

INCIDÊNCIA DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* EM ÁREAS DE
MULTIPLICAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR NO ESPÍRITO SANTO,
SUL DA BAHIA E OESTE MINEIRO E DETERMINAÇÃO DO
TAMANHO DA AMOSTRA PARA DETECÇÃO SOROLÓGICA

ELAINE CRISTINA DE PONTE

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 Mestre em Produção Vegetal

Aprovada em 25 de janeiro de 2006

Comissão Examinadora:

Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho (DS, Biotecnologia e Biotecnologia) - UENF

Prof. Luiz Antônio Maffia (Ph.D., Fitopatologia) - UFV

Prof. José Tarcísio Lima Thiebaut (DS, Produção Animal) - UENF

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira (DS, Fitopatologia) - UENF
Orientador

Aos meus pais, Claudomiro e Analina

Aos meus irmãos, Cláudia e Aderval

Ao meu esposo, Inorbert e ao nosso filho Guilherme

Dedico

AGRADECIMENTOS

A DEUS

A UENF e CAPES, pela concessão da bolsa e oportunidade de desenvolver esse trabalho

Ao professor Silvaldo Felipe da Silveira, pelos ensinamentos e orientação

Ao Pesquisador Josil de Barros Carneiro, pela co-orientação

Aos professores Gonçalo, Fábio Cunha, Thiebaut e Maffia pela colaboração

As Usinas DASA, LASA, DISA, ALCON e SAPUCAIA, pela colaboração

A todos do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia pelo auxílio e amizade

Aos técnicos do Campus Dr. Leonel Miranda da UFRRJ

À bibliotecária Analice, pelo auxílio na revisão bibliográfica

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1. Etiologia	05
2.2. Diagnose	06
2.2.1. Métodos de detecção do patógeno	07
2.3. Levantamentos da incidência de <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> em plantios comerciais de cana-de-açúcar	09
2.4. Amostragem de doenças	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Levantamento da incidência de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	12
3.2. Procedimento e intensidade da amostragem	13
3.3. Extração de seiva	13
3.4. Ensaio sorológico	14
3.5. Teste de amostragem para estudo da distribuição espacial da doença e determinação do tamanho de amostra	15

4. RESULTADOS	17
4.1. Levantamento da incidência de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> nos anos de 2003 e 2004	17
4.2. Resultado do teste de amostragem e distribuição espacial de raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar	23
5. DISCUSSÃO	27
RESUMO E CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMO

PONTE, Elaine Cristina de, M.S, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Janeiro de 2006. INCIDÊNCIA DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* EM ÁREAS DE MULTIPLICAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR NO ESPÍRITO SANTO, SUL DA BAHIA E OESTE MINEIRO E DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA PARA DETECÇÃO SOROLÓGICA. Orientador: Silvaldo Felipe da Silveira. Co-orientador: Josil Barros Carneiro Jr.

Detectar a incidência da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) em material propagativo é importante para o controle do Raquitismo da soqueira em regiões canavieiras. Objetivou-se avaliar a incidência da bactéria em áreas de multiplicação de empresas canavieiras da região do Espírito Santo, Oeste Mineiro e Sul da Bahia por meio da detecção sorológica e determinar estatisticamente um sistema de coleta de amostras e um tamanho mínimo de amostras de colmos de cana-de-açúcar a serem coletados, para fins de diagnose. Constatou-se no ano de 2003 que 65,62% dos talhões amostrados estavam infectados com *Lxx* e observou-se que a incidência média geral aumentou de cana planta (4,8%) para a cana de quinto corte (10,3%). No ano de 2004, 70,45% dos talhões amostrados apresentaram reações positivas a *Lxx* e observou-se maior incidência média da bactéria *Lxx* em cana-planta (18%), confirmando que o material propagativo utilizado na renovação dos talhões amostrados neste ano estava igualmente contaminado e foi obtido de campos comerciais com alta incidência da bactéria. Como esperado, nas áreas de soca, observou-se incidência crescente dos

talhões de 1º (5%) para 3º corte (13%). Para determinação do tamanho de amostra realizou-se coleta de colmos de cana-de-açúcar no município de Campos dos Goytacazes-RJ em quatro talhões da variedade SP 80-1842, com diferentes incidências médias de *Lxx* (13, 19, 23 e 28%). Aplicando-se a análise de “Ordinary Runs” todos os talhões amostrados apresentaram arranjo espacial predominantemente aleatório. Na estimativa do número adequado de linhas de plantio a serem amostrados para quantificação de *Lxx* pelo teste sorológico “Dot Blot”, a amostragem de 3 linhas de plantio com 21 colmos/linha/talhão, parece ser apropriado para quantificar a incidência de *Lxx* quando o erro aceitável for 10%, considerado satisfatório em levantamentos de campo e sob altos níveis de incidência (superior a 10%). Para se viabilizar um sistema de amostragem suficientemente seguro para se detectar incidências mínimas (inferiores a 10%), um método de detecção mais sensível necessita ser utilizado, bem como o tamanho da amostra reavaliado.

ABSTRACT

PONTE, Elaine Cristina de, M.S, Universidade Estadual do Norte Fluminense, December 2005. INCIDENCE THE OF *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* IN SUGAR CANE MULTIPLICATION ÁREAS OF ESPÍRITO SANTO STATE, SOUTH BAHIA AND WESTERN OF MINAS GERAIS AND DETERMINATION OF THE SAMPLE SIZE FOR SEROLOGICAL DETECTION. Major professor: Silvaldo Felipe da Silveira. Co-Advisor: Josil Barros Carneiro.

To detect of the incidence of the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) in propagation material is important for the control of Raton Stunting Disease (RSD) in sugarcane production regions. This research is a survey of the incidence of the pathogen in areas of sugarcane multiplication of the regions of the Espírito Santo State, Western of Minas Gerais and South of the Bahia State. The method of diagnosis used was the serological detection of the pathogen on xylem extracts by dot blot assay with the specific policlonal antiserum against Lxx. In the year of 2003, it was observed that 65,62% of the sampled areas was infected with Lxx and that the geral average incidence of infected stalks increased on the subsequent productions cycles from 4,8% on the first cycle until 10,3% on the fifth. In the year of 2004, 70,45% of the sampled areas presented positive reactions to Lxx and it was observed highest incidence of diseased sugarcane stalks on the first cycle (18%), which confirm that the propagation material used on these regions is from high infected commercial areas. As expected, because of the polyetic nature of RSD epidemics, on the subsequent cycles the incidence of

diseased stalks increase from 5% on the first cycle until 13% on the third cycle. To determination of sampling intensity, it was collected sugarcane stalks in the city of Campos dos Goytacazes-RJ, in four areas of SP 80-1842 variety, showing different average incidence of *Lxx*. (13, 19, 23 and 28%). Using the 'Ordinary Runs' analysis, it was observed that all plots predominantly showed a random spatial arrangement. In the estimative of adjusted number of crop rows for *Lxx* quantification through 'Dot Blot' serological test, the sampling of 3 rows with 21 stalks per row seems to be appropriated to quantify incidence of *Lxx* when the acceptable error is 10%, found to be ideal in field surveys.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, seguido pela União Européia e Índia. Na safra 2004/2005, a estimativa nacional de moagem foi de 375 milhões de toneladas de cana, produzindo 23,9 milhões de toneladas de açúcar e 15,14 bilhões de litros de álcool (AGRIANUAL, 2005). O parque sucroalcooleiro nacional possui 302 indústrias em atividade, 218 na região centro-sul e 84 na região Norte-Nordeste, sendo o setor responsável por cerca de 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos, congregando mais de 70 mil agricultores (Jornal da cana, 2004).

