

**EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DA INOCULAÇÃO DE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE DO RAQUITISMO DA
SOQUEIRA DA CANA-DE-AÇÚCAR**

JOSIL DE BARROS CARNEIRO JUNIOR

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
JULHO - 2006**

**EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DA INOCULAÇÃO DE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE DO RAQUITISMO DA
SOQUEIRA DA CANA-DE-AÇÚCAR**

JOSIL DE BARROS CARNEIRO JUNIOR

Tese apresentada ao Centro de
Ciências e Tecnologias
Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como parte das exigências
para obtenção do título de Doutor
em Produção Vegetal

Orientador: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira

Campos dos Goytacazes-RJ
Julho-2006

EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE DO RAQUITISMO DA SOQUEIRA DA CANA-DE-AÇÚCAR

JOSIL DE BARROS CARNEIRO JUNIOR

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal

Aprovada em 13 de Julho de 2006

Comissão Examinadora:

Prof. Gonçalo A. de Souza Filho (Doutor, Biociências e Biotecnologia) - UENF

Prof. Fabio Lopes Olivares (Doutor, Microbiologia do Solo) - UENF

Prof. Segundo S. U. Caballero (Doutor, Solos e Nutrição de Plantas) - EMBRAPA

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira (Doutor, Fitopatologia) – UENF
Orientador

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus.

Aos professores, Thelma, Rosana, Amaral, Messias, Gonçalo e Fabio Olivares, pelos ensinamentos e dedicação.

Ao orientador e amigo professor Silvaldo Felipe da Silveira pelo apoio, incentivo, dedicação e preocupação demonstrados durante meu mestrado e doutorado.

Aos companheiros que participaram desta jornada trocando informações, incentivando e colaborando para minha formação profissional, em especial, à colega Elaine, Marlon, Juan, Inorbert, Vicente e Karina.

À FENORTE/UENF, pela bolsa de estudo concedida.

À UFRRJ, pela liberação parcial das atividades em função do doutorado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vii
1.INTRODUÇÃO.....	01
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	06
2.1.Cana-de-açúcar – Classificação botânica.....	06
2.2.Cana-de-açúcar no Brasil.....	07
2.3. Etiologia do raquitismo da soqueira - RSD.....	08
2.4.Tratamento térmico.....	10
2.5. Bactérias endofíticas.....	11
3.TRABALHOS.....	15
3.1.Sanidade e vigor de mudas de cana-de-açúcar infectados por <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> e tratados por termoterapia.....	15
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
INTRODUÇÃO.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
Seleção de colmos infectados e extração de seiva do xilema.....	21
Ensaio sorológico.....	21
Tratamento térmico de toletes.....	22
Plantio no campo.....	23
Viveiro secundário.....	24
RESULTADOS.....	25

Características associadas ao vigor das mudas tratadas por termoterapia.....	25
Sanidade das mudas tratadas por termoterapia.....	28
DISCUSSÃO.....	33
RESUMO E CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
3.2.Efeito de bactérias endofíticas na sanidade e vigor de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar e inoculadas com <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	44
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	46
INTRODUÇÃO.....	48
MATERIAL E MÉTODOS.....	51
Produção de mudas sadias de Co 421.....	51
Multiplicação e inoculação das bactérias <i>Gluconacetobacter</i> <i>diazotrophicus</i> , <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i>	51
Inoculação do patógeno.....	52
Plantio do experimento em campo.....	52
Estimativa da densidade de talos bacterianos de bactérias diazotróficas na seiva pela contagem, em meio semi-seletivo, por técnica do número mais provável.....	53
Avaliação das características agronômicas.....	54
Estimativa da incidência de raquitismo por <i>Dot Blot</i>	54
RESULTADOS.....	56
DISCUSSÃO.....	66
RESUMO E CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
4.RESUMO E CONCLUSÕES.....	80
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

RESUMO

Carneiro, Josil de Barros Carneiro Junior; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; julho de 2006; Efeito do tratamento térmico e da inoculação de bactérias endofíticas no controle do raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar; Prof. Orientador: Silvaldo Felipe da Silveira. Professores conselheiros: Fabio Lopes Olivares, Gonçalo Apolinário de Souza Filho e Segundo Sacramento Urquiaga Caballero.

Foram realizados dois trabalhos: o primeiro, avaliaram-se mudas de cana-de-açúcar tratadas termicamente, em viveiro primário e secundário, do cultivar Co 421, suscetível ao RSD. Selecionaram-se 100 colmos infectados, por ensaio sorológico, sendo esses colmos casualizados e submetidos aos tratamentos combinados de imersão em água quente a 50,5 °C/120 min ou 52 °C/30 min, toletes de uma ou três gemas, com ou sem pré-imersão por 20 h em água, sendo a testemunha não tratada. Os toletes foram plantados em bandejas com substrato, as quais foram dispostas em viveiro num delineamento em blocos casualizados com quatro repetições. Aos quatro meses, as mudas foram transplantadas para o campo, obedecendo ao delineamento original, sendo feitas as avaliações na cana-planta aos 13 meses e na cana-soca aos 12 meses. Os resultados médios das duas colheitas mostraram um efeito positivo do tratamento 50,5 °C/120 min/toletes de três gemas/sem pré-imersão, que superou a testemunha, em tonelada de cana e brix por hectare, em 9,75% e 8,32%, respectivamente. Quanto à sanidade das mudas, a menor incidência foi de 7,7% do tratamento a 50,5 °C/120 min/toletes de três gemas/com pré-imersão. Conclui-se que o tratamento a 50,5 °C/120 min/toletes de

três gemas/sem pré-imersão resultou em ganhos no vigor das mudas obtidas, porém, nenhum dos tratamentos testados erradicou a bactéria do raquitismo.

No segundo trabalho, onde suspensões de células de bactérias endofíticas isoladas de cana-de-açúcar (*Gluconacetobacter diazotrophicus* – *Gd* estirpe PAL5; *Herbaspirillum seropedicae* – *Hs* estirpe HRC54 e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* – *Hr* estirpe HCC103) foram inoculadas isoladamente ou em conjunto (inóculo mixto) em frascos de mudas micropropagadas do cultivar Co 421 (suscetível ao raquitismo). Como testemunha, parte das mudas não foi inoculada nem com endófitas e com o patógeno. Antes do plantio no campo, as mudas foram aclimatadas sob sombrite 50% e, durante este período (4 meses), amostras de colmos e raízes foram removidas para isolamento e contagem das bactérias inoculadas, utilizando meio semi-sólido semi-seletivo JNFb e LGIP respectivamente para *Herbaspirillum* spp. e *G. diazotrophicus*. Aos 10 dias que antecederam o transplante, podaram-se as folhas basais das mudas com tesoura pré-imersa em seiva contaminada (soro-positiva por “dot blot” para presença de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) e as mudas foram plantadas no campo, seguindo-se o delineamento com quatro blocos e nove parcelas, cada uma constituída de linhas de 8 m, espaçadas com 1,40 m, com espaço entre plantas de 0,5 m e aceiro de 2 m. Procederam-se às avaliações na colheita aos 16 meses. Observou-se que *Gd* proporcionou ganhos em toneladas de cana por hectare (68,55%) e toneladas de brix por hectare (59,09%) em relação à testemunha. Nos tratamentos combinados de endofíticas com o patógeno, houve indução de tolerância ao raquitismo, pois apesar da alta incidência de positivos para *Lxx* nas parcelas inoculadas com endófitas, acusando a presença do patógeno, houve melhoria no rendimento agrônômico, em cana-planta de no mínimo 18,83 t de cana/ha, em relação à testemunha, e de 19,09 t de cana/ha em relação ao tratamento com *Lxx*.

ABSTRACT

Carneiro, Josil de Barros Carneiro Junior; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; July, 2006; Effect of thermotherapy and of inoculation with endophytic bacteria on the control of Ratoon stunting disease of sugarcane; Orienting Professor: Silvaldo Felipe da Silveira. Adviser Professors: Fabio Lopes Olivares, Gonçalo Apolinário de Souza Filho and Segundo Sacramento Urquiaga Caballero.

In regions and seasons with hydric deficit high incidence of Ratoon Stunting Disease (RSD) caused by the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) contributes for the reduction of sugarcane yield. The main mode of pathogen dispersion is through cutting tool of infected stalks during propagation or harvesting. At the present work, the sanity and other characteristics associated to the plant vigor of susceptible cultivar Co 421 pre-treated by thermo therapy were evaluated. One hundred stalks of sugarcane were collected from a known infected area were analyzed by dot blot serological assay. Selected contaminated stalks were randomised and submitted to the following combinations of treatment: immersion in hot water at 50.5 °C/2h or 52°C/30 min; stalks with 1 or 3 gems (buds); with or without 20h pre-immersion water bath; and not treated controls. After treatments, the stalks were planted in substrate in plastic trays that were transferred to a nursery following a randomised block designing with four replicates. Four months after the plants were transferred to field following the same designing. The yield of the first cycle was evaluated 13 months after planting date and the yield of the second cycle was evaluated 12 months after the first harvest. The average of productivity of the two evaluations showed positive effect of the treatment 50.5°C/2h/3gems (buds)/without pre immersion on TCH (tons of sugarcane per hectare) and TBH (tons of brix per hectare) supplanting the controls on 7.11 and 1.01 tons, respectively. The best treatment of thermotherapy for sanity was 50.5°C/2h/3gems/with pre-immersion which presented 7.7% of contaminated stalks (serum positive for *Lxx* detected by dot blot immune assay). It were concluded that 50.5 °C/2h/3gems/without pre-immersion water bath resulted in benefits to the plants but neither of the treatments cleaned the pathogen of the stalks. The efficiency

of thermotherapy as well the needs of new methodologies of cleaning sugarcane propagation material is discussed.

Single or mixed cell suspension of endophytic diazotrophic bacteria isolated from sugarcane (*Gluconacetobacter diazotrophicus* – *Gd* strain PAL5; *Herbaspirillum seropedicae* – *Hs* strain HRC54 and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* – *Hr* strain HCC103) and the pathogen were inoculated in micropropagated sugarcane cv. Co 421 (susceptible to RSD) and compared against uninoculated plants under greenhouse and field condition. After inoculation, the plantlets were transferred to greenhouse with 50% of solar irradiance reduction for acclimatation. At four months after inoculation, samples from roots and shoots were harvested for detection and enumeration of introduced bacteria strains using semi-solid JNFb or LGI-P medium, respectively for *Herbaspirillum* spp. and *G. diazotrophicus*. At ten days before field plantation, the basal leaves were cut at the middle portion half by a scissor which have been pre-immersed in contaminated sap extract of diseased plants (confirmed by dot blot immunoassay for *Lxx* presence). The experimental design was random block with four replicates and nine treatments. The experimental unit was designed with one line of 8 meters, with from 1.40 m and 0.5 m, respectively for crop line and plant inside the line, as well the frontal distance between useful plot of 2 m. The harvest was performed 16 months after planting on the field. *Gd* increased the number of sugarcane stalks and the brix per hectare, respectively in 68.55% and 59.09%, when compared with uninoculated control. Inoculation with endophytic bacteria did not cause a decreased the incidence of contaminated stalks. Compared with uninoculated or pathogen inoculated treatments the yield of sugarcane inoculated endophytes were superior in 18.83 and 19.09 ton of stalk per hectare, respectively. These results can be interpreted as RSD tolerance induction by the in vitro endophytic bacteria inoculation of micropropagated sugarcane.

1. INTRODUÇÃO

A cultura cana-de-açúcar é uma importante atividade econômica do Brasil, com uma área plantada superior a 5,5 milhões de hectares e com uma produção anual estimada em 397,1 milhões de toneladas, produzindo mais de 27 milhões de toneladas de açúcar e 17 milhões de m³ de álcool (Conab, 2005). A agroindústria canavieira tem destaque mundial na produção de açúcar, álcool, aguardente e outros subprodutos, trazendo forte contribuição sócio-econômica ao país (Graciano et al., 2002). A cultura da cana-de-açúcar a principal atividade agrícola da região Norte Fluminense, com uma área plantada de 116.746 ha, correspondendo a 15% da área agricultável do Estado do Rio de Janeiro (Asflucan, 2002). Contudo, a produtividade agrícola da cana-de-açúcar no Estado do Rio de Janeiro é de 46 t de colmos/ha (Cide, 2000), enquanto a média do Estado de São Paulo é de 80 a 100 t de colmos/ha (IBGE, 1996).

Dentre os fatores que afetam negativamente a produtividade da cana no Rio de Janeiro, podem ser citados: deficiência hídrica, plantio de variedades ultrapassadas, baixa renovação dos canaviais e ocorrência de doenças e de pragas. Das 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, pela primeira vez, constatada no Brasil incidindo sobre lavouras das variedades importadas, no município de Campos dos Goytacazes, RJ, por Frederico Veiga em 1956 (Cardoso, 1986). Em 1989, já havia sido relatada em 61 países (Tokeshi, 1997).

A bactéria Lxx está classificada no grupo corineforme, é gram-positiva, aeróbica, pleomórfica e fastidiosa. Cultivada *in vitro*, produz colônias minúsculas e translúcidas após 14 dias de cultivo em meio SC (*Soybean Corn* - descrito por Gillaspie et al., 1981, Cardoso, 1986). Coloniza o xilema vascular da planta obstruindo a translocação da água e nutrientes em condições de estresse hídrico

(Davis e Dean, 1984). As dificuldades no isolamento e no cultivo *in vitro* atrasaram a identificação do agente etiológico da doença (Davis et al., 1980) e, conseqüentemente, a seleção de genótipos resistentes ou tolerantes.

A importância do RSD varia em função dos fatores ambientais (Tokeshi, 1997; Rossler, 1974). Condições de estresse e déficit hídrico, encontradas na região Norte Fluminense, são ideais para o agravamento da doença. Em decorrência disto, acredita-se que o RSD contribua com parcela expressiva na redução da produtividade regional da cana-de-açúcar. Essa redução foi comprovada por ensaios, realizados por Chagas e Matsuoka (1988), em solos de tabuleiro na região de Macaé-RJ, onde se estimaram as perdas causadas por RSD, em toneladas de cana por hectare, em 21,51%, pela diferença entre parcelas tratadas termicamente (colmos tratados termicamente 50,5 °C/2 h) com as parcelas inoculadas com o patógeno (caldo contaminado). Observou-se também um aumento de produtividade da variedade Co 421 (suscetível ao RSD) em torno de 14 toneladas de colmos por hectare das parcelas tratadas em relação às não tratadas (Chagas e Matsuoka, 1988).

No Estado de São Paulo, observaram-se reduções na produção de colmos, devido ao RSD, variando entre 16 e 37%, do primeiro ao terceiro corte, nas variedades CB 41-76, CB 49-260 e IAC 52-326, (Matsuoka, 1971, 1984). Hoje, considerando que as cultivares são menos suscetíveis em decorrência dos programas de melhoramento genético, estimam-se perdas da produção em torno de 5 a 30%, dependendo do genótipo da cana e disponibilidade de água no solo (Dean e Davis, 1989). Na década de 80, Sanguino (1987) estimou que 90% dos canaviais estavam com RSD e que os danos poderiam atingir 60% da produção de toneladas de cana por hectare. Na década seguinte, Chagas (1996) relatou que as principais variedades da época, em São Paulo, não apresentavam imunidade à bactéria *Lxx*.

O RSD é uma doença facilmente disseminada mecanicamente durante a colheita da cana-de-açúcar e por colmos infectados. Com a expansão da área canavieira na implantação do Pró-álcool, em que as mudas utilizadas nem sempre eram sadias, houve ampla disseminação da doença para muitas áreas canavieiras do país (Sordi, 1986). A ausência de sintomas externos característicos específicos é o principal motivo da disseminação da bactéria em todas as regiões canavieiras do mundo (Cardoso, 1986). A sintomatologia inespecífica dificulta a diagnose direta de RSD, que geralmente necessita ser confirmada por testes sorológicos.

As estratégias de controle do RSD visam evitar a entrada do inóculo inicial (X_0) nas áreas de produção. Um dos métodos de controle empregados atualmente é o tratamento térmico de toletes ou minitoletes (50,5 °C por 120 min ou 52 °C por 30 min). Sabe-se que o tratamento térmico possui um efeito benéfico sobre a produtividade da cana-de-açúcar (Matsuoka, 1971), mas os efeitos dos diferentes métodos de tratamento térmicos sobre a colonização da *Lxx* e seu controle ainda não estão bem esclarecidos. A prática possui algumas limitações que desestimulam os produtores de empregá-la, tais como: custos do equipamento e da mão-de-obra; perdas de gemas ocasionando falhas na germinação, manutenção de viveiros primários com sistemas adequados de irrigação, e, principalmente, o reduzido efeito residual do tratamento que permite uma nova reinfestação da doença, já na primeira colheita. O raquitismo da soqueira aumenta sua incidência numa mesma área de cana-planta para soca, em até 31% (Steib et al., 1957), sendo o acréscimo na incidência de colmos infectados, em média, de 10% ao ano (Damann e Ollier, 1991). Em áreas implantadas com mudas submetidas a termoterapia, estima-se que após cinco ou seis cortes, a incidência de raquitismo seja semelhante aos níveis iniciais de infecção (Matsuoka, 1971, 1984).

Outra forma de controle do RSD é por meio da produção de mudas sadias por cultura de meristema (Leen 1988, 1991). Esse método apresenta como vantagens: à qualidade sanitária das mudas, facilidade no transporte, homogeneidade do plantio e o rápido acesso a cultivares recém-lançados. Apesar dessas características positivas, o plantio de mudas micropropagadas é relativamente baixo devido ao custo elevado das mudas, à necessidade de manutenção de viveiros primários, à falta de informações dos produtores quanto aos benefícios alcançados e ao reduzido efeito residual do tratamento (Lee, 1992).

Outro método alternativo de controle do RSD poderá ser através do controle biológico feito pela inoculação com bactérias endofíticas, as quais são capazes de colonizar os tecidos da planta hospedeira. O controle biológico de pragas e doenças de plantas pelo uso de bactérias endofíticas é uma promissora linha de pesquisa, tendo em vista a capacidade das endófitas habitarem o interior da planta sem incitar sintomas visíveis de doenças, competindo assim pelos mesmos sítios de colonização com o patógeno. Ademais, a colonização por endófitas pode induzir mecanismos de resistência do hospedeiro e, ou produzir bacteriocinas danosas ao

patógeno (antibiose), o que torna a aplicação de endófitos como agentes de biocontrole extremamente vantajosa (Olivares, 2000).

Hoje, já existem alguns exemplos da utilização de bactérias endofíticas no controle de doenças de plantas de em culturas como: milho, algodão, abóbora, tomate, batata, ervilha, dentre outras culturas de importância agrícola (Kloepper et al., 1997; Hallmann et al., 1997; Sharma et al., 1998; Sturz et al., 1998).

Outra perspectiva do biocontrole do RSD por bactérias endofíticas seria a possibilidade de estender os efeitos benéficos do tratamento térmico e da cultura de meristema por um maior número de ciclos da cultura. Isto resultaria em maior produtividade e menor custo para os produtores, justificando assim o investimento em mudas saudáveis. Além disso, o provável uso das endófitas como forma de controle do RSD possibilitaria que variedades com baixa resistência ao raquitismo, mas com grande potencial produtivo, fossem aproveitadas pelos programas de melhoramento e por produtores.

Na cultura da cana-de-açúcar, já foram descritas sete espécies de bactérias endofíticas, colonizando raízes, colmos e folhas (Baldani et al., 1997). Todas são bactérias capazes de fixar nitrogênio do ar (diazotróficas) e algumas colonizam o interior dos vasos do xilema da planta, podendo ocupar provavelmente um mesmo “nicho” que bactérias fitopatogênicas ocupam, como é o caso de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), causadora do raquitismo (Olivares, 2000). Apesar desta constatação, nenhum trabalho avaliou o potencial de bactérias diazotróficas endofíticas no controle do raquitismo da cana-de-açúcar. Valdebenito-Sanhueza e Tokeshi (1985), estudando a relação *Xanthomonas albilineans* (bactéria causadora da escaudadura das folhas), *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas* sp. em cana-de-açúcar, concluíram que bactérias não patogênicas podem modificar fases da doença e inibir sintomas, sugerindo tratar-se de um controle por competição. Pinon (2002) constatou a produção de bacteriocinas pela bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus*, que inibiu *in vitro* o desenvolvimento de *Xanthomonas albilineans*.

Neste contexto, pretende-se avaliar: (i) diferentes métodos de termoterapia, combinando temperatura/tempo de tratamento x tamanho do tolete x pré-imersão (20 h em água), sobre a colonização de Lxx e seu controle; (ii) o efeito na sanidade e vigor em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar, pré-inoculadas com estirpes de três espécies de bactérias diazotróficas endofíticas de

cana-de-açúcar: *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, e pós-inoculadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cana-de-açúcar – Classificação botânica

A cana-de-açúcar foi descrita por Linneu (1753), no livro *Specie Plantarum*, como *Saccharum officinarum* e *Saccharum spicatum*, e, posteriormente sofreu inúmeras alterações (Cesnik e Miocque, 2004). A cana pertence à família da Poaceae, tribo *Andropogoneae* e gênero *Saccharum*. Em nível de espécie, a classificação botânica das espécies de cana-de-açúcar mais aceita contempla: *Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule* (Barbosa, 2000).

A *S. officinarum* ($2n=80$) é conhecida por cana-nobre pelo fato de possuir alto teor de sacarose e baixa em fibra. *S. officinarum* é exigente em clima e solo e suscetível as principais doenças da cana-de-açúcar. Essa espécie é poliplóide cujo centro de origem é a Nova Guiné (Ros, 2004). O termo *S. officinarum* foi criado por melhoristas holandeses, em 1920, para se referir a essa espécie, em razão do seu elevado teor de açúcar (Barbosa, 2000).

A *S. sinense* ($2n=111$ a 120) é conhecida como cana chinesa ou japonesa, adapta-se bem em solos pobres e secos, tem colmos finos e compridos com internódios longos (Cesnik e Miocque, 2004).

A *S. barberi* ($2n=81$ a 124) é conhecida como cana da Índia, possui teor de sacarose médio e variedades precoces e alto teor de fibras.

A *S. spontaneum* ($2n=40$ a 128), conhecida como cana selvagem, apresentam colmos curtos e muito finos e sistema radicular bem desenvolvido. Embora *S. spontaneum* não seja cultivada, proporcionou a retomada do crescimento da indústria do açúcar e do álcool no mundo após as severas epidemias de gomose, mosaico e carvão. *S. spontaneum* é considerada um autopoliploide. Essa espécie é altamente polimórfica e contribuiu positivamente para os programas de melhoramentos com o vigor, o perfilhamento, a capacidade de rebrota da soqueira e tolerância a estresses (Barbosa, 2000).

A *S. robustum* ($2n=60$ a 205) possui colmos altos, podendo chegar a 10 metros, sendo utilizada como cerca viva; apresenta baixo teor de sacarose e alto teor de fibras e é considerada cana selvagem.

S. edule ($2n=60$ a 80) é uma espécie que possui uma inflorescência comestível e tem sido cultivada em jardins na Nova Guiné e Ilhas Fiji.

Atualmente, as canas cultivadas são híbridos de *Saccharum* spp. formada pelo cruzamento de *S. officinarum*, *robustum*, *spontaneum*, *barberi* e *sinense* (Barbosa, 2000).

2.2.Cana-de-açúcar no Brasil

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil no início do século XVI, por Martin Afonso de Souza, mais precisamente em 1536. Pedro Luiz Góis fundou na capitania São Tomé, na planície de Campos, o Engenho Vila da Rainha. A partir de 1538, a indústria canavieira expandiu-se para a Bahia (1957), Alagoas (1959), Paraíba (1622) e Maranhão (1730) (Cesnik e Miocque, 2004).

Os três primeiros cultivos da cana no Brasil ficaram conhecidos como “ciclo da creola”, pois tinham sido introduzidos híbridos de *S. officinarum* com *S. barberi* (grupo mungo), denominados cana-crioula ou cana-da-terra. Posteriormente, a cana-crioula foi substituída pelas canas nobres devido a sua alta suscetibilidade ao vírus-do-mosaico (Barbosa, 2000).

As canas nobres, conhecidas como cana caiana, foram introduzidas no século XIX. Estas são mais ricas em sacarose e constituíram a base da indústria canavieira no Brasil até 1850, quando ocorreu a epidemia de gomose (*Xanthomonas vascularum*,) que causou enormes prejuízos. Após essa epidemia foram introduzidas variedades japonesas como a POJ 32, POJ 213 e a POJ 2878. Nesta época,

também foram introduzidas as variedades da Índia como a Co 331, Co 413, Co 421, Co 419 e outras. Entretanto, epidemias severas de carvão forçaram a introdução de novos genótipos (Matsuoka, 1999). Com o carvão, surgiram os programas de melhoramento no Brasil e, a partir de 1950, as variedades do Campo Experimental de Campos (Campos Brasil - CB) passaram a ser largamente plantadas.

