estado do Paraná

O cultivo da cana-de-açúcar no Estado do Paraná iniciou-se em 1878, com a implantação do Engenho Central de Morretes, no Município de Morretes. Porém, somente em 1941, com a introdução de cultivares melhoradas, como a POJ2727 (Profestation Oest Java), e com a instalação de novas unidades produtoras, ocorreu a expansão da cultura para o terceiro planalto paranaense, região do norte pioneiro (DAROS et al., 1999).

O Estado do Paraná, situado entre 22 e 27°S de latitude, com altitudes de 0 a 1300m, caracteriza-se por apresentar grande diversidade de clima, solos e relevo, que proporcionam ambientes favoráveis para o cultivo de um grande número de espécies vegetais. Diversos microclimas com regimes térmicos e pluviométricos distintos podem ser observados ao longo do território paranaense, associados com variações de latitude e altitude.

O clima da região é classificado segundo o sistema baseado em Koeppen, como Cfa, com as seguintes características: subtropical úmido mesotérmico, verões quentes com geadas menos freqüentes que outras regiões do Estado, com tendência de concentração das chuvas nos meses de verão, sem estação seca definida.

O Estado do Paraná se situa em uma região de transição climática, passando de um clima subtropical com invernos mais amenos ao Norte para uma condição que se aproxima dos climas temperados ao Sul, onde os invernos são mais severos e a estação de crescimento das plantas é mais bem definida (IAPAR, 2007).

O cultivo da cana-de-açúcar no estado está localizado entre os paralelos 22° 30' e 24° 00', cujo clima é do tipo Cfa mesotérmico úmido, sem estação de seca e com média do mês mais quente superior a 22 °C, sendo limitado ao sul pela temperatura média anual de 21 °C. A área ainda apresenta uma precipitação média anual entre 1200 e 1500 mm, sendo que no trimestre mais chuvoso (Dez/Jan/Fev) constata-se precipitações em torno de 440 a 450 mm, enquanto o trimestre menos chuvoso (Jun/Jul/Ago) apresenta precipitações variando de 220 a 250 mm umidade, com uma relativa média anual de 75% e temperatura média do mês mais frio (julho) de 17 °C (IAPAR, 1994).

A cultura da cana-de-açúcar vem assumindo, nos últimos anos, posição de destaque na agricultura e importância cada vez maior na economia paranaense. Atualmente estão operando no Estado, 28 usinas, sendo 16 com destilarias anexas e 12 com destilarias autônomas (SCARAMUZZO, 2005). A produção paranaense de cana-de-açúcar para a safra de 2006/07 é estimada em cerca de 31,8 milhões de toneladas (JORNAL PARANÁ, 2007).

A região Noroeste do Paraná corresponde a 17,6 % da superfície do território estadual e apresenta solos derivados do arenito Caiuá, os quais representam 71,4 % da área da região e, em sua maioria, são caracterizados por apresentarem textura superficial franco-arenosa e baixos teores de matéria orgânica (CARVALHO, 1994).

Em relação ao solo do Estado, de acordo com o Sistema brasileiro de classificação de solos realizado pela Embrapa (1999), serão apresentadas a seguir, classes de solos encontrados na área com suas mais significantes características.

LATOSSOLOS: compreende solos constituídos por material mineral com horizonte B latossólico imediatamente abaixo de qualquer um dos tipos de horizonte diagnóstico superficial, exceto H hístico.

São solos em avançado estágio de intemperização, muito evoluídos, como resultado de enérgicas transformações no material constitutivo. São virtualmente destituídos de minerais primários ou secundários menos resistentes ao intemperismo, e têm capacidade de troca de cátions baixa. Variam de fortemente a bem drenados, embora ocorram variedades que têm cores pálidas, de drenagem moderada ou até mesmo imperfeitamente drenados.

Normalmente são solos muito profundos. Têm seqüência de horizontes A, B, C com pouca diferenciação de horizontes. São originados a partir de diversas espécies de rochas, sob condições de clima e tipos de vegetação os mais diversos.

Na região noroeste do Paraná, predominam os tipos Latossolo vermelho distroférico, Latossolo vermelho eutroférico, Latossolo vermelho distrófico e Latossolo amarelo distrófico.

NITOSSOLOS: compreende solos constituídos por material mineral com horizonte B nítico (reluzente) de argila de atividade baixa, textura argilosa ou

muito argilosa, estrutura em blocos subangulares, angulares ou prismática moderada ou forte. Estes solos apresentam horizonte B bem expressos em termos de desenvolvimento de estrutura e cerosidade, mas com inexpressivo gradiente textural.

Esta classe não engloba solos com incremento no teor de argila. São profundos, bem drenados, de coloração variando de vermelho a brunada. Nesta classe se enquadram solos que foram classificados, na maioria como Terra Roxa, Terra Bruna e Podzólicos.

2.1.4 Principais doenças da cana-de-açúcar

Para a cana-de-açúcar foram descritas mais de 216 doenças e, destas, pelo menos 58 foram encontradas no Brasil (PIZANO et al., 1990). Historicamente, na cultura da cana-de-açúcar no mundo, são consideradas em quatro as doenças mais importantes: carvão, raquitismo das soqueiras, escaldadura das folhas e mosaico da cana-de-açúcar (SANGUINO, 1998).

Existem aproximadamente 17 vírus infectando a cana em todo o mundo. Destes, dois são considerados mais importantes para a produção de cana-de-açúcar (Anon, 1980). O *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) é o mais disseminado, sendo que em condições naturais ele e o *Sorghum mosaic virus* (SrMV), ambos do gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, podem causar o mosaico, os membros desse gênero são transmitidos por mais de vinte espécies de afídeos, com maior eficiência por *Rhopalosiphum maidis*, *Schizaphis graminum* e *Myzus persicae* (SHUKLA et al., 1994), todos comumente encontrados no Brasil.

O *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV), gênero *Polerovirus*, família *Luteoviridae*, está associado com o amarelecimento foliar da cana-de-açúcar. No Brasil, a doença foi inicialmente relatada em 1989 e começou assumir caráter epidêmico em 1993 em plantações comerciais no Estado de São Paulo (Vega et al., 1997). O vírus é transmitido pelas espécies de afídeos *Melanaphys sacchari*, *Sypha flava* (LOPES et al., 1997) e *Rhopalosiphum maidis* (SCAGLIUSI & LOCKHART, 2000) e não é transmitido mecanicamente. As três espécies de afídeos são de comum ocorrência no Brasil.

Outros relatados, porém com menor importância, são sugarcane *Fiji disease virus* (FDV), gênero *Fijivirus*, família *Reoviridae*, está associado à

doença de Fiji, principalmente na Austrália; o *Sugarcane bacilliforme virus* (SCBV) gênero *Badnavirus*; o *Sugarcane streak virus* (SCSV), família *Geminiviridae*, gênero *Mastrevirus*; o *Sugarcane mild mottle virus* (SCMMV), gênero *Closterovirus*, família *Closteoviridae*; o *Peanut clump virus* (PCV), gênero *Furovirus*, em diferentes partes do mundo (BRUNT et al., 1996) e o *Sugarcane streak mosaic virus* - Andhra Pradesh (SCSMV-AP) (HEMA et al., 2002).

Entre as doenças fúngicas que trazem preocupações e podem trazer grandes prejuízos no setor canavieiro do Brasil, destacam-se a ferrugem e o carvão. A ferrugem é uma doença causada pelo fungo *Puccinia melanocephala*, encontra-se disseminada em todas as regiões produtoras no Brasil e relatada em aproximadamente 64 países produtores. Uma ferrugem não relatada no Brasil, mas de extrema importância na Austrália, é a causada pelo fungo *Puccinia kuehnii*, conhecida como ferrugem alaranjada, ocasionando perdas de até 40% na produtividade geral daquele país. O carvão da cana-de-açúcar, causado por *Ustilago scitaminea*, tem ocorrência generalizada no Brasil, desde a sua primeira constatação em 1946 no Estado de São Paulo. Já foi constatado em 72 países, sendo sua primeira aparição relatada em 1877 na África do Sul (ORDOSGOITTI et al., 1982). Os danos causados pelo carvão são variáveis, mas podem causar perdas de até 100% em variedades suscetíveis (TOKESHI, 1997).

Outras doenças fúngicas também foram registradas provocando prejuízos no país como a Podridão Abacaxi (*Ceratocystis paradoxa*), Mancha amarela (*Mycovellosiella koepkei*), a Mancha ocular (*Bipolaris sacchari*), a Podridão vermelha (*Glomerella tucumanensis*), a Podridão de Fusarium e Pokkah-Boeng (*Fusarium moniliforme* e *Fusarium subglutinans*), as Podridões de raízes (Complexos de *Pythium*) e a Podridão de Marasmius (*Marasmius sacchari*) (TOKESHI, 1997).

Entre as doenças bacterianas de grande importância no setor canavieiro brasileiro, destacam-se a escaldadura das folhas, estrias vermelhas e o raquitismo das soqueiras. Outras doenças também foram registradas provocando prejuízos dependendo da região e condições ambientais, como a gomose e a falsa estria vermelha (SMITH, 1999). A escaldadura das folhas é uma doença provocada pela bactéria *Xanthomonas albilineans*, uma das

doenças mais importantes no setor canavieiro. Foi primeiramente relatada em 1920 e desde então já foi assinalada em pelo menos 55 países (COMSTOCK e LENTINI, 2002). Esta doença tem grande potencial destrutivo, principalmente em variedades suscetíveis. No Brasil, sua importância tem sido subestimada devido aos erros de identificação e à confusão de seus prejuízos com aqueles causados pelo raquitismo das soqueiras (TOKESHI, 1997).

Pseudomonas rubrilineans é a bactéria causadora das estrias vermelhas em cana-de-açúcar, a doença teve origem na Ásia e hoje se encontra disseminada por todo o mundo. No Brasil o primeiro relato ocorreu em 1932 no Rio de Janeiro. O maior impacto econômico da doença ocorre nos Estados de São Paulo e Paraná e está associado aos solos de alta fertilidade (MATSUOKA, 1999).

Cultivada como monocultura contínua, a renovação dos campos de cana-de-açúcar quase sempre ocorre sem remoção de soqueiras velhas e replantio. Essas condições favorecem o desenvolvimento de populações de fitonematóides e, como consequência, 275 espécies de 48 gêneros já foram registradas, associadas a essa gramínea, sendo os ectoparasitos os mais freqüentes (MOURA & ALMEIDA, 1981). No Brasil, as primeiras referências de nematóides parasitando cana-de-açúcar, datam de 1962 no estado de São Paulo, quando foram registrados os gêneros *Helicotylenchus* Steiner e *Trichodorus* Cobb, na variedade Co290 (BRIEGER, 1962). Atualmente, nas condições brasileiras, quatro espécies de nematóides são economicamente importantes, em função dos danos que causam à cultura: *Meloidogyne javanica*, *M. incognita*, *Pratylenchus zae* e *P. brachyurus* (DINARDO-MIRANDA, 2005).

2.2 História, distribuição e importância do Raquitismo-da-Soqueira (RSD)

No verão de 1944 e 1945 na Austrália, após uma primavera bastante seca, alguns canaviais do então novo e promissor cultivar Q 28 apresentavam soqueiras subdesenvolvidas. Embora nada tivesse sido observado em cana-planta, a mesma anomalia ocorria nas socas dos viveiros que deram origem a esses canaviais, sugerindo que já em 1942 a anomalia incidia sobre o viveiro

da Q 28e, a partir daí, tenha sido disseminado para canaviais comerciais (STEINDL, 1961).