Estima-se que a produtividade da cana-de-açúcar no Estado do Rio de Janeiro seja de 54 t ha⁻¹ de colmos, no Estado do Espírito Santo de 73 t ha⁻¹ de colmos e Minas Gerais 74 t ha⁻¹ de colmos, inferior ao Estado de São Paulo que apresenta produtividade média em torno de 84 t ha⁻¹ de colmos (Rodrigues, 2003). Vários fatores reduzem a produtividade no Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais, como a deficiência hídrica, plantio de variedades ultrapassadas e a má condição fitossanitária da cultura (Carneiro et al., 2004a).

No Brasil, foram relatadas 58 entre as 216 doenças (provocadas por fungos, bactérias, vírus e micoplasmas) relacionados à cana de açúcar em todo o mundo (Sanguino, 1998a). Destas, considerada-se de maior importância econômica: raquitismo da soqueira (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* Davis, Gillaspie, Vidaver & Harris), Escaldadura das Folhas (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson), Carvão (*Ustilago scitaminea* Sydow), Ferrugem (*Puccinia*

melanocephala H. & P. Syd.) e o Mosaico (“Sugarcane Mosaic Vírus”- SCMV) (Barbosa, 2000). Dentre estas, destaca-se o Raquitismo da Soqueira (do inglês: Ratoon Stunting Disease - RSD), cujo agente causal é a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Evtshenko et al., 2000 sinónímia: *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, Davis, 1984). No Brasil, o RSD foi relatado pela primeira vez em 1956, na região de Campos dos Goytacazes – RJ, por Frederico da Veiga (Veiga, 1956). Em 1989, esta doença já havia sido relatada em 61 países produtores de cana-de-açúcar (Tokeshi, 1997).

No Brasil, em testes realizados no centro de Tecnologia da COPERSUCAR, estimou-se uma perda média devido ao raquitismo da soqueira de 0,4% na produtividade para cada 1% de incidência da bactéria (Sanguino, 1998 b). Matsuoka (1984), trabalhando com as variedades CB 41-76, CB 49-260 e IAC 52-326 em Araras – SP, obteve em média, do primeiro para o terceiro corte, diminuição da produção de canas doentes entre 16 e 37% com relação às canas sadias (cujas mudas foram tratadas termicamente). Segundo Giglioti, 1998 (citado por Gagliardi, 2003), no Estado de São Paulo, o RSD acarretou uma perda estimada de mais de U\$ 2 bilhões nos últimos 30 anos. Em Macaé - RJ, observaram-se diminuições significativas de produção variando de 4 a 14 t ha⁻¹ de colmos para seis variedades de cana-de-açúcar (CB 46-364, CB 45-3, CB 49-260, CO 421, CP 51-22 e NA 56-79) inoculadas com *L. xyli* subsp. *xyli*, quando comparadas a parcelas cujas mudas foram tratadas termicamente (Chagas e Matsuoka, 1988).

Em anos de seca, quando o desenvolvimento da cana-de-açúcar é prejudicado pela deficiência hídrica, pode se observar sintomas externos do raquitismo da soqueira (crescimento irregular, plantas raquíticas, pouco perfilhamento, colmos finos e sintomas de falta d’água). Não havendo déficit hídrico, estes sintomas podem não aparecer (Tokeshi, 1997). Sintomas internos observáveis apenas em variedades suscetíveis, são caracterizados pela presença de pontuações ou vírgulas avermelhadas nos feixes do xilema na região do nó. Porém nenhum sintoma interno ou externo tem poder diagnóstico, por não ser específico do raquitismo da soqueira (Comstock et al., 1997).

Uma vez que os sintomas não são evidenciados, a disseminação do RSD pelo material propagativo infectado é facilitada. A doença é disseminada pelo plantio de toletes infectados, colheita manual com facões, durante a colheita

mecânica e por meio de instrumentos de cultivo. Forbes, 1961 (citado por Matsuoka, 1975) verificou na Louisiana (USA), que quando se faz colheita mecânica, de uma percentagem inicial na cana-planta de 5,4% de plantas infectadas, obtiveram 15,6% de plantas contaminadas na soca e na multiplicação daquele material com 5,4% de infecção inicial se obteve uma incidência de 21,2% de raquitismo, dados que indicam a importância desse tipo de disseminação nas sucessivas colheitas e multiplicações.

Dentre as medidas de controle de doenças na cultura de cana-de-açúcar, destaca-se a utilização de variedades resistentes e o plantio de mudas saudáveis. Para se confirmar a diagnose do raquitismo, atualmente, utilizam-se técnicas de detecção do patógeno na seiva do xilema, tais como microscopia de contraste de fase (Steindl, 1976), técnicas sorológicas (Gillaspie, 1978) e, a Reação de Polimerase em Cadeia – PCR (Pan et al., 1998).

Para a produção de mudas saudáveis faz-se a limpeza clonal mediante o tratamento térmico de toletes ou minitoletes (50,5°C/2 horas ou 52°C/30 minutos) e a multiplicação inicial por cultura de meristemas. O tratamento térmico de toletes para formação de viveiros possui algumas limitações que desestimulam os produtores a utilizarem-no, tais como: custo dos equipamentos e da mão-de-obra, perdas de gemas que ocasionam falhas na germinação, além do que a eficiência de controle não alcança 100% (Damann e Benda, 1983; Matsuoka, 1984).

Acredita-se que em muitas regiões produtoras do Brasil, como o Nordeste, o litoral norte-fluminense e capixaba, o raquitismo da soqueira seja doença importante, pois os sintomas agravam-se com o déficit hídrico. Nestas regiões, variedades resistentes ou tolerantes à doença são desconhecidas. Ademais, variedades modernas, descritas como resistentes ao RSD em sua região de origem, podem ser suscetíveis em outras regiões, onde o déficit hídrico é pronunciado. O levantamento da incidência do RSD em áreas de multiplicação da região canavieira da região do Espírito Santo, Oeste Mineiro e Sul da Bahia é importante para indicar as variedades mais atacadas bem como direcionar medidas de controle, tais como a limpeza clonal, a reforma de canaviais altamente contaminados, e a escolha de talhões e áreas de multiplicação livres da doença ou com baixo índice de contaminação diminuindo significativamente perdas na produtividade.

Apesar da importância mundial, não existem estudos envolvendo a determinação de métodos de amostragem para quantificação do raquitismo da soqueira no campo. Para detecção do patógeno, entretanto, não há um padrão definido de amostragem de colmos, independente do método de detecção empregado. No presente trabalho propôs-se determinar estatisticamente um plano de amostragem bem como um nível mínimo de colmos a serem coletados para detecção sorológica de *Lxx* em áreas de multiplicação de cana-de-açúcar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Etiologia

Steindl, na safra de 1944-45, em Queensland, na Austrália, após uma primavera bastante seca observou que canaviais da variedade Q28 tiveram péssimo desenvolvimento das socas quando comparados com socas adjacentes da mesma variedade. Embora havia indicações de que um patógeno poderia estar associado, a ausência de sintoma externo específico dificultou os estudos. Somente em 1949, é que se obtiveram resultados experimentais indicando que um patógeno transmissível era responsável por essa doença (Steindl, 1961).

Em Campos dos Goytacazes - RJ, Frederico Veiga, em 1956, encontrando plantas suspeitas em lote de variedades importadas, concluiu estar diante do raquitismo da soqueira (RSD), quando inoculou extrato do xilema daquelas canas supostamente doentes em variedades locais (Veiga, 1956).

Inicialmente considerava-se que o agente causal do RSD era um vírus (Steindl, 1961; Matsuoka, 1971). Isto, porque não se conseguia isolar o agente causal em meio axênico e também porque a doença era facilmente disseminada mecanicamente, via instrumentos de corte.