Hoje, o Brasil é o maior produtor mundial de álcool e açúcar com uma área plantada superior a 5,5 milhões de hectares e produção anual de 397,1 milhões de toneladas de cana, 27 milhões de toneladas de açúcar e 17 milhões de m³ de álcool (Conab, 2005). Atualmente, no Brasil, atuam quatro programas de melhoramento de cana-de-açúcar: 1) Instituto Agrônomo de Campinas-IAC, 2) Centro de Tecnologia Canavieira - CTC, 3) Canavialis (Grupo Votoratin) e o Programa da RIDESA - Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro - composta pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal de Alagoas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Universidade Federal de Viçosa, Universidade Federal de Goiás, Universidade Federal de São Carlos e Universidade Federal do Paraná.

Os Estados brasileiros com maior produção de cana-de-açúcar são: São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Alagoas e Pernambuco. O Estado do Rio de Janeiro que já foi um dos pioneiros na indústria canavieira e um dos grandes produtores brasileiros de cana, hoje, tem uma produção apenas de 1,5 – 2,0% da produção brasileira.

2.3. Etiologia do raquitismo da soqueira - RSD

O raquitismo da soqueira (*Ratoon stunting disease*) da cana-de-açúcar é uma das principais doenças desta cultura, estando disseminada por todas as regiões onde se cultiva a cana-de-açúcar (Cardoso, 1986). Essa doença foi relatada, pela primeira vez, na Austrália em 1944-45. Em 1949, comprovou-se a disseminação da doença através da inoculação de caldo contaminado (Steindl, 1949, citado por Giglioti, 1997). Pelo difícil isolamento e cultivo do patógeno *in vitro*, acreditou-se que o RSD fosse causado por vírus (Steindl, 1961). Somente em 1973 visualizaram-se bactérias em seiva do xilema, em canas contaminadas, através de microscopia de contraste de fase (Gillaspie et al., 1973).

A bactéria agente causal do RSD foi isolada em 1980 (Davis et al., 1980) e denominada *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (Davis et al., 1984). Recentemente, a bactéria foi reclassificada, em novo gênero, como *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Evtushenko et al., 2000). *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* pertence ao grupo das bactérias corineformes, é gram-positiva, não produz flagelos, é aeróbica obrigatória, pleomórfica, fastidiosa, baciliforme, reta ou ligeiramente curva, mede 0,25 - 0,35 x 1 - 4 μm , sendo dificilmente cultivada *in vitro*. Produz, após 14 dias de cultivo em placas, colônias microscópicas e translúcidas, dificilmente vistas a olhos nus.

A bactéria *Lxx* caracteriza-se por sobreviver nos colmos de cana-de-açúcar e nas touceiras, de um ciclo para o outro da cultura. Há relatos que evidenciam a presença de *Lxx* em outras gramíneas quando inoculadas artificialmente, o que sugere que *Lxx* não tenha hospedeiros alternativos e seja um parasito obrigatório e específico (Giglioti, 1997).

Lxx penetra em colmos de cana-de-açúcar passivamente através de ferimentos ou pelos instrumentos de corte. A disseminação é via colheita e plantio manual e mecanizado, ou seja, o homem é o principal disseminador da doença. Outra forma de disseminação é o plantio de colmos infectados pela bactéria.

A infecção/colonização depende da densidade de talos bacterianos de *Lxx* na seiva, e da resistência/tolerância varietal. Variedades resistentes necessitam de uma densidade maior (10^8 células/ml) para que sejam infectadas. Já variedades suscetíveis, a densidade é de 10^4 células/ml (Gillaspie et al., 1973). Após infecção, a bactéria coloniza os vasos do xilema e a região basal dos colmos (Bailey, 1977; Davis et al., 1988). Sob condições de estresse hídrico, a bactéria causa obstrução da passagem de seiva no xilema, ocasionando menor desenvolvimento. A intensidade dos danos é diretamente relacionada à idade da cultura, ao genótipo e às condições climáticas (Giglioti, 1997).

Sintomas externos podem ser observados apenas em condições ambientais adversas e em cultivares intolerantes ou suscetíveis. Nestas condições, as plantas doentes podem apresentar crescimento irregular, colmos finos, encurtamento dos entrenós e sintomas de deficiência hídrica, em períodos curtos de falta d'água. Estes sintomas podem desaparecer quando não há déficit hídrico (Tokeshi, 1997).

Sintomas internos podem ser observados em cultivares mais suscetíveis, na altura do anel de cera, e consistem de alterações da coloração vascular variando de alaranjado-claro a vermelho-escuro. Dependendo da posição dos vasos e do corte

dos colmos, observam-se pontos ou vírgulas avermelhadas. Em nós imaturos, observa-se a coloração rosada do palmito, abaixo do meristema apical, imediatamente depois de efetuado corte longitudinal (Cardoso, 1986). Sintomas análogos aos citados acima podem ser induzidos por fusariose (*Fusarium moniliforme* Sheldon), ataque da broca da cana-de-açúcar (*Diatrea saccharalis*), escaldaduras das folhas (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, Arruda) e estrias cloróticas (Hughes e Steindl, 1955).

No RSD, a diagnose por meio de sintomas é imprecisa devido à sintomatologia inespecífica ou ausente em períodos chuvosos. Por isso, a diagnose da doença necessita sempre ser confirmada por algum método confiável de detecção do patógeno (Sanguino, 1984, 1998), a qual pode ser baseada em testes sorológicos e moleculares, como a técnica de amplificação do DNA por reação de polimerase em cadeia - PCR (Pan et al., 1998).

2.4.Tratamento térmico

Os estudos pioneiros sobre o tratamento térmico para o controle do RSD foram realizados na Austrália (Matsuoka, 1984). Atualmente, utilizam-se várias formas de termoterapia: água quente (52 °C/30 min ou 50,5 °C/120 min), ar quente 58 °C/8 h e vapor quente 53 °C/4 h. No Brasil, o tratamento com água quente é o mais utilizado devido à maior facilidade no controle da temperatura (Gheller e Godoy, 1987).

Relatos do efeito curativo do tratamento térmico de toletes ou cana inteira existem em abundância em vários países canavieiros. Contudo, apesar do tratamento produzir muda de boa qualidade sanitária, sabe-se que a erradicação do RSD não é completa e o retorno da doença ocorre em um espaço de tempo relativamente curto (Matsuoka, 1984; Comostock et al., 1996).

No Brasil, foram desenvolvidos dois sistemas de tratamento térmico. O primeiro, de gemas isoladas, pela Copersucar, que visava a um melhor controle da temperatura e uniformidade do material (Silva, 1974). O segundo, por Tokeshi e colaboradores (1983), conhecido como “Modelo UTII”, permitia um bom controle de temperatura para o tratamento de toletes maiores e canas inteiras, simplificando as operações necessárias para tratamento térmico em larga escala.

Muitos trabalhos realizados com termoterapia relataram os seus efeitos

positivos sobre a produção da cana-de-açúcar, mas também que os tratamentos térmicos convencionais (50,5 °C/120 min e 52 °C/30 min) não eliminam a bactéria do raquitismo (Matsuoka, 1971, 1984). Gheller e Godoy (1987), comparando o efeito do tratamento térmico a 50,5 °C/120 min, em toletes de uma e três gemas, na sanidade e produtividade, concluíram que os tratamentos foram semelhantes na inativação do agente causal, isto é, não eliminavam a bactéria causadora do raquitismo. Entretanto, proporcionaram ganhos na produtividade agrícola, em cana-planta e soca, de 16 a 31% para CB 41-76, 20 e 41% para Na 56-79 e 15 e 21% para CB 49-260.

Chagas e Matsuoka (1988) relataram ganhos médios decorrentes do tratamento térmico 50,5 °C/120 min, toletes de três gemas, em solos de tabuleiro, na região de Macaé-RJ, de 21,51%. Neste trabalho, observou-se um ganho médio, em quatro cortes, devido ao tratamento térmico, relacionando as parcelas tratadas com as não tratadas, na cultivar Co 421 de 13,80 toneladas de cana por hectare.

2.5. Bactérias endofíticas

Os microrganismos endofíticos (fungos e bactérias) são conhecidos por microbiologistas e fitopatologistas desde o início do século, mas despertaram um interesse maior quando se vislumbrou o potencial destes microrganismos no controle de doenças e pragas, em vista da capacidade de colonizar o interior dos tecidos vegetais e permanecerem, durante grande parte do ciclo de vida, dentro da planta (Petrini, 1991).

Os primeiros trabalhos de observação de endófitas relataram a localização das bactérias endofíticas no interior de vacúolos, próximos aos cloroplastos, presentes em talo de algas (Colombo, 1978). Alguns autores observaram bactérias endofíticas colonizando fruteiras e olerícolas (Samish, 1963). Do algodoeiro, isolaram-se *Erwinia* sp., *Bacillus* spp., *Clavibacter* sp. e *Xanthomonas* sp. das raízes, caules e botões florais (Misaghi e Domndelinger, 1990). Em colmos de milho, a população de bactérias endofíticas variou inicialmente de 1×10^{10} a 1×10^3 bactérias por grama de colmo, depois de 10 semanas (Mcinroy e Kloepper, 1991).

Nos últimos anos, uma das linhas de pesquisa crescentes tem sido o controle biológico (biocontrole) de pragas e doenças pelo uso das bactérias endofíticas, e alguns resultados positivos foram obtidos no controle de patógenos

de solo (Wei et al.,1991; Brooks et al.,1994; Chen et al., 1995). O fato de as bactérias endofíticas colonizarem o interior da planta, competindo pelos mesmos sítios de colonização do patógeno sem incitar sintomas aparentes, aliado ao menor impacto de flutuações abióticas no interior da planta, torna a aplicação de endófitos, como agentes de biocontrole, potencialmente vantajosa comparada à utilização de microrganismos rizosféricos (Olivares, 2000).

Trabalhos que avaliaram o controle da murcha de *Fusarium* do algodão (*Fusarium oxysporum* fsp. *vasinfectum*), utilizando bactérias endofíticas (isoladas do interior dos tecidos do algodoeiro), mostraram uma redução significativa na expressão dos sintomas em casa de vegetação (Chen et al., 1995). Alguns estudos indicam, como uma forma de biocontrole, a indução de resistência sistêmica ou localizada ao patógeno, induzida por rizobactérias e bactérias endofíticas (Alström, 1991; Van Peer et al., 1991; Wei et al., 1991; Tuzun e Kloepper, 1994; Lemanceau e Alabouvette, 1993). Geralmente, a indução de resistência sistêmica (IRS) em plantas é um mecanismo de defesa caracterizado pelo aumento dos níveis de resistência após a infecção com um fitopatógeno. Uma das maneiras de observar IRS seria através da acumulação de um composto sinalizador, o ácido salicílico por exemplo, que induz a ativação de genes envolvidos na síntese de proteínas PR (pathogenesis-related proteins).

Outras possibilidades para o uso das bactérias endofíticas estão na biotecnologia vegetal, na utilização como vetor para transformações genéticas na planta (Uratani et al., 1995) ou no uso de bactérias endofíticas transgênicas (Tester, 1992). Alguns trabalhos nesta área têm sido realizados, como a utilização de *Clavibacter xily* subsp. *cynodontis* (endófito) modificado geneticamente para a produção da delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, objetivando o controle da broca do colmo do milho (Fahey, 1988).

Na cultura da cana-de-açúcar, os principais trabalhos com bactérias endofíticas surgiram na década de 1950, com a microbiologista Johanna Döbereiner e sua equipe, que pesquisaram principalmente as bactérias fixadoras de nitrogênio. As bactérias diazotróficas do gênero *Beijerinckia* foram encontradas em diversos campos de cana-de-açúcar (Döbereiner, 1961) e uma nova espécie de *Beijerinckia* foi descoberta, *B. fluminense* (Döbereiner e Ruschel, 1958). Outras bactérias diazotróficas de cana-de-açúcar foram isoladas, como: *Erwinia*, *Azotobacter*, *Derxia*,

Azospirillum, *Enterobacter* e bactérias anaeróbicas, como *Clostridium* e *Klebsiella* spp (Purchase, 1980; Graciolli et al., 1983).

Verificou-se ainda que um grande número de bactérias fixadoras de nitrogênio colonizava naturalmente o interior do tecido de plantas de cana-de-açúcar, sendo designadas como bactérias diazotróficas endofíticas (Döbereiner, 1992). A primeira bactéria endofítica caracterizada como diazotrófica foi *Acetobacter diazotrophicus* (posteriormente denominada *Gluconacetobacter diazotrophicus*), isolada de cana-de-açúcar, em meio semi-sólido com caldo de cana (Cavalcante e Döbereiner, 1988). *G. diazotrophicus* tem sido encontrada dentro de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar em áreas do Brasil, Uruguai, Austrália e México (Li e Macrae, 1991; Fuentes-Ramirez et al., 1993). Contudo, não tem sido encontrada em outros hospedeiros ou no solo (Reis, 1994). Evidências apontam que *G. diazotrophicus* sobrevive por menos de 1 semana após sua introdução em solo natural e esterilizado (Caruso e Baldani, 1995).

Gluconacetobacter diazotrophicus pertence à família Acetobacteraceae e subclasse Proteobacteria, são bactérias gram-negativas, não apresentam movimento espiralado, com pH ótimo na faixa de 4,5-5,8 e com células variando entre (0,7 a 0,8) x (2 a 4) μm . Estas bactérias são isoladas em meios semi-sólidos LGI-P (Reis, 1994) e, após o período de sete a dez dias, apresentam uma película alaranjada, sendo que, abaixo da película, o meio fica incolor devido à assimilação do azul de bromotimol (Dobereiner et al., 1995).

Outra bactéria diazotrófica endofítica em cana-de-açúcar foi identificada como *Burkholderia* sp., a qual coloniza endofiticamente cana-de-açúcar, mandioca e arroz (Baldani et al., 1996). O gênero *Herbaspirillum* foi descrito como um grupo de bactérias diazotróficas associadas a raízes das gramíneas. *H. rubrisubalbicans* foi isolada apenas de cana-de-açúcar e raízes de gramíneas invasoras. Um monitoramento da população destas bactérias no interior da planta permitiu estimar a população em torno de 10^4 células g^{-1} , sendo que *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* em cana-de-açúcar colonizam os espaços intercelulares das células do córtex das raízes. No tecido vascular, estas bactérias colonizam os meatos celulares e o interior das células do parênquima vascular, invadindo o xilema e, provavelmente, translocando-se via fluxo transpiratório (Olivares et al., 1996).

O gênero *Herbaspirillum* é composto por bactérias gram-negativas, com flagelos variando de um a três, sendo uni ou bipolares e suas células variam de 0,6

a 0,7 x 3 a 5 μm . Suas culturas crescem, em pH de 5,3 a 8,0, com temperatura de 35 °C. As duas espécies de *Herbaspirillum* são diferenciadas pela fonte de carbono (C). A espécie *Herbaspirillum seropedicae* é capaz de usar N-acetil-glucosamina como fonte única de C sob condições de fixação de N (em meio JNFb semi-sólido sem ácido málico). Já *Herbaspirillum rubrisulbicans* usa meso-eritritol somente em meio com N mineral. Ambas as espécies são isoladas através do meio semi-sólido JNFb, sendo que o crescimento é observado através de fina película, abaixo da superfície, sob condições microaeróbicas (Döbereiner, et al., 1995).

3. TRABALHOS

3.1. SANIDADE E VIGOR DE COLMOS DE CANA-DE-AÇÚCAR INFECTADOS POR *LEIFSONIA Xyli* SUBSP. *Xyli* E TRATADOS POR TERMOTERAPIA

RESUMO

Neste trabalho, foram avaliadas a sanidade e características associadas ao vigor de mudas tratadas em viveiro primário e secundário do cultivar Co 421, suscetível ao RSD. De um infectário da mesma cultivar, foram selecionados 100 colmos infectados pelo patógeno, conforme constatado por ensaio sorológico. Esses colmos foram casualizados e submetidos aos tratamentos combinados de imersão em água quente a 50,5 °C/120 min ou 52 °C/30 min, toletes de uma ou três gemas, com ou sem pré-imersão por 20 h em água, sendo a testemunha não tratada. Os toletes foram plantados em bandejas com substrato, as quais foram dispostas em viveiro num delineamento em blocos casualizados com quatro repetições. Aos quatro meses, as mudas foram transplantadas para o campo obedecendo ao delineamento original, sendo feitas as avaliações na cana-planta aos 13 meses, e na cana soca aos 12 meses. Os resultados médios das duas colheitas mostraram um efeito positivo do tratamento 50,5 °C/120 min/toletes de três gemas/sem pré-imersão

que superou a testemunha, em toneladas de cana e brix por hectare, em 9,75% e 8,32%, respectivamente. Quanto à sanidade das mudas, a menor incidência foi de 7,7% do tratamento a 50,5 °C/120 min/tolete de três gemas/com pré-imersão. Conclui-se que o tratamento a 50,5 °C/120 min/sem pré-imersão resultou em ganhos no vigor das mudas obtidas, porém, nenhum dos tratamentos testados erradicou a bactéria do raquitismo. Discute-se a eficiência da termoterapia bem como a necessidade de serem testadas novas metodologias para obtenção de mudas de cana-de-açúcar livres do patógeno.

ABSTRACT

In regions and seasons with hydric deficit high incidence of *Raton stunting disease* (RSD) caused by the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) contributes for the reduction of sugarcane yield. The main mode of pathogen dispersion is through cutting tool of infected stalks during propagation or harvesting. At the present work, the sanity and other characteristics associated to the plant vigor of susceptible cultivar Co 421 pre-treated by thermo therapy were evaluated. One hundred stalks of sugarcane were collected from a known infected area were analyzed by dot blot serological assay. Selected contaminated stalks were randomised and submitted to the following combinations of treatment: immersion in hot water at 50.5 °C/2h or 52°C/30 min; stalks with 1 or 3 gems (buds); with or without 20h pre-immersion water bath; and not treated controls. After treatments, the stalks were planted in substrate in plastic trays that were transferred to a nursery following a randomised block designing with four replicates. Four months after the plants were transferred to field following the same designing. The yield of the first cycle was evaluated 13 months after planting date and the yield of the second cycle was evaluated 12 months after the first harvest. The average of productivity of the two evaluations showed positive effect of the treatment 50.5°C/2h/3gems (buds)/without pre immersion on TCH (tons of sugarcane per hectare) and TBH (tons of brix per hectare) supplanting the controls on 7.11 and 1.01 tons, respectively. The best treatment of thermotherapy for sanity was 50.5°C/2h/3gems/with pre-immersion which presented 7.7% of contaminated stalks (serum positive for *Lxx* detected by dot blot immune assay). It were concluded

that 50.5 °C/2h/3gms/without pre-immersion water bath resulted in benefits to the plants but neither of the treatments cleaned the pathogen of the stalks. The efficiency of thermotherapy as well the needs of new methodologies of cleaning sugarcane propagation material is discussed.

INTRODUÇÃO

A cultura cana-de-açúcar é uma importante atividade econômica do Brasil, com uma área plantada superior a 5,5 milhões de hectares e com uma produção anual estimada em 397,1 milhões de toneladas, produzindo mais de 27 milhões de toneladas e açúcar de 17 milhões de m³ de álcool (Conab, 2005). Atualmente, no Brasil, a cultura da cana-de-açúcar é uma das mais competitivas do mundo devido a sua boa produtividade agrícola e industrial (Matsuoka, 1995).

Contudo, em algumas regiões do Brasil, a produtividade da cana-de-açúcar ainda é baixa. Geralmente, essas regiões são afetadas pelo déficit hídrico associado à ocorrência de doenças, como o raquitismo-da-soqueira, afetando negativamente a produtividade. O raquitismo da soqueira (RSD) é causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Davis et al., 1980, 1984; Evtushenko et al., 2000). Sua importância varia em função dos fatores ambientais, sendo favorecida por estresse hídrico (Tokeshi, 1997). Perdas de produtividade de 10 a 25%, em cana-planta, foram observadas na Região Nordeste do Brasil, em variedades comercialmente importantes (Chaves et al., 2002).

A ausência de sintomas externos específicos é o principal motivo de disseminação da bactéria em todas as regiões canavieiras do mundo (Cardoso, 1986). As principais vias de disseminação são mudas infectadas, e, mecanicamente, por meio de instrumentos de corte, durante a colheita no canavial. Sendo o raquitismo uma doença monocíclica e poliética (Giglioti, 1997), as medidas de controle devem preconizar a redução do inóculo inicial (X₀) nas áreas de produção. Contudo, trabalhos de levantamento do raquitismo em algumas regiões brasileiras

mostram que a doença está presente em 90% dos canaviais (Sanguino et al., 1984, 1998). As medidas de controle mais preconizadas para o raquitismo consistem em reformar os canaviais com novas variedades resistentes ou tolerantes a partir de mudas tratadas por termoterapia de toletes ou minitoletes (50,5 °C por 120 min ou 52 °C por 30 min) ou, ainda, por mudas oriundas de cultura de meristemas (Giglioti, 1997). Todavia, o tratamento térmico pela imersão de toletes em água quente (50 °C/120 min) não elimina completamente a bactéria do raquitismo, embora se observe efeito benéfico dessa prática por até seis multiplicações subseqüentes (Matsuoka, 1971). Contudo, na Colômbia, o CENICAÑA (Centro de Investigación de lá Caña de Colombia), após seis anos de controle do RSD, por meio de tratamento térmico do material propagativo, observaram-se reduções na incidência da doença da ordem de 83%, (Guzmán e Victoria, 1992, 1993). No Brasil, vários trabalhos exaltam a importância do tratamento térmico para o controle do RSD e de outras doenças, com reflexos positivos na produtividade dos canaviais (Chagas e Matsuoka, 1988; Chaves et al., 2002). Estudo realizado na Região Nordeste com variedades comercialmente importantes mostrou ganhos de produtividade, em cana-planta das parcelas tratadas sobre as doentes, com RSD, de 10% a 25%. Nas variedades SP 79-1011 e RB 72454, os ganhos foram de 15,9% e 11,4%, respectivamente (Chaves et al., 2002).

A maioria dos trabalhos com tratamento térmico ressalta o efeito positivo na produtividade, mas não na sanidade das mudas (Matsuoka, 1971, 1984; Gheller e Godoy, 1987). Para se demonstrar o efeito do tratamento térmico na sanidade de mudas e no controle do raquitismo, alguns trabalhos utilizaram como técnicas de detecção do patógeno a microscopia de contraste de fase, que não garante a identidade do patógeno. Ainda assim, Gheller e Godoy (1987), avaliando os tratamentos 50,5 °C/120 min e 52 °C/30 min, por contraste de fase, concluíram que ambos os tratamentos não eliminaram a bactéria causadora do raquitismo.

Neste trabalho, objetivou-se avaliar a interação da termoterapia (50,5 °C/120 min e a 52 °C/30 min) e do tamanho dos toletes (uma e três gemas) com a pré-imersão em água por 20 h, no controle de *Lxx* e na sanidade de mudas de cana-de-açúcar. Adicionalmente, avaliou-se o efeito desses tratamentos sobre alguns parâmetros agrícolas associados ao crescimento e vigor das mudas.

MATERIAL E MÉTODOS

O tratamento térmico das mudas foi efetuado no segundo semestre de 2002, sendo as colheitas dos ensaios, em abril de 2004 e 2005, no Campus Dr. Leonel Miranda (UFRRJ). Os testes sorológicos foram feitos no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes, RJ.

Seleção de colmos infectados e extração de seiva do xilema

Amostras de 100 colmos, de 14 meses, da variedade Co 421, foram coletadas em infectário de raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar, mantido no Campus Dr. Leonel Miranda. A seiva do xilema foi extraída do terceiro internódio, retirando-se amostras cilíndricas de 1 cm de diâmetro e 1 cm de comprimento da região central (Carneiro et al., 2003). Os fragmentos cilíndricos removidos dos colmos foram acondicionados em tubos de microcentrifuga (1,5 ml). Procedeu-se à centrifugação por 2 min, a 13.000 rpm, obtendo, de cada amostra, em torno de 100 µl de seiva de xilema, a qual foi armazenada em congelador (- 4 °C).