A natureza infecciosa do raquitismo-da-soqueira foi comprovada em 1949, através de estudos e reprodução de sintomas a partir de inoculações artificiais com caldo extraído de colmos afetados (STEINDL, 1950). Estes estudos determinaram também que o principal agente transmissor da doença era o próprio homem com suas ferramentas de trabalho (as máquinas de plantio, facões, etc.) utilizadas na colheita. Através da troca de germoplasmas contaminados, em virtude da ausência de sintomas característicos da doença, houve ampla disseminação do RSD para a maioria dos países produtores de cana-de-açúcar do mundo (GILLASPIE JR. & TEAKLE, 1989).

Em Campos de Goytacazes - RJ, Frederico Veiga em 1956, encontrou plantas suspeitas em lotes de variedades importadas, concluiu estar adiante do raquitismo-da-soqueira, quando inoculou extrato do xilema daquelas plantas supostamente doentes em variedades locais (VEIGA, 1956).

Considerava-se inicialmente que o agente causal do RSD era um vírus (STEINDL, 1961; MATSUOKA, 1971). Isto porque não se conseguia isolar o agente causal em meio axênico e também por que a doença era facilmente disseminada mecanicamente, via instrumentos de corte. No entanto, três diferentes grupos de pesquisadores, reportaram a descoberta de uma bactéria habitante do xilema como agente causal do RSD (GILLASPIE JR. et al., 1973; MARAMORCH et al., 1973; MATSUOKA, 1972). Com esses resultados, Lui et al. (1974) e Tokeshi et al. (1974) tentaram identificar e classificar a bactéria do RSD como sendo a *Xanthomonas vasculorum* (causadora da gomose) e *Xanthomonas albilineas* (agente causal da escaldadura das folhas), respectivamente. Porém, somente nas décadas de 80 e 90, estudos permitiram conhecer um pouco mais sobre a doença (GILLASPIE Jr. et al., 1989).

Na década de 80 na Flórida, foi isolada a bactéria em cultura axênica e confirmada sua patogenicidade através dos postulados de Koch. Os testes de patogenicidade foram feitos com oito isolados da bactéria em cultura pura provenientes de colmos de cana-de-açúcar doentes de diferentes regiões: Brasil, Japão, Estados Unidos e África do Sul. Todos os oitos isolados causaram sintomas de RSD em plantas da variedade CP44-101 e foram reisolados posteriormente, classificando – a assim como *Clavibacter xyli* subsp.

xyli pertencente ao gênero *Corynebacterium*, que hoje é denominada *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (DAVIS et al., 1984).

Diminuições significativas na produção foram observadas em Macaé - RJ, variando de 4 a 14 t ha⁻¹ de colmos para seis variedades de cana-de-açúcar (CB 46-364, CB 45-3, CB 49-260, CO 421, CP 51-22 e NA 56-79) inoculadas com *L. xyli* subsp. *xyli*, quando comparadas a parcelas cujas mudas foram tratadas termicamente (CHAGAS & MATSUOKA, 1988). Segundo Giglioti (1998), no estado de São Paulo o raquitismo-da-soqueira acarretou uma perda estimada de mais de 2 bilhões de dólares nos últimos 30 anos.

A bactéria Lxx é gram positiva, fastidiosa, não forma endóporos, aeróbica obrigatória, não possui flagelos (atríquia), possui células na forma de bastonetes retos ou ligeiramente curvos (pleomórficas), medindo 0,25-0,35 x 1-4 µm. Quando cultivada em meio SC (*Soybean Corn*), produz após 14 dias de cultivo, sob temperatura de 30 °C, colônias minúsculas e translúcidas, com diâmetro variando entre 0,1 a 0,3 mm (DAVIS et al., 1984).

Em 1989, a doença já havia sido relatada em 61 países (TOKESHI, 1997). Hoje é encontrada na maioria das áreas cultivadas com cana-de-açúcar, podendo causar perdas acima de 50% em variedades susceptíveis e não tolerantes (GILLASPIE & TEAKLE, 1989). As perdas na agroindústria devido à doença têm sido provavelmente bem acima daquelas causadas por outras doenças nos últimos 40 anos (JAMES, 1996).

Foram estimadas perdas anuais variando de 5 a 15% em plantios na Flórida (EUA), o que representou cerca de U\$ 36,8 milhões na safra 1988-89 (DEAN & DAVIS, 1989). Já na Austrália, a doença foi responsável por perdas anuais de U\$ 11 milhões no setor agroindustrial (FEGAN et al., 1998).

A relação cana-de-açúcar X *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é bastante complexa, tal qual o efeito desta relação no crescimento da planta devido à ausência de sintomas. Por esta razão, passados mais de 50 anos desde a descoberta desta doença, a qual ainda é endêmica nos canaviais do mundo (RICAUD, 1974) causando perdas consideráveis (GILLASPIE Jr. et al., 1989).

Em relação a outros países, a canavicultura brasileira é alvo de danos causados pelo RSD. Estimativa de queda de produtividade atingiu valores da ordem de 16% a 37% para os genótipos CB41-76, CB49-260 e IAC 52-326 (MATSUOKA, 1984). Provavelmente os danos podem ter sido ainda maiores

ao ser considerado que, na década de 80, cerca de 90% dos canaviais brasileiros encontravam-se infectados por *Lxx*, em diferentes intensidades (SANGUINO, 1987). Na década de 90, o problema ainda persistia, pois muitas unidades produtoras desativaram o sistema de tratamento térmico dos toletes para produção de mudas sadias o qual era largamente utilizado na década de 80 alegando-se a necessidade de redução de custos de produção (SANGUINO, 1987).

A bactéria *Lxx* coevoluiu com a cana-de-açúcar, resultando numa estreita adaptação à colonização dos tecidos do xilema, num grau de parasitismo elevado e níveis baixos de patogenicidade, na maioria das variedades comerciais (TOKESHI, 1997). Desta forma, é difícil encontrar variedades imunes ao patógeno, podendo aquelas com alto nível de resistência horizontal serem portadoras sem sintomas. Assim, nestes casos, a densidade populacional da bactéria é menor que em cultivares suscetíveis, dificultando a diagnose (DAVIS et al., 1988).

2.3 Sintomas do Raquitismo-da-Soqueira

Os sintomas mais comuns são crescimento irregular, subdesenvolvimento e encurtamento dos colmos de plantas de cana-de-açúcar. Porém, algumas variedades podem exibir alto nível de infecção sem, no entanto, apresentar sintomas externos. Isso ocorre em função da influência do ambiente na expressão da doença, sendo mascarados pela disponibilidade de água para a planta (GILLASPIE JR. & TEAKLE, 1989; GILLASPIE JR. & DAVIS, 1992; TOKESHI, 1997). Genótipos suscetíveis podem apresentar crescimento retardado e, em condições extremas, aspecto de murcha, necrose nas pontas e bordas das folhas, seguida de morte da planta (STEIDNL, 1961; TOKESHI, 1997).

Sintomas externos são evidenciados por outros fatores, como ano agrícola com pluviosidade desfavorável e/ou práticas culturais inadequadas, que determinam à planta uma condição de estresse, tais como a presença de plantas invasoras, compactação do solo, acúmulo ou falta de adubos, corretivos, herbicidas e ocorrência de outras doenças (GIGLIOTI, 1997). Logo,

sintomas externos não podem confirmar a presença do RSD, a não ser que estudos mais precisos sejam realizados em laboratório para diagnosticar a doença.

Os sintomas internos são caracterizados pela presença de pontuações ou estrias avermelhadas, decorrentes da deposição de gomas ou formação de nodos nos feixes do xilema e pela coloração rosa nos tecidos meristemáticos de plantas jovens, localizados na região inferior do nó (STEINDL, 1961; KAO & DAMANN, 1980). No entanto, os sintomas internos são difíceis de serem visualizados após o envelhecimento da planta, devido ao escurecimento e seca dos tecidos. Além disso, estes sintomas não são específicos do RSD, ocorrendo também em função de ataques de outros patógenos, como *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum falcatum*, *Xanthomonas albilineans*, *X. campestris* pv. *Vasculorum* e *Erwinia herbicola* (RICAUD, 1974; TOKESHI, 1980)

Análises de microscopia do feixe vascular revelaram que muitos vasos do sistema vascular da planta são bloqueados por uma substância gomosa, contendo a bactéria, levando assim a uma diminuição da circulação de água e nutrientes na planta, reduzindo a produção (GIGLIOTI, 1997).

2.4 Transmissão

Leifsonia xyli subsp. *xyli* é transmitida por estacas ou colmos-sementes oriundas de plantas doentes. Este mecanismo de disseminação da doença tem sido de grande importância, pois havendo cultivo com material infectado, a doença será facilmente disseminada, visto que como os sintomas da doença não são muito evidentes, a disseminação do RSD através do plantio de material infectado é facilitada.

Plantas saudáveis podem ser facilmente infectadas com o patógeno por inoculação mecânica com extratos de canas doentes. A transmissão ocorre ao usar facões em plantas doentes e em seguida cortar plantas saudáveis (MATSUOKA, 1985). Também são responsáveis pela transmissão da bactéria qualquer outro implemento agrícola de corte, como colheitadeiras e plantadoras de cana-de-açúcar (GILLASPIE & TEAKLE, 1989). Não há relatos da transmissão da doença por insetos (DAVIS, 1980).

Forbes et al. (1960) (citado por MATSUOKA, 1975) verificou na Louisiana (USA), que quando se faz colheita mecânica, de uma percentagem inicial na cana-planta de 5,4% de plantas infectadas, obtiveram 15,6% de plantas contaminadas na soca e na multiplicação daquele material com 5,4% de infecção inicial se obteve uma incidência de 21,2% de raquitismo, dados que indicam a importância desse tipo de disseminação da doença nas sucessivas colheitas e multiplicações.

2.5 Diagnose

Uma das razões do demorado progresso no conhecimento desta interação foi a dificuldade em diagnosticar a doença (MATSUOKA, 1972; RICAUD, 1974). Desde sua descoberta na Austrália, na década de 40, levou-se mais cinco anos para ser efetivamente considerada uma doença transmissível (STEINDL, 1950), e ainda muitos anos depois para se descartar a hipótese de etiologia viral que se tornara senso comum (FORBES et al., 1960; GILLASPIE JR. et al., 1966; GILLASPIE JR. et al., 1966). Na década de 70 foi discutida sua etiologia (GILLASPIE JR. et al., 1973; TEAKLE, 1974), para ao final desta década se estabelecer definitivamente uma bactéria como seu agente causal (DAVIS et al., 1980) e se estabelecer sua identidade (DAVIS et al., 1984). Porém, ainda com dificuldades, os métodos de detecção da presença bacteriana em cana-de-açúcar evoluíram (CHAGAS & TOKESHI, 1994; DAVIS et al., 1994). Logo, com o êxito no cultivo de *L. xyli* subsp. *xyli* em meio de cultivo artificial (DAVIS, 1980) foi possível a produção específica de anticorpos úteis para sua detecção.

Um dos maiores problemas para as pesquisas com raquitismo-da-soqueira, ou mesmo para se avaliar a sanidade das mudas de cana-de-açúcar em áreas de multiplicação, por muitos anos, foi a falta de um método para diagnóstico preciso da doença, uma vez que, os sintomas não são específicos (SANGUINO et al., 1984). Assim, nas pesquisas são necessários métodos para diagnosticar a doença. Desde os anos 70, quando a bactéria foi descrita como agente causal da doença, técnicas de microscopia de contraste de fase ou imunofluorescência têm sido utilizadas para a diagnose (STEINDL, 1976).