Gillaspie et al., em 1973 visualizaram células bacterianas em extrato do xilema extraído de canas contaminadas, em microscópio de contraste de fase. Posteriormente, na década de 1980, Davis e colaboradores conseguiram isolar pela primeira vez em meio axênico uma bactéria associada ao raquitismo da

soqueira. Os testes de patogenicidade foram feitos com oito isolados da bactéria em cultura pura provenientes de colmos de cana-de-açúcar doentes de diferentes regiões: Brasil, Japão, Estados Unidos e África do Sul. Todos os oito isolados causaram sintomas de RSD em plantas da variedade CP 44-101 e foram reisolados posteriormente. A bactéria associada ao RSD foi classificada no grupo das bactérias corineformes, sendo a espécie, *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, que é gram positiva, fastidiosa, não forma endósporos, aeróbica obrigatória, não possui flagelos (atríquia), as células bacterianas são bastonetes retos ou ligeiramente curvos (pleomórficas), medindo 0,25-0,35 x 1-4 µm. Quando cultivada em meio SC (Soybean Corn), produz após 14 dias de cultivo sob temperatura de 30°C, colônias minúsculas e translúcidas, com diâmetro variando entre 0,1 a 0,3 mm (Davis et al., 1984).

2.2. Diagnose

Um dos maiores problemas para as pesquisas com raquitismo da soqueira, ou mesmo para se avaliar a sanidade das mudas de cana-de-açúcar em áreas de multiplicação, por muitos anos, foi a falta de um método para diagnóstico preciso da doença, uma vez que os sintomas não são específicos, os quais podem ser evidenciados em algumas variedades suscetíveis em épocas com déficit hídrico (Sanguino et al., 1984). Sintomas externos são observados em anos de seca, quando o desenvolvimento da planta é prejudicado pela deficiência hídrica, observando-se assim colmos finos, poucos perfilhos, internódios curtos e sintomas de deficiência hídrica. Assim, nas pesquisas são necessários métodos para diagnosticar a doença, dentre os quais existem aqueles envolvendo observações da bactéria por meio de microscopia de contraste de fase (Steindl, 1976), técnicas sorológicas (Gillaspie, 1978) e Reação de Polimerase em Cadeia - PCR (Pan et al., 1998).

2.2.1. Métodos de detecção do patógeno

A utilização de plantas indicadoras (Matsuoka, 1972) é um método que consiste em inocular extratos de cana-de-açúcar suspeita de estarem contaminados com *L. xyli* subsp. *xyli*, em plantas como o Capim Elefante (*Pennisetum purpureum* Schum), o qual apresentará sintomas internos se infectado. Betti et al. (1980), apontou uma provável interferência de agentes não relacionados com o RSD na diagnose através do teste com capim-elefante, além disto o inconveniente da utilização deste método é o fato de os sintomas aparecerem 20 a 30 dias após a inoculação, o que inviabilizou seu uso rotineiramente.

Valarini e Tokeshi (1981a), desenvolveram um método para determinar a resistência ao RSD através da determinação do fluxo de água em colmos sadios e doentes de cana-de-açúcar. Mas, verificaram que alguns fatores como pressão de vácuo, posições do nó no colmo e dias de armazenamento dos colmos interferem na avaliação de resistência ao RSD por este método (Valarini e Tokeshi 1981b).

Para Chagas e Tokeshi (1988, 1994), a precisão do método de Coloração do Xilema pelo Fluxo Transpiratório pode ser aplicado na seleção de variedades resistentes ao raquitismo da soqueira. Este método consiste na utilização do fluxo transpiratório natural do colmo para promover a translocação de uma solução corante a base de Safranina-O, para avaliação do número de vasos funcionais (coloridos) no colmo. Pérez et al. (2001), utilizaram este método para avaliar a sanidade de cultivares de cana-de-açúcar e encontraram boa correlação entre peso de colmos e percentagem de vasos funcionais para colmos tratados e inoculados.

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

Para fins de levantamento e monitoramento do RSD, os métodos citados apresentam inconvenientes que restringem sua utilização rotineira: a) como sintomas e respostas inespecíficas da planta, b) os resultados podem ser demorados, f) os sintomas e respostas só são verificados sob altos níveis de infecção e g) colonização dos colmos pela bactéria e os testes têm que ser realizados logo que se faz a coleta das amostras.

Atualmente métodos baseados na detecção específica do patógeno no extrato do xilema da cana-de-açúcar, são os mais utilizados. Com estes pode-se estimar a quantidade de bactéria no extrato e as amostras depois de coletadas, pode ser estocada para posterior avaliação, sem comprometimento do resultado final.

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

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

A técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), consiste em fixar a bactéria a partir da adição do extrato de cana-de-açúcar em cavidades de placas de poliestireno, previamente cobertos por anticorpos específicos e fixados. Após lavagem, adiciona-se o anticorpo específico ligado a enzima (fosfatase alcalina) e, após nova lavagem, adiciona-se uma solução cuja coloração pode ser alterada pela enzima. Na presença da bactéria no extrato, ocorrerá sua fixação na placa, bem como a fixação da enzima ligada ao anticorpo que promoverá a alteração de cor da solução. Gillaspie e Harris (1979), encontraram problemas na utilização de ELISA em seus trabalhos, relatando baixa sensibilidade, e resultados inconsistentes na detecção de *L. xyli* subsp. *xyli* em cana-de-açúcar. Assim, embora a técnica seja rápida, ela apresenta custo alto e gera resultados falso-positivos.

A técnica de Dot Blot EIA (dot blot enzyme immunoassay) consiste em fixar o extrato de cana-de-açúcar em membrana de nitrocelulose, e incuba-la com

anticorpo específico contra a bactéria (*L. xyli* subsp. *xyli*). Faz-se lavagens e em seguida incuba-se com anticorpo específico conjugado com a enzima fosfatase alcalina ou peroxidase. Após novas lavagens, a membrana é submetida a uma solução indicadora, que contém o substrato da enzima. Na presença da bactéria obter-se-á mudança de coloração nos locais onde a seiva foi fixada (Harrison e Davis, 1986). A intensidade da cor é proporcional ao número de bactérias presentes na amostra. O nível de detecção deste método foi estimado em 2×10^6 células bacterianas/ml. Esta técnica é barata e apresenta como vantagem o fato da leitura dos resultados ser rápida e direta, sem a necessidade de equipamentos especiais. Apesar da técnica ser pouco sensível comparada à imunofluorescência e ao PCR, ela é suficientemente sensível para orientar a necessidade do tratamento térmico do material propagativo (Carneiro et al., 2004b).

Outra técnica sorológica é o TB-EIA (Tissue Blot enzyme immunoassay) (Harrison & Davis, 1988), similar ao método de Dot Blot EIA. A diferença é que a seiva é extraída diretamente por centrifugação de um cilindro do colmo sobre a membrana de nitrocelulose, imprimindo-se nesta, em baixo relevo, os vasos do metaxilema. Esta técnica vem sendo usada para avaliar a resistência de variedades com base no percentual de vasos colonizados (Davis et al., 1994; Comstock et al., 1996; Comstock et al., 1997; Miller et al, 2002; Ros, 2004).

Pan et al. (1998), publicaram protocolo para detecção de *L. xyli* subsp. *xyli* para técnica de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia). Esta técnica é altamente sensível para detecção da bactéria.

Além das técnicas descritas para diagnose de RSD pode-se citar a Imunofluorescência que, de acordo com Guzman e Victoria (1993), apresenta maior sensibilidade de detecção que microscopia de contraste e ensaio sorológico EB-EIA (Evaporative-Binding Enzyme-Linked Immunoassay) usado para diagnose e seleção de variedades resistentes.