Ensaio sorológico

Utilizou-se metodologia adaptada de Harrison e Davis (1990) conforme descrito por Carneiro et al., 2003. O ensaio sorológico iniciou-se com a hidratação da membrana de nitrocelulose com água estéril por 10 min. Aplicaram-se na membrana 90 amostras de seiva do xilema e seis amostras controle (seiva comprovadamente

infectada, seiva comprovadamente infectada diluída 10 vezes, suspensão bacteriana de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* pura e diluída 10 vezes e o controle negativo com seiva filtrada sem a bactéria), foram aplicadas na membrana sob vácuo de 10 µl de cada amostra; em seguida, a membrana foi incubada por uma hora em solução tampão TS (tris base 100 mM, pH 7,4; NaCl 1,5 M; tween 20 0,5%) com 0,3% de leite em pó desnatado; lavada por 10 min, por três vezes, em tampão TS; incubada por mais uma hora em solução de antissoro contra *Lxx* (produzido por Carneiro, 2001), sendo este diluído 1:20.000 em tampão TS com 0,1% de leite desnatado; lavada por 10 min, por três vezes, em tampão TS. A membrana foi novamente incubada por duas horas na presença de antissoro de cabra contra IgG de coelho conjugado à fosfatase-alcalina, diluído 1:2.000 em tampão TS com 0,1% de leite desnatado; lavada por 10 min, por três vezes, em tampão TS e por 15 min em PBS 0,01 M. A revelação da membrana foi realizada segundo protocolo de Harrison e Davis (1990). Todo o processo sorológico foi conduzido sob agitação, à temperatura ambiente.

Após a revelação, realizou-se a leitura da membrana observando as reações positivas (coloração azul). Das 90 amostras extraídas de colmos do infectário, apenas seis não apresentaram reações ao RSD (Figura 1). As reações foram classificadas, em função da intensidade das reações, em muito fortes (17 colmos), fortes (44 colmos) e fracas (23 colmos).

Tratamento térmico de toletes

Selecionaram-se 36 colmos com nove gemas para os ensaios de termoterapia, cujas reações positivas ao raquitismo foram fortes e muito fortes. Esses colmos foram levados à Biofábrica do Campus Dr. Leonel Miranda e submetidos à termoterapia em banheira manual (Quadro 1). Os colmos foram divididos em gemas conforme os tratamentos, acondicionados em sacos de aniagem (fio de náilon) e imersos na banheira pré-aquecida, à temperatura desejada. O tempo de cada tratamento foi contado a partir do momento em que a banheira com os colmos atingiu a temperatura preconizada.

Após a termoterapia, os toletes foram resfriados à sombra e tratados por imersão em calda do fungicida Benlate 50 PM, com 30 g do produto comercial/100 litros de água, por 10 min. Em seguida, os toletes foram plantados em caixas plásticas com substrato (areia + terra, 1:1), na densidade de nove gemas por caixa,

num total de 36 caixas (36 parcelas), correspondendo ao ensaio em blocos casualizados (quatro blocos e nove parcelas por bloco). As caixas foram levadas para casa-de-vegetação e, aos 30 dias, avaliou-se a germinação. Aos 45 dias, as caixas foram transferidas para viveiro a céu aberto.

Quadro 1 - Relação dos tratamentos térmicos realizados

Tratamento	Tempo (min)/ temperatura (°C)	Nº. de gemas por tolete	Pré-imersão por 20 h em água
1	120/50,5	1	Não
2	120/50,5	3	Não
3	120/50,5	1	Sim
4	120/50,5	3	Sim
5	30/52	1	Não
6	30/52	3	Não
7	30/52	1	Sim
8	30/52	3	Sim
9	Não tratada	3	Não

Plantio no campo

Após quatro meses no viveiro, as mudas foram plantadas no campo, seguindo-se o delineamento em blocos casualizados com quatro blocos e nove parcelas, com uma linha de bordadura lateral. Cada parcela correspondeu à uma caixa e às plantas que nelas germinaram e sobreviveram. O espaçamento foi de 0,5 m x 1,4 m, com aceiro de 2,0 m entre parcelas. Após 13 meses, colheu-se a cana-planta, e a cana soca foi colhida aos 12 meses.

As características avaliadas foram: número de colmos por parcela; diâmetro médio do colmo, o qual foi estimado medindo-se 10 colmos por parcela, na altura do quinto internódio basal, com paquímetro; brix da parcela, estimado com o refratômetro de campo, amostrando-se os cinco colmos mais velhos da parcela na altura do quinto internódio basal; peso da parcela, estimado pela pesagem de todos os colmos em balança de 50 Kg; peso médio do colmo, estimado pela relação peso

da parcela/número de colmos; o TCH – toneladas de cana por hectare estimado pelo cálculo da área útil da parcela extrapolando para 10.000 m²; e o TBH – toneladas de brix por hectare estimado pela fórmula $TCH \cdot brix / 100$. A incidência média da doença na parcela foi dada pela incidência de colmos que apresentaram reações soropositivas para *Lxx*, que foi estimada pela fórmula: [(número de reações positivas/número de amostras)*100], utilizando uma amostragem de 30% dos colmos da parcela (média de 9 colmos por parcelas, 336 colmos em todo o experimento, mínimo de 3 e máximo de 10 colmos por parcela, em cana-planta e soca). Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de médias de Scott & Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico Genes (Cruz, 2001).

Viveiro secundário

Instalou-se um segundo ensaio, com colmos provenientes da colheita da cana-planta do ensaio de termoterapia, em abril de 2004. O delineamento foi em blocos ao acaso com quatro blocos e nove parcelas por bloco. A parcela foi constituída de uma linha de 5 m, com 1,40 m entre parcelas e com densidade de plantio de 15 gemas/metro, tendo duas linhas de bordadura lateral e 3 m de bordadura frontal e distal. A colheita deste ensaio foi realizada aos 12 meses após o plantio. Os tratamentos e esquema de plantio foram os mesmos do delineamento de termoterapia anterior, isto é, nove tratamentos. Avaliou-se a incidência do raquitismo antes do plantio; diferença entre a incidência inicial e a incidência final, que é o aumento da doença em um ciclo da cultura; e os parâmetros agrícolas ligados à produção: brix, número de colmos, diâmetro médio do colmo, peso médio do colmo, peso da parcela, TCH e TBH. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de médias de Scott & Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico Genes (Cruz, 2001).

RESULTADOS

Características associadas ao vigor das mudas tratadas por termoterapia

Observou-se uma germinação média de 34,57% dos toletes e não houve diferença significativa dos tratamentos em relação à testemunha. Mas, a melhor germinação deu-se no tratamento 50,5 °C/120 min/tolete de três gemas/sem pré-imersão, com 50% dos toletes germinados; já a testemunha com 25%. Os tratamentos que não passaram pela pré-imersão tiveram germinação média de 43,75%, enquanto que, com os tratamentos que sofreram pré-imersão, esta média foi de 27,78% (Tabela 1). Após a germinação, foi observada morte de alguns perfilhos dos tratamentos que sofreram termoterapia.

Não houve diferenças significativas entre os tratamentos e a testemunha pelo teste F a 5% de significância, quanto às características associadas ao vigor em cana-planta, soca e na média dos dois cortes, e também do viveiro secundário. O maior teor de sólidos solúveis (Brix) foi observado na testemunha, em cana-planta e na média de planta e soca, corroborando o que foi observado por Matsuoka (1971). Em cana soca, o tratamento 52 °C/30 min/tolete de uma gema/sem pré-imersão destacou-se em relação aos demais (Tabela 1). No viveiro secundário, observou-se que os tratamentos 50,5 °C/120 min superaram os demais, em cana-planta, no teor de sólidos solúveis (Tabela 2).

Tabela 1 – Características associadas ao vigor e a sanidade de mudas submetidas a tratamentos de termoterapia (imersão em água quente) no viveiro primário em cana-planta e primeira soca

Tratamentos									
Temperatura (°C)	50,5	50,5	50,5	50,5	52	52	52	52	0

Tempo de termoterapia (min)	120	120	120	120	30	30	30	30	0		
Número de gemas	1	3	1	3	1	3	1	3	3		
Pré-imersão	não	Não	sim	sim	não	Não	sim	sim	não		
Característica	Cana-planta - viveiro primário									CV%	X
Porcentagem de germinação	44,44a	50,00a	19,44a	27,77a	44,44a	36,11a	36,11a	27,79a	25,00a	46,30	34,57
Brix (teor de sólidos solúveis)	17,12a	17,24a	12,58a	16,75a	16,38a	17,49a	16,96a	17,17a	17,79a	18,72	16,61
Número médio de colmos por parcela	20,01a	24,50a	12,00a	18,5a	20,50a	23,75a	21,25a	17,25a	26,00a	26,96	20,57
Peso médio do colmo (kg/colmo)	1,38a	1,34a	1,02a	1,32a	1,20a	1,50a	1,35a	1,60a	1,21a	21,22	1,32
Diâmetro médio do colmo (cm/colmo)	2,96a	2,86a	2,15a	2,88a	2,76 a	3,01a	2,92a	3,11a	2,79a	17,32	2,83
Peso da parcela (kg de colmo/parcela)	28,80a	33,40a	16,60a	24,45a	25,40a	35,40	28,85a	27,35a	31,40a	30,91	27,96
TCH (toneladas de cana por ha)	68,57a	79,52a	39,52a	58,21a	60,48a	84,29a	68,69a	65,12a	74,76a	30,91	66,57
TBH (toneladas de brix por ha)	11,84a	13,72a	6,70a	9,65a	9,92a	14,96a	11,39a	11,07a	13,14a	11,38	31,98
Incidência média (%)	28,77b	18,75b	5,00b	0,00b	6,25b	19,46b	45,13b	14,28b	100a	64,99	26,41
	Cana soca - viveiro primário										
Brix (teor de sólidos solúveis)	16,9a	17,03a	12,49a	15,59a	16,91a	16,59a	17,9a	17,28a	17,31a	19,24	16,45
Número médio de colmos por parcela	25,25a	25,00a	17,25a	21,00a	28,25a	22,75a	21,00a	18,5a	27,00a	27,79	22,89
Peso médio do colmo (kg/colmo)	1,30a	1,27a	0,97a	1,20a	1,08a	1,05a	1,24a	1,36a	1,00a	24,51	1,16
Diâmetro médio do colmo (cm/colmo)	2,79a	2,63a	2,03a	2,69a	2,64a	2,75a	2,81a	2,88a	2,68 a	18,23	2,65
Peso da parcela (kg de colmo/parcela)	34,52a	31,05a	22,45a	25,32a	30,15a	22,72a	25,55a	25,10a	27,07a	33,18	27,11
TCH (toneladas de cana por ha)	82,20a	73,92a	53,45a	60,30a	71,78a	54,11a	60,83a	59,76a	64,46a	33,20	64,54
TBH (toneladas de brix por ha)	14,23a	12,57a	8,90a	9,47a	12,16a	8,99a	10,59a	10,33a	11,11a	35,50	10,93
Incidência média (%)	84,36a	57,98a	28,57b	15,47b	29,78b	48,71b	81,25a	67,92a	100a	41,41	57,12
	Médias de cana-planta e soca – viveiro primário										
Brix (teor de sólidos solúveis)	17,01a	17,13a	12,53a	16,17a	16,64a	17,04a	17,43a	17,23a	17,55a	18,47	16,52
Número médio de colmos por parcela	23,13a	24,75a	14,63a	19,75a	24,38a	23,25a	21,13a	17,88a	26,50a	25,52	21,71
Peso médio do colmo (kg/colmo)	1,34a	1,31a	0,99a	1,26a	1,14a	1,28a	1,29a	1,48a	1,00 a	20,77	1,25
Diâmetro médio do colmo (cm/colmo)	2,88a	2,75a	2,09a	2,79a	2,70a	2,88a	2,87a	2,99a	2,73 a	17,28	2,74
Peso da parcela (kg de colmo/parcela)	31,66a	32,23a	19,53a	24,79a	27,78a	29,06a	27,20a	26,23a	29,24a	27,78	27,53
TCH (toneladas de cana por ha)	75,39a	76,73a	46,49a	59,26a	66,13a	69,20a	64,76a	62,44a	69,91a	27,79	65,56
TBH (toneladas de brix por ha)	13,04a	13,14a	7,80a	9,56a	11,05a	11,97	10,99a	10,70a	12,13a	29,05	11,15
Incidência média (%)	56,57b	38,37c	16,79d	7,74d	18,02d	34,08c	63,19b	41,10c	100a	42,39	41,76
Aumento da IC - planta para soca (%)	55,59a	39,24a	23,58a	15,48a	23,53a	31,83a	36,09a	53,6 a	0a	69,37	31,00

CV % - coeficiente de variação; X – média.

Acerca do número de colmos, observou-se que em cana-planta, soca e na média das duas colheitas, a testemunha apresentou 26,5 colmos por parcela, enquanto a média dos demais tratamentos foi de 21,70 colmos por parcela (Tabela 1). No viveiro secundário, o melhor tratamento foi 50,5 °C/120 min/tolete de uma gema/com imersão com uma média de 49,75 colmos por parcela, enquanto a testemunha apresentou 44,75 colmos por parcela (Tabela 2).

Quanto ao peso médio e diâmetro médio dos colmos, em cana-planta, soca e na média dos dois cortes, o tratamento 52 °C/30 min/tolete de três gemas/com pré-imersão superou os demais. Nestas características, a testemunha foi superada por seis dos oito tratamentos (Tabela 1). No viveiro secundário, em cana-planta, o tratamento 50,5 °C/120 min/ tolete de uma gema/ com pré-imersão foi superior aos demais, sendo a testemunha superada por todos os tratamentos em peso médio dos colmos e em por seis tratamentos, em diâmetro médio do colmo (Tabela 2).

No peso da parcela (Kg de colmos por parcela) e na estimativa de TCH (toneladas de cana por hectare), características altamente correlacionadas, em cana-planta, o tratamento 52 °C/30 min/toletes de três gemas/sem pré-imersão superou a testemunha, em TCH, em 13%. Na cana soca, o tratamento 50,5 °C/120 min/tolete de uma gema/sem pré-imersão superou a testemunha, em TCH, em 27,52%. Entretanto, na média dos dois cortes, o tratamento que se destacou foi 50,5 °C/120 mi/tolete de três gemas/sem pré-imersão, que superou a testemunha, em TCH, em 9,75% (Tabela 2). No viveiro secundário, em cana-planta, o tratamento 50,5 °C/120 min/tolete de uma gema/com pré-imersão superou a testemunha em 23,1 toneladas de cana por hectare. Seis tratamentos superaram a testemunha em TCH (Tabela 2).

Na estimativa de TBH (toneladas de brix por hectare), característica extremamente importante, pois associa a produção agrícola com a produção de açúcar por hectare, o tratamento 52 °C/30 min/toletes de três gemas/sem pré-imersão, em cana-planta, superou a testemunha, em 13,85%. Na soca, o tratamento 50,5 °C/120 min/tolete de uma gema/sem pré-imersão superou a testemunha, em 28,08%. Na média dos dois cortes, o tratamento 50,5 °C/120 min/tolete de três gemas/sem pré-imersão superou a testemunha, em 8,32% (Tabela 1). No viveiro secundário, em cana-planta, o tratamento 50,5 °C/120 min

/tolete de uma gema/com pré-imersão superou a testemunha, em 52,75%, sendo ainda a testemunha superada por seis dos oito tratamentos (Tabela 2).

No viveiro primário (primeiro ensaio de termoterapia), o tratamento em destaque nas características associadas ao vigor foi 50,5 °C/120 min/tolete de três gemas/sem pré-imersão. Já no viveiro secundário, o tratamento 50,5 °C/120 min/tolete de uma gema/com pré-imersão se destacou. Ambos têm em comum o binômio temperatura x tempo (50,5 °C/120 min).

Tabela 2 – Características associadas ao vigor e à sanidade de mudas submetidas a tratamentos de termoterapia (imersão em água quente) no viveiro secundário, em cana-planta

Médias de cana-planta – Viveiro secundário											
Temperatura (°C)	50,5	50,5	50,5	50,5	52	52	52	52	0		
Tempo de termoterapia (min)	120	120	120	120	30	30	30	30	0		
Número de gemas	1	3	1	3	1	3	1	3	3		
Pré-imersão	não	não	sim	sim	não	não	sim	sim	não		
Tratamentos											
Característica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	CV%	X
Brix (teor de sólidos solúveis)	15,56a	16,44a	16,46a	15,16a	15,79a	15,95a	15,67a	15,85a	15,44a	4,84	15,82
Número médio de colmos por parcela	44,00a	39,50a	49,75a	35,75a	44,25a	37,00a	40,75a	39,50a	44,75a	17,99	41,70
Peso médio do colmo (kg/colmo)	0,85a	0,79a	0,93a	0,84a	0,93a	0,85a	0,83a	0,87a	0,71a	17,34	0,84
Diâmetro médio do colmo (cm/colmo)	2,64a	2,59a	2,69a	2,58a	2,75a	2,67a	2,50a	2,47a	2,55a	7,19	2,61
Peso da parcela (kg de colmo /parcela)	37,55a	31,45a	46,10a	30,00a	41,00a	31,05a	35,05a	35,00a	32,00a	27,31	35,47
TCH (toneladas de cana por ha)	53,64a	44,83a	65,86a	42,86a	58,57a	44,36a	50,07a	50,00a	45,73a	27,31	50,67
TBH (toneladas de brix por ha)	8,34a	7,38a	10,83a	6,54a	9,27a	7,06a	7,84a	8,06a	7,09a	28,18	8,04
Incidência média (%)	60,71a	81,67a	52,81a	38,71a	68,75a	62,14a	47,91a	65,42a	100a	40,54	64,24

CV % - coeficiente de variação e X – média das características avaliadas.

Sanidade das mudas tratadas por termoterapia

Houve diferença significativa entre os tratamentos quanto à incidência média de colmos infectados por *Lxx* em cana-planta. A maior incidência foi detectada na testemunha, com 100% de reações positivas, em cana-planta e soca. O tratamento 52 °C/30 min/toletes de uma gema/pré-imersão e o 50,5 °C/120 min/toletes de uma gema/sem pré-imersão apresentaram altas incidências em

cana-planta e soca, respectivamente (Tabela 1). No conjunto, as menores incidências, tanto em cana-planta quanto em cana soca, foram nos tratamentos a 50,5 °C/120 min com pré-imersão. Em cana-planta, nenhuma reação positiva ao raquitismo foi detectada no tratamento 50,5 °C/120 min/tolete de três gemas/com pré-imersão, mas na cana soca foi detectada uma incidência de 15,45% (Tabela 1 e 3).

As reações positivas à *Lxx* diminuíram na intensidade da cor após a termoterapia em todos os tratamentos, exceto na testemunha. Nas amostras de cana soca, observou-se uma maior incidência da doença e intensidade das reações positivas (cor azul), o que indica aumento da concentração de *Lxx* em relação à cana-planta. Em 100% das amostras da testemunha, as reações foram positivas e com intensidades maiores (Figura 1).

Observou-se um aumento percentual médio na incidência de colmos infectados, da cana-planta para a cana soca, em 31%. Os maiores aumentos foram observados nos tratamentos 50,5 °C/120 min/tolete de uma gema/sem pré-imersão (55,59%) e 52 °C/30 min/toletes três de gemas/com pré-imersão (53,6%) (Tabela 3).

No viveiro secundário, não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto à incidência média de colmos infectados em cana-planta.

A maior incidência foi detectada na testemunha com 100% de reações positivas em cana-planta. Dentre os tratamentos que passaram pela termoterapia, o 50,5 °C/120 min/três gemas/sem pré-imersão e o 52 °C/30 min/uma gema/sem pré-imersão foram os que apresentaram maiores incidências, de 81,67% e 68,75%, respectivamente. As menores incidências foram nos tratamentos 50,5 °C/120 min/tolete de três gemas/com pré-imersão (38,71%) e 52 °C/30 min/tolete de uma gema/com pré-imersão (47,92%) (Tabela 3).

No viveiro secundário (instalado a partir da colheita em cana-planta do viveiro primário), a incidência média de colmos infectados em cana-planta foi de 64,23%. Considerando a incidência inicial das mudas plantadas no viveiro secundário de 26,41%, o aumento médio na incidência de colmos infectados, em um único ciclo de viveiro secundário, foi de 37,83%. Os maiores aumentos foram detectados nos tratamentos 50,5 °C/120 min/toletes de três gemas/sem pré-imersão e o 52 °C/30 min/tolete de uma gema/sem pré-imersão, com 62,92% e 62,50%, respectivamente (Tabela 3). Na testemunha, não se podiam obter aumentos

na incidência de colmos infectados, pois todos os colmos já se encontravam infectados no segundo plantio.

Quanto à intensidade das reações, pôde-se observar reações fortes semelhantes às da testemunha em todos os tratamentos, exceto nos tratamentos 52 °C/30 min/tolete de uma gema/com pré-imersão e 52 °C/30 min/tolete de três gemas/com pré-imersão, em que as reações foram fracas (Figura 2).

Tabela 3 – Sanidade de mudas submetidas a tratamentos de termoterapia (imersão em água quente) no viveiro primário, em cana-planta e soca, e no viveiro secundário, em cana-planta

Tratamentos											
Temperatura (°C)	50,5	50,5	50,5	50,5	52	52	52	52	0		
Tempo de termoterapia (min)	120	120	120	120	30	30	30	30	0		
Número de gemas	1	3	1	3	1	3	1	3	3		
Pré-imersão	não	não	sim	sim	não	não	sim	sim	não		
Viveiro primário – cana-planta para soca											
Característica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	CV%	X
Incidência cana-planta %	28,77b	18,75b	5,00b	0,00b	6,25b	19,46b	45,16b	14,28b	100a	64,96	26,41
Incidência cana soca %	84,36a	57,99a	28,58b	15,48b	29,78b	48,71b	81,25a	67,92a	100a	41,41	57,40
Aumento da Incidência %	55,59a	39,24a	23,58a	15,48a	23,53 ^a	31,83a	36,09a	53,64a	0,00a	69,37	31,00
Viveiro secundário – cana-planta											
Incidência inicial %	28,77b	18,75b	5,00b	0,00b	6,25b	19,46b	45,16b	14,28b	100a	64,96	26,41
Incidência cana-planta %	60,71a	81,67a	52,81a	38,71a	68,75a	62,14a	47,92a	65,42a	100a	40,54	64,23
Aumento da Incidência %	31,94a	62,92a	47,81a	38,71a	62,50a	42,68a	2,75a	51,13a	0,00a	82,01	37,83

CV % - coeficiente de variação e X – média das características avaliadas.

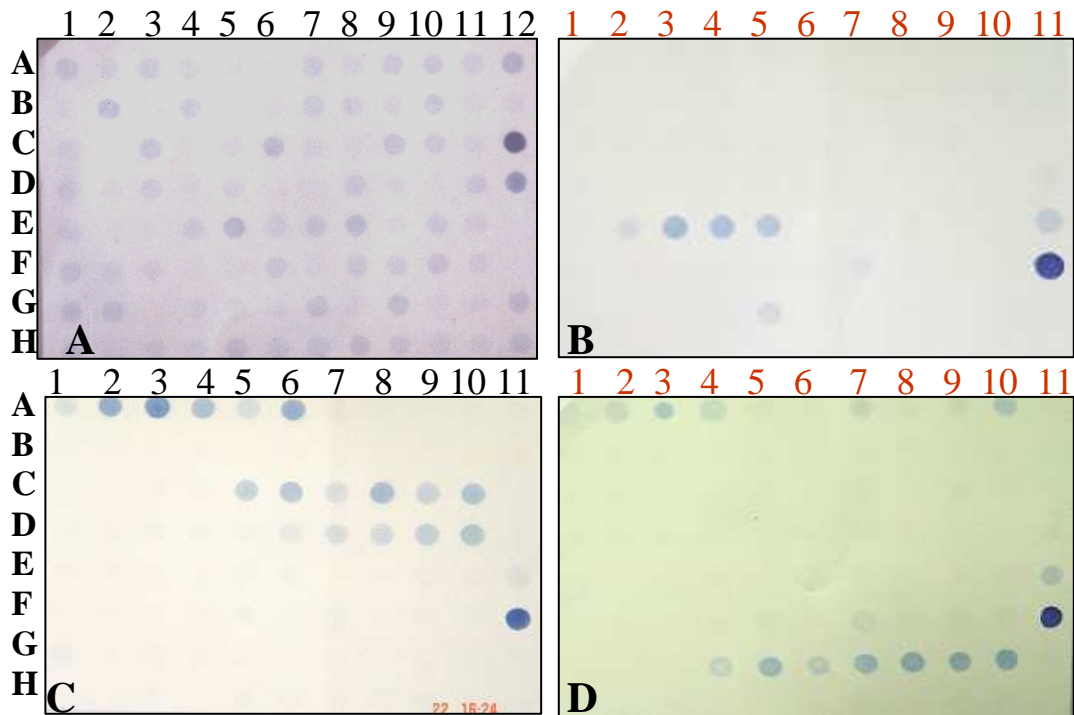


Figura 1 - Membranas de nitrocelulose evidenciando reações soro-positivas (azuis) para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, em amostras de seiva do xilema de colmos, da variedade Co 421, tratados por termoterapia.