Assim, com os avanços da pesquisa nessa área, novas técnicas têm sido utilizadas para a diagnose, como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), EB-EIA (evaporative-binding enzyme-linked immunoassay) (Gillaspie, 1978) e Reação de Polimerase em Cadeia - PCR (Pan et al., 1998), esta última utilizando iniciadores específicos derivados da região 16S e 23S do rRNA (FEGAN, 1998). A técnica de 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 & DE BRUJIN, 1996).

2.6 Métodos de detecção do patógeno

Plantas indicadoras como o Capim elefante (*Pennisetum purpureum*) foram inoculadas com extratos de cana-de-açúcar com suspeita de contaminação por *L. xyli* subsp. *xyli*, ocorrendo então a manifestação de sintomas internos nas plantas de capim causados pela bactéria proveniente de cana-de-açúcar contaminada (MATSUOKA, 1972). Todavia Betti et al. (1980), apontaram uma provável interferência de agentes não relacionados com o RSD na diagnose através deste teste biológico, além do inconveniente aparecimento de sintomas somente após 20 a 30 dias depois da inoculação, o que inviabilizaria o uso rotineiro do método.

O raquitismo-da-soqueira também foi diagnosticado através de exsudado do xilema, empregando-se a microscopia de contraste de fase ou campo escuro, sendo estes testes fáceis, rápidos, mais acessíveis e menos dispendiosos do que microscopia eletrônica (GILLASPIE JR. et al., 1976; STEINDL, 1976; BAILEY, 1977).

Associando a técnica de sorologia com a microscopia eletrônica, foi observado células bacterianas associadas ao RSD, concluindo que essa técnica poderia ser eficiente para a diagnose da doença com sensibilidade maior do que a técnica de microscopia com imersão rápida (DAMANN et al., 1977).

A técnica de imunofluorescência foi utilizada com anti-soro específico, para diagnosticar bactérias em amostras de caldo bruto, mesmo contendo

baixas concentrações da bactéria, constituindo assim um teste mais sensível que a microscopia de contraste de fase na diagnose do raquitismo-da-soqueira (HARRIS & GILLASPIE JR., 1978).

Um método foi desenvolvido para determinar a resistência de variedades de cana-de-açúcar 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 de resistência ao RSD por este método (VALARINI & TOKESHI, 1981).

A autofluorescência de vasos do metaxilema (DAMANN, 1988), é um método que avalia a presença da bactéria pela autofluorescência ou não da parede do metaxilema, após seções do colmo serem tratados com 0,1 M Tris (tris hydroxymethyl aminomethane) e observadas sob microscópio de fluorescência. Guzman e Victoria (1993) observaram que, em algumas variedades, houve autofluorescência do metaxilema sem que a presença da bactéria fosse detectada pelos métodos de imunofluorescência e microscopia de contraste de fase.

Para Chagas e Tokeshi (1988, 1994), a precisão do método de Coloração do Xilema pelo Fluxo Transpiratório pode ser aplicado 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. Pérez et al. (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.

Identificando variedades resistentes com base na densidade populacional da bactéria do RSD, Gillaspie Jr. et al. (1973), estimaram a quantidade de células bacterianas de suco extraído de colmos nas variedades CP44-101, CP65-367, L62-96 e L65-69. A extração foi feita através da moagem dos colmos com seis meses de idade e a contagem bacteriana com auxílio de microscópio de contraste de fase. Assim, os autores sugeriram o uso desse método e concluíram que a parte basal (principalmente os nós) dos colmos continham mais bactéria, e que as amostras poderiam ser conservadas em

baixas temperaturas até duas semanas. Assim, a observação não necessitava ser imediatamente após a extração. O número de bactérias foi diferente entre as variedades e entre as plantas do mesmo cultivar, sendo que canas apresentando sintomas característicos de RSD continham mais bactérias do que aquelas com sintomas indistintos.

A microscopia de contraste de fase ou de campo escuro (GILLASPIE et al., 1976), é uma técnica rápida e barata, mas a bactéria só é detectada sob altos níveis de infecção (superiores a 10^6 células ml^{-1} de extrato).

Em um trabalho, comparando os métodos de microscopia de contraste de fase, isolamento em meio de cultura e reação sorológica (Fluorescent Antibody Stains on Membranes – FASM) na observação da bactéria do RSD em canaviais comerciais da Flórida, foi demonstrado que 79% das amostras de 20 campos comerciais, estavam infectadas pela doença, sendo detectado pelo menos por um destes 3 métodos. Concluíram então, que o FASM foi 20% superior aos outros métodos, além de possuir as características necessárias a todas as técnicas de diagnóstico (sensibilidade, especificidade e confiabilidade) (DAVIS & DEAN, 1984).

Jayarawe e Widanapathirana (1987) utilizaram o microscópio de contraste de fase para estudar o ciclo de vida da bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* e determinaram que a bactéria sobreviveu por mais de 19 dias sobre uma superfície de capim esterilizado e sem nutriente. Relataram também, que o tratamento com água quente não foi efetivo para eliminar a bactéria do RSD. Ainda, segundo os autores, em uma pesquisa realizada na Estação de cana-de-açúcar de Kantale, foi encontrada a incidência de 25% da doença em viveiro primário oriundo de tratamento térmico e no viveiro secundário de 33%.

Harrison e Davis (1988), após muitas pesquisas, procurando um método eficaz para identificar genótipos resistentes ao RSD, apresentaram a técnica que hoje é de grande utilidade em programas de melhoramento de cana-de-açúcar para quantificar a colonização de tecidos vasculares por *Lxx*, conhecida como “Tissue-blot enzyme immunoassay” – TBIA. 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 serológico, feixes vasculares colonizados por *Lxx* são identificados na membrana pela coloração azulada, quando observados através de microscópio estereoscópio. Depósitos coloridos de dimensões similares à de um metaxilema individualizado podem ser observados em membranas processadas. Com o TBIA foi demonstrado que a resistência de variedades de cana-de-açúcar estava associada com uma redução na colonização dos tecidos vasculares do colmo por *Lxx*.

Pelo isolamento em meio de cultura artificial (DAVIS et al., 1980), as colônias são observadas após 14 dias de incubação. Devido a esta demora na obtenção de resultados, o método por ser muito trabalhoso e apresentar alta frequência de contaminantes, não é utilizado na detecção do patógeno para fins de levantamento.

Com base no teste ELISA (Enzyme Linked Imunosorbent Assay), 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 ou em torno de 3 bactérias por campo de microscópio de contraste de fase (GILLASPIE JR. & HARRIS, 1978).

A técnica de ELISA 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. Gillaspie e Harris (1979), relataram possíveis limitações na utilização de ELISA em seus trabalhos, demonstrando baixa sensibilidade, alta absorção de fundo e resultados inconsistentes na detecção de *L. xyli* subsp. *xyli* em cana-de-açúcar. Assim, embora a técnica seja rápida, ela apresenta alto custo e pode gerar resultados falso positivos.

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*). Faz-se lavagens consecutivas e em seguida incuba-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 (HARRISSON & 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. Esta técnica é relativamente barata e apresenta como vantagem o fato da leitura dos resultados ser rápida e direta, sem a necessidade de equipamentos especiais. Apesar da técnica ser menos sensível comparada à imunofluorescência e ao PCR, ela é suficientemente sensível para orientar a necessidade do tratamento térmico do material propagativo (CARNEIRO et al., 2004a).

Outra técnica sorológica é o TB-EIA (Tissue Blot enzyme immunoassay) (HARRISSON & DAVIS, 1988), 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. Esta técnica vem sendo usada para avaliar a resistência de variedades com base no percentual de vasos colonizados (DAVIS et al., 1994; COMSTOCK et al., 1996; COMSTOCK et al., 1997; MILLER et al., 2002; ROS, 2004).

Para Harrison e Davis (1990), a eficiência relativa do “Tissue-blot enzyme immunoassay” e microscopia de fase (MCF) para detectar a bactéria foi 94,7% e 87,8%, respectivamente, comparados com a eficiência do “Fluorescent antibody direct count on filters technique” (FADCF). Devido a sua capacidade de processar amostras múltiplas e praticidade na aplicação, o Dot Blot EIA se torna um meio prático para testar plantas de cana-de-açúcar contra o RSD, em grande escala.

Novas tecnologias de DNA como a PCR resultaram na amplificação de fragmentos do DNA genômico de *Lxx* (Pan et al., 1998; Fegan et al., 1998). Estes autores afirmam que a técnica é mais sensível (10^4 células/ml) do que as técnicas sorológicas (10^4 a 10^5 células/ml) (GILLASPIE & HARRIS, 1979; DAVIS & DEAN, 1994), e também mais sensível do que a visualização da bactéria em extratos fibrovasculares utilizando a microscopia de contraste de fase (10^6 células/ml).

2.7 Métodos de controle

Devido à forma de transmissão da doença, o controle tem sido realizado através de métodos de exclusão, baseados no uso de material sadio para plantio. Utensílios de corte devem ser desinfestados, especialmente quando usados em campos de propagação de material. A desinfestação normalmente é realizada através de produtos químicos como amônia quaternária, solução de ácido cresílico e etanol 50%, podendo também ser realizada através do calor como chama ou água quente (STEINDL, 1961; TEAKLE, 1983; GILLASPIE JR. & TEAKLE, 1989).

O tratamento térmico dos colmos-sementes ou estacas através de calor (vapor ou água quente) a 52°C por 30 minutos e ou 50,5 °C por 2 horas é também muito utilizado (SANGUINO, 1989) para produzir material sadio a ser utilizado no estabelecimento de viveiros livres da doença e de campos comerciais (TOKESHI, 1997).

A interação da produção de mudas sadias de variedades resistentes e, descontaminação de instrumentos de corte é sugerida porque o tratamento térmico de toletes não é 100% eficiente, persistindo um residual de bactérias ativas dentro dos colmos tratados (GILLASPIE JR & TEAKLE, 1989). A partir desse residual, devido à alta infectividade do caldo de colmos doentes, a doença apresentará uma rápida evolução para áreas vizinhas, ou dentro do talhão, para as soqueiras subseqüentes. Além disso, muitas vezes essas medidas de controle não são devidamente conduzidas ou sequer utilizadas. Nestes casos, o uso de variedades com a capacidade de limitar a freqüência de infecções, a intensidade da colonização de seus tecidos por *Lxx* e os danos decorrentes deste ataque consiste na única maneira de controlar eficientemente o RSD.

Assim, a maioria dos programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar estão, se não envolvidos, pelo menos preocupados com a execução de atividades de rotina para a obtenção de variedades resistentes ou tolerantes a esta doença (GIGLIOTI, 1997).

Um método de controle mais eficiente e moderno, que garante uma maior recuperação da produtividade frente aos métodos de controle tradicionais, utiliza plantas matrizes comprovadamente sadias (indexadas)

como base para a multiplicação de mudas de alta sanidade. Para se obter tais plantas matrizes, combinam-se o tratamento térmico com o cultivo de meristemas, aplicando-se um processo cuidadoso de limpeza associado a um método de diagnóstico de alta sensibilidade (MATSUOKA et al., 1999).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização do Local

Para o levantamento da incidência de *Lxx* no Noroeste do Paraná, foram selecionadas áreas de produção de cana-de-açúcar, com produção destinada a duas unidades produtoras de açúcar e álcool da região, e com histórico de queda progressiva de produção.

As amostras foram obtidas de lavouras comerciais de cana-de-açúcar pertencentes às usinas COOPERVAL – Cooperativa Agroindustrial Vale do Ivaí LTDA no município de Jandaia do Sul e da USACIGA – Açúcar, Álcool e Energia Elétrica LTDA de Cidade Gaúcha – PR.