2.3. Levantamentos da incidência de *L. xyli* subsp. *xyli* em plantios comerciais de cana-de-açúcar

O levantamento realizado na Colômbia, em 1982 abrangeu uma área correspondente a 10% da área cultivada no Vale Geográfico do Rio Cauca,

abrangendo diferentes engenhos. Foi encontrada incidência média de 38,9%, por meio de sintomas internos, coincidindo baixa incidência para aqueles locais onde se realizava tratamento térmico e alta para locais onde não se realizava nenhum método de controle. A partir de 1985, nesta mesma região começou-se a prestar serviço de diagnóstico de RSD utilizando técnicas de microscopia de contraste de fase e autofluorescência. A partir de então, notou-se um decréscimo notável na percentagem de incidência de *L. xyli* subsp. *xyli* em todas as variedades. Em 1985, observou-se até 80% de incidência da bactéria em determinadas áreas. Em 1990 a incidência não passou de 15% nas áreas amostradas, o que indica o bom controle realizado nas áreas de multiplicação e a utilidade de se realizar um acompanhamento fitossanitário da cultura (Guzmán e Victoria, 1992).

Nos anos de 2000 e 2001, na região de Tucumã, na Argentina, foi feito um levantamento em nove variedades de cana-de-açúcar, onde seis destas (CP65357, TUC 77-42, TUC 72-16, NA 63-90 e FAM 81-77) ocupam 92% da área cultivada com cana-de-açúcar. A análise foi realizada por meio da técnica sorológica "Tissue Blot Immuno Assay". Para a variedade CP 65357 todas as localidades amostradas nos dois anos estavam infectadas com uma incidência média de 81,7% para o primeiro ano e 73,9% para o segundo ano. Já para a variedade TUC 77-42, 50% das localidades apresentaram incidência média de 53,7% e 66,3% nos dois anos (Rago et al., 2002).

No Sul da África em 1998, aproximadamente 12% dos campos comerciais de cana-de-açúcar apresentaram algum nível de incidência de RSD (Bailey, 1999). Jiménez e Fernández (1987) avaliaram 260 amostras de cana-de-açúcar de seis zonas canavieiras da Costa Rica pela técnica de microscopia de contraste de fases e verificaram a presença da bactéria *L. xyli* subsp. *xyli* em todas as regiões amostradas com índices de incidência de até 77%.

No Brasil constataram-se altos índices de incidência de *Lxx* em cana-planta, nas variedades SP 77-5181 (52%) e SP 79-1011 (18%), no Estado do Pernambuco, SP 70-1143 (12%) e SP 79-1011 (11%) no Rio Grande do Norte, analisadas pela técnica de Dot Blot EIA.

2.4. Amostragem de doenças

A amostragem é uma das mais importantes atividades no estudo de epidemias de doenças de plantas. Com um plano de amostragem adequado, estimativas representativas das características da epidemia podem ser obtidas por um custo reduzido, com a maior exatidão e precisão possível (Campbell e Madden, 1990).

As principais técnicas utilizadas na amostragem de plantas para avaliação de doenças incluem amostragem ao acaso, sistemática, estratificada e seqüencial (Amorin, 1995). Levando-se em consideração as características da cultura de cana-de-açúcar, torna-se difícil adotar alguma destas técnicas de amostragem, pois a coleta de material para se fazer análises em áreas de multiplicação é feita em canaviais que não passam pelo processo de queima, uma vez que será usada como material propagativo, o caminharmento na área total dos talhões é inviável. Referências a respeito do número de amostras a serem coletadas e procedimentos de entrada no talhão de cana-de-açúcar para levantamento da incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* são escassas, sendo definidas arbitrariamente, a critério do investigador.

Guzmán e Victoria (1992), relatam que para talhões com menos de 3 ha de cana-de-açúcar deve-se coletar 20 colmos aleatoriamente para análises de incidência de RSD. Em levantamento da incidência de RSD utilizando a técnica sorológica TBIA em campos de cultivo de cana-de-açúcar na Flórida, para cada 16,2 ha coletaram-se 30 colmos aleatoriamente (Comstock et al., 1997). Já o Centro de Tecnologia COPERSUCAR recomenda coletar 100 colmos ao acaso por talhão, independente da extensão deste, que na cultura da cana-de-açúcar, pode variar entre um e dez hectares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Levantamento da incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Este levantamento foi realizado em áreas de multiplicação de cana-de-açúcar de usinas instaladas na região Norte do Espírito Santo, Oeste Mineiro. Foram amostradas áreas com canas em idade mínima de nove meses após o último corte, das quais obtém-se material propagativo para plantios comerciais. No levantamento, priorizaram-se cultivares mais importantes e plantados em cada usina e na região (Tabela 1).

A coleta das amostras foi realizada em dois anos consecutivos, sendo aproximadamente 4000 amostras em 2003 e 2000 amostras em 2004, em diferentes talhões.

No Espírito Santo as amostragens foram feitas em áreas de três usinas, e em Minas Gerais em uma usina, incluindo áreas de multiplicação no Sul da Bahia.

Tabela 1: Relação de variedades amostradas para avaliação de incidência de *L. xyli* subsp. *xyli*

VARIETADE	VARIETADE	VARIETADE	VARIETADE
RB 72454	RB 855595	RB 92579	SP 83-5073
RB 758540	RB 858927	RB 928064	SP 87-396
RB 765418	RB 855453	SP 71-6959	SP 90-3414
RB 838089	RB 855536	SP 71-1406	SP 90-3723
RB 835486	RB 855463	SP 79-1011	SP 90-1638
RB 835054	RB 855113	SP 80-1816	SP 91-1049
RB 845257	RB 855546	SP 80-1842	IACSP93-6006
RB 845210	RB 865230	SP 81-3250	
RB 855035	RB 867515	SP 83-2843	

3.2. Procedimento e intensidade da amostragem

Em vista da diferença de tamanho dos talhões, em áreas com menos de cinco hectares coletaram-se 45 amostras e em talhões com áreas entre cinco e dez hectares coletaram-se 90 amostras.

Os amostradores entraram nas linhas de plantio de cana-de-açúcar espaçada, de 5 em 5 ou de 10 em 10 linhas dependendo do tamanho e forma do talhão. Ao entrar na linha, percorreram uma distância de 50 a 100 metros e retornaram coletando, a cada 10 metros, o colmo mais velho da touceira amostrada (colmos sem qualquer injúria ou doença visível), cortando-o rente ao solo. Os colmos foram limpos e cortados na altura do quarto internódio basal, amarrados, identificados, ensacados e levados ao laboratório.

3.3. Extração de seiva

Para extração da seiva do xilema foram utilizados segmentos do segundo ou terceiro internódios basais, retirando-se com auxílio de um furador de rolhas, um cilindro de um centímetro de diâmetro e 10 cm de comprimento da região central de cada colmo. Os cilindros foram cortados com 1cm de comprimento e acondicionados em tubos plásticos de microcentrifuga de 1,5 ml, centrifugados por 2 minutos, a 30.000 g (13.000 rpm na microcentrifuga FANEM[®] - mod. 243) e o extrato resultante foi armazenado a -20°C (Carneiro et al., 2003).

3.4. Ensaio sorológico

Nos ensaios sorológicos foi utilizada a técnica de Dot Blot EIA (“Dot Blot Enzyme Immunoassay”, Harisson e Davis, 1986 modificado conforme Carneiro et al., 2004b). Utilizou-se anticorpo policlonal específico contra *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* disponível no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da UENF, produzido e testado por Carneiro et al., (2004b).

Antes da fixação dos extratos na membrana de nitrocelulose 0,2 micron, os mesmos foram descongelados a temperatura ambiente. Cada membrana recebeu um total de 88 amostras, sendo que quatro destas referem-se a padrões de comparação e o restante as amostras de cada talhão. Os padrões consistiram de suspensão de bactérias *L. xyli* subsp. *xyli* pura, seiva de cana doente cuja presença da bactéria foi confirmada em ensaio sorológico prévio, seiva de cana doente diluída 10 vezes em água destilada e seiva de cana filtrada em filtro milipore de 9 µm (padrão negativo).