Membrana A – amostras selecionadas para o tratamento térmico. As amostras de A1, A3, C11 e H7 - 50,5 °C/120 min/uma gema/com pré-imersão; E5, F8, H5 e H6 - 50,5 °C/120 min/três gemas/sem pré-imersão; A7, A9, B73 e C3 - 50,5 °C/120 min/uma gema/com pré-imersão; B9, E8, E10 e H12 - 50,5 °C/120 min/três gemas/com pré-imersão; C6, D8, E4 e H9 - 52 °C/30 min/uma gema/sem pré-imersão; D11, F1, F2 e F10 - 52 °C/30 min/três gemas/sem pré-imersão; A4, B8, C9 e H3 - 52 °C/30 min/uma gema/com pré-imersão; B4, D3, E1 e E6 - 52 °C/30 min/três gemas/com pré-imersão; F6, G1, G2 e G12 – Testemunha. As amostras controle: A12 - seiva de xilema infectada com *Lxx*, B12 - seiva de xilema infectada com *Lxx* diluída 10 x; C12 - suspensão bacteriana de *Lxx*; D12 – suspensão bacteriana de *Lxx* diluída 10 vezes; E12 – água destilada; F12 - seiva de xilema filtrada em membrana milipore (0.2 µm). **Membrana B** - Amostras de cana-planta: A1 à A7, F3 à F7 - 52 °C/30 min/três gemas/sem pré-imersão; A8 à 11, B11 e G6 à G9 - 52 °C/30 min/três gemas/com pré-imersão; B2 a B10, G1 a G5 - 52 °C/30 min/uma gema/com pré-imersão; B1, C2 à C6, E1, F1 e F2 - 52 °C/30 min/uma gema/sem pré-imersão; C7 à C10, D6 à D10, E6 à E10 - 50,5 °C/120 min/três gemas/sem pré-imersão; D1 à D5 - 50,5 °C/120 min/ três gemas/com pré-imersão; E2 à E5 - Testemunha; F8 à F10, G10 e G11 - 50,5 °C/120 min/uma gema/com pré-imersão; H1 à H11 - sem plotagem. **Membrana C** - Amostras de seiva do xilema de cana-planta de colmos da variedade Co 421: A1 à A6 - seiva de xilema infectada com *Lxx*; A6 à A11, B9 à B11 - 52 °C/30 min/uma gema/sem pré-imersão; B1 à B3 e C1 a C4 - 52 °C/30 min/três gemas/sem pré-imersão; B4 à B8 - 50,5 °C/120 min/três gemas/com pré-imersão; C5 à C10, D7 à D10 - Testemunha; D1 à D6, H1 à H9 - 52 °C/30 min/uma gema/com pré-imersão; E1 à E7 -52 °C/30 min/toletes de três gemas/com pré-imersão; E8 à E10, F7 à F10 - 50,5 °C/120 min/uma gema/com pré-imersão; F1 à F6, G1 e G2 - 50,5 °C/120 min/três gemas/sem pré-imersão; G3 à G11, H10 e H11 - 50,5 °C/120 min/uma gema/com pré-imersão. **Membrana D** - Amostras de seiva do xilema de cana-planta de colmos da variedade Co 421: A1 à A10, G4 à G10 - Testemunha; A11, B6 à B11 - 52 °C/30 min/três gemas/com pré-imersão; B1 à B5, C1 e C2, F1 à F2 e G1 à G3 - 50,5 °C/120 min/três gemas/com pré-imersão; C3 à C10 e D8 à D10 - 52 °C/ 30 min/três gemas/sem pré-imersão; D2 à D7 - 52 °C/30 min/uma gema/sem pré-imersão; D1 e E1 à E9 - 50,5 °C/120 min/três gemas/sem pré-imersão; E10, F3 à F10, G11 e H8 à H10 - 50,5 °C/120 min/uma gema/com pré-imersão; H1 à H6 - 50,5 °C/120 min/uma gema/com pré-imersão. **Membranas B, C e D amostras controle:** C11 - seiva de xilema filtrada em membrana milipore (0.2 µm); D11 - seiva de xilema infectada com *Lxx* diluída 10 x; E11 - seiva de xilema infectada com *Lxx* e F11- suspensão bacteriana de *Lxx*.

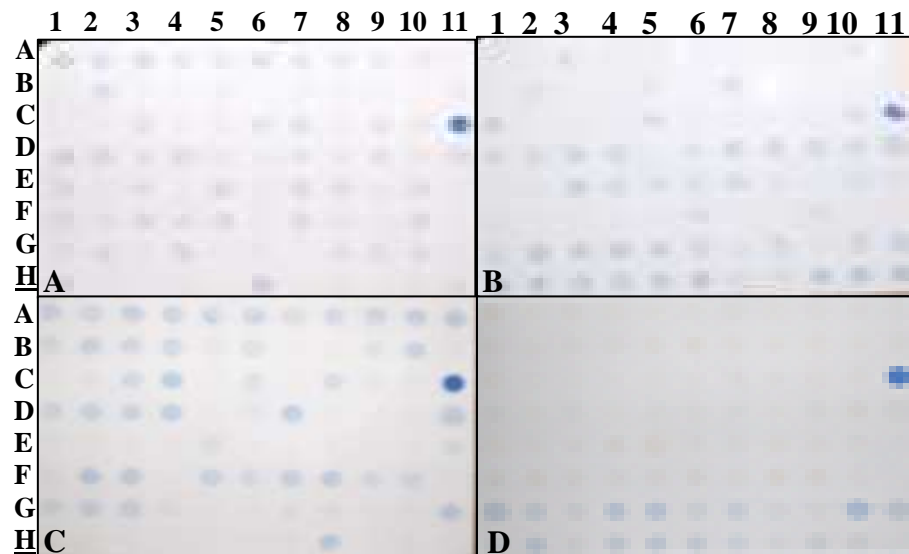


Figura 2—Membranas de nitrocelulose evidenciando reações soro-positivas (azuis) para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, em amostras de seiva do xilema de colmos da variedade Co 42,1 de cana-planta do viveiro secundário. As amostras em letras (linhas) e número (colunas):

Membrana A – A1 à A11, B1 à B11, C1 à C4 – 50,5 °C/120 min/uma gema/com pré-imersão;

C5 à C10, D1 à D10, E1 à E10, F1 à F10, G1 à G10 e H1 – 50,5 °C/120 min/três gemas/sem pré-imersão;

H2 à H10 - 50,5 °C/120 min/ três gemas/com pré-imersão.

Membrana B - A1 à A11, B1 à B11, C1 à C10, D1 e D2 – 50,5 °C/120 min/três gemas/com pré-imersão;

D3 à D10, E1 à E10, F1 à F10, G1 à G10 e H1 à H10 – 52 °C/30 min/uma gema/sem pré-imersão.

Membrana C – A1 à A4 – 52 °C/30 min/uma gema/sem pré-imersão;

A4 à A11, B1 à B11, C1 à C10, D1 à D10, E1 à E7 – 52 °C/30 min/três gemas/sem pré-imersão;

E8 à E10, F1 à F10, G1 à G11, H1 à H11 – 52 °C/30 min/uma gema/com pré-imersão.

Membrana D - A1 à A11, B1 à B4 – 52 °C/30 min/uma gema/com pré-imersão;

B5 à B11, C1 à C10, D1 à D10, E1 à E10 F1 à F10 – 52 °C/30 min/três gemas/com pré-imersão;

G1 à G11, H1 à H10 – testemunha (sem tratamento);

Amostras controle nas membranas A, B, C e D:

C11 – suspensão bacteriana de *Lxx*;

D11 – seiva de xilema infectada com *Lxx*;

E11 – seiva de xilema infectada com *Lxx* diluída 10 x;

F11– seiva de xilema filtrada em membrana milipore (0.2 µm);

H11– sem amostras.

DISCUSSÃO

A termoterapia afeta a germinação das gemas dos colmos de cana-de-açúcar, o que é considerado uma desvantagem desta prática (Tokeshi, 1997). Por isso, esperava-se que a melhor germinação fosse a das mudas não tratadas. Todavia, observou-se que a germinação da testemunha foi inferior aos demais tratamentos, exceto um. Contudo, deve-se ressaltar que a variedade testada (Co 421) é suscetível ao raquitismo e que os colmos selecionados para os tratamentos estavam todos infectados por *Lxx*. Ademais, a capacidade de germinação pós-tratamento varia em função da sensibilidade do genótipo e tipo de termoterapia (Giglioti, 1997). Resultados análogos a estes foram obtidos por Chaves (2002), que verificou que as parcelas tratadas tiveram uma germinação superior à das parcelas doentes. Detectou-se um efeito positivo dos diferentes tratamentos térmicos, principalmente do 50,5 °C/120 min/tolete de três gemas/sem pré-imersão sobre a germinação de colmos de cana-de-açúcar severamente infectados por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, em cultivar suscetível ao raquitismo. Constatou-se um efeito negativo da pré-imersão dos toletes em água na germinação, o que pode inviabilizar a sua utilização rotineira em tratamentos em larga escala.

Apesar da fraca germinação da testemunha, os perfilhos sobreviventes produziram vários colmos. Enquanto, nos demais tratamentos, inclusive nos que tiveram boa germinação, observou-se morte de perfilhos na pós-germinação, o que, conseqüentemente, reduziu o número de touceiras e de colmos. Observou-se também que o tratamento térmico teve um efeito benéfico sobre a germinação

numa variedade suscetível, mas os perfilhos oriundos do tratamento térmico foram mais sensíveis aos estresses ambientais e aos ataques de fungos, fato que ocasionou a morte de alguns perfilhos, refletindo na produção e características associadas ao vigor das mudas em algumas parcelas.

Quanto ao teor de sólidos solúveis (brix), houve uma tendência de a testemunha superar os demais tratamentos, isso provavelmente em decorrência do entupimento dos vasos do xilema, causado pela alta incidência da doença, que reduz o fluxo de água (Matsuoka, 1984). A redução da translocação de água para os tecidos resulta em um maior teor de sólidos solúveis no colmo. Matsuoka (1971), avaliando o fluxo de água em colmos infectados, verificou uma tendência de aumento da vazão de água nos vasos dos colmos mais saudáveis. Verificou-se também uma tendência da testemunha (cana doente sem tratamento) em apresentar um maior teor de sacarose (pol), característica altamente correlacionada com o brix. No viveiro secundário, não foi observada nenhuma superioridade da testemunha em relação aos tratamentos; pelo contrário, sete dos oito tratamentos superaram a testemunha em brix, mostrando um comportamento diferente das mudas replantadas em relação às aquelas tratadas que foram utilizadas no viveiro primário. Entretanto, as mudas utilizadas no plantio do viveiro secundário estavam com incidência média no plantio de 26,41%, portanto, severamente infectadas.

Embora o número de colmos por parcela tenha sido maior na testemunha, em cana-planta, houve uma tendência das parcelas tratadas superarem a testemunha na soca, pois se observou um aumento do número de colmos de cana-planta para soca na testemunha de 4%, enquanto, nos demais tratamentos, este foi de 11%. Este resultado sugere que, nos cortes subsequentes, haverá uma tendência das parcelas tratadas rapidamente superarem a testemunha, já que o raquitismo da soqueira agrava-se com os sucessivos cortes. No viveiro secundário, constatou-se que apenas um tratamento superou a testemunha quanto ao número de colmos/parcela, mas os resultados entre tratamentos foram muito próximos, diferentes dos observados no viveiro primário. Observou-se melhor germinação e formação de *stands* mais uniformes nas parcelas cujas mudas foram oriundas dos tratamentos térmicos.

Para a maioria dos tratamentos que sofreram termoterapia, obtiveram-se, nos dois cortes, médias de peso e diâmetro de colmos superiores aos da

testemunha, o que poderia ser explicado pela tendência natural de que quanto maior o número de colmos, menor o diâmetro e peso médio deste colmo. Contudo, houve em cana soca uma diminuição do número, peso e diâmetro de colmos na testemunha, enquanto, nos tratamentos que sofreram termoterapia, houve um aumento do número de colmos com pequena redução do peso e diâmetro médio do colmo. No viveiro secundário, todos os tratamentos superaram a testemunha, em peso médio do colmo, e sete, em diâmetro, mostrando que a muda tratada sadia resulta em melhoria destas características. Este comportamento mostra um efeito benéfico da termoterapia sobre parâmetros importantes na produção agrícola; resultados semelhantes foram relatados por Gheller e Godoy, 1987.

Os resultados de peso da parcela, toneladas de cana por hectare (TCH) e toneladas de brix por hectare (TBH), características mais importantes para produção agrícola, mostram efeito positivo do tratamento térmico, pois em TCH houve uma redução média de cana-planta para soca, em todos os tratamentos de 3,1%, enquanto, na testemunha esta redução foi de 15,95%, o que mostra uma maior estabilidade da produção agrícola nas socarias da cana-de-açúcar das parcelas tratadas, corroborando resultados de trabalhos prévios (Chagas e Matsuoka, 1988). É importante salientar que o raquitismo agrava-se em condições de estresse hídrico (Tokeshi, 1997, Matsuoka, 1971) e que, no período experimental, a precipitação foi favorável ao desenvolvimento da cana (1.154 mm e 1.277 mm para cana-planta e soca, respectivamente). Com os sucessivos cortes e em anos mais desfavoráveis, espera-se que haja aumento nesta diferença entre as parcelas que sofreram algum tipo de tratamento térmico em relação à testemunha. Outro ponto importante é que a variedade testada é suscetível e encontrava-se altamente infestada pela bactéria do raquitismo neste experimento.

Os resultados do viveiro secundário corroboram os efeitos benéficos do tratamento térmico observados no viveiro primário, sendo estes resultados ainda mais expressivos, pois, no viveiro secundário, cinco dos oito tratamentos superaram a testemunha em peso da parcela e TCH, seis em TBH, sendo que nesta última característica o ganho médio dos tratamentos sobre a testemunha foi de 13%. O tratamento 50,5 °C/120 mim/tolete de uma gema/com pré-imersão superou os demais tratamentos nas características ligadas à produção, mostrando que mudas oriundas de viveiro primário, tratadas com a 50,5 °C/120 mim/tolete de uma gema/com pré-imersão, têm maior vigor e produção que os demais tratamentos

testados. Este comportamento não foi observado nas touceiras-mãe do ensaio de viveiro primário, provavelmente devido ao estresse causado pelo tratamento. Comportamento semelhante é observado no primeiro ano dos materiais oriundos de cultura de meristema que apresentam desenvolvimento irregular, mas quando as mudas oriundas destas plântulas micropropagadas são multiplicadas observa-se um aumento de vigor (experiência pessoal de trabalho adquirida na gerência do Laboratório de Cultura de Tecidos – Biofábrica – UFRRJ, por cinco anos).

Nenhum dos tratamentos que passaram pela termoterapia erradicou a bactéria do raquitismo da soqueira, corroborando o trabalho de Gheler (1987), que testou os tratamentos convencionais (50,5 °C/120 min/três gemas e 52 °C/30 min/uma gema), mas sem pré-imersão, concluindo que os tratamentos não inativavam todas as bactérias em colmos de cana-de-açúcar. Neste trabalho, introduziu-se a pré-imersão aos tratamentos convencionais com o objetivo de proporcionar uma melhor limpeza clonal. Verificou-se uma interação positiva entre temperatura X tempo X pré-imersão, pois o tratamento 50,5 °C/120 min/com pré-imersão/três gemas apresentou a menor incidência tanto no viveiro primário, quanto no secundário. Deve-se salientar que, em variedades suscetíveis como a Co 421, o patógeno pode atingir alta concentração de células na seiva (10^8 células/ml de seiva), o que facilita a sua disseminação (Giglioti, 1997).

As reações soro-positivas em cana-planta, menos intensas nas parcelas tratadas, em relação às iniciais (reações soro-positivas utilizadas para seleção dos colmos na instalação do ensaio) demonstram efeito erradicante da termoterapia sobre o patógeno. Entretanto, o rápido aumento na incidência dos colmos infectados de cana-planta para a primeira-soca, em todos os tratamentos, pode ser em função, da alta incidência inicial (pré-tratamento térmico) e residual (pós-tratamento térmico). Steib (1957) relatou um aumento da doença de 16% em cana-planta e de 47% em cana soca. Damann e Ollier (1991), analisando vários cultivares, chegaram a um aumento anual médio na incidência de colmos doentes de 10%. Por isso, espera-se que, após algumas multiplicações ou cortes, a incidência da doença atinja níveis tão elevados quanto àqueles iniciais, antes do tratamento. No viveiro secundário, houve uma alta incidência da doença de 64,23% já em cana-planta. Este rápido aumento da doença de 37,83%, está relacionado com a muda, cuja incidência inicial média era de 26,40%. Estes resultados corroboram os resultados do viveiro primário, cujo aumento de cana-

planta para a soca foi de 30,71%. Nas duas situações os resultados corroboram os trabalhos de Matsuoka (1984), que concluiu que apenas cinco multiplicações são necessárias para que o nível inicial de infecção seja atingido após o tratamento térmico.

Na testemunha, nos viveiros primário e secundário, o aumento da doença foi de 0%, pois esta apresentou 100% de reações positivas ao raquitismo em todas as análises sorológicas, em cana-planta e em soca, indicando que o plantio de mudas infectadas é 100% eficiente na transmissão da doença de um ciclo ao outro.

Com base neste trabalho, para as usinas que renovam o canavieiro com maior frequência, o tratamento 50,5 °C/120 min/tolete três gemas/sem pré-imersão poderá ser indicado para a formação de viveiros. Como o tratamento não elimina a bactéria do raquitismo completamente, torna-se necessária a adoção de outras medidas, como: retratamento térmico dos viveiros já tratados, visando à redução cada vez mais do inóculo inicial (X_0); desinfecção dos instrumentos de cortes nos viveiros para diminuir a disseminação da bactéria e a utilização de cultivares mais resistentes, visando a restringir, ao máximo, tanto o inóculo inicial (X_0) quanto a disseminação da doença. Na prática, todas estas medidas de controle devem ser integradas para o manejo da doença do raquitismo da soqueira.

Levando em consideração o quadro atual do setor canavieiro, com grande expansão de áreas cultivadas, gerando a necessidade urgente de mudas, a falta de mão-de-obra para atividades de produção que leva o aumento rápido da mecanização do corte e plantio, este quadro é desfavorável à adoção das práticas do controle do RSD, por isso, espera-se um agravamento da doença, aumentando a necessidade de novas pesquisas na busca de métodos eficientes de limpeza clonal e de seleção de variedades resistentes. Damann e Ollier (1991) relatam que, na Louisiana em 1986, a incidência de raquitismo foi de 33% em viveiros tratados termicamente, e atribuem o alto nível da doença à alta transmissão no plantio e na colheita mecanizada.

Visando à produção de material propagativo limpo, pode-se utilizar para a cultura de meristemas associada ao tratamento 50,5 °C/120 min/tolete de três gemas/com pré-imersão. Apesar de esse tratamento ter apresentado resultados agrônômicos baixos, ele proporcionou melhores condições sanitárias das mudas. Entretanto, este tratamento deve ser associado à técnica de detecção do patógeno de maior sensibilidade, como o PCR, utilizando “primers” específicos para a bactéria

Lxx, visando detectar os explantes saudáveis e a indexação de plantas matrizes livres de doenças. Alternativa seria testar novos tratamentos térmicos, aumentando-se o binômio temperatura versus tempo de tratamento, mantendo a pré-imersão e ainda introduzindo produtos bactericidas e antibióticos nos tratamentos térmicos e na cultura de tecidos. Logicamente, haverá prejuízos na germinação das gemas, o que poderá impossibilitar a utilização destes tratamentos em larga escala. Contudo, para a cultura de meristemas, que necessita de poucos explantes saudáveis, pode ser viável, principalmente, visando-se à indexação de mudas.

RESUMO E CONCLUSÕES

Colmos infectados do cultivar Co 421, suscetível ao raquitismo, foram selecionados por teste sorológico, sendo estes colmos casualizados e submetidos aos tratamentos combinados de termoterapia a 50,5 °C/120 min ou 52 °C/30 min; toletes de uma ou três gemas; com ou sem pré-imersão por 20 h em água; sendo a testemunha não tratada. Os toletes foram plantados em bandejas e estas dispostas no viveiro num delineamento em blocos casualizados com quatro repetições e nove parcelas. Aos quatro meses, instalou-se um ensaio de campo obedecendo ao delineamento original, sendo feitas as avaliações na cana-planta aos 13 meses e na cana soca aos 12 meses. Os resultados médios das duas colheitas do viveiro primário mostraram efeito positivo do tratamento 50,5 °C/120 min/toletes de três gemas/sem pré-imersão que superou a testemunha, em tonelada de cana e brix por hectare, em 9,75% e 8,32%, respectivamente. No viveiro secundário, o tratamento 50,5 °C/120 min/tolete de uma gema/sem pré-imersão superou a testemunha em TCH (44%) e TBH (52,75%). Quanto à sanidade das mudas, a menor incidência foi de 7,7% no tratamento a 50,5 °C/120 min/toletes de três gemas/com pré-imersão, na média de dois cortes no viveiro primário, e 38,71% no viveiro secundário.

Conclui-se:

- Nenhum dos tratamentos testados elimina completamente a bactéria do raquitismo da soqueira;

- Observou-se uma interação positiva da sanidade com a pré-imersão e tratamentos mais longos. Novos ensaios poderão ser realizados, prolongando o tempo de exposição.
- O tratamento 50,5 °C/120 min/tolete de uma e três gemas/com pré-imersão poderá ser usado em programa de limpeza clonal ou indexação de plantas ou “áreas matrizes”, desde que o mesmo seja associado à técnica de detecção do patógeno de maior sensibilidade.
- O tratamento 50,5 °C/120 min/tolete três gemas/sem pré-imersão poderá ser utilizado para o tratamento térmico das mudas para a formação de viveiros em empresas, pois apresenta aumento de produtividade; mas, este deve ser associado a outras práticas de controle como: desinfecção de instrumentos de corte e variedades resistentes/tolerantes e retratamento térmico cíclico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cardoso, C.O.N. (1986) Isolamento da bactéria do raquitismo (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) no Brasil. *Boletim Técnico COPERSUCAR*, São Paulo, (34):48-52.
- Carneiro, J.B.C. (2001) *Obtenção e análise de especificidade de antissoro (policlonal) contra Leifsonia xyli subsp. xyli agente causal do RSD*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytagazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 42 p.
- Carneiro, J.B.C., Pontes, E.C., Silveira, S.F., Olivares, F.L. (2003) Método de extração de seiva do xilema de cana-de-açúcar e detecção sorológica por dot blot de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Resumo Expandido. *Congresso de Fitopatologia*, Águas de São Pedro.
- Chagas, P.R.R., Matsuoka, S. (1988) Medidas de controle do raquitismo da soqueira. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, (106):40-44.
- Chaves, A., Pedrosa, E.M.R., Cavalcante, J.F.D., Araújo, 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 de cana-planta. *VIII Congresso Nacional da STAB*, Recife, p. 27-34.
- Conab (2005) Estimativa de produção de cana-de-açúcar safra 2005/2006; <http://www.udop.com.br> em 17/10/2005.
- Cruz, C.D. (2001) Programa Genes (versão Windows): Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 648p.

- Damman, K.E.Jr., Ollier, C.A. (1991) Distribution and incidence of ratoon stunting disease in Louisiana sugarcane. *Plant Disease*, 75:568-571.
- Davis, M.J., Gillaspie, A.G., Harris, R.W., Lawson, R.H. (1980) Ratoon stunting disease of sugarcane: isolation of the causal bacteria. *Science*, Washington, 210:1365-1367.
- Davis, M.J., Gillaspie, A.G., Vidaver, A.K., Harris, R.W. (1984) *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*, Washington, 34 (2):107-117.
- Davis, M.J., Dean, J.L., Harrison, N.A. (1988) Distribution of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in resistance to ratoon stunting disease. *Plant Disease*, 72:443-448.
- Evtushenko, L.I., Dorofeeva, L.V., Subbotin, S.A., Cole, J.R., Tiedje, J.M. (2000) *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 Microbiolog.* 50:371-380.
- Gheller, A.C.A., Godoy, G.P. (1987) Eficiência comparativa de dois sistemas de tratamento térmico na inativação do agente causal do raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar. *Anais do Congresso Nacional da STAB*, Olinda, p. 257-266.
- Giglioti, E. (1997) *Conciliação dos métodos de STM e TBIA para determinação de resistência de genótipos de cana-de-açúcar RSD*. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Piracicaba - SP, Escola Superior Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 234p.
- Guzmán, M.L., Victoria, J.I. (1992) Incidencia del raquitismo de la soca (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) en semilleros de la cana de azúcar y evaluación de métodos de su diagnóstico. *Fitopatología Colombiana*, Palmira, 16:126-134.
- Guzmán, M.L., Victoria, J.I. (1993) Empleo del método de inmunofluorescencia directa en la detección del raquitismo de la soca (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*). *Fitopatología Colombiana*, Palmira, 17:21-30.