3.2 Solo

As classes de solos predominantes das lavouras comerciais onde as amostras foram obtidas na usina Cooperval é o Latossolo vermelho distroférico, Latossolo vermelho eutroférico e parte de Nitossolo vermelho eutroférico. Na usina Usaciga predominam as classes Latossolo vermelho distrófico e Latossolo amarelo distrófico.

3.3 Clima

O clima da região é o Cfa, segundo a classificação de Köppen, apresenta clima subtropical, temperatura média no mês mais frio inferior a 17°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, precipitação média anual de 1200 e 1500 mm (IAPAR, 1994). Os dados de temperatura e precipitação durante a realização do trabalho estão representados na Figura 1.

Foram selecionados canaviais com no mínimo 9 meses de idade, sendo que cada amostra foi constituída de 25 a 45 colmos de uma variedade, independente do tamanho do talhão. As amostras foram obtidas em cada linha de plantio de cana-de-açúcar, espaçadas entre si de 5 em 5 linhas. Ao se entrar na linha, foi percorrida uma distância de 100 metros, coletando-se uma amostra a cada 10 metros, retornando-se ao ponto de entrada na linha. Os colmos foram quebrados manualmente em sua base e não cortados, evitando-se os colmos com qualquer tipo de injúria ou doença visível, nos três primeiros entrenós da base, procurando fazer a coleta do colmo mais velho da touceira, evitando-se os brotões. As amostras foram identificadas quanto à origem, variedade, talhão e corte, sendo amarradas, ensacadas e levadas ao laboratório para extração da seiva de cada colmo constituinte da amostra.

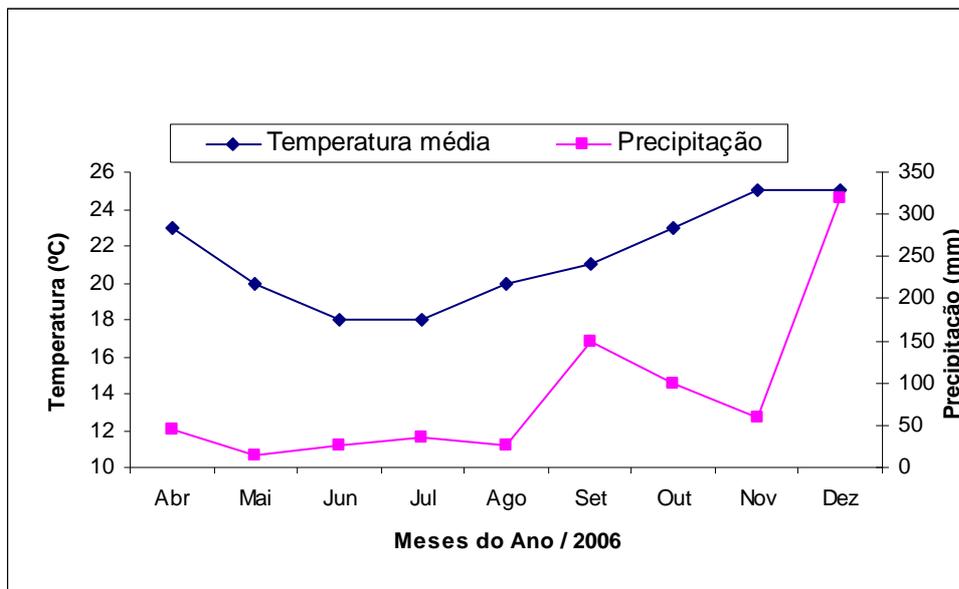


Figura 1: Dados climatológicos de temperatura média e precipitação no período de Abril a Dezembro de 2006. Estação Meteorológica IAPAR / SIMEPAR.

3.4 Descrição das variedades e clones analisados

As cultivares utilizadas neste trabalho estão adaptadas à região Noroeste do Estado do Paraná, pois as condições de clima e solo são propícias para o cultivo da cana-de-açúcar, e por consequência para estas cultivares, uma vez que a sua adaptação já foi obtida para esta região produtora. A seguir serão descritas as cultivares utilizadas no presente trabalho, segundo PMGCA Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar, Departamento de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de São Carlos – SP.

Nas amostragens foram escolhidas prioritariamente 8 variedades mais cultivadas na região e 2 clones promissores (Tabela 1). As coletas foram realizadas no período de Maio-Junho e Outubro-Novembro de 2006.

Tabela 1: Relação de 8 variedades e dois clones de cana-de-açúcar cultivadas no noroeste do Paraná e amostradas para avaliação de incidência de *L. xyli* subsp. *xyli*

VARIEDADE
RB72454
RB835089
RB855536
RB835486
RB835054
RB845257
RB855156
SP77-5181
CL RB946903
CL RB956911

3.4.1 RB72454

Destaca-se por apresentar produtividade alta em cana-planta e cana-soca, rendimento agroindustrial alto, exigência em fertilidade do solo baixa, adaptabilidade ampla e estabilidade de produção alta. Apresenta potencial médio de brotação de soqueira e, por isso sua colheita não é recomendável nos meses secos e frios, especialmente nos solos argilosos. Uma das

melhores opções para ambientes de baixo potencial de produção, especialmente quando em solos de textura arenosa.

3.4.2 RB835089

Apresenta produtividade alta em cana-planta e cana-soca, rendimento agroindustrial alto, exigência em fertilidade do solo baixa, adaptabilidade ampla e estabilidade de produção alta. Apresenta potencial médio de brotação de soqueira e, por isso sua colheita não é recomendável nos meses secos e frios, especialmente nos solos argilosos. Alta produtividade agrícola e longevidade. Adaptação a regiões com outono-inverno de temperaturas mínimas mais rigorosas, o que propicia melhor maturação.

3.4.3 RB855536

Destaca-se por apresentar produtividade alta em cana-planta e cana-soca, rendimento agroindustrial alto, exigência em fertilidade do solo baixa, adaptabilidade e estabilidade de produção alta. Apresenta potencial bom de brotação de soqueira. Alta produtividade agrícola e industrial em ambientes de produção favoráveis, sendo exigente no ambiente. Ótima brotação de soqueira, mesmo sob colheita mecanizada e sob palha.

3.4.4 RB835486

Variedade com retorno econômico superior às demais quando corretamente manejada. Apresenta produtividade alta em cana-planta e cana-soca, baixa exigência em fertilidade do solo, adaptabilidade ampla e estabilidade de produção alta. Boa brotação das socas, mesmo na seca, tanto em colheita manual como mecanizada. Altíssima riqueza e qualidade industrial. Longevidade de cortes.

3.4.5 RB835054

Opção de variedade precoce para ambientes de médio à alto potencial de produção Destaca-se por apresentar produtividade alta em cana-planta e cana-soca, rendimento agroindustrial alto, exigência em fertilidade do solo baixa, adaptabilidade ampla. Apresenta potencial médio de brotação de soqueira. Bom comportamento como cana de ano em função de sua riqueza e crescimento rápido. Bons rendimentos agroindustriais em área de vinhaça.

3.4.6 RB845257

Alta produtividade em cana-planta e cana-soca, rendimento agroindustrial alto, exigência em fertilidade do solo baixa, mas possui alta exigência em disponibilidade de água. Adaptabilidade restrita e estabilidade de produção regular. Apresenta potencial médio de brotação de soqueira. O porte ereto e colmos pesados proporcionam alta densidade de carga, o que torna vantajoso seu plantio em distâncias maiores da fábrica. Alto teor de sacarose. Perdas de produtividade ao longo dos cortes.

3.4.7 RB855156

Apresenta produtividade alta em cana-planta e cana-soca, rendimento agroindustrial alto, exigência em fertilidade do solo baixa, adaptabilidade alta e boa estabilidade de produção. Boa produtividade agrícola, mesmo em ambientes restritivos de produção, especialmente nas socas. Resistência à seca.

3.4.8 SP77-5181

Esta se mostra muito exigente para o tipo de solo e umidade, na seca dá entrenós curtos e é suscetível à broca, possui uma maturação precoce, a brotação de soca se mostra lenta e irregular, não suportando pisoteio.

3.4.9 CL RB94690

Apresenta boa produtividade em cana-planta e cana-soca, rendimento agroindustrial alto, exigência em fertilidade do solo média, restrita adaptabilidade e boa estabilidade. Desenvolvimento médio e fechamento de entrelinhas bom com hábito de crescimento ereto. Colmos de diâmetros médios grossos.

3.4.10 CL RB956911

Apresenta boa produtividade em cana-planta e cana-soca, rendimento agroindustrial médio alto, exigência em fertilidade do solo média, restrita adaptabilidade e boa estabilidade. Desenvolvimento médio e fechamento de entrelinhas bom com hábito de crescimento ereto. Colmos de diâmetros médios.

3.5 Extração da Seiva

As etapas do trabalho foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Estadual de Maringá – Paraná.

Das amostragens constituídas por 45 colmos, foram selecionados ao acaso, 20 a 40 colmos para a extração da seiva, pois segundo Ponte (2006), a amostragem composta por 21 colmos é considerada satisfatória em levantamentos de campo.

Para extração da seiva do xilema (Figura 2) foram utilizados segmentos do segundo ou terceiro internódios basais, retirando-se com auxílio de um

furador de rolhas, um cilindro de aproximadamente um centímetro de diâmetro e 10 cm de comprimento da região central de cada colmo. Os cilindros foram acondicionados em tubos plásticos de microcentrífuga de 1,5 ml, centrifugados por 5 minutos, a 12.000 rpm em uma microcentrífuga Hsiangtai® e o extrato resultante foi armazenado a -20°C, conforme metodologia sugerida por Carneiro et al (2003).

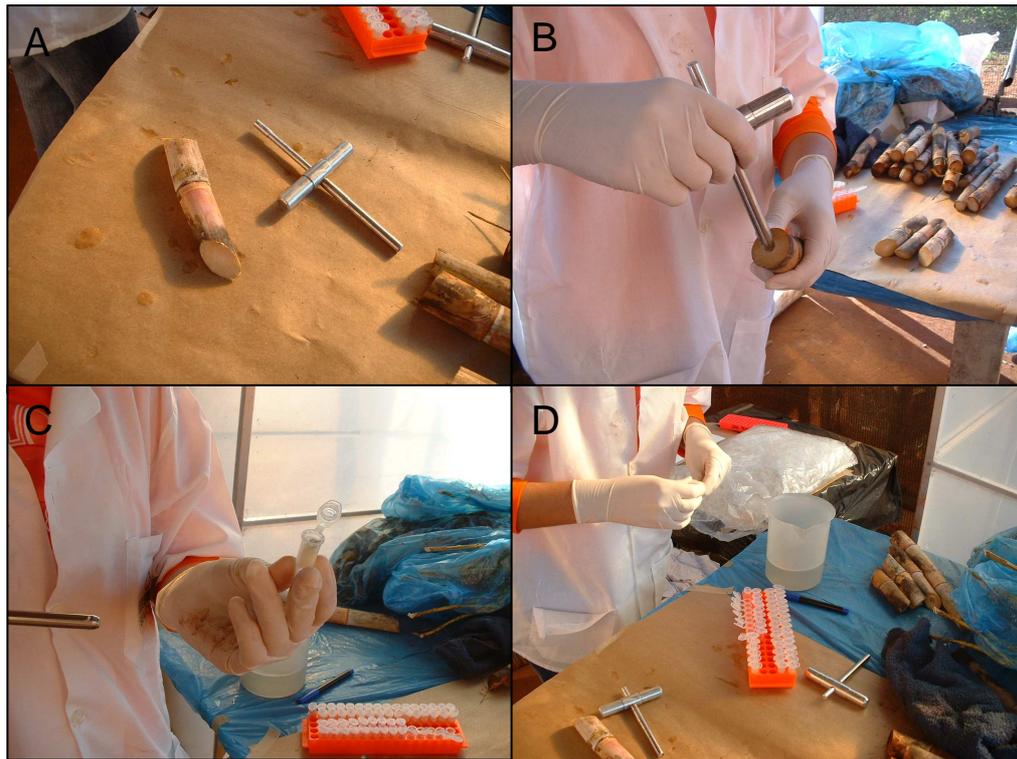


Figura 2: Método de extração da seiva das amostras de cana-de-açúcar: (A) amostra de colmo de cana-de-açúcar e extrator tipo furador de rolhas. (B) Extração do tecido fibrovascular. (C) Amostra em tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. (D) Amostras prontas para microcentrifugação.