O ensaio sorológico iniciou-se com a hidratação da membrana de nitrocelulose (Sigma[®]) em água ultra pura, por 10 min. Sob vácuo, foi aplicada na membrana 10 µl de cada amostra. Em seguida, bloqueou-se a membrana por 60 min em solução tampão TS (Tris 100mM, NaCl 1,5 M, Tween-20 0,5% pH 7,4) com 0,3% de leite desnatado em pó (Molico[®]). Após, a membrana foi lavada em solução TS, por três vezes, durante 10 min cada. Após a lavagem a membrana foi incubada por 60 min em solução do antissoro diluído (1: 20.000 em tampão TS com 0,1% de leite). Após esse período, lavou-se a membrana em tampão TS, por três vezes, durante 10 min cada. Em seguida a membrana foi incubada por 120 min na presença de anticorpo de cabra contra IgG de coelho, conjugado a

fosfatase-alkalina (Sigma Chemical Co.®), diluído 1: 2.000 em solução tampão TS com 0,1% de leite em pó. A membrana foi, então, lavada por três vezes em solução TS e por 10 minutos em solução tampão fosfato 1M salino (NaCl 0,8%). O processo sorológico foi finalizado incubando-se (sob agitação a 60 rpm e no escuro) a membrana por 15 min em solução reveladora (Naphthol-as-phosphate 0,3g, N, N Dimethyl formamide 5ml, Tris-base 24g, Fast blue 0,1g, pH 9,1). Após a incubação, a membrana foi lavada por 30 min em solução de Hipoclorito de sódio 2% (v/v) para remoção de manchas residuais. Todo o processo sorológico foi conduzido sob agitação (60 rpm), à temperatura ambiente.

As análises estatísticas (intervalos de confiança) dos resultados obtidos foram efetuadas com auxílio do programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, Viçosa, UFV, 1997).

3.5. Teste de amostragem para estudo da distribuição espacial da doença e determinação do tamanho de amostra

Visando otimizar a coleta de amostras, foram realizados ensaios para se determinar o melhor esquema amostral e o número mínimo de colmos a serem coletados em áreas de cana-de-açúcar com diferentes incidências de doença, bem como se avaliou o arranjo espacial da doença no campo (se agregado ou aleatório).

No município de Campos dos Goytacazes-RJ foram selecionados quatro talhões plantados com a variedade SP 80-1842 e medindo cerca de 8 ha cada e com diferentes incidências da bactéria *L. xyli* subsp. *xyli* verificadas previamente. Na coleta das amostras nos talhões entrava-se em 8 linhas de plantio de cada talhão e se coletavam-se seqüencialmente 42 amostras em cada linha (1 colmo/touceira ou metro). Cada amostra foi numerada de acordo com a linha de plantio amostrada e com a ordem em que foi coletada.

No laboratório foi feita a extração da seiva por centrifugação e a detecção sorológica da bactéria, seguindo protocolo já descrito.

A partir da caracterização das plantas soro positivas e negativas em cada linha amostrada, determinou-se os arranjos espaciais das plantas doentes para os

quatro talhões amostrados de acordo com a análise de “Ordinary runs”, descrita por Madden et al., 1982 (citado por Campbell e Madden, 1990).

Para determinação da intensidade de amostras a serem coletadas, utilizou-se o método gráfico a partir do cálculo de médias e desvios, segundo Kranz, 1998 (citado por Campbell e Madden, 1990). Para isso, efetuou-se simulações em computador, combinando-se os dados para uma, duas até quatro entradas, evitando-se a repetição de dados, para o cálculo de médias e desvios. Posteriormente, repetiram-se os cálculos, simulando-se a coleta de amostras nas linhas, reduzindo-se o caminhar pela metade (21 amostras/entrada) e alternando-se as amostras (1 coleta para cada 2 metros ou 2 touceiras). Também, foi calculado o número de linhas de plantio a ser amostrado baseado no coeficiente de variação da média e em probabilidade conforme os modelos de distribuição de Poisson (Campbell e Madden, 1990).

4. RESULTADOS

4.1. Levantamento da incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* nos anos de 2003 e 2004

No período compreendido entre agosto e outubro de 2003, foram amostrados 333,26 ha em áreas de multiplicação de cana-de-açúcar de diferentes cortes, em 64 talhões de onde se obtiveram aproximadamente 4000 amostras que foram analisadas pelo teste sorológico “Dot Blot”. Verificou-se que 65,62% destes talhões ou 213,53 ha contêm plantas infectadas pela bactéria *L. xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*). A bactéria foi detectada em todas as regiões amostradas do Norte do Espírito Santo, Oeste de Minas Gerais e Sul da Bahia (Tabela 2).

No município de Linhares-ES, das 882 amostras retiradas, 6,46% apresentaram reações positivas a *Lxx* e um talhão da variedade SP 80-1842 apresentou a maior incidência (30,95%), entre as variedades analisadas neste município (Tabela 2). Das 1889 amostras coletadas no município de Conceição da Barra - ES, 6,14% apresentaram reações positivas a *Lxx*. As variedades RB 85 5035 e SP 80-1842 apresentaram a maior incidência, 42,85% e 38%, respectivamente (Tabela 2).

A bactéria *Lxx* foi diagnosticada tanto em áreas de multiplicação de cana-planta quanto em cana soca. Em 2003, cerca de 47% dos talhões amostrados foram de cana-planta e nestes a incidência variou de zero a 34,2%. Observou-se

que a incidência média geral aumentou de cana planta (4,8%) para a cana de quinto corte (10,3%) (Figura 1).

Tabela 2: Variedades amostradas para diagnose do raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar mediante detecção do patógeno em extrato de seiva do xilema, corte, local de coleta e incidência de *L. xyli* subsp. *xyli* nos colmos por talhão

Ano de avaliação	Amostra	Local	Área (ha)	Corte	Variedade	*IC %
2003	1	Linhares – ES	12,43	Planta	SP 80-1842	NI
2003	2	Linhares – ES	4,34	Planta	SP 81-3250	NI
2003	3	Linhares – ES	1,32	Planta	RB 83 5054	NI
2003	4	Linhares – ES	1,57	Planta	RB 83 5486	11,90±10,16
2003	5	Linhares – ES	4,50	Planta	RB 85 5595	11,90±10,16
2003	6	Linhares – ES	0,50	Planta	SP 71-6959	11,90±10,16
2003	7	Linhares – ES	3,00	Planta	RB 85 5546	19,05±12,33
2003	8	Linhares – ES	6,27	Planta	RB 75 8540	NI
2003	9	Linhares – ES	5,06	Planta	RB 85 5035	NI
2003	10	Linhares – ES	9,00	Planta	RB 86 5230	1,19±2,37
2003	11	Linhares – ES	3,40	Planta	RB 85 5453	NI
2003	12	Linhares – ES	8,75	5º corte	RB 72 454	11,90±7,07
2003	13	Linhares – ES	2,80	5º corte	RB 76 5418	7,14±8,08
2003	14	Linhares – ES	4,00	3º corte	SP 79-1011	8,33±6,08
2003	15	Linhares – ES	2,90	3º corte	SP 80-1842	30,95±14,51
2003	16	Conceição da Barra – ES	4,56	1º corte	SP 70-1406	NI
2003	17	Conceição da Barra – ES	6,00	1º corte	RB 85 5536	1,19±2,37
2003	18	Conceição da Barra – ES	6,42	1º corte	RB 83 5486	NI
2003	19	Conceição da Barra – ES	3,00	1º corte	SP 80-1816	19,04±12,33
2003	20	Conceição da Barra – ES	3,94	2º corte	RB 85 5035	42,85±15,53
2003	21	Conceição da Barra – ES	7,82	1º corte	RB 75 8540	1,19±2,37
2003	22	Conceição da Barra – ES	4,12	2º corte	SP 79-1011	NI
2003	23	Conceição da Barra – ES	4,30	2º corte	SP 79-1011	2,44±4,95
2003	24	Conceição da Barra – ES	6,03	Planta	RB 72 454	NI
2003	25	Conceição da Barra – ES	2,15	2º corte	RB 72 454	14,28±10,98
2003	26	Conceição da Barra – ES	3,15	Planta	SP 70-1406	19,04±12,33
2003	27	Conceição da Barra – ES	7,32	1º corte	SP 80-1842	38,00±10,61
2003	28	Conceição da Barra – ES	8,55	1º corte	SP 80-1816	7,14±5,62
2003	29	Conceição da Barra – ES	9,08	1º corte	SP 80-1842	NI
2003	30	Conceição da Barra – ES	6,93	2º corte	RB 83 5486	3,57±4,05
2003	31	Conceição da Barra – ES	6,83	1º corte	SP 71-1406	NI
2003	32	Conceição da Barra – ES	0,69	2º corte	RB 72 454	NI
2003	33	Conceição da Barra – ES	6,32	1º corte	RB 85 5113	NI
2003	34	Conceição da Barra – ES	4,72	Planta	RB 72 454	NI
2003	35	Conceição da Barra – ES	6,98	3º corte	RB 83 5486	1,19±2,37
2003	36	Conceição da Barra – ES	8,08	2º corte	RB 83 5089	4,76±6,68
2003	37	Conceição da Barra – ES	7,03	2º corte	RB 83 5089	7,14±8,08