- Harrison, J., Davis, M.J. (1990) Comparison of serological techniques for diagnosis of ratoon stunting disease. *SugarCane*. 1990. Port Talbot: 5-9 (Resumo em CAB Abstracts on CD-ROM, v. 3A, 1990-91).
- Matsuoka, S. (1971) Incidência do vírus do raquitismo da soqueira em canas provenientes de material propagativo tratado termicamente. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, Mossoró, 4:63-64.
- Matsuoka, S. (1984) Longevidade do efeito do tratamento térmico em canas infectadas pelo raquitismo da soqueira. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 2:57-59.
- Matsuoka, S., Arizono, H., Bassinello, A.I., Gheller, A.C.A., Hoffmann, H.P., Masuda, Y. (1995) Variedades super-precoces da cana-de-açúcar. *Revista Álcool & Açúcar*, 78:22-29.
- Sanguino, A. (1998) Diagnóstico e controle do raquitismo da soqueira causado pela bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*. *Açúcar, Álcool e Subprodutos*, Piracicaba, 17 (1):26.
- Sanguino, A., Moraes, V.A., Santos Filho, O.T.D. (1984) Diagnóstico do raquitismo da soqueira em colmos de cana-de-açúcar. *Anais do Seminário de Tecnologia Agrônômica*, 2, Piracicaba, p. 250-253.
- Steib, R.J., Forbes, I.L., Chilton, S.J.P. (1957) A report on further studies on the ratoon stunting disease of sugarcane in Louisiana. *Journal Sugar*, 19:35-37.
- Tokeshi, H. (1997) Doenças da cana-de-açúcar *In: Manual de Fitopatologia, Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Editora Ceres, p. 207-255.

3.2. EFEITO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NA SANIDADE E NO VIGOR DA MUDAS MICROPROPAGADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR E INOCULADAS COM *LEIFSONIA Xyli* SUBSP. *Xyli*.

RESUMO

Suspensões de células de bactérias endofíticas isoladas de cana-de-açúcar (*Gluconacetobacter diazotrophicus* – *Gd* estirpe PAL5; *Herbaspirillum seropedicae* – *Hs* estirpe HRC54 e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* – *Hr* estirpe HCC103) foram inoculadas isoladamente ou em conjunto (inóculo misto), em frascos de mudas micropropagadas do cultivar Co 421 (suscetível ao raquitismo). Como testemunha, parte das mudas não foi inoculada nem com endófitas e nem com o patógeno. Antes do plantio no campo, as mudas foram aclimatadas sob sombrite 50% e, durante este período (4 meses), amostras de colmos e raízes foram removidas para isolamento e contagem das bactérias inoculadas, utilizando meio semi-sólido semi-seletivo JNFb e LGIP, respectivamente para *Herbaspirillum* spp. e *G. diazotrophicus*. Aos 10 dias que antecederam o transplântio, podaram-se as folhas basais das mudas com tesoura pré-imersa em seiva contaminada (soro-positiva por “dot blot” para presença de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), e as mudas foram plantadas no campo, seguindo-se o delineamento com quatro blocos e nove parcelas, cada uma constituída de linhas de 8 m, espaçadas com 1,40 m, com espaço entre plantas de 0,5 m e aceiro de 2 m. Procederam-se às avaliações na colheita, aos 16 meses. Observou-se que *Gd*

proporcionou ganhos em toneladas de cana por hectare (68,55%) e toneladas de brix por hectare (59,09%) em relação à testemunha. Nos tratamentos combinados de endofíticas com o patógeno, houve indução de tolerância ao raquitismo, pois, apesar da alta incidência de positivos para *Lxx* nas parcelas inoculadas com endófitas, acusando a presença do patógeno, houve melhoria no rendimento agrônômico, em cana-planta, de no mínimo 18,83 t de cana/ha em relação à testemunha, e de 19,09 t de cana/ha, em relação ao tratamento com *Lxx*.

ABSTRACT

Single or mixed cell suspension of endophytic diazotrophic bacteria isolated from sugarcane (*Gluconacetobacter diazotrophicus* – *Gd* strain PAL5; *Herbaspirillum seropedicae* – *Hs* strain HRC54 and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* – *Hr* strain HCC103) and the pathogen were inoculated in micropropagated sugarcane cv. Co 421 (susceptible to RSD) and compared against uninoculated plants under greenhouse and field condition. After inoculation, the plantlets were transferred to greenhouse with 50% of solar irradiance reduction for acclimatation. At four months after inoculation, samples from roots and shoots were harvested for detection and enumeration of introduced bacteria strains using semi-solid JNFb or LGI-P medium, respectively for *Herbaspirillum* spp. and *G. diazotrophicus*. At ten days before field plantation, the basal leaves were cut at the middle portion half by a scissor which have been pre-immersed in contaminated sap extract of diseased plants (confirmed by dot blot immunoassay for *Lxx* presence). The experimental design was random block with four replicates and nine treatments. The experimental unit was designed with one line of 8 meters, with from 1.40 m and 0.5 m, respectively for crop line and plant inside the line, as well the frontal distance between useful plot of 2 m. The harvest was performed 16 months after planting on the field. *Gd* increased the number of sugarcane stalks and the brix per hectare, respectively in 68.55% and 59.09%, when compared with uninoculated control. Inoculation with endophytic bacteria did not cause a decreased the incidence of contaminated stalks. Compared with uninoculated or pathogen inoculated treatments the yield of sugarcane inoculated endophytes were superior in 18.83 and 19.09 ton of stalk per hectare,

respectively. These results can be interpreted as RSD tolerance induction by the in vitro endophytic bacteria inoculation of micropropagated sugarcane.

INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar é a principal atividade agrícola da região Norte Fluminense, com uma área plantada de 116.746 ha, correspondendo a 15% da área agricultável do Estado do Rio de Janeiro (Asflucan, 2002). A produtividade agrícola da cana-de-açúcar no Estado do Rio de Janeiro é baixa, em torno de 46 toneladas de cana/ha (Cide, 2000), enquanto que no Estado de São Paulo (maior produtor brasileiro) é de 80 a 100 t de cana/ha (IBGE, 1996). O principal fator para a baixa produtividade é a deficiência hídrica constante nos meses de maior crescimento (janeiro a março). Esta condição de estresse hídrico propicia o desenvolvimento do 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, Gillaspie, et al., 1981). Essa doença, já foi relatada em 61 países produtores de cana-de-açúcar e sua importância varia em função dos fatores ambientais (Tokeshi, 1997; Rossler, 1974), condição esta recorrente na região Norte-Fluminense. Por isso, acredita-se que o RSD contribua com parcela expressiva na redução da produtividade regional da cana-de-açúcar.

A bactéria *Lxx* está classificada no grupo corineforme, é gram-positiva, aeróbica, pleomórfica e fastidiosa. Cultivada *in vitro*, produz colônias minúsculas e translúcidas após 14 dias de cultivo em meio SC (*Soybean Corn* - descrito por Gillaspie et al., 1981; Cardoso, 1986). Coloniza o xilema da planta obstruindo a translocação da água e nutrientes, especialmente nas condições de estresse hídrico (Davis e Dean, 1984). As dificuldades no isolamento e no cultivo *in vitro*

atrasaram a identificação do agente etiológico da doença (Davis et al., 1980) e, conseqüentemente, a seleção de genótipos resistentes ou tolerantes.

A redução da produção agrícola devido ao raquitismo no Norte-Fluminense foi estudada por Chagas e Matsuoka (1988), em solos de tabuleiro, na região de Macaé-RJ, onde as perdas causadas por RSD, em toneladas de cana por hectare, foram de 21,51%, pela diferença entre parcelas tratadas termicamente (colmos tratados termicamente 50,5°C/2 h) e as parcelas inoculadas com o patógeno (caldo contaminado).

O RSD é disseminado mecanicamente durante a colheita da cana-de-açúcar e por colmos infectados, condição esta que deve ser agravada nos próximos anos pela adoção crescente do plantio e corte mecanizado. A ausência de sintomas externos característicos e específicos é o principal motivo da disseminação da bactéria em todas as regiões canavieiras do mundo (Cardoso, 1986). A sintomatologia inespecífica dificulta a diagnose direta de RSD, que geralmente necessita ser confirmada por testes sorológicos.

As estratégias de controle do RSD visam evitar a entrada do inóculo inicial nas áreas de produção. Um método de controle empregado atualmente é o tratamento térmico de toletes ou minitoletes (50,5 °C/120 min ou 52 °C/30 min). Entretanto, ambos não eliminam completamente a bactéria causadora do raquitismo (Gheller e Godoy, 1987; Matsuoka, 1984). Outro método auxiliar seria a multiplicação pela micropropagação por cultura de meristemas de plantas indexadas (Lee, 1988). Porém, não há método confiável que garanta a eliminação total da bactéria causadora do raquitismo da soqueira.

O biocontrole de doenças de plantas pela utilização de bactérias endofíticas é uma promissora linha de pesquisa, pois estas bactérias podem habitar o interior da planta sem incitar sintomas visíveis de doenças aparentes, competindo, ainda, pelos mesmos sítios de colonização do patógeno. Além disso, há a possibilidade das endófitas acionarem mecanismos de resistências do hospedeiro ou produzir bacteriocinas danosas ao patógeno (Olivares, 2000). Na cultura da cana-de-açúcar, foram descritas varias bactérias endofíticas que colonizam raízes, colmos e folhas, todas diazotróficas (Baldani et al.,1997), sendo que algumas das bactérias endofíticas colonizam os vasos do xilema, que é o hábitat natural da bactéria causadora do raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar.

A hipótese do biocontrole do RSD por bactérias endofíticas abre a perspectiva de controle da doença e, principalmente, possibilita estender os efeitos benéficos do tratamento térmico e da cultura de meristemas por mais ciclos da cultura. Nestas técnicas, a eliminação ou pelo menos a redução da microbiota associada à planta de cana-de-açúcar cria oportunidade efetiva para reintrodução de microrganismos selecionados. Esta reconstrução paulatina da biota pode resultar numa maior produtividade e menor custo para os produtores, justificando assim o investimento em mudas saudáveis. Ademais, a possibilidade do uso das endófitas como forma de controle do RSD possibilitará que variedades com baixa resistência/tolerância ao RSD, mas com grande potencial produtivo, sejam aproveitadas pelos programas de melhoramento e produtores.

Neste contexto, pretende-se avaliar, em condições de campo, o efeito na sanidade e vigor de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, inoculadas com estirpes selecionadas de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de cana-de-açúcar *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, e avaliar o potencial desta prática no controle do RSD.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção de mudas sadias de Co 421

Utilizaram-se mudas micropropagadas da variedade Co 421 produzidas no Laboratório de Cultura de Meristema do Campus Dr. Leonel Miranda (UFRRJ). Para isso, os toletes de Co 421, provenientes da coleção do Campus Dr. Leonel Miranda, foram previamente tratados termicamente a 50,5 °C/120 min e multiplicados por meio de cultura de meristema (Hendre et al.,1983). Parte das plântulas foi transferida para frascos de vidro contendo 50 ml de meio MS modificado, sem hormônios e diluído dez vezes, e inoculada com as bactérias endofíticas, permanecendo por sete dias na presença da bactéria até o transplante para o viveiro (Reis et al.,1999). Plantas não inoculadas (controle) permaneceram pelo mesmo período de tempo em meio MS com 1/10 da força iônica.

Multiplicação e inoculação das bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*

As bactérias endofíticas *Gluconacetobacter diazotrophicus* – *Gd* (isolado PAL5) (Gillis et al., 1989), *Herbaspirillum seropedicae* – *Hs* (isolado HRC54) (Baldani et al., 1986) e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* - *Hr* (isolado HCC103) (Olivares et al.,1996), cedidas pelo professor Fabio Lopes Olivares, do LBCT/UENF, foram repicadas para o meio Digy's líquido (Rodrigues Neto et al.,1986) e incubadas, por

48 horas, a temperatura de 32 °C, sob agitação. O inóculo (constituído das culturas em meio Digy's líquido) foi adicionado às plântulas em meio MS modificado (100 µl de inóculo/plântula/frasco). Após 7 dias da inoculação (DAI), as plântulas foram transplantadas para caixas de isopor de 128 células, contendo substrato de torta de filtro, bagaço-de-cana e terra (1:1:1), e mantidas em viveiro-telado (sombrite 50%) por 20 dias. Seguiu-se a aclimação das plântulas em canteiros, a céu aberto, e, após 150 dias foram plantadas no campo. As mudas não receberam fertilização química, sendo apenas irrigadas diariamente quando necessário.

Inoculação do patógeno

Aos 140 dias do transplante, foi inoculada a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (causadora do RSD) na fase de aclimação no viveiro. A inoculação foi feita pela poda das folhas basais com tesoura pré-imersa em seiva contaminada da variedade CB 49-260, altamente suscetível e comprovadamente infectada por *Lxx* pelo teste sorológico de "Dot Blot" (Carneiro, 2001).

Plantio do experimento no campo

O experimento foi instalado no Campus Dr. Leonel Miranda/UFRRJ, no mês de novembro de 2003, com mudas de 5 meses no delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cada bloco constituído de nove parcelas, com linhas de 8 m, espaçamento entre linhas de 1,40 m e entre plantas de 0,5 m, aceiro de 2 m e linha de bordadura distal. Durante a condução do ensaio, não foi realizada nenhuma irrigação ou adubação. Somente foram feitas capinas regulares. Cada tratamento foi composto de aproximadamente 150 mudas da variedade Co 421 (provenientes de cultura de meristema), que foram inoculadas com bactérias conforme, a que se segue:

- 1- *Gluconacetobacter diazotrophicus* - Gd
- 2- *Herbaspirillum seropedicae* - Hs
- 3- *Herbaspirillum rubrisubalbicans* - Hr
- 4- *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* - Lxx
- 5- *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* – Gd+Lxx
- 6- *Herbaspirillum seropedicae* e *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* – Hs+Lxx

- 7- *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* - Hr+Lxx
- 8- *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* – todas Gd+Hs+Hr+Lxx
- 9- Testemunha – mudas micropropagadas sem inoculação de bactérias

Estimativa da densidade de talos bacterianos de bactérias diazotróficas na seiva, pela contagem em meio semi-seletivo, usando a técnica do número mais provável.

Aos 42 e 86 dias após a inoculação das bactérias endofíticas, foram coletadas cinco plântulas de cada tratamento para se quantificar a população das bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Para tal, utilizou-se 1 g das amostras de raízes e 5 g de folhas e colmos, que foram lavados em água corrente e parcialmente desinfetados com algodão embebido com álcool. Após desinfestação, as amostras de raízes, colmos e folhas foram trituradas em liquidificador com uma solução salina por dois minutos. Em seguida, realizou-se a diluição seriada (10^{-2} a 10^{-7}) das amostras em solução salina. Cem μ l de cada diluição foram aplicados em meio semi-sólido específico, no centro do meio, em triplicata (três frascos para cada diluição). A ausência ou presença da película formada a 1 cm da superfície no meio semi-sólido permitiu estimar, de acordo com a Tabela de McCrady, o Número Mais provável (NMP) de células bacterianas por ml (Dobereiner et al., 1995). Para as espécies de *Herbaspirillum*, foi utilizado o meio semi-sólido JNFb, sendo o malato a fonte de carbono. Já para *Gluconacetobacter diazotrophicus*, foi utilizado o meio LGI-P, tendo como fonte de carbono a sacarose e o caldo de cana (Reis, 1994). No caso de dúvidas sobre a real identificação das bactérias, preparam-se lâminas para visualização dos talos, em microscópio ótico de contraste de fase, seguindo-se a caracterização das colônias em placas que continham os respectivos meios sólidos (Döbereiner et al., 1995).

Além do método clássico de amostragem e trituração dos diferentes órgãos da planta, as bactérias foram detectadas na seiva do xilema extraída na colheita aos 16 meses, numa amostragem composta, constituída de 10 colmos por parcela. As amostras de seiva do xilema foram obtidas conforme descrito por Carneiro et al.

(2003). As amostras de seiva foram diluídas de 10^{-1} a 10^{-4} , em solução salina, para o semeio nos meios JNFb e LGI-P, conforme descrito.

Avaliação das características agronômicas

Avaliou-se, aos 30 dias após transplântio para o campo, a porcentagem de pegamento das mudas, número, altura (cm) e diâmetro (cm) médio dos perfilhos.

Aos 16 meses, o ensaio foi colhido, realizando-se primeiramente a contagem do número de colmos por parcela. Em seguida, foram retiradas do centro de cada parcela 30 colmos em seqüência, que foram utilizados para as avaliações do diâmetro médio do colmo, estimado medindo-se 10 colmos por parcela na altura do quinto internódio basal com paquímetro; o brix da parcela foi estimado com o refratômetro de campo e amostrando-se cinco colmos mais velhos da parcela, na altura do quinto internódio basal; o peso da parcela, estimado pela multiplicação do peso médio do colmo – PMC e número de colmos por parcela - NCP; o peso médio do colmo foi estimado pela relação entre o peso de 30 colmos/30; o TCH – toneladas de cana por hectare - foi estimado por meio do cálculo da área útil da parcela extrapolando para 10.000 m²; e o TBH – toneladas de brix por hectare - foi estimado por meio da equação $TCH \cdot brix / 100$.

Os dados foram submetidos à análise de variância e testes de médias de Scott & knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico Genes (Cruz, 2001).

Estimativa da incidência de colmos com raquitismo por sorologia

Foi realizada uma amostragem nas parcelas do ensaio, retirando-se aleatoriamente 10 colmos por parcela. Amostras de seiva do xilema foram retiradas do terceiro internódio basal dos colmos para serem utilizadas no ensaio sorológico de “Dot Blot”, como descrito por Carneiro et al. (2003). A incidência média da doença na parcela foi estimada pela incidência de colmos que apresentaram reações soropositivas para *Lxx*, cuja a fórmula é: (número de reações positivas/número de amostras)*100. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de médias de Scott & knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico Genes (Cruz, 2001).

RESULTADOS

Aos 42 e 86 dias após a inoculação, foram feitos o reisolamento e a quantificação das bactérias endofíticas. Constatou-se, aos 42 dias, a presença de *Gluconacetobacter diazotrophicus* nos tratamentos em que esta foi inoculada com uma maior população nas raízes que na parte aérea. Entretanto, nas parcelas onde se inocularam todas as bactérias, *Gluconacetobacter diazotrophicus* não foi recuperada na parte aérea. Observou-se também *Gd* em pequena população nas parcelas inoculadas com *Lxx*. Aos 86 dias, observou-se novamente a presença de *Gd* nos tratamentos onde foi inoculada, mas com densidade menor de células nos tecidos radiculares, em relação ao primeiro reisolamento. Aos 86 dias, também foi detectada a presença de *Gd* nas raízes das parcelas inoculadas com todas as bactérias (Tabelas 1 e 2).

Aos 42 dias, *Herbaspirillum seropedicae* foi reisolada na parte aérea, no segundo isolamento, aos 86 dias, na parte aérea e nas raízes com números populacionais nas parcelas onde foi inoculada. Já *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foi isolada, aos 42 dias, em densidades maiores nas raízes em relação à parte aérea. No reisolamento, aos 86 dias, observou-se uma diminuição nos números populacionais desta bactéria na raiz, enquanto que na parte aérea a população praticamente não se alterou (Tabelas 1 e 2).

No tratamento onde todas as bactérias foram inoculadas (inóculo misto), observou-se que tanto a população de *Herbaspirillum* spp. quanto a de *Gluconacetobacter* apresentavam números populacionais baixos em comparação

Tabela 1 – Densidade de talos bacterianos (nº células/grama de massa fresca) em raízes e parte aérea das plantas de cana-de-açúcar, aos 42 dias, e estimada pelo número mais provável (NMP) aos 7 dias, após a incubação, em meio semi-seletivo

TRATAMENTO	Nº CELULAS/G			
	RAÍZ		PARTE AÉREA	
	JFNB	LGIP	JFNB	LGIP
Gd	nd ¹	7X10 ⁶	nd ²	7X10 ²
Hs	nd ¹	nd ¹	4,5 x 10 ³	nd ²
Hr	1,5X10 ⁶	nd ¹	7 x10 ³	nd ²
Lxx	nd ¹	nd ¹	9 x10 ²	3 x10 ²
Gd+Lxx	nd ¹	1,5 x 10 ⁵	nd ²	4,5 x 10 ³
Hs+Lxx	3 x 10 ⁵	nd ¹	nd ²	nd ²
Hr+Lxx	nd ¹	nd ¹	1,5 x 10 ⁴	nd ²
Todas	nd ¹	nd ¹	Nd	1,5 x 10 ⁴
Test	nd ¹	nd ¹	1,5 x 10 ⁴	nd ²

nd – não detectada;

nd¹ – não detectada na diluição superior a 10⁻⁴ em raízes;

nd² – não detectada na diluição superior a 10⁻² em parte aérea;

JFNB – meio seletivo para isolamento de *Herbaspirillum*;

LGIP – meio seletivo para isolamento de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Tabela 2 – Densidade de talos bacterianos (nº células/grama de massa fresca) em raízes e parte aérea das plantas de cana-de-açúcar aos 86 dias, e estimada pelo Número mais provável (NMP) aos 7 dias, após a incubação, em meio semi-seletivo

TRATAMENTO	Nº CELULAS/G			
	RAÍZ		PARTE AEREA	
	JFNB	LGIP	JFNB	LGIP
Gd	nd ¹	6 x10 ²	nd ²	3 x10 ³
Hs	1,5 x10 ³	nd ¹	3,5 x 10 ³	nd ²
Hr	3,5 x 10 ³	nd ¹	3,5 x 10 ³	nd ²
Lxx	nd ¹	nd ¹	nd ²	nd ²
Gd+Lxx	nd ¹	3 x10 ²	nd ²	9 x10 ²
Hs+Lxx	2,0 x 10 ³	nd ¹	2,0 x 10 ⁴	nd ²
Hr+Lxx	1,5 x10 ³	nd ¹	9 x10 ²	nd ²
Todas	9 x10 ²	1,5 x10 ³	nd ²	nd ²
Test	nd ¹	Nd ¹	nd ²	nd ²

nd – não detectada;

nd¹ – não detectada na diluição superior a 10⁻⁴ em raízes;

nd² – não detectada na diluição superior a 10⁻² em parte aérea;

JFNB – meio seletivo para isolamento de *Herbaspirillum*;

LGIP – meio seletivo para isolamento de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

aos tratamentos onde as bactérias foram inoculadas individualmente (inóculo simples). Na inoculação mista, aos 42 dias, somente foi isolada *Gluconacetobacter* da parte aérea e, aos 86 dias, isolou-se *Herbaspirillum* das raízes e *Gluconacetobacter* da parte aérea.

No tratamento com *Lxx* em que não se inocularam endófitas, detectou-se aos 42 dias a presença tanto de *Herbaspirillum* quanto de *Gluconacetobacter* em baixas densidades. Aos 86 dias, não foi detectada a presença destas bactérias. Na testemunha, no primeiro isolamento, detectou-se *Herbaspirillum*, mas, aos 86 dias, não foi detectada nenhuma bactéria (Tabelas 1 e 2).

No isolamento realizado aos 16 meses, quando se optou pela extração da seiva, observou-se uma baixa densidade de bactérias endofíticas na seiva, pois somente em 06 das 36 parcelas foram isoladas as bactérias. No tratamento *Hr*, foram detectadas baixas populações de *Herbaspirillum* em todos os blocos: 1 – $2,5 \times 10^2$ células bacterianas por ml de seiva bruta de cana no meio LGIP, 2 – $0,4 \times 10^2$ células bacterianas por ml de seiva bruta de cana nos meios LGIP e JFNb, 3 – $2,5 \times 10^2$ células bacterianas por ml de seiva bruta de cana no meio LGIP e 4 – $0,4 \times 10^2$ células bacterianas por ml de seiva bruta de cana no meio LGIP e $2,5 \times 10^2$ células bacterianas por ml de seiva bruta de cana no meio JNFb. Além disso, numa única parcela do tratamento *Hr + Lxx*, foi detectada baixa população de *Herbaspirillum* no bloco 4, apresentando $2,5 \times 10^2$ bactérias no meio LGIP. Na testemunha, no bloco 4, foi detectada a *Herbaspirillum* na concentração de $9,5 \times 10^3$ células bacterianas por ml de seiva bruta de cana e *Gluconacetobacter* $4,5 \times 10^3$ células bacterianas por ml de seiva bruta de cana.