3.6 Ensaio Sorológico

Nos ensaios sorológicos foi utilizada a técnica de Dot Blot EIA (“Dot Blot Enzyme Immunoassay”), (HARRISON & DAVIS, 1986) modificada conforme Carneiro et al. (2004b). Utilizou-se anti-soro policlonal específico contra *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* produzido e testado por Carneiro et al., (2004b) e alíquotas do mesmo anti-soro, cedidas pelo professor Paulo Gagliardi (UFSCar-Araras). Antes da fixação dos extratos nas membranas de

nitrocelulose de 0,2 micron, os mesmos foram descongelados a temperatura ambiente. Cada membrana recebeu um total de 96 amostras, sendo que seis destas eram correspondentes aos padrões de comparação, e as 90 restantes, correspondentes às amostras de cada talhão. Os padrões consistiram de suspensões de bactérias *L. xyli* subsp. *xyli* pura, seiva de cana doente das variedades CB 49 2606 e SP70-1078 cuja presença da bactéria foi confirmada em ensaio sorológico prévio, seiva de cana doente diluída 10 vezes em água destilada e somente água destilada (padrão negativo) (Figura 3).

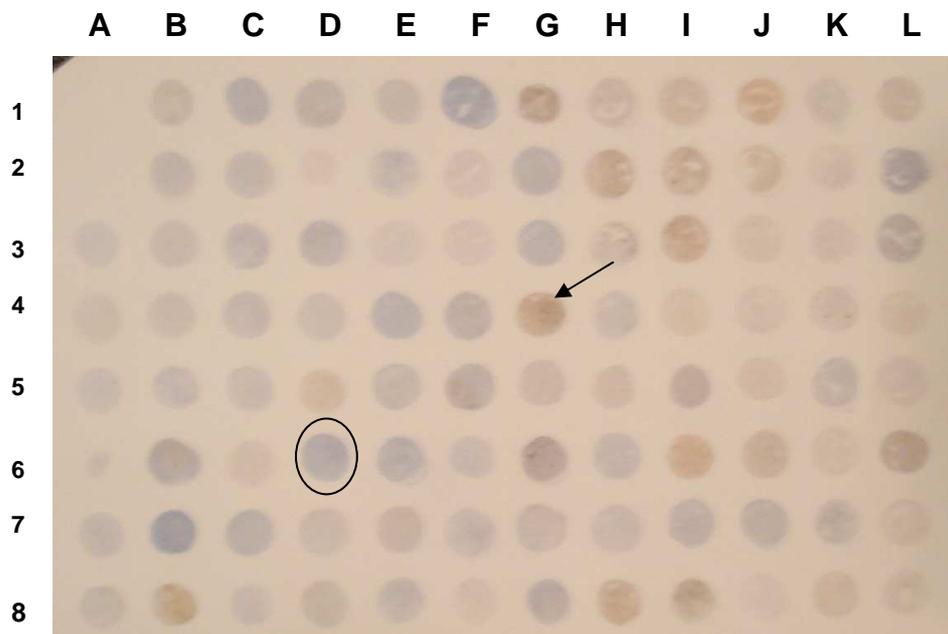


Figura 3: Seleção de amostras infectadas por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* para uso nos ensaios "Dot Blot" com cana-de-açúcar do noroeste do Paraná. As diferentes tonalidades de azul representam amostras infectadas (círculo). A seta indica uma amostra negativa.

- 1) O ensaio sorológico iniciou-se com a hidratação da membrana de nitrocelulose (Sigma[®]) em água ultra pura (Mili-Q), por 10 min.
- 2) Sob bomba de vácuo, foi aplicada na membrana 12 µl de cada amostra.
- 3) Em seguida, bloqueou-se a membrana por 60 min em solução tampão TS (Tris 100mM, NaCl 1,5 M, Tween-20 0,5% pH 7,4) com 0,3% de leite desnatado em pó (Molico[®]).
- 4) Após, a membrana foi lavada em solução TS, por três vezes, durante 10 min cada.

- 5) Após a lavagem, 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).
- 6) Após esse período, lavou-se a membrana em tampão TS, por três vezes, durante 10 min cada.
- 7) Em seguida a membrana foi incubada por 120 min na presença de anticorpo de cabra contra IgG de coelho, conjugado a 15 fosfatase-alcalina (Sigma Chemical Co. [®]), diluído 1: 2.000 em solução tampão TS com 0,1% de leite em pó.
- 8) A membrana foi, então, lavada por três vezes em solução TS e por 15 minutos em solução tampão PBS fosfato 1M salino (NaCl 0,8%).
- 9) O processo sorológico foi finalizado incubando-se (no escuro) a membrana por 20 min em solução reveladora (Naphthol-as-phosphate 0,3g, N, N Dimethyl formamide 5ml, Tris-base 24g, Fast blue 0,1g, pH 9,1).
- 10) Após a incubação, a membrana foi lavada por 30 min em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v) para remoção de manchas residuais. Todo o processo sorológico foi conduzido sob agitação (60 rpm), à temperatura ambiente.
- 11) As amostras que apresentaram coloração azul são positivas.

3.7 Obtenção do DNA Genômico

Para extração do DNA de *L. xyli* subsp. *xyli*, a ser utilizado nas reações de PCR, foi utilizado o fluído extraído das amostras de cana-de-açúcar as quais já haviam sido analisadas anteriormente pelo método "Dot Blot".

Foram utilizados 100 µl de fluido centrifugado a 12.000 rpm durante 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionados 100 µl de água ultra pura (Mili Q) e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µl de água ultra pura (Mili Q) e centrifugado pela última vez, descartando-se o sobrenadante. Em seguida adicionou-se 100 µl de água ultra pura (Mili Q) e levado ao vortex para ressuspender o pellet. Para finalizar foi realizado o choque térmico, sendo a amostra aquecida por 2 min em água fervente e transferida para gelo por 10 min. A amostra foi mantida a -20 °C,

para posterior utilização no protocolo de PCR, segundo TAYLOR et al., 2003.

3.8 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Nas reações de PCR, foram utilizados os oligonucleotídeos Lxx 23SF e Lxx 23SR (GAGLIARDI, 2003) e também os oligonucleotídeos C2F e C2R (TAYLOR et al., 2003).

Com os oligonucleotídeos Lxx 23SF e Lxx 23SR, foi utilizado o protocolo de PCR conforme Pan et al. (1998) com modificações por Gagliardi (2003), onde foram adicionados 3 µl de DNA das amostras (aproximadamente 50 ng) em microtúbulos contendo 2,5 µl de tampão buffer 10X, 1,0 µl MgCl₂ 50mM, 2,0 µl dNTPs 10mM, 0,2 µl Taq DNA polimerase (5 unidades/l), 2,0 µl primer Lxx 23SF (5'- ACCTCCTTTCTAAGGAGC-3') e 2,0 µl Lxx 23SR (5'- TGAATTGATCGGCTCACC-3'), desenhados a partir da região 23S do RNA ribossômico (GAGLIARDI, 2003), totalizando um volume final da reação de 25 µl.

As reações foram realizadas em um termociclador Biômetra® utilizando os seguintes ciclos: um ciclo inicial à 94°C por 5 min, 40 ciclos de desnaturação à 95°C por 30 segundos, hibridização a 57°C por 1 min. e extensão a 72°C por 1,5 min, e um ciclo final de extensão a 72°C por 3 min. Parte do produto amplificado (8 – 10 µl) foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 3,0% em tampão TBE 1X (Tris-base 50mM, ácido bórico 50 mM e EDTA 1 mM – pH 8,5) a 85 V. o gel foi corado com brometo de etídio (5 µg/ml) e fotografado. O tamanho dos fragmentos amplificados foram estimados com base em comparações com marcador molecular de 100pb DNA *Ladder* (Invitrogen®).

Nas ampliações com os oligonucleotídeos Lxx C2F e Lxx C2R foi utilizado o protocolo segundo Taylor et al. (2003): 3 µl de DNA das amostras em microtúbulos contendo 2,5 µl de tampão buffer 10X, 2,5 µl de MgCl₂ 50mM, 4 µl de dNTPs 10mM, 1 µl de Taq DNA polimerase (5 unidades/l), 2 µl primer Lxx C2F (5' – CGAGTTTGGGTTTCTGCCTGC - 3'), 2 µl Lxx C2R (5' – AGGTGGCAGCGACAACGGTGC - 3'), totalizando um volume final de 20 µl. A reação foi conduzida utilizando os seguintes ciclos: um ciclo inicial à 96°C por 5

min, 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 15 segundos, hibridização à 57°C por 30 seg. e extensão à 72°C por 30 seg, com um ciclo final de extensão à 72°C durante 10 min. Parte do produto amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 3,0% em tampão buffer 3,0% em tampão TBE 1X (Tris-base 50mM, ácido bórico 50 mM e EDTA 1 mM – pH 8,5) a 85 V. o gel foi corado com brometo de etídio (5 µg/ml) e fotografado. O tamanho dos fragmentos gerados foram estimados com base em comparações com marcador molecular 100pb DNA *Ladder*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Paraná, existem suspeitas de que a queda de produtividade verificada em determinadas áreas de plantio esteja relacionada à ocorrência do raquitismo, segundo relatos de técnicos responsáveis pelos setores de produção das usinas.

Nos períodos de Maio a Junho e de Novembro a Dezembro de 2006, foram amostradas 32 propriedades no noroeste do Estado. As amostras foram obtidas em 50 talhões, cultivados com 9 variedades e 2 clones, a partir de plantas com diferentes épocas de corte, perfazendo o total de 1395 amostras, que foram analisadas pelo teste sorológico “Dot Blot” (Tabela 2)

Tabela 2: Relação das variedades amostradas e resultados das análises “Dot Blot” nas áreas de produção de duas usinas do noroeste do Paraná.