Tabela 2, Cont.

Ano de avaliação	Amostra	Local	Área (ha)	Corte	Variedade	*IC %
2003	38	Conceição da Barra – ES	2,58	2º corte	SP 80-1842	7,14±8,08
2003	39	Conceição da Barra – ES	2,60	2º corte	SP 80-1842	4,76±6,68
2003	40	Conceição da Barra – ES	4,23	2º corte	SP 80-1842	26,19±13,80
2003	41	Conceição da Barra – ES	4,42	2º corte	SP 80-1842	2,38±4,78
2003	42	Conceição da Barra – ES	4,42	2º corte	SP 80-1842	NI
2003	43	Conceição da Barra – ES	2,59	2º corte	SP 80-1842	2,38±4,78
2003	44	Conceição da Barra – ES	10,00	2º corte	RB 72 454	1,19±2,37
2003	45	Conceição da Barra – ES	9,94	2º corte	RB 72 454	NI
2003	46	Conceição da Barra – ES	4,43	Planta	IACSP93-606	9,52±9,21
2003	47	Conceição da Barra – ES	5,50	Planta	IACSP 93 606	2,38±4,78
2003	48	Lagedão – BA	6,16	Planta	SP 71-1406	3,6±4,05
2003	49	Lagedão – BA	6,18	Planta	SP 71-1406	NI
2003	50	Serra dos Aimorés – MG	4,76	Planta	RB 72 454	11,9±10,16
2003	51	Serra dos Aimorés – MG	3,89	Planta	SP 79-1011	34,2±15,22
2003	52	Mucuri – BA	4,98	2º corte	SP 79-1011	16,7±11,70
2003	53	Mucuri – BA	7,18	Planta	RB 85 5113	1,20±2,37
2003	54	Mucuri – BA	6,84	Planta	RB 72 454	1,20±2,37
2003	55	Mucuri – BA	1,64	2º corte	SP 71-1406	NI
2003	56	Mucuri – BA	4,84	Planta	RB 72 454	NI
2003	57	Mucuri – BA	4,68	Planta	RB 85 5536	4,80±6,68
2003	58	Mucuri – BA	5,00	Planta	RB 83 5486	26,20±13,80
2003	59	Mucuri – BA	4,84	Planta	RB 85 5113	9,52±9,21
2003	60	Ibirapuã – BA	6,72	1º corte	RB 72 454	NI
2003	61	Nova Viçosa – BA	4,14	Planta	SP 71-1406	2,70±5,49
2003	62	Nova Viçosa – BA	4,33	Planta	SP 71-1406	2,56±5,20
2003	63	Nova Viçosa – BA	5,09	Planta	SP 71-1406	NI
2003	64	Nova Viçosa – BA	6,92	Planta	SP 71-1406	1,20±2,37
2004	65	Linhares – ES	4,88	2º corte	RB 84 5210	NI
2004	66	Linhares – ES	4,04	2º corte	SP 80-1842	NI
2004	67	Linhares – ES	9,45	Planta	RB 86 7515	NI
2004	68	Linhares – ES	2,40	Planta	RB 86 7515	NI
2004	69	Linhares – ES	4,51	1º corte	RB 92 8064	9,52±9,21
2004	70	Linhares – ES	9,40	Planta	SP 81-3250	12,19±10,50
2004	71	Linhares – ES	12,51	2º corte	RB 83 5486	30,95±14,51
2004	72	Linhares – ES	3,42	Planta	SP 81-3250	NI
2004	73	Linhares – ES	5,41	2º corte	SP 71-6959	30,95±14,51
2004	74	Linhares – ES	4,87	2º corte	SP 80-1842	9,52±9,21
2004	75	Linhares – ES	3,74	Planta	RB 86 7515	27,5±14,51
2004	76	Conceição da Barra – ES	7,17	3º corte	SP 80-1816	NI
2004	77	Conceição da Barra – ES	1,58	3º corte	RB85 5536	NI
2004	78	Conceição da Barra – ES	1,21	planta	RB 928064	9,52±9,21
2004	79	Conceição da Barra – ES	0,10	planta	SP 91-1049	9,52±9,21
2004	80	Conceição da Barra – ES	1,34	planta	RB 92 579	30,00±14,90
2004	81	Conceição da Barra – ES	7,39	2º corte	SP 71-1406	14,28±10,98

Tabela 2, Cont.

Ano de avaliação	Amostra	Local	Área (ha)	Corte	Variedade	*IC %
2004	82	Conceição da Barra – ES	0,26	planta	RB85 5463	9,52±9,21
2004	83	Conceição da Barra – ES	7,61	planta	SP81 3250	NI
2004	84	Conceição da Barra – ES	0,43	1º corte	RB85 8927	4,76±6,68
2004	85	Conceição da Barra – ES	2,12	1º corte	RB85 5113	4,76±6,68
2004	86	Conceição da Barra – ES	1,53	planta	RB75 8540	NI
2004	87	Conceição da Barra – ES	11,28	planta	SP 83-2847	41,67±16,97
2004	88	Conceição da Barra – ES	4,86	planta	SP 83-5073	21,95±13,28
2004	89	Conceição da Barra – ES	6,29	planta	SP 80-1842	30,95±14,51
2004	90	Conceição da Barra – ES	2,00	planta	SP 87-396	21,43±12,88
2004	91	Conceição da Barra – ES	9,00	planta	SP 90-3414	36,58±15,46
2004	92	Conceição da Barra – ES	9,00	planta	SP 90-1638	19,05±12,33
2004	93	Conceição da Barra – ES	1,30	planta	SP 90-3723	14,28±10,98
2004	94	Conceição da Barra – ES	8,42	planta	RB 84 5257	33,33±14,80
2004	95	Conceição da Barra – ES	8,61	planta	RB 84 5257	26,19±13,80
2004	96	Conceição da Barra – ES	14,28	planta	RB 72 454	14,28±10,98
2004	97	Conceição da Barra – ES	8,10	planta	SP 91 1049	9,52±9,21
2004	98	Mucuri – BA	6,16	1º corte	RB 83 5486	NI
2004	99	Mucuri – BA	5,14	1º corte	SP 71 1406	NI
2004	100	Mucuri – BA	3,42	2º corte	RB 72 454	2,38±4,78
2004	101	Mucuri – BA	3,65	2º corte	RB 85 5113	NI
2004	102	Mucuri – BA	6,44	1º corte	SP 79-1011	19,05±12,33
2004	103	Mucuri – BA	4,84	2º corte	RB 72 454	NI
2004	104	Ibirapuã – BA	6,23	planta	RB 85 5113	59,52±15,41
2004	105	Ibirapuã – BA	6,77	planta	SP 79 1011	11,90±10,16
2004	106	Serra dos Aimorés – MG	4,01	2º corte	RB 85 5536	9,52±9,21
2004	107	Serra dos Aimorés – MG	6,52	2º corte	SP 79-1011	16,67±11,70
2004	108	Serra dos Aimorés – MG	2,35	3º corte	RB 85 5536	40,48±15,41

*IC (%): incidência ± intervalo de confiança considerando $\alpha = 5\%$.