Os parâmetros avaliados aos 30 dias, após transplântio para o campo, mostraram que apenas o número de perfilhos por parcela não apresentou diferença estatística pelo teste F a 5% (Tabela 3). Quanto à porcentagem de pegamento das mudas, os melhores tratamentos foram a testemunha, todas as bactérias inoculadas, *Hr+Lxx*, *Hs+Lxx*, *Gd* e *Lxx*. Na maioria dos tratamentos, a porcentagem de pegamento das mudas foi de 100%, exceto a dos tratamentos, com *Hs*, de 85%; *Hr*, de 97%; *Lxx*, de 98,33% e *Gd+Lxx*, de 97%.

Quanto à altura e diâmetro médio dos perfilhos, o melhor resultado foi observado nas plantas inoculadas com *Gd*, com altura e diâmetro médio de 75,42 e 1,5 cm, respectivamente. Na observação visual do vigor aos 30 dias, notou-se que

o tratamento *Gd* apresentava um maior vigor e crescimento que os demais tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados do número, altura e diâmetro médio dos perfilhos e porcentagem de pagamento aos 30 dias após transplante para o campo, de mudas de cana inoculadas com bactérias endofíticas e *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Trat	N. perfilhos	Trat	Altura perfilho (cm)	Trat	Diâmetro perfilho (cm)	Trat	% Pagamento
Gd	78,75a	Gd	75,415a	Gd	0,15 a	Gd	100,00a
Hs+Lxx	74,75a	Todas	58,48b	Hs	0,08b	Hs+Lxx	100,00a
Lxx	66 a	Gd+Lxx	54,13b	Gd+Lxx	0,08b	Todas	100,00a
Todas	60a	Hs+Lxx	53,67b	Hs+Lxx	0,08b	Test	100,00a
Hr+Lxx	52,25a	Hr+Lxx	52,03b	Hr+Lxx	0,08b	Hr+Lxx	100,00a
Test	52,25a	Hr	51,42b	Todas	0,08b	Lxx	98,33 ^a
Hr	50,5a	Lxx	50,21b	Hr	0,07b	Hr	96,67a
Hs	41,75a	Hs	49,62b	Lxx	0,07b	Gd+Lxx	96,67 ^a
Gd+Lxx	39,25a	Test	47,08b	Test	0,07b	Hs	85,00b
CV	37,1		10		16,24		4,76
Média	57,3		54,68		0,08		97
F	1,62		9,46		10,04		4,41

Gluconacetobacter diazotrophicus – *Gd*; *Herbaspirillum seropedicae* – *Hs*; *Herbaspirillum rubrisubalbicans* - *Hr*; *Leifsonia xyli*, subsp. *xyli* – *Lxx*. CV % - coeficiente de variação, média dos tratamentos e F – valor de F calculado pela análise de variância.

Na colheita do experimento, verificou-se que, de todos os parâmetros agrônômicos analisados (brix da parcela; peso da parcela; peso médio do colmo; número de colmos por parcela; TCH – toneladas de cana por hectare; TBH – toneladas de brix por hectare), apenas o número de colmos por parcela e diâmetro médio do colmo não apresentaram diferenças mínimas significativas entre os tratamentos, pelo teste F a 5% (Tabela 4).

Quanto ao número de colmos os tratamentos *Gd* e *Hs+Lxx* destacaram-se, sendo os piores tratamentos o *Hs*, *Gd+Lxx*, *Lxx*, testemunha e *Hr*, que ficaram abaixo da média de 91,47 colmos por parcela. Quanto ao diâmetro médio do colmo, os resultados foram semelhantes, mas o tratamento *Hr+Lxx* superou os demais, sendo os piores tratamentos a testemunha, todas as bactérias, *Hs*, *Hs + Lxx*, os quais apresentaram médias abaixo de 2,71 centímetros de diâmetro (Tabela 4).

Em relação ao brix, o tratamento em que foram inoculadas todas as bactérias diferiu significativamente dos demais tratamentos. O pior brix foi o do tratamento *G,d* com 15,06, bem abaixo da média de 16,67 (Tabela 4).

Quanto ao peso médio do colmo, pelo teste Scott & knott a 5%, observaram-se os melhores resultados nos tratamentos: *Hr+Lxx*, *Gd+Lxx*, *Gd*, *Hr* e *Hs+Lxx*. Os piores resultados foram o da testemunha, *Lxx* e todas as bactérias; estes tratamentos ficaram abaixo da média de 1,63 Kg por colmo (Tabela 4).

Quanto ao peso de colmos por parcela, pelo teste de Scott & knott a 5%, os tratamentos que se destacaram foram *Gd*, *Hr+Lxx* e *Hs+Lxx*, sendo os piores tratamentos *Hs*, *Lxx*, testemunha, *Gd+Lxx* e todas as bactérias, que ficaram abaixo da média de 150,42 Kg de cana por parcela (Tabela 4).

Para toneladas de cana por hectare (TCH), pelo teste Scott & knott a 5%, verificou-se que os tratamentos *Gd*, *Hr+Lxx* e *Hs+Lxx* destacaram-se em relação aos demais, sendo que o tratamento *Gd* superou a testemunha em 74,79 toneladas de cana por hectare, e os piores resultados foram os dos tratamentos *Hs* (que apresentou falhas) e *Lxx*. Ambos ficaram abaixo da testemunha e da média de 134,30 toneladas de cana por hectare. Dos tratamentos combinados, em que foram inoculadas *Lxx* e bactérias endofíticas, todos superaram a testemunha e o tratamento com *Lxx*. Contudo, destes tratamentos combinados, apenas dois superaram a média (134,30 t/ha), o *Hr+Lxx* e *Hs+Lxx* (Figura 1).

Para a TBH (toneladas de brix por hectare), pelo teste Scott & knott a 5%, observou-se que os tratamentos *Gd*, *Hr+Lxx*, *Hs+Lxx*, *Gd+Hr+Hs+Lxx* e *Hr* se destacaram. Os tratamentos *Hs*, testemunha e *Lxx* apresentaram os piores resultados, ficando abaixo da média. Dos tratamentos combinados onde inocularam-se *Lxx* e bactérias endofíticas, todos superaram a testemunha e o tratamento com *Lxx*. Contudo, destes tratamentos combinados apenas três superaram a média (22,28 t de brix/ha), o *Hr+Lxx*, *Hs+Lxx* e todas as bactérias (Figura 2).

Quanto à incidência de colmos soro-positivos à *Lxx*, em cana-planta, pelo teste Scott & knott a 5%, observaram-se as maiores incidências nos tratamentos *Hs+Lxx*, *Gd*, *Hr+Lxx*, *Gd+Lxx*, *Hs* e testemunha. As menores incidências foram observadas nos tratamentos *Hr*, *Lxx* e todas as bactérias. A média da incidência, em cana-planta, foi de 16,39%, sendo a maior incidência detectada no tratamento *Hs+Lxx*, com 32,5% (Figura 3). Os tratamentos *Gd*, *Hr* e *Hs* apresentaram poucas reações positivas fortes ao raquitismo, já o tratamento *Lxx*, testemunha, *Hr* e todas

as bactérias apresentaram reações fracas; o *Gd+Lxx* e *Hs+Lxx*, muitas reações fortes (Figuras 4 e 5).

Tabela 4 - Resultados das características associadas ao vigor e sanidade na colheita aos 16 meses, em cana-planta, após inoculação de mudas micropropagadas com bactérias endofíticas e *Lxx*.

Tratamentos	Parâmetros						
	Brix	Tratamentos	Número médio de colmos	Tratamentos	Peso médio do colmo	Tratamentos	Diâmetro médio do colmo
<i>Gd+Hs+Hr+Lxx</i>	19,26a	<i>Gd</i>	119a	<i>Gd+Lxx</i>	1,84a	<i>Hr+Lxx</i>	2,85a
<i>Hr</i>	16,93b	<i>Hs+Lxx</i>	104,5a	<i>Hr+Lxx</i>	1,82a	<i>Hr</i>	2,80a
<i>Hs+Lxx</i>	16,86b	<i>Hr+Lxx</i>	96,25a	<i>Gd</i>	1,73 a	<i>Gd+Lxx</i>	2,80a
<i>Hr+Lxx</i>	16,58b	<i>Gd+Hs+Hr+Lxx</i>	93 a	<i>Hr</i>	1,70a	<i>Lxx</i>	2,75 a
<i>Gd+Lxx</i>	16,44b	<i>Hr</i>	90,5a	<i>Hs+Lxx</i>	1,64 a	<i>Gd</i>	2,72 a
<i>Lxx</i>	16,43b	Testemunha	85a	<i>Gd+Hs+Hr+Lxx</i>	1,54b	<i>Hs+Lxx</i>	2,68 a
<i>Hs</i>	16,31b	<i>Lxx</i>	80,75 a	<i>Hs</i>	1,52b	<i>Hs</i>	2,64a
Testemunha	16,08b	<i>Gd+Lxx</i>	79 a	<i>Lxx</i>	1,48b	<i>Gd+Hs+Hr+Lxx</i>	2,62a
<i>Gd</i>	15,06b	<i>Hs</i>	75,25a	Testemunha	1,46b	Testemunha	2,56a
Média	16,67	Média	91,47	Média	1,63	Média	2,71
CV%	7,42	CV%	20,54	CV%	11,06	CV%	9,03
F	3,27	F	2,16	F	2,26	F	0,61

Tratamentos	Peso da parcela	Tratamentos	TCH	Tratamentos	TBH	Tratamentos	Incidência média
<i>Gd</i>	205,96a	<i>Gd</i>	183,89a	<i>Gd</i>	27,46a	<i>Hs+Lxx</i>	32,50a
<i>Hr+Lxx</i>	176,08a	<i>Hr+Lxx</i>	157,21a	<i>Hr+Lxx</i>	25,94a	<i>Gd</i>	30,00a
<i>Hs+Lxx</i>	172,27a	<i>Hs+Lxx</i>	153,81a	<i>Hs+Lxx</i>	25,89a	<i>Hr+Lxx</i>	22,50a
<i>Hr</i>	153,31b	<i>Hr</i>	136,89b	<i>Gd+Hs+Hr+Lxx</i>	24,74a	<i>Gd+Lxx</i>	20,00a
<i>Gd+Hs+Hr+Lxx</i>	143,65b	<i>Gd+Hs+Hr+Lxx</i>	128,26b	<i>Hr</i>	23,09a	<i>Hs</i>	17,50a
<i>Gd+Lxx</i>	143,39b	<i>Gd+Lxx</i>	128,03b	<i>Gd+Lxx</i>	21,22b	Testemunha	15,00a
Testemunha	122,19b	Testemunha	109,10b	<i>Lxx</i>	18,12b	<i>Gd+Hs+Hr+Lxx</i>	5,00b
<i>Lxx</i>	122,02b	<i>Lxx</i>	108,94b	Testemunha	17,26b	<i>Hr</i>	2,50b
<i>Hs</i>	114,9b	<i>Hs</i>	102,52b	<i>Hs</i>	16,80b	<i>Lxx</i>	2,50b
Média	150,42	Média	134,3	Média	22,28	Média	16,39
CV%	22,9	CV%	22,9	CV%	23,28	CV%	80,18
F	3,02	F	3,02	F	2,48	F	2,93

Gluconacetobacter diazotrophicus – *Gd*; *Herbaspirillum seropedicae* – *Hs*; *Herbaspirillum rubrisubalbicans* - *Hr*; *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* - *Lxx*, CV % - coeficiente de variação, média dos tratamentos e F – valor de F calculado pela análise de variância. Brix – teor de sólidos solúveis, TCH – tonelada de cana por hectare e TBH – tonelada de brix por hectare.

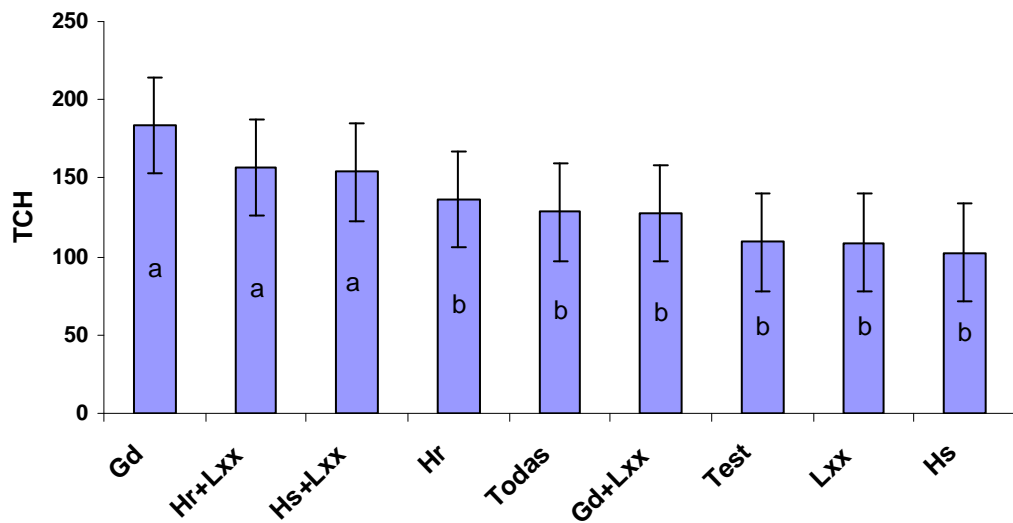


Figura 1 – Comparação da produção em toneladas de cana por hectare, dos tratamentos inoculados com bactérias endofíticas e com *Lxx*, e não inoculados. *Gluconacetobacter diazotrophicus* – Gd; *Herbaspirillum seropedicae* – Hs; *Herbaspirillum rubrisubalbicans* - Hr; *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* – Lxx; Todas Gd+Hs+Hr+Lxx; Testemunha – Test.

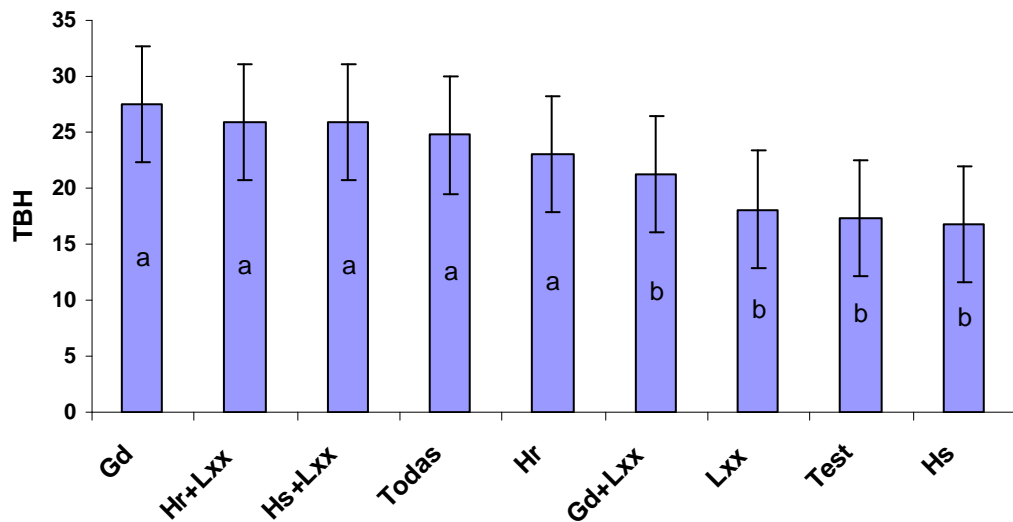


Figura 2 – Comparação da produção em toneladas de brix por hectare, dos tratamentos inoculados com bactérias endofíticas e com *Lxx* e não inoculados. *Gluconacetobacter diazotrophicus* – Gd; *Herbaspirillum seropedicae* – Hs; *Herbaspirillum rubrisubalbicans* - Hr; *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* – Lxx; Todas Gd+Hs+Hr+Lxx; Testemunha – Test.

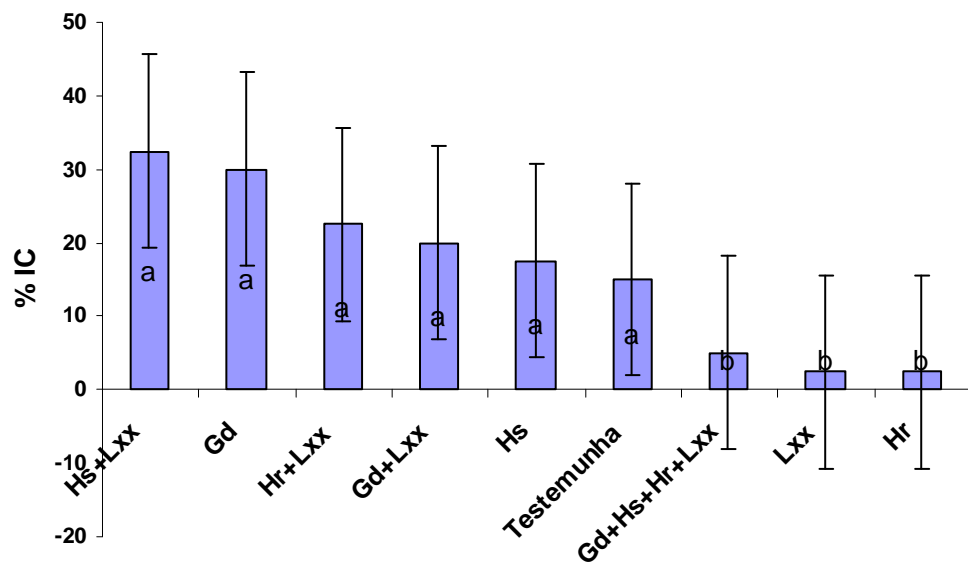


Figura 3– Incidência média de colmos soro-positivos para *Lxx*, em cana-planta, aos 16 meses, após transplante de mudas micropropagadas e inoculadas com bactérias endofíticas e *Lxx* e não inoculadas. *Gluconacetobacter diazotrophicus* – *Gd*; *Herbaspirillum seropedicae* – *Hs*; *Herbaspirillum rubrisubalbicans* - *Hr*; *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* – *Lxx*; Todas *Gd+Hs+Hr+Lxx*; Testemunha – Test.

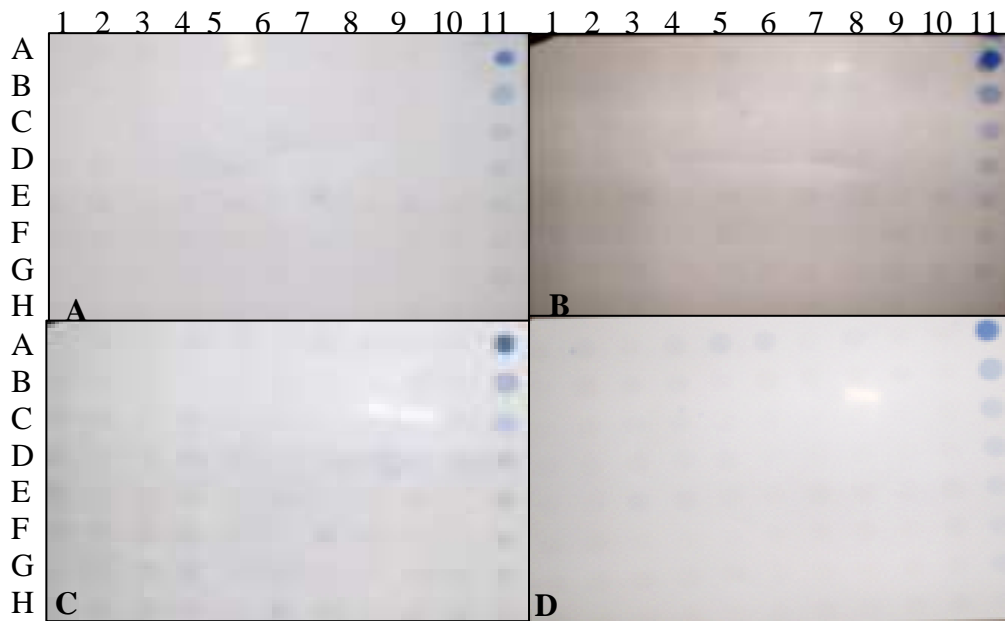


Figura 4 - Membranas de nitrocelulose evidenciando reações soro-positivas (azuis) para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, em amostras de seiva do xilema de colmos da variedade Co 421 de cana-planta. Observam-se reações positivas em todos os tratamentos. As amostras em letras (linhas) e número (colunas):

Membrana A – A1 à A10, B1 à B10, C1 à C10 e D1 à D10 – tratamento com *Gd*; E1 à E10, F1 à F10, G1 à G10 e H1 à H10 – tratamento com *Hs*;

Membrana B - A1 à A10, B1 à B10, C1 à C10 e D1 à D10 – tratamento com *Hr*; E1 à E10, F1 à F10, G1 à G10 e H1 à H10 – tratamento com *Lxx*;

Membrana C - A1 à A10, B1 à B10, C1 à C10 e D1 à D10 – tratamento com *Gd+Lxx*; E1 à E10, F1 à F10, G1 à G10 e H1 à H10 – tratamento com *Hs+Lxx*;

Membrana D - A1 à A10, B1 à B10, C1 à C10 e D1 à D10 – tratamento com *Hr+Lxx*; E1 à E10, F1 à F10, G1 à G10 e H1 à H10 – tratamento com *Gd+Hs+Hr+Lxx*;

Amostras controle:

A11 – suspensão bacteriana de *Lxx*;

B11 – seiva de xilema infectada com *Lxx*;

C11 – seiva de xilema infectada com *Lxx* diluída 1:2;

D11 – seiva de xilema infectada com *Lxx* diluída 1:4;

E11 – seiva de xilema infectada com *Lxx* diluída 1:6;

F11 – seiva de xilema infectada com *Lxx* diluída 1:8;

G11 – seiva de xilema infectada com *Lxx* diluída 1:10;

H11 – seiva de xilema filtrada em membrana milipore (0.2 µm).



Figura 5 – Membranas de nitrocelulose evidenciando reações soro positivas (azuis) para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, em amostras de seiva do xilema de colmos da variedade Co 421 de cana-planta. Observam-se reações positivas na testemunha, isto é, cana oriunda de cultura de meristema. As amostras em letras (linhas) e número (colunas): A1 à A10, B1 à B10, C1 à C10 e D1 à D10 – testemunha; Amostras controle:
 A11 – suspensão bacteriana de *Lxx*;
 B11 – seiva de xilema infectada com *Lxx*;
 C11 – seiva de xilema infectada com *Lxx* diluída 1:2;
 D11 – seiva de xilema infectada com *Lxx* diluída 1:4;
 E1 – seiva de xilema infectada com *Lxx* diluída 1:6;
 E2 – seiva de xilema infectada com *Lxx* diluída 1:8;
 E3 – seiva de xilema infectada com *Lxx* diluída 1:10;
 E4 – seiva de xilema filtrada em membrana milipore (0.2 μm).

DISCUSSÕES

Os dados de reisolamento das bactérias endofíticas inoculadas indicaram tendência de maiores números populacionais nos tecidos radiculares em relação à parte aérea, corroborando resultados de Reis (2000). No primeiro isolamento, aos 42 dias, foi detectada a presença de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. em algumas parcelas inoculadas apenas com *Lxx*, que pode estar associada à não eliminação das bactérias endofíticas pelo tratamento térmico e cultura de meristema. Entretanto, no segundo isolamento, aos 86 dias, não foi reisolada nenhuma bactéria no tratamento *Lxx*.

Quando se tentou isolar as bactérias da seiva do xilema, aos 16 meses, em que os colmos encontravam-se maduros, não se obteve sucesso, exceto em algumas parcelas, onde foram detectadas pequenas densidades de *Herbaspirillum* spp., e numa parcela com *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Provavelmente, a quantidade de bactérias endofíticas nos vasos do xilema, no estágio final de maturação dos colmos de cana-de-açúcar, era reduzida ou ausente. Baldani (1997) cita que *Herbaspirillum seropedicae* coloniza os vasos do xilema em pequenas densidades de células, por isso, dificilmente causa sintomas, enquanto *Herbaspirillum rubrisubalbicans* coloniza os vasos em altas concentrações, causando em variedades suscetíveis a estria mosqueada (Olivares, 1997). Ademais, Reis (2000) relata que há uma redução da população de *Gd* no final do ciclo da cultura, a partir dos 15 meses, não sendo observado o mesmo para *Hs* e *Hr*. Já Costa e Ruschel (1981), estudando a flutuação populacional de microrganismos em

cana-de-açúcar, observaram que há uma influência direta da época do ano e do estado fisiológico da cultura na população de bactérias diazotróficas. Em decorrência do relatado acima, esperava-se que a população das bactérias endofíticas, na seiva de xilema, aos 16 meses, fosse baixa, mas a presença de *Herbaspirillum* spp. nas parcelas inoculadas com *Hr* mostrou que esta bactéria coloniza os vasos do xilema nos internódios basais dos colmos de cana-de-açúcar, o que pode ser um indicativo de que ela esteja competindo, com os mesmos sítios de colonização, com a bactéria causadora do raquitismo.