Data	Variedade	Local	Corte	Amostras positivas/ Total de amostras
16/05/06	RB72454	Faz. São Lucas	3º	0/40
16/05/06	RB72454	Sítio Orsi	4º	0/40
16/05/06	RB72454	Sítio Gasparelo	5º	0/30
16/05/06	CL RB946903	Faz. Santa Helena	C. planta	0/30
16/05/06	CL RB946903	Faz. Jade	1º	0/30
16/05/06	CL RB946903	Faz. Jade	2º	0/30
16/05/06	RB855536	Faz. Jataí	2º	0/25
16/05/06	RB855536	Faz. Jataí	4º	0/25
16/05/06	CL RB956911	Faz. Jade	1º	0/25
16/05/06	CL RB956911	Faz. Jade	2º	0/25
17/05/06	RB855156	Faz. Santa Lucia	C. planta	0/20
17/05/06	RB855156	Sítio Itapuã	1º	0/20
17/05/06	RB855156	Faz. Jade	2º	0/20
17/05/06	RB855156	Faz. Santa Lucia	3º	0/25
17/05/06	RB855156	Sítio Prado	4º	0/25
17/05/06	RB855156	Sítio Sassa	5º	0/25
05/06/06	RB835089	área da usina	2º	0/25
05/06/06	RB72454	área da usina	C. planta	0/30
05/06/06	RB855536	área da usina	3º	0/20
05/06/06	RB835486	área da usina	2º	0/20
07/06/06	RB855536	Faz. Aparecidinha	5º	0/20
07/06/06	RB72454	Faz. Aparecidinha	5º	0/20
07/06/06	RB835089	Faz. Noivos	6º	0/25
07/06/06	RB867515	Faz. Riacho Azul	2º	0/25
09/10/06	RB855536	Faz. Tapiruçu	3º	0/40
09/10/06	RB72454	Faz. Tapiruçu	6º	0/40
09/10/06	RB835089	Faz. Tapiruçu	6º	0/40
09/10/06	RB835054	Faz. Tapiruçu	6º	0/40
09/10/06	RB835089	Faz. Ciriaco	6º	0/25
09/10/06	RB845257	Faz. Eloi Catani	5º	0/25
09/10/06	RB855536	Faz. Fernando Catani	5º	0/25
11/10/06	RB72454	Faz. São José	5º	0/30
11/10/06	RB72454	Faz. 6 irmãos	5º	0/30
11/10/06	RB72454	Faz. Santana	4º	0/30
16/10/06	RB72454	Faz. N. S. Aparecida	4º	0/30
16/10/06	RB72454	Sítio São José	3º	0/30
16/10/06	RB72454	Sítio Rabelo	5º	0/30
23/10/06	RB72454	Faz. Jade	3º	0/30
23/10/06	SP77-5181	Faz. Jade	3º	8/30
23/10/06	RB72454	Faz. Jade	3º	0/30
24/10/06	SP77-5181	Faz. Jade	3º	6/30
24/10/06	RB72454	Faz. Maravilha	1º	0/30
24/10/06	RB72454	Faz. Santa Amélia	2º	0/30
24/10/06	RB72454	Sítio Bom Sucesso	2º	0/30
24/10/06	RB72454	Sítio Santa Amélia	2º	0/30
26/10/06	RB72454	Sítio Maralino	2º	0/30
26/10/06	RB72454	Faz. Carmona	3º	0/30
26/10/06	RB72454	Sítio Marumbi	4º	0/30
26/10/06	RB855536	Sítio Santa Laura	1º	0/30
Total				14/1395

Apesar da sua importância, faltam referências sobre a determinação de métodos de amostragem para a quantificação do raquitismo-da-soqueira no campo. Para a detecção do patógeno, não há um padrão definido de amostragem de colmos, independente do método de detecção empregado. O número de amostras a serem coletadas e os procedimentos de entrada no talhão são definidos arbitrariamente, a critério do investigador. O Centro de Tecnologia canavieiro COPERSUCAR (CTC), por exemplo, recomenda coletar 100 colmos ao acaso por talhão independente da extensão deste, que na cultura da cana-de-açúcar, pode variar entre um e dez hectares. Recentemente, Ponte (2006) propôs um plano de amostragem e um número mínimo de colmos a serem coletados para a detecção de *Lxx*, consistindo na coleta de 21 colmos/linha/talhão, sendo três linhas por talhão. Provavelmente, independentemente do método de coleta utilizado, os resultados obtidos neste trabalho, não seriam diferentes, considerando-se que a incidência de *Lxx* nas amostras analisadas tenha sido muito baixa, ou seja, dos 1395 colmos testados através do ensaio “Dot Blot”, apenas 14, ou 1%, apresentaram-se infectados.

Pelos resultados apresentados na Tabela 2, em relação a variedade SP 77-5171, tendo como base os estudos de Sanguino (1998) que estimou uma perda média de 0,4% na produtividade para cada 1% de incidência da bactéria. Se considerarmos uma produtividade média de 75 t/ha, para o nível de infecção de 20 a 26% constatado para a variedade, poderíamos projetar com base neste estudo, uma perda média de 6,0 a 8,0 t/ha.

Segundo Chaves et al. (2002), em trabalhos desenvolvidos na região Nordeste do país, utilizando-se do teste sorológico “Dot Blot”, foram constatados altos índices de incidência de *Lxx* na variedade SP79-1011, 11 e 18% no Estado do Rio Grande do Norte e Pernambuco, respectivamente. No presente trabalho, a variedade SP77-5181 foi amostrada, sendo que a bactéria foi detectada em 14 de um total de 60 colmos, de uma mesma propriedade. Também foram amostrados 1340 colmos de variedades RB, nas quais a bactéria não foi detectada. Todavia, em um levantamento realizado por Ponte (2006) durante 2 anos, com aproximadamente 6000 amostras nos Estados do Espírito Santo, Bahia e Minas Gerais, totalizando 108 talhões, tanto variedades RB como SP, apresentaram expressivo índice de incidência (IC) da bactéria, como SP 79-1011 com IC=11,6%, RB855536 com IC=16,66% e RB72454

IC=3,5%.

No levantamento realizado por Ponte (2006), *Lxx* foi detectada nas variedades RB855536, RB72454, RB835054 e RB835089, e no presente trabalho não houve a detecção da bactéria nessas mesmas variedades. Uma possível explicação para este fato, poderia ser o bom estado fitossanitário apresentado pelo material propagativo que foi utilizado nos viveiros primários das usinas do Paraná, embora segundo informações obtidas, este material não tenha passado por tratamento térmico. Deste modo, o decréscimo na produção nessas áreas, que tem sido verificado ano após ano, talvez esteja relacionado a outros fatores, climáticos, ou do solo, e não devido à bactéria. Sabe-se que a cana-de-açúcar desenvolveu naturalmente, ao longo de sua evolução, a resistência horizontal para a maioria das suas doenças (MATSUOKA et al., 1999) e que o ambiente nas variedades comerciais tem capital importância no comportamento produtivo.

Apesar de preliminares, os resultados desse trabalho poderiam indicar a ausência de *Lxx* nas áreas amostradas com variedades RB, e sua alta incidência IC= 23% na variedade SP77-5181 amostrada.

Segundo Segato (2006), em função do ambiente de produção, a variedade SP77-5181 encontra-se classificada como responsiva, onde se tem grande resposta a uma condição favorável de cultivo, mas que esta não se adapta a ambientes mais restritos, assim, poderíamos supor que devido a fatores edafoclimáticas desfavoráveis para esta variedade, a mesma poderia ter sofrido algum tipo de estresse causado por estes fatores, que a condicionaram à susceptibilidade a *Lxx*, que poderia estar presente no solo, ou até mesmo em restos de toletes de cortes anteriores, pois segundo Kimati et al. (2005) na ausência da cultura, a bactéria pode permanecer infectiva em restos de toletes e no solo por vários meses, sendo necessário deixar transcorrer entre três a seis meses antes de um novo plantio.

Para se considerar como verdadeira a afirmação da ausência de *Lxx* nas variedades e clones RB, e dentro de uma margem de erro aceitável, futuras amostragens nestas mesmas áreas, devem consistir de no mínimo três linhas de plantio com 21 colmos/linha/talhão, para um erro de 10%, o que seria considerado satisfatório para levantamentos de campo e sob altos níveis de incidência da bactéria, superiores a 10%. E para uma margem de erro de 1 a

5%, o número de linhas a serem coletadas num mesmo talhão, deverá ser elevado para 13 (para um erro de 5%) ou 314 (para um erro de 1%), se o índice de incidência da bactéria no campo for inferior a 10%, isto segundo Ponte (2006). Considerando estes parâmetros, poderíamos concluir que *Lxx* pode estar presente nas áreas cultivadas com as variedades RB, e com uma incidência abaixo de 10%, não sendo possível a sua detecção com o padrão de amostras utilizado neste trabalho. Portanto, para que a probabilidade estatística de sua detecção seja ampliada, futuras amostras deverão ser constituídas de um número de linhas/talhão maior do que o realizado.

Deve-se considerar que o tamanho da amostra depende do objetivo do levantamento, dos níveis de acurácia e precisão desejados além da disponibilidade de recursos (AMORIM, 1995). Sendo o raquitismo-da-soqueira uma epidemia poliética, ou seja, a intensidade da doença aumenta a cada ciclo de cultivo, sugere-se então que o tamanho da amostra diminua com o acréscimo no número de colheitas. No entanto, para estabelecer um número de amostras confiável para cada ciclo de cultivo e que satisfaça as mais diversificadas situações, se faz necessário um plano de amostragem em diferentes variedades de diferentes idades de corte a fim de se chegar a um denominador mínimo que atenda tanto a um plano de controle fitossanitário e que seja exequível.

Trabalhos subseqüentes de inoculação artificial da bactéria nestas mesmas variedades poderão elucidar em definitivo se estas variedades são resistentes a *Lxx* nas condições edafoclimáticas do noroeste do Paraná, uma vez que a bactéria está presente na região, conforme evidenciado através da sua detecção sorológica na variedade SP77-5181 (Figura 3) embora aparentemente, não se encontre amplamente disseminada.

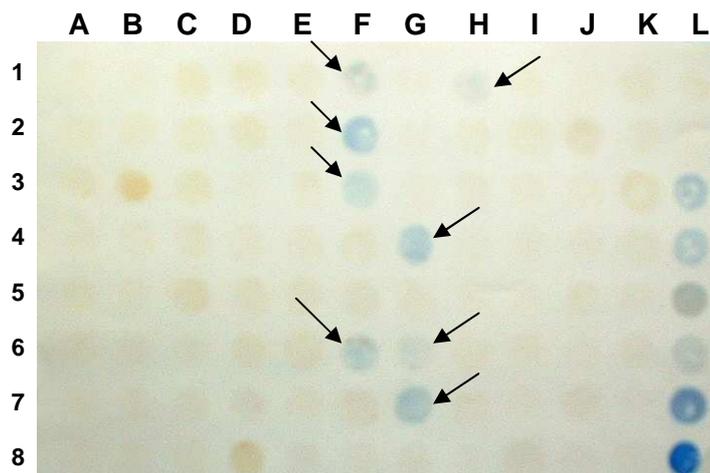


Figura 4: Resultado de um dos experimentos “Dot Blot” com amostras de cana-de-açúcar do noroeste do Paraná (RB72454 e SP77-5181). As setas indicam reação positiva para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em oito colmos da SP77-5181. Os pontos L3 a L7 representam controles positivos previamente selecionados de cana-de-açúcar infectadas, e L8, bactéria purificada.

A infecção da variedade SP77-5181 por *Lxx* também pôde ser comprovada através da amplificação por PCR com dois pares de oligonucleotídeos específicos para uma região do DNA genômico (Fig. 4). Todavia foi observado que mesmo nas amostras de colmos infectados utilizadas como controle positivo, não se verificou reproducibilidade de amplificação, talvez devido à ação de inibidores presentes nos tecidos fibrovasculares da cana-de-açúcar, como já observado anteriormente por Pan et al., (1998).

Deve-se considerar que a técnica de PCR apresenta maior sensibilidade que os métodos sorológicos para a detecção de *Lxx* (TAYLOR et al., 2003). No entanto, diversos autores relatam desvantagens no uso rotineiro da técnica, pois esta apresenta maior custo por amostra, além da possibilidade de ocorrência de contaminações exógenas e de falsos positivos (IGLESIA et al., 2003).