NI: não incidência

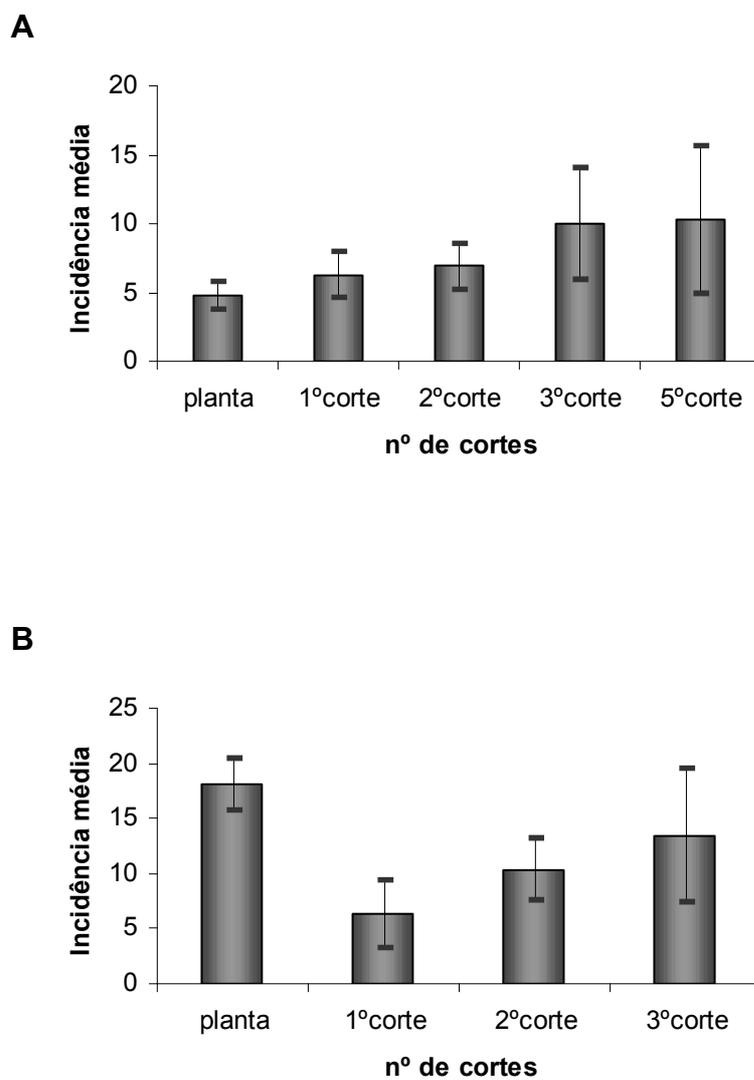


Figura 1: Distribuição da incidência média de *L. xyli* subsp. *xyli* por idade do talhão ou número de colheitas (cortes) e respectivos intervalos de confiança ($\alpha = 5\%$). A – ano de 2003 e B – ano de 2004.

De agosto a outubro de 2004 foram amostrados 44 talhões de áreas de multiplicação de cana-de-açúcar de diferentes cortes que correspondem a 234,04 ha, situados nos municípios já citados anteriormente, onde se obteve aproximadamente 2000 amostras que foram analisadas pelo teste sorológico “Dot Blot”. Constatou-se que 70,45% dos talhões ou 172,17 ha estavam infectados com *Lxx* (Tabela 2).

No município de Linhares-ES foram coletadas 459 amostras e destas 10,89% apresentaram reação positiva a *Lxx*. No município de Conceição da Barra - ES, a bactéria foi diagnosticada em 15,75% das 914 amostras coletadas.

As variedades com maiores incidências de *Lxx* nestas regiões foram SP 83-2847, SP 90-3414 e RB 92 579, que apresentaram incidência de até 41,67%, 36,58% e 30%, respectivamente.

A média de incidência nas amostras dos municípios de Mucuri-BA, Ibirapuã-BA e Serra dos Aimorés-MG foram de 3,57%, 35,71% e 22,22%, respectivamente.

As variedades com maior número de talhões analisados foram RB 72 454, SP 81-3250, SP 80-1842, RB 86 7515, SP 79-1011, RB 85 5536 e RB 85 5113 com incidência de *Lxx* de até 59,52% em áreas de cana-planta (Tabela 3). A comparação entre variedades quanto à incidência da doença não pode ser feita, pois o número de talhões amostrados por variedade foi irregular e muitas vezes insuficiente, o que poderia ser interpretado como um indicativo da suscetibilidade das cultivares na região.

Tabela 3- Relação das variedades, número de talhões amostrados e incidência média de *L. xyli* subsp. *xyli* por variedade

Variedade	Ano de avaliação	Nº talhões Amostrados	IC* MÉDIA (%)	Variedade	Ano de avaliação	Nº talhões Amostrados	IC* MÉDIA (%)
RB 72 454	2003	11	3,50±1,35	RB 75 8540	2003	2	0,60±1,16
RB 72 454	2004	03	5,55±4,01	RB 75 8540	2004	01	NI
SP 80-1842	2003	10	11,54±2,68	IACSP 936006	2003	2	5,95±5,17
SP 80-1842	2004	03	13,49±5,99	RB 86 7515	2004	03	8,87±5,02
SP 71-1406	2003	10	2,41±1,25	SP 81-3250	2003	1	NI
SP 71-1406	2004	02	7,14±5,62	SP 81-3250	2004	03	4,00±3,45
SP 79-1011	2003	5	11,60±4,00	SP 71-5969	2003	1	11,90±10,16
SP 79-1011	2004	03	15,87±6,41	SP 71-6959	2004	01	30,95±14,51
RB 83 5486	2003	5	6,00±2,53	RB 86 5230	2003	1	1,19±2,37
RB 85 5113	2003	3	2,38±2,07	RB 85 5595	2003	1	11,90±10,16
RB 85 5113	2004	03	21,42±7,19	RB 84 5257	2004	02	29,76±10,00
SP 80-1816	2003	2	11,11±5,51	RB 85 5546	2003	1	19,05±12,33
SP 80-1816	2004	01	NI	RB 83 5486	2004	02	15,47±7,90
RB 85 5536	2003	2	2,38±2,67	RB 85 5453	2003	1	NI
RB 85 5536	2004	03	16,66±6,53	RB 92 8064	2004	02	9,52±6,41
RB 85 5035	2003	2	14,28±6,13	RB 83 5054	2003	1	NI
RB 83 5089	2003	2	5,95±5,17	RB 76 5418	2003	1	7,14±8,08
RB 92 579	2004	01	30,00±14,90	RB 85 8927	2004	01	4,76±6,68
RB 84 5210	2004	01	NI	RB 85 5463	2004	01	9,52±9,21
SP 90-3723	2004	01	14,28±10,98	SP 83-2843	2004	01	41,67±16,92
SP 87-396	2004	01	21,43±12,88	SP 90-1638	2004	01	19,05±12,33
SP 90-3414	2004	01	36,58±15,46	SP 83-5073	2004	01	21,95±13,28

*IC MÉDIA (%): incidência média geral ± intervalo de confiança considerando $\alpha = 5\%$.

NI: não incidência

No ano de 2004 cerca de 54,54% dos talhões amostrados foram de cana-planta, nestes a incidência variou de zero a 59,52%, e observou-se maior incidência média da bactéria *Lxx* em cana-planta em relação a 2003. Porém, não foram amostrados os mesmos talhões e as mesmas variedades. Verificou-se aumento da incidência em talhões de 1º ao 3º corte (Figura 1).