Os vasos do xilema são o hábitat natural de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, sendo que, internódios basais, o local de maior concentração de *Lxx* principalmente no estágio fisiológico de maturação (Harrison e Davis, 1988). A dinâmica populacional de *Lxx* facilita a disseminação na colheita, por isso, esperava-se que bactérias endofíticas que colonizam os vasos do xilema, durante todo o ciclo da cultura da cana-de-açúcar, tivessem um efeito na redução da colonização de *Lxx*. Entretanto, a dinâmica populacional das bactérias endofíticas e a do patógeno são diferentes; enquanto o patógeno aumenta a população com a maturação (Harrison e Davis, 1988) há uma tendência natural de as bactérias endofíticas diminuir (Costa e Ruschel, 1981). Este comportamento, associado às características da cultura da cana-de-açúcar (aumento do teor de sacarose associado ao período de colheita), promove a colonização dos vasos do xilema por *Lxx* no final do ciclo, o que facilita a disseminação do raquitismo da soqueira durante a colheita.

Mecanismos devem ser criados na colheita ou pós-colheita para que a população das bactérias endofíticas seja restabelecida, já que encontra-se baixa no período de colheita. Outro agravante é a crescente mecanização das atividades agrícolas por que passam, por exemplo, a cultura da cana-de-açúcar, principalmente, no plantio e colheita mecanizada. Estas atividades proporcionam uma disseminação mais rápida da bactéria do raquitismo da soqueira. Damann e Ollier (1991), estudando a distribuição da incidência do raquitismo, na Louisiana, relatam que a incidência da doença foi de 33% em viveiros em decorrência da alta transmissão mecânica no plantio e colheita. Hughes e Steindl (1955), estudando a disseminação do raquitismo da soqueira, estimaram que a máquina de plantio transmite o raquitismo, a partir de somente uma planta doente, para 60 outras plantas à frente. Esses dados mostram que há uma tendência natural do aumento da incidência do raquitismo, seja pela mecanização da cultura ou pela não adoção das

práticas de controle, como a utilização de mudas sadias, resistência varietal, desinfecção das lâminas das máquinas de plantio e corte e instrumentos de colheita manual.

Quanto às características importantes para a produção agroindustrial, brix, número, peso e diâmetro médio do colmo, peso da parcela, toneladas de cana por hectare (TCH) e toneladas de brix por hectare (TBH), observou-se um efeito positivo de *Gd*. Houve um aumento médio nas parcelas de *Gd* em relação às da testemunha de 10,2 toneladas de brix por hectare. Este aumento na produtividade corrobora o que Olivares (informações pessoais) relatou: um aumento de 28% no peso de matéria seca, na parte aérea, em decorrência da inoculação de *Gd* (estirpe Pal 5; a mesma utilizada neste trabalho) em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. Quando se associou as bactérias *Gd* + *Lxx*, o resultado em TCH foi 43,63% menor em relação ao das plantas com *Gd*, mostrando que a bactéria do raquitismo teve um efeito negativo sobre *Gd* já em cana-planta. Entretanto, parte deste efeito pode ter sido minimizado pelo efeito de *Gd*, pois o rendimento agrícola de *Gd* + *Lxx* superou a testemunha e as plantas inoculadas com *Lxx*, em TCH, em 17,35% e 17,52%, respectivamente. A bactéria *Gd* mostrou um efeito negativo, quando inoculada isoladamente, sobre o brix (teor de sólidos solúveis), pois o vigor vegetativo induzido por esta bactéria levou a uma excessiva brotação de perfilhos com idades de maturação diferentes, conseqüentemente, ocasionado um menor teor de sólidos solúveis. A alta incidência de raquitismo nas plantas inoculadas com *Gd* e *Gd* + *Lxx* mostra primeiramente que a limpeza clonal preconizada pelo tratamento térmico e cultura de meristema não ocorreu e que, aparentemente, não houve impedimento completo da colonização de *Lxx* por *Gd*. A utilização de *Gd* como agente de biocontrole deve ser mais estudada. Neste estudo, a inoculação precoce do patógeno pode ter contribuído negativamente para a colonização dos vasos do xilema por *Gd*, já que naturalmente, em condições normais nos campos, esta inoculação seria na época da colheita, isto é, dos 12 aos 18 meses após o plantio.

A inoculação com *Hs* teve um efeito negativo nas características associadas à produção; em toneladas de brix por hectare foi inferior a 1,32 t, em relação às plantas com *Lxx*, mostrando que o efeito de *Hs* foi mais negativo que o da *Lxx*, e que houve uma interação negativa entre cultivar Co 421 e *Hs*. Olivares (1997) relata que ocorrem diferentes níveis de interação entre bactérias e espécies de plantas ou ainda uma afinidade entre estirpes e cultivares. Este fato explica, em parte, o baixo

desenvolvimento inicial que resultou, posteriormente, em baixos rendimentos agrícolas nas plantas com *Hs*. Entretanto, observou-se quando se associou *Hs* à *Lxx* melhor desenvolvimento em relação à testemunha e às plantas inoculadas somente com *Lxx*, mostrando um efeito positivo intrigante da interação das duas bactérias. A competição entre as bactérias (*Hs* e *Lxx*) pode ter ocasionado uma maior atividade da *Hs* (como fixadora de nitrogênio), beneficiando a planta hospedeira. Este comportamento foi verificado em menor intensidade nas plantas com *Hr* + *Lxx*. Baldani (1997) trata ambas as bactérias (*Hs* e *Hr*) como bactérias fitopatogênicas fixadoras de nitrogênio e relata que *Hr*, quando inoculada no limbo foliar, desenvolve sintomas de estrias mosqueadas na cultivar B-4362 e não na SP 70-1143 (resistente). A *Hs* pode induzir reações de hipersensibilidade em folhas de cana-de-açúcar (Olivares et al., 1997). Todavia, neste trabalho, a cultivar utilizada Co 421 não apresentou nenhum sintoma de estria mosqueada, mas uma pequena clorose nas folhas e desenvolvimento inicial reduzido nas plantas inoculadas com *Hs*. Não há informações sobre a reação da inoculação das bactérias (*Hs* e *Hr*) na cultivar Co 421, a qual pode ser suscetível, podendo responder a esta infecção acionando os mecanismos de defesa da planta pela deposição de gomas, compostos fenólicos e calose (Baldani et al., 1997). Atuação destes mecanismos de defesa da planta leva a um aumento da taxa de respiração, podendo diminuir a taxa de fotossíntese, o que resultaria em menor desenvolvimento (Bergamin et al., 1995). Isso explicaria o fraco desempenho agrícola das plantas inoculadas com *Hs*, principalmente na fase inicial de desenvolvimento.

A bactéria *Hs* não apresentou efeito sobre a colonização de *Lxx*, pois a incidência de colmos infectados foi alta nas plantas inoculadas com *Hs* e *Hs* + *Lxx*, mostrando que não houve restrição de colonização da *Lxx*. Nas plantas inoculadas com *Hs*, houve baixo rendimento associado à alta incidência de colmos soro positivos para *Lxx*, apontando que não houve controle do patógeno e nem ganhos de produção, sendo que as plantas reagiram à inoculação da *Hs* de maneira negativa. Nas plantas inoculadas com *Hs* + *Lxx*, houve melhor rendimento associado à alta incidência para *Lxx*, mostrando uma indução de tolerância à doença, fato esse explicado por uma interação das duas bactérias ou pela indução de maior atividade da *Hs* como fixadora de nitrogênio, após a inoculação de *Lxx*. Segundo Gillaspie (1966), em anos sem deficiência hídrica, em solos argilosos e adubação com sulfato de amônia reduzem a severidade do raquitismo da soqueira.

Gul e Hassan (1995) relataram a redução da incidência de raquitismo em 22,89% e ganhos de 29,09 toneladas de cana por hectare, com a aplicação de sulfato de amônia e concluíram que ocorreu uma espécie de supressão da doença com a adubação.

Salienta-se que, neste trabalho, o ensaio foi instalado em solo argiloso; no ano de condução do ensaio, não houve deficiência hídrica, podendo ser a fonte de nitrogênio advinda, em parte, da atividade diazotrófica das bactérias inoculadas. Todos esses fatores podem ter contribuído positivamente para a indução da tolerância observada nas plantas inoculadas com bactérias endofíticas e o patógeno. A bactéria *Hs*, quando inoculada isoladamente, apresentou os piores resultados, não sendo isolada na seiva do xilema das plantas as quais exibiram altas incidências do raquitismo e fracos rendimentos agrícolas. Todavia, quando inoculada em conjunto com o patógeno, apresentou indução de tolerância, o que sugere maiores estudos nas futuras socas e em outros cultivares.

A bactéria *Hr*, ao contrário de *Hs*, mostrou efeito positivo quanto às características associadas ao vigor, como número, peso, diâmetro médio do colmo e toneladas de brix por hectare. As plantas inoculadas com *Hr* superaram às da testemunha e *Lxx*, mostrando uma interação positiva entre esta bactéria e a cultivar Co 421. Entretanto, o desempenho das plantas inoculadas com *Hr+Lxx* foi superior aos das plantas com *Hr*, o que indica uma interação positiva entre estas bactérias ou que *Lxx* estimulou a atividade de fixação biológica de *Hr*; esse mesmo comportamento foi observado com *Hs+Lxx*, mas não com *Gd+Lxx*. Estes resultados expressam um efeito benéfico de *Hr* tanto isoladamente quanto associada à *Lxx*, indicando que *Hr* minimizou os efeitos negativos de *Lxx*. Observou-se, ainda, nas plantas inoculadas isoladamente com *Hr*, a menor incidência de colmos soro-positivos para *Lxx*. Associado ao fato da detecção de pequenas concentrações de *Hr*, aos 16 meses, nas parcelas inoculadas com *Hr*, indica que esta bactéria estava presente na seiva do xilema e pode colonizar os vasos do xilema (hábitat natural de *Lxx*), competindo por espaços, oxigênio e nutrientes com *Lxx*. Entretanto, nas plantas inoculadas com *Hr+Lxx*, a incidência de soro-positivo para *Lxx* foi alta, mas, neste caso, em apenas uma parcela foi detectada a presença de *Hr*, aos 16 meses, na seiva do xilema. Outro ponto que pode justificar esta alta incidência de *Lxx* foi a inoculação precoce de *Lxx*, aos quatro meses, interferindo na colonização dos vasos do xilema por *Hr*; talvez se a inoculação de *Lxx* tivesse ocorrido na época da

colheita, aos 12 - 16 meses, as bactérias endofíticas (*Gd*, *Hs* e *Hr*) poderiam ter colonizado mais intensamente os vasos do xilema, tendo um efeito mais intenso na colonização de *Lxx*.

Observou-se a indução de tolerância por *Hr*, pois, neste tratamento, verificou-se alta incidência de *Lxx* (nas plantas com *Hr+Lxx*) com altos rendimentos agrícolas, explicado pelos efeitos positivos proporcionados por *Hr* que superaram os efeitos negativos de *Lxx*. A bactéria *Hr*, quando inoculada em plantas micropropagadas isoladamente, foi detectada na seiva do xilema, indicando assim potencial como agente de biocontrole, e também apresentou baixas incidências de colmos soro-positivos para *Lxx* e bons rendimentos agroindustriais.

Os efeitos da associação das bactérias *Gd+Hs+Hr+Lxx* sobre as características associadas ao vigor foram positivas, pois superaram os da testemunha e das plantas inoculadas com *Lxx* na maioria das características, principalmente, em toneladas de cana e brix por hectare. A baixa incidência observada nas plantas inoculadas com bactérias *Gd*, *Hs*, *Hr* e *Lxx* não indica necessariamente efeito das bactérias na colonização de *Lxx*, pois nenhuma destas bactérias (*Gd*, *Hs* e *Hr*) foi isolada na seiva do xilema, aos 16 meses, neste tratamento. A incidência baixa pode estar relacionada com a qualidade sanitária do explante utilizado na multiplicação *in vitro*, pois vários explantes foram utilizados na multiplicação de Co 421. Explantes estes retirados de partes diferentes dos colmos, isto é, basal, intermediária ou apical. As gemas apicais teriam uma menor concentração de *Lxx* segundo Harrison e Davis (1988), podendo resultar em explantes mais saudáveis e com menores incidências de raquitismo.

Outra hipótese para a baixa incidência de *Lxx* seria uma maior competição por nutrientes, espaço e oxigênio, entre as bactérias inoculadas, reduzindo, assim, a população das mesmas bactérias. Esta competição pode ter contribuído para a baixa incidência de raquitismo e também para as baixas densidades das bactérias endofíticas. O melhor rendimento pode ser devido à indução de tolerância pela melhor nutrição da planta, propiciando um melhor rendimento agrícola. A mistura de bactérias utilizadas (*Gd*, *Hs* e *Hr*) apresentou bom potencial agrícola, mas sua utilização como agente de biocontrole deve ser mais estudada.

As plantas inoculadas isoladamente com *Lxx* tiveram um fraco rendimento agrícola, superando em alguns parâmetros (TBH, brix, peso e diâmetro médio do colmo) apenas as plantas com *Hs* e a testemunha, o que não era esperado.

Entretanto, a maior incidência de colmos soro-positivos para *Lxx* nas plantas inoculadas com *Hs* e na testemunha, em relação à *Lxx*, explica em parte os resultados dos rendimentos destes tratamentos. A baixa incidência de colmos soro-positivos com *Lxx*, nos tratamentos com *Lxx*, causou surpresa, pois a inoculação das plantas foi realizada na mesma hora, local e com o mesmo inóculo dos demais tratamentos. Porém, nos quatro tratamentos combinados (endófitas x patógeno), houve altas incidências de *Lxx*, o que sugere efeito sinérgico entre *Lxx* e endófitas. Outra hipótese para a baixa incidência de *Lxx*, nas parcelas inoculadas com o patógeno, seria a variação na sanidade dos explantes utilizados na multiplicação *in vitro*, como discutido anteriormente. O baixo rendimento agrícola associado à baixa incidência de raquitismo indica que pequenas concentrações de *Lxx* são capazes de reduzir a produção numa variedade suscetível ao raquitismo, como a Co 421.

As plantas micropropagadas não inoculadas (testemunha) mostraram baixo rendimento agrícola e alta incidência de colmos soro-positivos para *Lxx*, o que confirma que a termoterapia a 50,5 °C/120 minutos/tolete de uma gema, associada à cultura de meristema não promoveu a eliminação total da bactéria do raquitismo. Novas técnicas de controle deverão ser testadas visando à limpeza clonal, tais como: associação da termoterapia a antibióticos, aumento no tempo de termoterapia e utilização das gemas apicais para termoterapia. O baixo rendimento associado à alta incidência de colmos com *Lxx* mostra o efeito negativo do patógeno sobre os rendimentos agrícolas, já em cana-planta, em um cultivar suscetível à doença.

Salienta-se, ainda, que a severidade do raquitismo da soqueira agrava-se com as sucessivas socarias e em condições de estresse hídrico (Davis e Dean, 1984; Giglioti, 1997; Tokeshi, 1997; Matsuoka, 1971). Estes resultados são de cana-planta, e a precipitação durante a condução do ensaio foi de 1.876 mm, acima da média regional (895 mm) (Posto climatológico - UFRRJ). Espera-se, portanto, que os efeitos negativos da doença fiquem mais intensos nos próximos anos.

Como não se conhece a verdadeira dinâmica populacional das bactérias endofíticas com as sucessivas socarias, questionam-se quais serão os resultados de cana soca, já que, em trabalho paralelo de termoterapia, observou-se um aumento constante da incidência de raquitismo. Discuti-se também se a indução de tolerância observada, em cana-planta, ocorrerá nas socas, ou ainda, se as populações de endofíticas serão suficientes para promover crescimento (aumento de produção) nas socas, numa situação de aumento constante do inóculo de *Lxx* e,

consequentemente, dum aumento na competição pela colonização dos vasos do xilema.

RESUMO E CONCLUSÕES

Suspensões de células de bactérias endofíticas isoladas de cana-de-açúcar (*Gluconacetobacter diazotrophicus* – *Gd* estirpe PAL5; *Herbaspirillum seropedicae* – *Hs* estirpe HRC54 e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* – *Hr* estirpe HCC103) foram inoculadas isoladamente ou em conjunto (inóculo misto), em frascos de mudas micropropagadas do cultivar Co 421 (suscetível ao raquitismo). Como testemunha, parte das mudas não foi inoculada nem com endófitas e nem com o patógeno. Antes do plantio no campo, as mudas foram aclimatadas sob sombrite 50% e, durante este período (4 meses), amostras de colmos e raízes foram removidas para isolamento e contagem das bactérias inoculadas, utilizando-se meios semi-sólido e semi-seletivo JNFb e LGIP respectivamente para *Herbaspirillum* spp. e *G. diazotrophicus*. Aos 10 dias que antecederam o transplântio, podaram-se as folhas basais das mudas com tesoura pré-imersa em seiva contaminada (soro-positiva por “dot blot” para presença de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) e essas mudas foram plantadas no campo, seguindo-se o delineamento com 4 blocos e nove parcelas, cada uma constituída de linhas de 8 m, espaçadas a com 1,40 m, com espaço entre plantas de 0,5 m e aceiro de 2 m. Procedeu-se às avaliações na colheita, aos 16 meses. Observou-se que *Gd* proporcionou ganhos em toneladas de cana por hectare (68,55%) e toneladas de brix por hectare (59,09%) em relação à testemunha. Nos tratamentos combinados de endofíticas com o patógeno, houve indução de tolerância ao raquitismo, pois, apesar das reações sorológicas positivas nas parcelas inoculadas com endófitas acusando a presença do patógeno, houve melhoria no rendimento agrônômico, em cana-planta

de no mínimo 18,83 t de cana/ha, em relação à testemunha, e de 19,09 t de cana/ha em relação ao tratamento com *Lxx*. A bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* proporcionou baixas incidências e bons rendimentos agrônômicos, mostrando poder ter algum efeito na colonização de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, na variedade Co 421.

Conclui-se que:

- A cultura de meristema associada ao tratamento 50,5 °C/120 min/tolete de uma gema não proporciona a eliminação total do raquitismo da soqueira.
- A *Gd* inoculada em plantas micropropagadas isoladamente promoveu crescimento nas plantas de Co 421, o que resultou em melhores rendimentos agrícolas, mas como agente de biocontrole deverá ser mais estudada.
- As bactérias *Gd*, *Hs* e *Hr* combinadas com *Lxx* induziram tolerância ao raquitismo na variedade Co 421 (suscetível ao raquitismo), em cana-planta, e deverão ser mais estudadas.
- Baixas incidências de raquitismo, como detectado pelo método sorológico, na ausência de bactérias endofíticas, foram associadas a menores produtividades da cultivar Co 421, já em cana-planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asflucan (2002) III Encontro de fornecedores de cana-de-açúcar do Estado do Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes. RJ.
- Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Seldin, L., Dobereiner, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., a root associated nitrogen fixing bacterium. *International journal of Systematic Bacteriology*, (36):86-93.
- Baldani, J.I., Caruso, L., Baldani, V.L.D., Goi, S.R., Döbereiner, J. (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 29 (5/6):911- 922.
- Bergamin, A.F., Kimati, H., Amorin, L. (1995) *Manual de Fitopatologia (Princípios e conceitos)*. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 919p.
- Cardoso, C.O.N. (1986) Isolamento da bactéria do raquitismo (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) no Brasil. *Boletim Técnico COPERSUCAR*, São Paulo, (34):48-52.
- Carneiro, J.B.C. (2001) *Obtenção e análise de especificidade de antissoro (policlonal) contra Leifsonia xyli subsp. xyli agente causal do RSD*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Estadual do Norte-Fluminense Darcy Ribeiro - Campos dos Goytagazes. Rio de Janeiro. 42 p.
- Carneiro, J.B.C., Pontes, E.C., Silveira., S.F., Olivares., F.L. (2003) Método de extração de seiva do xilema de cana-de-açúcar e detecção sorológica por dot blot de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Resumo Expandido. *Congresso de Fitopatologia*, Águas de São Pedro.

- Chagas, P.R.R., Matsuoka, S. (1988) Medidas de controle do raquitismo da soqueira. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, 106:40-44.
- Cide - Centro de Informação e Dados Estatísticos do Rio de Janeiro (1999/2000) *Anuário Estatístico do Estado do Rio de Janeiro*, 423-424 p. .
- Costa, J.M.T., Ruschel, A.P. (1981) Seasonal variation in the microbial populations of sugar-cane plants. *In*: Vose, P.B., Ruschel, A.P. (eds.) Associative N₂ – Fixation. Boca Raton: CRC, 2:109-118.
- Cruz, C.D. (2001) Programa Genes (versão Windows): Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 648p.
- Damman, K.E.Jr., Ollier, C.A. (1991) Distribution and incidence of ratoon stunting disease in Louisiana sugarcane. *Plant Disease*, 75:568-571.
- Davis, M.J., Gillaspie, A.G., Harris, R.W., Lawson, R.H. (1980) Ratoon stunting disease of sugarcane: isolation of the causal bacteria. *Science*, Washington, 210:1365-1367.
- Davis, M.J., Gillaspie, A.G., Vidaver, A.K., Harris, R.W. (1984) *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*, Washington, 34 (2):107-117.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. (1995) *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas*. Brasília, EMBRAPA-SPI. Itaguaí, RJ, EMBRAPA-CNPAB, 40p.
- Evtushenko, L.I., Dorofeeva, L.V., Subbotin, S.A., Cole, J.R., Tiedje, J.M. (2000) *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*, 50:371-380.
- Gheller, A.C.A., Godoy, G.P. (1987) Eficiência comparativa de dois sistemas de tratamento térmico na inativação do agente causal do raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar. *Anais do Congresso Nacional da STAB*, Olinda, p. 257-266.

- Giglioti, E. (1997) *Conciliação dos métodos de STM e TBIA para determinação de resistência de genótipos de cana-de-açúcar RSD*. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Piracicaba - SP, Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 234p.
- Gillaspie, A.G., Irvine, J.E., Steere, R.L. (1966) Ratoon stunting disease virus: assay technique and partial purification. *Phytopathology*, St. Paul, 56:1426-1427.
- Gillaspie, A.G., Davis, M.T., Harris, R.W., Lawson, R.H. (1981) Isolation and pathogenicity of the ratoon stunting disease bacterium. *International Sugar Journal*, New Orleans, 83:324-326.
- Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R.M., Stephom, M.P., Texeira, K.R.S., Dobereiner, J., Ley, J. (1989) *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39:361-364.
- Gul, F., Hassan, S. (1995) Further studies on the control of ratoon stunting disease of sugarcane in the N.W.F.P. *Pak. J. Phytopathol.* 7 (2):163-165.
- Harrison, J., Davis, M.J. (1988) Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. *Phytopathology*, St Paul, 78:722-727.
- Hendre, R.R., Iyor, R.S., Kotwalm, M., Kluspe, S.S., Mascarenhas, A.F. (1983) Rapid multiplication of sugarcane by tissue culture. *Sugarcane*, Port Talbot, 1:5-8.
- Hughes, C.G., Steindl, D.R.L. (1955) Ratoon stunting disease of sugarcane. *Technical Communication Queensland Bureau of Sugar Experiment Stations*, 2:54.
- IBGE (1996) *Anuário Estatístico do Brasil 1996*. Rio de Janeiro, RJ, 56: 3-44.
- Lee, T.S.G. (1988) Produção de mudas sadias de cana-de-açúcar através da técnica de cultura de tecidos. *Álcool e Açúcar*, Piracicaba, 45:20-29.
- Matsuoka, S. (1971) Incidência do vírus do raquitismo da soqueira em canas provenientes de material propagativo tratado termicamente. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, Mossoró, 4:63-64.