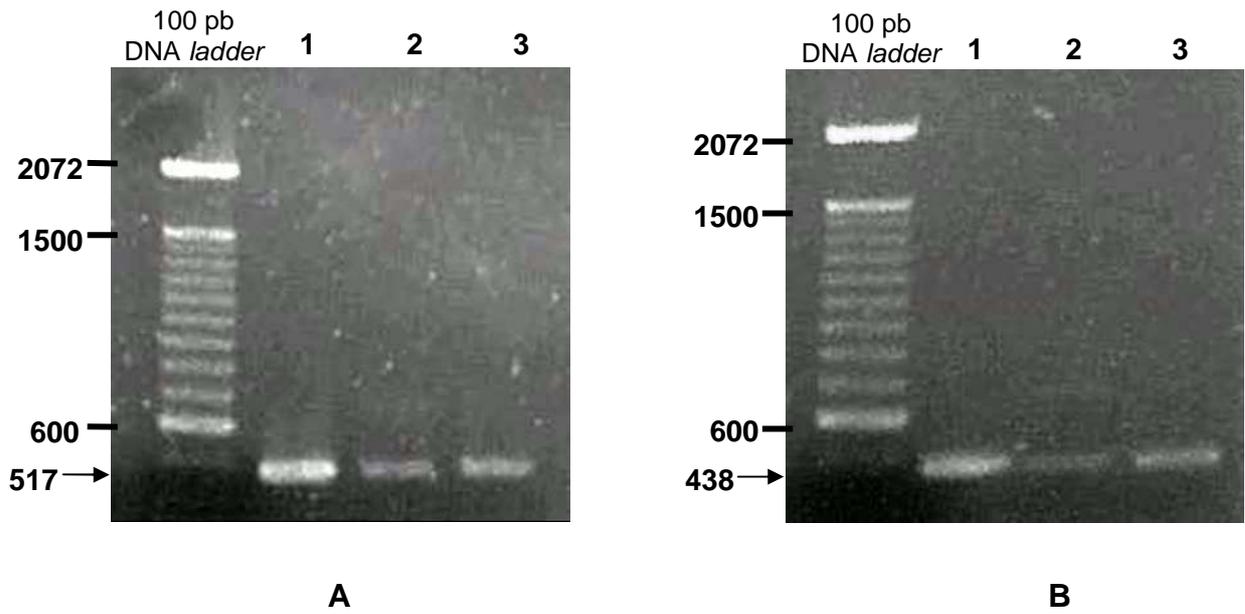


Figura 5: Resultados de ensaios de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* com amostras da SP77-5181. A - Amplificações com os oligonucleotídeos C2F e C2R: 1 – produto de amplificação da bactéria purificada, 2 e 3 produtos de amplificação a partir de SP77-5181. B- Amplificações com os oligonucleotídeos 23SF e 23SR: 1 – produto de amplificação da bactéria purificada, 2 e 3 produtos de amplificação a partir de SP77-5181.

5 CONCLUSÕES

Foi possível detectar a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* ocorrendo em infecção natural em uma área de plantio comercial de cana-de-açúcar no noroeste do Paraná.

A bactéria foi encontrada na variedade SP77-5181 analisada, e não foi encontrada nas amostras de 8 variedades e 2 clones RB.

Os resultados obtidos permitem afirmar que ocorre a incidência de *Lxx* no noroeste do Paraná, e aparentemente a mesma não está amplamente disseminada.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. Anuário estatístico da agricultura Brasileira. São Paulo: **FNP. Consultoria e Comércio**, p. 261-277, 2005.
- AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: Bergamim Filho, A., Kimati, H., Amorim, L. (eds.) **Manual de Fitopatologia**. v.1, p. 647-671, 1995.
- ANON. Sugarcane diseases in South Africa. In: **The South African Sugar Association Experiment Station**. Mt. Edgecombe, South Africa: Boletim 9, 1980.
- ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE ÁLCOOL E AÇÚCAR DO ESTADO DO PARANÁ – ALCOPAR. Disponível em: < <http://www.alcopar.org.br> >. Acesso em: 06 de janeiro de 2006.
- 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.
- BETTI, J. A.; COSTA, A. S.; PARADELA FILHO, O.; SOAVE, J.; MATSUOKA, S. Descoloração vascular na região dos nós em capim-elefante causada por várias espécies de bactéria. **Fitopatologia Brasileira**. v. 6, p.139-147, 1980.
- BRIEGER, F. A. **Recomendações para o plantio da cana-de-açúcar**. São Paulo. Cooperativa Oeste do Estado de São Paulo, Boletim n.10, 1962.
- CARNEIRO, J. B.; SILVEIRA, S. F.; DE SOUZA FILHO, G. A.; OLIVARES, F. L.; GIGLIOTI, E.A. Especificidade de anti-soro policlonal à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 614-619, 2004.
- CARNEIRO, J. B.; PONTE, E. C.; SILVEIRA, S. F.; OLIVARES, F. L. **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. p.116-117, 2003.
- CARNEIRO, J. B.; PONTE, E. C.; SILVEIRA, S. F. Levantamento fitossanitário da região norte capixaba e oeste mineiro. **Fitopatologia brasileira** (Suplemento). In: XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia. p.191, 2004a.
- CARNEIRO, J. B.; SILVEIRA, S. F.; SOUZA FILHO, G. A.; OLIVARES, F. L.; GIGLIOTI, E. A. Especificidade de anti-soro policlonal a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 614-619, 2004b.
- CARVALHO, A. P. Solos do arenito caiué. In: PEREIRA, P.P.; FERREIRA, M.E.; PESSOA DA CRUZ, M.C., eds. **Solos altamente susceptíveis à erosão**. Jaboticabal, FCAVUNESP/SBCS, p.39-49, 1994.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. (Ed). Ecofisiologia de culturas extrativas: cana-de-açúcar: **Seringueira: Coqueiro: Dendezeiro e Oliveira**. 138p, 2001.

CHAGAS, P. R. R.; MATSUOKA, S. Medidas de controle do raquitismo-da-soqueira. **Brasil Açucareiro**, v. 106, n. 1, p. 40-44, 1988.

CHAGAS, P. R. R.; TOKESHI, H. Método alternativo de coloração do xilema para a avaliação do índice de contaminação do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 4, p.16-25, 1988.

CHAGAS, P. R. R.; TOKESHI, H. Comparison between methods for diagnosis of ratoon stunting disease: I. Water flow, flow and staining by transpiration. Festschrift, K.S.B. Current trends in sugarcane pathology. Delhi: **International Books & Periodicals Supply Service**, p.163-171, 1994.

CHAVES, A.; PEDROSA, E. M. R.; CAVALCANTE, J. F. D.; ARAUJO, C. F. S.; FERREIRA, G.E. (2002) Comportamento de variedades comerciais de cana-de-açúcar em relação ao raquitismo da soqueira (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) na região Nordeste do Brasil – avaliações em cana-planta. **Anais do 8º congresso Nacional da STAB**. Pernambuco, p.27-34.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento.

Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=73&NSN=232>>

Acesso em 30 de Abril 2007.

COMSTOCK, J. C.; SHINE JR, J. M.; DAVIS, M. J.; DEAN, J. L. Relationship between resistance to *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* colonization. Sugarcane and spread of ratoon stunting disease in the field. **Plant Disease**. v.80, n. 6, p. 704-708, 1996.

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**, v.17, p. 95-101, 1997.

COMSTOCK, J. C.; LENTINI, R. S. Sugarcane leaf scald disease. 2002.

Disponível em: http://edis.ufl.edu/body_SC008>.

Acesso em: 10 Jan. 2007.

COPLANA – Cooperativa dos plantadores de Cana da zona de Guariba.

Disponível em:

<http://www.coplana.com/gxpsites/hgxpp001.aspx?1,5,312,O,P,0,,>

Acesso em: 29 de Abril de 2007.

DAMANN Jr., K. E.; DERRICH, K. S.; GILLASPIE Jr., A. G.; FONTENOT, B. F.; KAO, J. Detection of the RSD-associated bacterium by serologically specific electron microscopy. **Congress International Society of Sugar Cane Technologists**, v. 18, p. 966-977, 1977.

- DAMANN, K. E. Alkaline induced metaxylem autofluorescence: a diagnostic symptom of ratoon stunting disease of sugarcane. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 2, p. 23-26, 1988.
- DANIELS, J.; ROACH, B. T. A review of the origin and improvement of sugarcane. In: **Copersucar International Sugarcane Breeding Workshop**, Piracicaba: COPERSUCAR, 1987.
- DAROS, E.; ZAMBOM, J. L. C.; WEBER, H.; IDO, O. T.; GRACIANO, P. A. **Paraná: Evolução de cultivos das variedades de cana-de-açúcar**. In: 7º Congresso STAB, p. 64-69, 1999.
- DAVIS, M. J.; GILLASPIE, A. G.; HARRIS, R. W.; LAWSON, R. H. Ratoon stunting disease of sugarcane: isolation of the causal bacterium. **Science**, v. 210, p. 1365-1367, 1980.
- DAVIS, M. J.; GILLASPIE, A. G.; VIDAVER, A. K.; HARRIS, R. W. *Clavibacter*, a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp.nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 107-117, 1984.
- DAVIS, M. J.; DEAN, J. L. Comparison of diagnostic techniques for determining incidence of ratoon stunting disease in Florida. **Plant Disease**, v. 68, n. 10, p. 896-899, 1984.
- DAVIS, M. J.; DEAN, J. L.; HARRISSON, N. A. Quantitative variability of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* populations in sugarcane cultivars differing in resistance to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, v.78, p. 462-468, 1988.
- DAVIS, M. J.; DEAN, J. L.; MILLER, J. D.; SHINE JR, J. M. A method to screen for resistance to ratoon stunting disease of sugarcane. **Sugar Cane**, v. 6, p. 9-16, 1994.
- DAVIS, M.J.; BAILEY, R.A. Ratoon stunting. In: ROTT, P.; BAILEY, R.A.; COMSTOCK, J. C.; CROFT, B. J.; SAUMTALLY, A. S. (Ed). **A guide to sugarcane disease**, p. 49-54, 2000.
- DEAN. J. L.; DAVIS. M. J. Yield losses caused by ratoon stunting disease of sugarcane in Florida. **Journal of the American Society of Sugarcane Technologists**. n. 10, p. 66-72, 1989.
- DIAS, F. L. F. **Relação entre a produtividade, clima, solos e variedades de cana-de-açúcar, na Região Noroeste do Estado de São Paulo**. Piracicaba, 1997. 64f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- DINARDO – MIRANDA, L. L. Nematóides e pragas de solo em cana-de-açúcar. **Encarte técnico Potafós**, n.110, p. 25-32, 2005.

EVTUSHENKO, L. I.; DOROFEEVA, L. V.; SUBBOTIN, S. A.; COLE, J. R.; TIEDJE, J. M. *Leifsonia poae*. gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of *Corynebacterium aquaticum* Leifson 1962 as *Leifsonia 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. comb. nov., **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 50, p. 371-380, 2000.

FEGAN, M.; CROFT, B. J.; TEAKLE, D. S. et al. Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agente of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. **Plant Pathology**, v. 4, n. 47, p. 495-504, 1998.

FORBES, I.L.; STEIB, R. J.; CHILTON, S. J. P. Ratoon stunting disease of sugarcane. **La. Agric. Exp. Stn. Bull**, p. 532, 1960.

GAGLIARDI, P. R. **Análise estrutural e comparativa do genoma de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. Tese (Mestrado) - Piracicaba - SP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo - ESALQ, 61p. 2003.

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

GIGLIOTI, E. A. RSD Impact on sugar industries – Brazil. **International Congress of Plant Pathology**, v. 7, n. 9, p.16, 1998.

GILLASPIE JR., A. G.; IRVINE, J. E.; STEERE, R. L. Ratoon stunting disease vírus assay technique and partial purification. **Phytopathology**, v. 56, p. 1426-1427, 1966.

GILLASPIE, A. G.; DAVIS, R. E.; WORLEY, J. F. Diagnosis of ratoon stunting disease based on the presence of a specific microorganism. **Plant Disease reporter**, v. 60, n. 7, p. 573-576, 1973.

GILLASPIE, A. G.; DAVIS, R. E.; WORLEY, J. F. Nature of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. **Sugarcane Pathologists Newsletter**, Reduit, (15/16), p.11-15, 1976.

GILLASPIE, A. G. Ratoon stunting disease for sugarcane serology. **Phytopathology**, v. 68, p. 529-532, 1978.

GILLASPIE Jr., A. G.; HARRIS, R. W. Screening for resistanse to ratoon stunting disease-injury: the enzyme-linked immunosorbent assay. **Sugar y Azucar**, v. 73, n. 6, p. 42-43, 1978.

GILLASPIE, A. G.; HARRIS, R. W. Limitations of Elisa for detection of the RSD - associated bacterium in sugarcane and sudangrass. **Sugarcane Pathologists Newsletter**, v. 22, p. 25-28, 1979.

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**, p. 59-80, 1989.

GILLASPIE JR., A. G.; DAVIS, M. J. Ratoon stunting disease of sugarcane. In: MUKHOPADHYAY, A. N.; KAMAR, J.; CHAUBE, H. S.; SING, U. S. (Ed). **Plant diseases of international importance disease of sugar, forest and plantation crops**. Englewood Cliffs, v. 4, p. 41-61, 1992.

GUZMÁN, M. L.; VICTORIA, J. I. Empleo del metodo de inmunofluorescencia directa en la deteccion del raquitismo de la soca (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*). **Fitopatologia Colombiana**, v. 17, n. 1, p. 21-30, 1993.

HARRIS, R. W.; GILLASPIE Jr., A. G. Immunofluorescent diagnosis of ratoon stunting disease. **Plant Disease Repórter**, v. 62, n. 3, 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**, v. 70, n. 6, p. 556-558, 1986.

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**, v. 78, n. 6, p. 722-727, 1988.

HARRISON, N. A.; DAVIS, M. J. Comparision of serological techniques for diagnosis of ratoon stunting disease. **Sugar Cane**, v. 3, p. 5-9, 1990.

HEMA, M.; SREENIVASULU, P.; SAVITHRI, H, S. Taxonomic position of sugarcane streak mosaic virus in the family Potyviridae. **Archives of Virology**, v.147, p. 1997–2007, 2002.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ, IAPAR. **Cartas climáticas do Estado do Paraná**. Londrina, 49p. 1994.

IAPAR; Disponível em: < <http://200.201.27.14/Site/Sma/index.php> >.
Acesso em: 05 de janeiro de 2007.

IGLESIA, A.; FONSECA, D.; DÍAZ, M.; NUÑEZ, O.; GONZÁLEZ, R.; PAZOS, V.; PERALTA, E. L. División de Protección de Plantas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). **Protección Veg**, v. 18, n. 1, p. 23-27, 2003.

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

JAYARATNE, D. L.; WUDANAPATHIRANA, S. Ratoon stunting disease of sugarcane in Sri Lanka. **Journal of the National Science Council of Sri Lanka**, v. 15, n. 2, p. 227-232, 1987.

Jornal da cana;

<<http://www.jornaldacana.com.br/conteudo/Conheca%20o%20Setor.asp>>

Acesso em: 05 de Dez. de 2006

Jornal Paraná; <<http://www.jornalparana.com.br/>>

Acesso em: 07 de Jan. de 2007

JUNQUEIRA, A. A. B.; DANTAS, B. A cana-de-açúcar no Brasil. In: MALAVOLTA, E. (ed.). **Cultura e adubação da cana-de-açúcar**. Instituto Brasileiro de Potassa, p. 27-60, 1964.

KAO, J.; DAMANN Jr., K. E. In situ localization and morphology of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. **Canadian Journal Botany**, v. 58, n. 3, p. 310-315, 1980.

LOPES, J. R. S.; GONCALVES, M. C.; VEGA, J.; KRÜGNER, R.; NAVAS, S. M. Aphid transmission of a virus associated with sugarcane yellow leaf. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 335-335, 1997.

LU, Y. H.; D'HONT, A.; PAULET, F.; GRIVET, L.; ARNAUD, M.; CLASZMANN, J. C. Molecular diversity and genome structure in modern sugarcane varieties. **Euphytica**, v. 78, p. 217-226, 1994.

LUI, L. J.; CORTÉS-MONLLOR, A.; BENDA, G. T. A.; MARAMOROSCH, K.; HIRUMI, H.; PÉREZ, J. E.; BIRD, J. Isolation of an organism resembling *Xanthomonas vasculorum* from sugarcane affected by ratoon stunting disease. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, v. 15, n. 1, p. 234-240, 1974.

MARAMOROSCH, K.; PLAVSIC – BANJAC, B.; BIRD, J.; LIU, L. J. Electron microscopy of ratoon stunted sugar cane: microorganism in xylem. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 77, p. 270-273, 1973.

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

MATSUOKA, S. Ratoon stunting disease diagnosis with elephant-grass as an indicator plant. **Sugarcane Pathologist's Newsletter**, v. 8, p.10-11, 1972.

MATSUOKA, S. Disseminação e controle do raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, v. 1, n. 4, p. 245-257, 1975.

MATSUOKA, S. Longevidade do efeito do tratamento térmico em canas infectadas pelo raquitismo-da-soqueira. **Anais do III Congresso Nacional da STAB**, p. 244-249, 1984.

MATSUOKA, S. The contribution of man-made varieties to the sugar cane industry in São Paulo. **Ciência e Cultura**, v. 43, p. 282-289, 1991.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In BORÉM, A. (Ed). **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2.ed. Editora UFV, p. 205-251, 1999.

MILLER, J. D.; COMSTOCK, J. C.; TAI, P. Y. P.; GLAZ, B. A technique to breed for ratoon stunting disease in sugarcane. **Journal American of Sugarcane**, v. 22, p.134, 2002.

MIOCQUE, J. Y. J.; MACHADO Jr., G. R. Review of sugarcane varieties and breeding in Brazil. **Journal Sugarcane**, v.9, p.13, 1977.

MOURA, R. M.; ALMEIDA, A.V. Estudos preliminares sobre a ocorrência de fitonematóides associados à cana-de-açúcar em áreas de baixa produtividade agrícola no Estado de Pernambuco. **Anais**, 5ª Reunião Brasileira de Nematologia, Piracicaba, SP, p. 213-220, 1981.

NANNI, M. R. **Delimitação de unidades fisiográficas para estudo de solos utilizando análise multivariada e técnicas de sensoriamento remoto**. Curitiba, 1995. 196p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.

NANNI, M. R.; DEMATTÊ, J. A. M.; FIORIO, P. R. Análise discriminante dos solos por meio da resposta espectral no nível terrestre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n.10, 2004.

OLIVEIRA, M.; VASCONCELOS, Y. Soluções para geração de eletricidade. **Pesquisa FAPESP**, v. 65, p. 66-69, 2001.

ORDOSGOITTI, A.; GONZÁLEZ, V.; APONTE, A. El carbon de la caña de azúcar en Venezuela. **Agronomía Tropical**, v. 31, n.1/6, p.301-307, 1982.

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**, v. 82, n. 3, p.285-290, 1998.

PÉREZ, J. R.; MATOS, M.; FIGUEIREDO, Y. Estudio de la resistencia de variedades comerciales de la caña de azúcar al raquitismo de los retoños empleando el método de tinción por transpiración. **Cultivos Tropicales**, v. 22, n. 2, p. 9-42, 2001.

PIZANO, M. A.; MACEDO, N.; BOTELHO, P. S. M. Racionalização no controle de cupins subterrâneos em cana-de-açúcar. **Álcool & Açúcar**, São Paulo, n.53, p.26-27, 1990.

PONTE, E. L. de. **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.** Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2006. 43p. Dissertação (Mestrado).

RICAUD, C. Problems in the diagnosis of ratoon stunting disease. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, v.15, p. 241-248, 1974.

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*.** 2004. 58 p. Dissertação (Mestrado).

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

SANGUINO, A. Principais moléstias da cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B. **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**, v. 6, p. 741-757, 1987.

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

SCAGLIUSI, S. M.; LOCKHART, B. E. Transmission, characterization and serology of sugarcane yellow leaf luteovirus. **Phytopathology**, v.90, p.120-124, 2000.

SCARAMUZZO, M. Minas supera Paraná em açúcar. Valor Econômico – Agronegócios, 2005.
Disponível em: <<http://www.alcopar.org.br/clipping/index.htm>>.
Acesso em: 05 de janeiro de 2007.

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

SILVA, J. A. G.; SORRELLS, M. E.; BURNQUIST, W. L.; TANKSLEY, S. D. RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneus*. **Genome**, v. 36, p. 782-791, 1993.

SMITH, D. T. Crop profile for sugarcane in Texas – Diseases. 1999.
Disponível em:
<<http://www.pestdata.ncsu.edu/cropprofiles/docs/txsugarcane.html>>.
Acesso em: 9 de Jan. 2007.

SREENIVASAN, T. V.; AHLWALIA, B. S.; HEINZ, D. J. Cytogenetics. In: Heinz DJ (Ed). **Sugarcane improvement through breeding**, p. 211-253, 1987.

STEINDL, D. R. L. Ratoon stunting disease. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, v. 7, p. 57-65, 1950.

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

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**, p. 71-72, 1976.

STEVENSON, G. C. **Genetics and breeding of sugarcane**. London: Longmans. 284 p. 1965.

SHUKLA, D. D.; FRENKEL, M. J.; MCKERN, N. M.; WARD, C. W.; JILKA, J.; TOSIC, M.; FORD, R. E. Present status of the sugarcane mosaic subgroup of potyviruses. In: BARNETT, O.W. (Ed.). **Potyvirus taxonomy**. New York: Springer, v. 5, p. 363-373 (Suppl.), 1992.

TAYLOR, P. W. J.; PETRASOVITS, L. A.; VAN DER VELDE R.; BIRCH, R. G.; CROFT, B. J.; FEGAN, M.; SMITH, G. R.; BRUMBLEY, S. M. Development of PCR-based markers for detection of *Leifsonia xyli* subsp *xyli* in fibrovascular fluid of infected sugarcane plants. **Australasian Plant Pathology**, v. 32, n. 3, p. 367-375, 2003.

TEAKLE, D. S.; SMITH, P. M.; STEINDL, D. R. L. Association of small coryneform bacterium with the ratoon stunting disease of sugarcane. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 24, p. 869-874, 1973.

TOKESHI, H.; SANGUINO, A.; AKIBA, F. *Xanthomonas albilineans*, provável agente causal de raquitismo-da-soqueira e escaldadura da cana-de-açúcar. **Brasil açucareiro**, v. 84, n. 6, p. 28-40, 1974.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H; AMORIM, A. L; Bergamin Filho, A. et al. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**, v. 2, p. 207-225, 1997.

VALARINI, J. P.; TOKESHI, H. Factors that interfere in evaluation of ratoon stunting disease resistance by water flow in sugarcane stalks. **Summa Phytopathologica**, v. 7, p. 51- 56, 1981.

VEGA, J.; SCAGLIUSI, S. M. M.; ULIAN, E.C. Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: evidence of association with a luteovirus. **Plant Disease**, v. 81, p.21-26, 1997.

VEIGA, F. M. Notas sobre o raquitismo das socas em Campos. **Brasil Açucareiro**, v. 47, p. 81-83, 1956.