- Matsuoka, S. (1984) Longevidade do efeito do tratamento térmico em canas infectadas pelo raquitismo da soqueira. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 2:57-59.
- Olivares, F.L. (2000) *Avaliação do potencial de bactérias endofíticas visando à promoção do crescimento e ao controle biológico de doenças da cultura da cana-de-açúcar*. Projeto FAPERJ, 35p.
- Olivares, F.L., Baldani, V.L.D., Reis, V.M., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (1996) Occurrence of the diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, 21:197-200.
- Olivares, F.L., James, E.K., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (1997) Infection of Mottled Stripe disease Susceptible and Resistant Sugarcane Varieties by Endophytic Diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytologist*, London, 135 (4):723-737.
- Reis, V.M. (1994) *Estudo de infecção e métodos de detecção da bactéria endófito Acetobacter diazotrophicus em associação com a cana-de-açúcar*. Tese (Doutorado em Microbiologia do Solo) – Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, 213p.
- Reis, V.M., Olivares, F.L., Oliveira, A.L.M., Reis Jr, F.B., Baldani, J.I. Döbereiner, J. (1999) Technical approaches to inoculate micropropagated sugarcane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. *Plant and Soil*, 206:205-211.
- Reis Jr, F.B. Silva, L.G., Reis, V.M., Döbereiner, J. (2000) Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 35:985-994.
- Rodrigues Neto, J., Malavolta JR., V.A., Victot, O. (1986) Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* TIPO B. *Suma Phytopathologica*, São Paulo, 12:1-16.
- Rosler, L.A. (1974) The effects of ratoon stunting disease on three sugarcane varieties under different irrigation regimes. *Proceedings International Society of Sugarcane technologists*. XV Congress. p. 250-257.
- Tokeshi, H. (1997) Doenças da cana-de-açúcar. In: *Manual de Fitopatologia, Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Editora Ceres, p. 207-255.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

No primeiro trabalho, colmos infectados do cultivar Co 421, suscetível ao raquitismo, foram selecionados por teste sorológico, sendo estes colmos casualizados e submetidos aos tratamentos combinados de termoterapia a 50,5 °C/120 min ou 52 °C/30 min; toletes de uma ou três gemas; com ou sem pré-imersão por 20 h em água; sendo a testemunha não tratada. Os toletes foram plantados em bandejas e estas dispostas no viveiro, num delineamento em blocos casualizados com quatro repetições e nove parcelas. Aos quatro meses, instalou-se um ensaio de campo obedecendo o delineamento original, sendo feitas as avaliações na cana-planta aos 13 meses e na cana soca aos 12 meses. Os resultados médios das duas colheitas do viveiro primário mostraram efeito positivo do tratamento 50,5 °C/120 min/toletes de três gemas/sem pré-imersão, que superou a testemunha, em toneladas de cana e brix por hectare, em 9,75% e 8,32%, respectivamente. No viveiro secundário, o tratamento 50,5 °C/120 min/tolete de uma gema/sem pré-imersão superou a testemunha em TCH (44%) e TBH (52,75%). Quanto à sanidade das mudas, a menor incidência foi de 7,7%, no tratamento a 50,5 °C/120 min/toletes de três gemas/com pré-imersão, na média dos dois cortes no viveiro primário; e 38,71% no viveiro secundário.

Conclui-se:

- Nenhum dos tratamentos testados elimina completamente a bactéria do raquitismo da soqueira;

- Observou-se uma interação positiva da sanidade com a pré-imersão e tratamentos mais longos. Novos ensaios poderão ser realizados, prolongando o tempo de exposição.
- O tratamento 50,5 °C/120 min/tolete de uma e três gemas/com pré-imersão poderá ser usado em programa de limpeza clonal ou indexação de plantas ou “áreas matrizes”, desde que o mesmo seja repetido e associado à técnica de detecção do patógeno de maior sensibilidade.
- O tratamento 50,5 °C/120 min/tolete três gemas/sem pré-imersão poderá ser utilizado para o tratamento térmico das mudas para a formação de viveiros em empresas, pois apresenta aumento de produtividade; mas, este deve ser associado a outras práticas de controle como: desinfecção de instrumentos de corte e variedades resistentes/tolerantes e retratamento térmico cíclico.

No segundo trabalho, suspensões de células de bactérias endofíticas isoladas de cana-de-açúcar (*Gluconacetobacter diazotrophicus* – *Gd* estirpe PAL5; *Herbaspirillum seropedicae* – *Hs* estirpe HRC54 e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* – *Hr* estirpe HCC103) foram inoculadas isoladamente ou em conjunto (inóculo misto), em frascos de mudas micropropagadas do cultivar Co 421 (suscetível ao raquitismo). Como testemunha, parte das mudas não foi inoculada nem com endófitas e nem com o patógeno. Antes do plantio no campo, as mudas foram aclimatadas sob sombrite 50% e, durante este período (4 meses), amostras de colmos e raízes foram removidas para isolamento e contagem das bactérias inoculadas, utilizando-se meios semi-sólido e semi-seletivo JNFb e LGIP respectivamente para *Herbaspirillum* spp. e *G. diazotrophicus*. Aos 10 dias que antecederam o transplante, podaram-se as folhas basais das mudas com tesoura pré-imersa em seiva contaminada (soro-positiva por “dot blot” para presença de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) e essas mudas foram plantadas no campo, seguindo-se o delineamento com 4 blocos e nove parcelas, cada uma constituída de linhas de 8 m, espaçadas com 1,40 m, com espaço entre plantas de 0,5 m e aceiro de 2 m. Procedeu-se às avaliações na colheita, aos 16 meses. Observou-se que *Gd* proporcionou ganhos em toneladas de cana por hectare (68,55%) e toneladas de brix por hectare (59,09%) em relação à testemunha. Nos tratamentos combinados de endofíticas com o patógeno, houve

indução de tolerância ao raquitismo, pois, apesar das reações sorológicas positivas nas parcelas inoculadas com endófitas, acusando a presença do patógeno, houve melhoria no rendimento agrônomico, em cana-planta, de no mínimo 18,83 t de cana/ha, em relação à testemunha, e de 19,09 t de cana/ha em relação ao tratamento com *Lxx*. A bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* proporcionou baixas incidências e bons rendimentos agrônomicos, mostrando poder ter algum efeito na colonização de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, na variedade Co 421.

Conclui-se que:

- A cultura de meristema associada ao tratamento 50,5 °C/120 mim/tolete de uma gema não proporciona a eliminação total do raquitismo da soqueira.
- A *Gd* inoculada em plantas micropropagadas isoladamente promoveu crescimento nas plantas de Co 421, o que resultou em melhores rendimentos agrícolas, mas como agente de biocontrole deverá ser mais estudada.
- As bactérias *Gd*, *Hs* e *Hr* combinadas com *Lxx* induziram tolerância ao raquitismo na variedade Co 421 (suscetível ao raquitismo), em cana-planta, e deverão ser mais estudadas.
- Baixas incidências de raquitismo, como detectado pelo método sorológico, na ausência de bactérias endofíticas, foram associadas a menores produtividades da cultivar Co 421, já em cana-planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrianual (2001) Anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: FNP. Consultoria e Comércio. 532p.
- Alström, S. (1991) Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterisation with rhizosphere pseudomonads. *Journal General Applied of Microbiology*, 37:495-501.
- Asflucan (2002) III Encontro de Fornecedores de cana-de-açúcar do Estado do Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes - RJ.
- Bailey, R.A. (1977) The systemic distribution and relative occurrence of bacteria in sugarcane varieties affected by ratoon stunting disease. *Proceedings of the South Africa Technologist Association*, 6:466-467.
- Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Seldin, L., Dobereiner, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., a root associated nitrogen fixing bacterium. *International journal of Systematic Bacteriology*, (36):86-93.
- Baldani, J.I., Pot, B., Kirchhof, G., Falsen, E., Baldani, V.L.D., Olivares, F.L., Haste, B., Kersters, K., Hortmann, A., Gillis, M., Dobereiner, J. (1996) Emended description of *Herbaspirillum*, inclusion of (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov., and clarification of group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 14:263-279.

- Baldani, J.I., Caruso, L., Baldani, V.L.D., Goi, S.R., Döbereiner, J. (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 29 (5/6):911- 922.
- Barbosa, M.H.P. (2000) Perspectivas para o melhoramento da cana-de-açúcar. *Simpósio de Atualização em Genética e Melhoramento de Plantas*. Universidade Federal de Lavras. Lavras. p. 1-17.
- Bergamin, A.F., Kimati, H., Amorin, L. (1995) Manual de Fitopatologia (*Princípios e conceitos*). 3. ed. São Paulo. Editora Agronômica Ceres. São Paulo. 919p.
- Brooks, D.S., Gonzalez, C.F., Appel, D.N., Filer, T.H. (1994) Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. *Biological Control*. Orlando, 4: 373-381.
- Cardoso, C.O.N. (1986) Isolamento da bactéria do raquitismo (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) no Brasil. *Boletim Técnico COPERSUCAR*, São Paulo, (34): 48-52.
- Carneiro, J.B.C. (2001) *Obtenção e análise de especificidade de antissoro (policlonal) contra Leifsonia xyli subsp. xyli agente causal do RSD*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytagazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 42 p.
- Carneiro, J.B.C., Pontes, E.C., Silveira., S. F., Olivares., F. L. (2003) Método de extração de seiva do xilema de cana-de-açúcar e detecção sorológica por dot blot de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Resumo Expandido. *Congresso de Fitopatologia*, Águas de São Pedro.
- Caruso, L.V., Baldani, J.I. (1995) Monitoring the survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil using Lac-Z fusion. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts, 108-109 p, Angra dos Reis. November 26th - December 1st 1995.
- Cavalcante, V., Döbereiner, J. (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar-cane. *Plant and Soil*, Dordrecht, 108: 23-31.
- Cesnik, R., Miocque, J. (2004) Melhoramento da Cana-de-açúcar. Embrapa Informações Tecnológicas. Brasília, 307p.
- Chagas, P.R.R (1996) *Raquitismo da soqueira: severidade dos sintomas no xilema e quantificação dos danos agro-industriais*. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 161p.

- Chagas, P.R.R., Matsuoka, S. (1988) Medidas de controle do raquitismo da soqueira. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro. (106):40-44.
- Chaves, A., Pedrosa, E.M.R., Cavalcante, J.F.D., Araújo, 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 de cana-planta. *VIII Congresso Nacional da STAB*. Anais do Congresso, Recife. p 27-34.
- Chen, C., Bauske, E.M., Musson, G., Rodríguez-kábana, R., Kloepper, J.W. (1995) Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control*, Orlando, 5: 83-91.
- Cide - Centro de Informação e Dados Estatísticos do Rio de Janeiro (1999/2000) *Anuário Estatístico do Estado do Rio de Janeiro*, 423-424 p.
- Colombo, P.M. (1978) Occurrence of endophytic bacteria in siphonous algae. *Phycologia*, 17: 148-151.
- Comstock, J.C., Shine, J.M., Davis, M.J., Dean, J.L (1996) Relationship between resistance to *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* colonization in sugar cane and spread of ratoon stunting disease in the field. *Plant Disease*, 80:704-706.
- Conab (2005) Estimativa de produção de cana-de-açúcar safra 2005/2006; <http://www.udop.com.br> em em 17/10/2005.
- Costa, J.M.T., Ruschel, A.P. (1981) Seasonal variation in the microbial populations of sugar-cane plants. *In*: Vose, P.B., Ruschel, A.P. (eds.) Associative N₂ – Fixation. Boca Raton: CRC, 2:109-118.
- Cruz, C.D. (2001) Programa Genes (versão Windows): Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 648p.
- Damman, K.E.Jr. e Ollier, C.A. (1991) Distribution and incidence of ratoon stunting disease in Louisiana sugarcane. *Plant Disease*, 75:568-571.
- Davis, M.J., Gillaspie, A.G., Harris, R.W., Lawson, R.H. (1980) Ratoon stunting disease of sugarcane: isolation of the causal bacteria. *Science*, Washington, 210:1365-1367.
- Davis, M.J., Dean, J.L. e Harrison, N.A. (1988) Distribution of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in resistance to ratoon stunting disease. *Plant Disease*, 72:443-448.

- Davis, M.J., Gillaspie, A.G., Vidaver, A.K., Harris, R.W. (1984) *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*, Washington, 34:107-117.
- Dean, J.L., Davis, M.J. (1989) Yield losses caused by ratoon stunting disease of sugarcane in Florida. *J. Am. Soc. Sugarcane Technol.* 10:66-72.
- Döbereiner, J. (1961) Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. *Plant and Soil*, Dordrecht, 15:211-216.
- Döbereiner, J. (1992) History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, Rehovot, 13:1-13.
- Döbereiner, J., Ruschel, A.P. (1958) Uma nova espécie de *Beijerinckia* Derx. *Revista Brasileira de Biologia*, 21:261-277.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. (1995) *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas*. Brasília, EMBRAPA-SPI. Itaguaí, RJ, EMBRAPA-CNPAB, p 40.
- Evtushenko, L.I., Dorofeeva, L.V., Subbotin, S.A., Cole, J.R., Tiedje, J.M. (2000) *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 Microbiolog.* 50:371-380.
- Fahey, J.W. (1988) Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. In: Cutler, H.O. (org). *Biologically Active Natural Products. Potencial Use In Agriculture*. Washington, 380: 120-128.
- Fuentes-Ramirez, L.E., Jimenez-Salgado, I.R., Abarca-Ocampo, Caballero-Mellado. (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. *Plant and Soil*, Dordrecht, 154:145-150.
- Gheller, A.C.A., Godoy, G.P. (1987) Eficiência comparativa de dois sistemas de tratamento térmico na inativação do agente causal do raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar. *Anais do Congresso Nacional da STAB*, Olinda, p 257-266.

- Giglioti, E. (1997) *Conciliação dos métodos de STM e TBIA para determinação de resistência de genótipos de cana-de-açúcar RSD*. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Piracicaba - SP, Escola Superior Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 234p.
- Gillaspie, A.G., Irvine, J.E., Steere, R.L. (1966) Ratoon stunting disease virus: assay technique and partial purification. *Phytopathology*, St. Paul, 56: 1426-1427.
- Gillaspie, A.G., Davis, R.E., Worley, J.F. (1973) Diagnosis of ratoon stunting disease based on the presence of a specific microorganism. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 60 (7):573-576.
- Gillaspie, A.G., Davis, M.T., Harris, R.W., Lawson, R.H. (1981) Isolation and pathogenicity of the ratoon stunting disease bacterium. *International Sugar Journal*, New Orleans, 83: 324-326.
- Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R.M., Stephom, M.P., Texeira, K.R.S., Dobereiner, J., Ley, J. (1989) *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39: 361-364.
- Graciano, P.A., Daros, E., Weber, H., Zambon, J.L.C., Ido, T.O. (2002) Controle da *Brachiaria decumbens* na cultura da cana-de-açúcar. *Anais da STAB*. P 158-174.
- Gracioli, L.A., Freitas, J.R., Ruschel, A.P. (1983) Bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar (*saccharum* sp.). *Revista Microbiológica*, São Paulo, 14:191-196.
- Gul, F., Hassan, S. (1995) Further studies on the control of ratoon stunting disease of sugarcane in the N.W.F.P. *Pak. J. Phytopathol.* 7 (2):163-165.
- Guzmán, M.L., Victoria, J.I. (1992) Incidencia del raquitismo de la soca (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) en semilleros de la cana de azúcar y evaluación de métodos de su diagnóstico. *Fitopatología Colombiana*, Palmira, 16:126-134.
- Guzmán, M.L., Victoria, J.I. (1993) Empleo del método de inmunofluorescencia directa en la detección del raquitismo de la soca (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*). *Fitopatología Colombiana*, Palmira, 17:21-30.
- Hallmann, A., Benhamou, N. e Kloepper, J.W. (1997) Bacterial Endophytes in cotton: mechanisms of entering the plants. *Canadian Journal of Microbiology*, 43:577-582.

- Harrison, J., Davis, M.J. (1988) Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. *Phytopathology*, St Paul, 78:722-727.
- Harrison, J., Davis, M.J. (1990) Comparison of serological techniques for diagnosis of ratoon stunting disease. *Sugarcane*. 1990. Port Talbot: 5-9 (Resumo em CAB Abstracts on CD-ROM, v. 3A, 1990-91).
- Hendre, R.R., Iyor, R.S., Kotwalm, M., Kluspe, S.S., Mascarenhas, A.F. (1983) Rapid multiplication of sugarcane by tissue culture. *Sugarcane*. Port Talbot. 1: 5-8.
- Hughes, C.G., Steindl, D.R.L. (1955) Ratoon stunting disease of sugarcane. *Technical Communication Queensland Bureau of Sugar Experiment Stations*, 2:54.
- IBGE (1996) *Anuário Estatístico do Brasil 1996*. Rio de Janeiro, RJ, 56: 3-44.
- Kloepper, J.W., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., Hallmann, J. (1997) Recent studies on the microbial ecology of bacterial endophytes in plants. XXVI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Rio de Janeiro. 20 a 26 Julho.
- Lee, T.S.G. (1988) Produção de mudas sadias de cana-de-açúcar através da técnica de cultura de tecidos. *Álcool e Açúcar*, Piracicaba, 45:20-29.
- Lee, T.S.G. (1991) Produção industrial de mudas de cana-de-açúcar; uma nova abordagem. *Álcool e Açúcar*, Piracicaba, 59:12-16.
- Lee, T.S.G. (1992) Biofábrica de cana-de-açúcar. *Álcool e Açúcar*, Piracicaba, 63:26-32.
- Lemanceau, P., Alabouvette, C. (1993) Suppression of *Fusarium* wilts by fluorescent pseudomonads. Mechanisms and application. *Biocontrol Science and Technology*, 3: 219-234.
- Li, R., Macrae, I.C. (1991) Specific association of diazotrophic Acetobacters with sugarcane. *Soil Biology and Biochemistry*, Exeter, 23:999-1002.
- Matsuoka, S. (1971) Incidência do vírus do raquitismo da soqueira em canas provenientes de material propagativo tratado termicamente. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*. Mossoró, 4:63-64.

- Matsuoka, S. (1984) Longevidade do efeito do tratamento térmico em canas infectadas pelo raquitismo da soqueira. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba,2: 57-59.
- Matsuoka, S., Arizono, H., Bassinello, A.I., Gheller, A.C.A., Hoffmann, H.P., Masuda, Y. (1995) Variedades super-precoces da cana-de-açúcar. *Revista Álcool e Açúcar*,78:22-29.
- Matsuoka, S., Garcia, A.A.F., Calheiros, G.G. (1999) Hibridação em cana-de-açúcar. Borém, A. (ed). *Hibridação artificial de plantas*. UFV. p 221-254.
- Mcinroy, J.A., Kloepper, J.W. (1991) Endophytic bacteria from field-grown corn and cotton, *Phytopathology*, 81:812-813.
- Mishagi, I.J., Donndelinger, C.R. (1990) Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*, 80:808-811.
- Olivares, F.L. (2000) *Avaliação do potencial de bactérias endofíticas visando á promoção do crescimento e ao controle biológico de doenças da cultura da cana-de-açúcar*; Projeto FAPERJ, 35p.
- Olivares, F.L., Baldani, V.L.D., Reis, V.M., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (1996) Occurrence of the diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, 21: 197-200.
- Olivares, F.L., James, E.K., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (1997) Infection of Mottled Stripe disease Susceptible and Resistant Sugarcane Varieties by Endophytic Diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytologist*, London, 135 (4):723-737.
- Pan, Y.B., Grisham, M.P., Burner, D.M.A. (1998) Polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. *Plant Disease*, 82 (3): 285-290.
- Petrini, O. (1991) Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews, J., S. Hirano (eds). *Microbial Ecology of Leaves*. New York, Springer-Verlag.
- Pinón, D., Casas, M., Blanch, M., Fontaniella, B., Blanco, Y., Vicente, C., Solas, M., Legaz, M. (2002). *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. *Research in Microbiology*, 153: 345-351.
- Purchase, B.S. (1980) Nitrogen fixation associated with sugar cane. *Proc. S. Afr. Sugar Technol. Assoc*, A3-A6.

- Reis, V.M. (1994) *Estudo de infecção e métodos de detecção da bactéria endófito Acetobacter diazotrophicus em associação com a cana-de-açúcar*. Tese (Doutorado em Microbiologia do Solo) – Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, 213p.
- Reis Jr, F.B. Silva, L.G., Reis, V.M., Döbereiner, J. (2000) Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 35:985-994.
- Reis, V.M., Olivares, F.L., Oliveira, A.L.M., Reis Jr, F.B., Baldani, J.I. e Döbereiner, J. (1999) Technical approaches to inoculate micropropagated sugarcane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. *Plant and Soil*, 206:205-211.
- Rodrigues Neto, J., Malavolta JR., V.A., Victot, O. (1986) Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* TIPO B. *Suma Phytopathologica*, São Paulo, 12: 1-16.
- Ros, P.B. (2004) *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*. Tese (Mestrado em 2004) – Piracicaba – SP - Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, p 58.
- Rossler, L.A. (1974) The effects of ratoon stuntig disease on three sugarcane varieties under different irrigation regimes. In: *Proceedings International Society of Sugarcane technologists*. XV Congress. p 250-257.
- Samish, Z., Etinger-tulczynnska, R., Bick, M. (1963) The microflora within the tissue of fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 28:259-266.
- Sanguino, A. (1987) Principais moléstias da cana-de-açúcar. In: Paranhos, S.B. *Cana-de-açúcar: cultivo e utilização*. Campinas: Fundação Cargil. 741-757.
- Sanguino, A. (1998) Diagnóstico e controle do raquitismo da soqueira causado pela bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* STAB, *Açúcar, Álcool e Subprodutos*, Piracicaba, 17 (1):26.
- Sanguino, A., Moraes, V.A., Santos Filho, O.T. D. (1984) Diagnóstico do raquitismo da soqueira em colmos de cana-de-açúcar. *Anais do Seminário de Tecnologia Agrônômica*, 2, Piracicaba, p 250-253.
- Sharma, V.K., Nowak, J. (1998) Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. Strain PsJN). *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 528-536.

- Silva, W.M. (1974) Hot treatment of single buds for ratoon stunting disease control. *Sugarcane Pathologist Newslette*, Réduit, 11/12:32-33.
- Sordi, R.A.(1986) *Escaldadura das folhas da cana-de-açúcar: crescimento in vitro do agente causal (Xanthomonas Albilineans), diagnose por planta teste e cura por termoterapia in vitro e cultura de ápices meristemático*. Tese (Mestrado em 1986) – Piracicaba - Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, p 161.
- Steib, R.J., Forbes, I.L. e Chilton, S.J.P. (1957) A report on further studies on the ratoon stunting disease of sugarcane in Louisiana. *Journal Sugar*,19:35-37.
- Steindl, D.R.L. (1949) Q.28 Disease. *Cane Grow. Q. Rull*, Queensland, 12 (4):191-193.
- Steindl, D.R.L. (1961) Q.28 Disease. *Plate XX, Internal symptoms of ratoon disease*, Amsterdam, 20: 433-453.
- Sturz, A.V., Christie, B.R., Matheson, B.G. (1998) Associations of bacterial endophytes populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Canadian Journal of Microbiology*, 44:162-167.
- Tester, C.F. (1992) Influence of a genetically modified endophytic bacterium on composition and decomposition of corn residue. *Soil Biology and Biochemistry*, Exeter, 24:1107-1112.
- Tokeshi, H. (1997) Doenças da cana-de-açúcar *In: Manual de Fitopatologia, Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Editora Ceres, p 207-255.
- Tokeshi, H., Gheller, A.C., Sordi, R.A., Masuda, Y., e Matsuoka, S. (1983) Nova unidade de tratamento térmico de toletes de cana-de-açúcar para o controle do raquitismo da soqueira (RSD). *Summa phytophotologica*, Piracicaba, 9: 59-61.
- Tuzun, S., Kloepper, J. (1994) Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *In: Ryder, M.H., Stephens, P.M., Bowen, G.D., (eds.) Improvement Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*. Adelaide: CSIRO. p 104-109.
- Uratani, B.B., Alcorn, S.C., Tsang, B.H., Kelly, J.L. (1995) Construction of secretion vectors and use of heterologous signal sequences for protein secretion in *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. *Molecular Plant and Microbe Interaction*, St. Paul, 8: 891-898.

- Valdebenito-Sanhueza, R.M., Tokeshi, H. (1985) Relação entre *Xanthomonas albilineans*, *Erwinia herbícola* e *Pseudomonas* sp., cana-de-açúcar. *Summa Phytopathologica*, Campinas, 11:105-114.
- Van Peer, R., Niemann, G.J., Schippers, B. (1991) Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. estirpe WCS417r. *Phytopathology*, St Paul, 81:728-734.
- Veiga, F.M. (1956) Notas sobre o raquitismo das socas em Campos dos Goytacazes. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, 47 (1):81-83.
- Wei, G., Kloepper, J.W., Tuzun, S. (1991) Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, St. Paul, 81:1508-1512.