4.2. Resultado do teste de amostragem e distribuição espacial de raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar

Dos talhões analisados previamente, selecionaram-se quatro da variedade SP 80-1842, os quais apresentaram as incidências médias de *Lxx* de 13, 19, 23 e 28%.

Aplicando-se a análise de “Ordinary Runs” (Madden, 1982 citado por Campbell e Madden, 1990), em todos os quatro talhões amostrados o arranjo espacial da doença foi predominantemente aleatório, independente da incidência média do talhão. Nos talhões que apresentaram incidência de 19 e 28%, das 8 linhas de plantio amostradas, 5 destas apresentaram arranjo espacial aleatório. No talhão com 13% de incidência de *Lxx* todas as linhas apresentaram arranjo espacial da doença aleatório. Já o talhão com 23% de incidência, 7 linhas de plantio apresentaram arranjo espacial aleatório e 1 linha apresentou arranjo agregado.

Na estimativa do tamanho ideal de amostras a serem coletadas para quantificação de *Lxx* em talhões de cana-de-açúcar, pelo teste sorológico “Dot Blot”, verificou-se por meio da análise gráfica para os três caminhamentos analisados (A: caminhando 42m e coletando uma amostra a cada um metro; B: caminhando 21m e coletando uma amostra a cada metro; C: caminhando 21m e coletando uma amostra a cada dois metros) que a estabilização do desvio padrão foi observada a partir de três entradas ou caminhamentos, independente do talhão e da incidência (Figura 2).

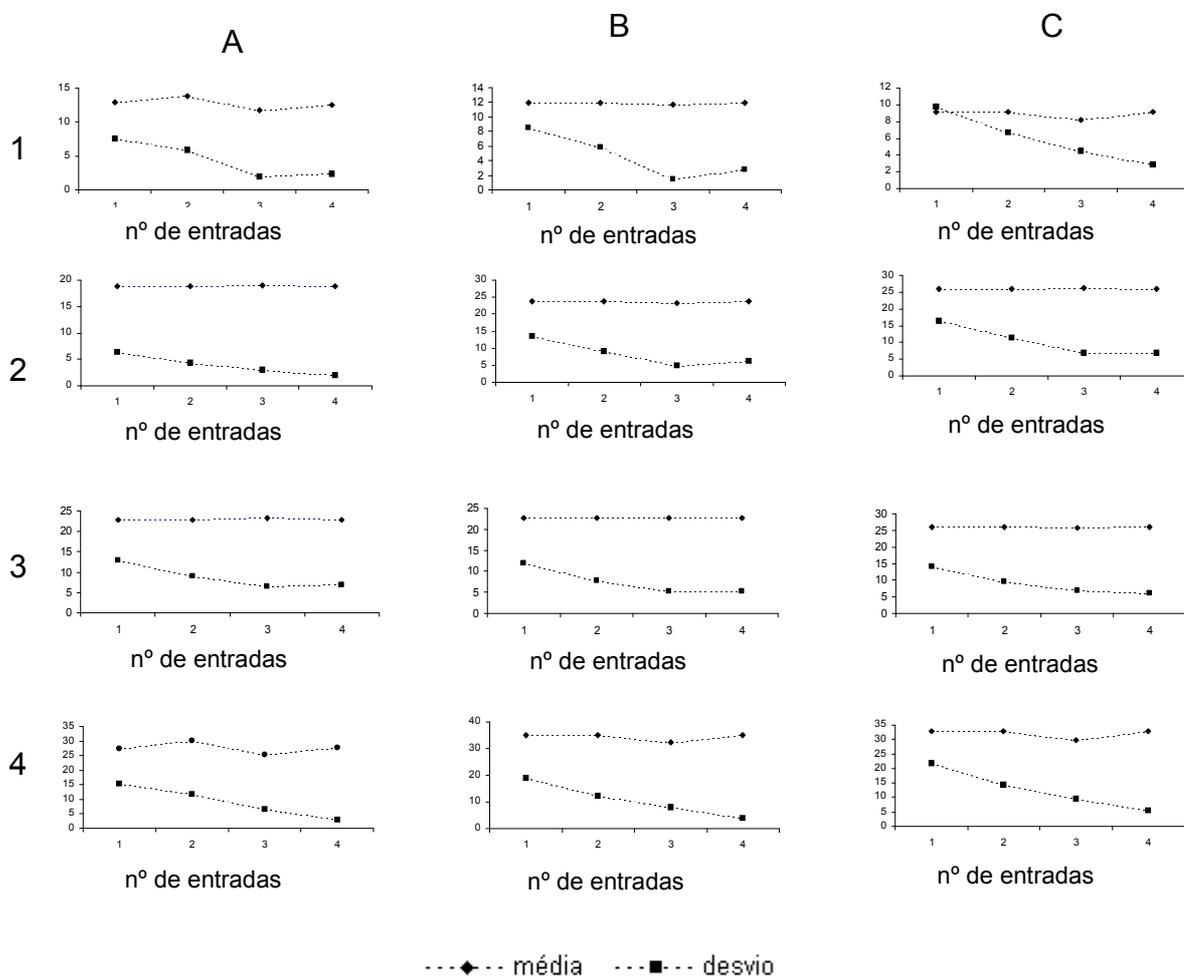


Figura 2: Efeito do tamanho da amostra na média e no desvio padrão da média da incidência de colmos soropositivos para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, a partir da análise de “Dot blot” de extratos de seiva do xilema de cana-de-açúcar, utilizando-se antissoro policlonal não-purificado. 1- talhão com 13% de incidência, 2- talhão com 19% de incidência, 3- talhão com 23% de incidência, 4- talhão com 28% de incidência (A: caminhando-se 42m e coletando-se 1 amostra a cada 1m; B: caminhando-se 21m e coletando-se 1 amostra a cada 2m; C: caminhando-se 21m e coletando-se 1 amostra a cada 1m).

Na estimativa do número de linhas de plantio (entradas no talhão) ideal para quantificação da incidência de *Lxx* pelo teste sorológico “Dot Blot”, verificou-se que o número de linhas de plantio a serem amostradas reduziu significativamente com a elevação do erro padrão aceitável/coeficiente de variação aceitável, assim como o aumento da incidência média de *Lxx* (Tabela 4 e 5).

Tabela 4: Número de entradas para amostragem de colmos para quantificação da incidência da bactéria *Lxx* em cana-de-açúcar por meio da detecção sorológica do patógeno pela técnica de “dot blot”, para quatro talhões amostrados com níveis diferentes de incidência média. A confiabilidade da amostragem foi definida nas fórmulas pelo coeficiente de variação (C)* e intervalo de confiança / erro padrão da média (D)**, considerando 42 colmos avaliados por linha de plantio

Incidência Média(%)	$N = \frac{s^2}{\bar{x}C^2}$			$N = \frac{1}{\bar{x}C^2}$			$N = \frac{t_{(p/2)}^2}{D^2\bar{x}}$		
	1%*	5%*	10%*	1%*	5%*	10%*	1%**	5%**	10%**
13	828	33	8	769	31	8	38877	1555	389
19	332	13	3	526	21	5	22800	912	228
23	132	5	1	424	17	4	10987	439	110
28	77	3	0,7	357	14	3	7736	309	77
Média	342,25	13,5	3,17	519	20,75	5	20100	803,75	201

Número de entradas no talhão (N); variância (s); incidência média de *Lxx* (x), citando Campbell e Madden (1990).

* Coeficiente de variação aceitável (C)

**Erro padrão aceitável (D)

Tabela 5: Número de entradas para amostragem de colmos para quantificação da incidência da bactéria *Lxx* em cana-de-açúcar por meio da detecção sorológica do patógeno pela técnica de “dot blot”, para quatro talhões amostrados com níveis diferentes de incidência média. A confiabilidade da amostragem foi definida nas fórmulas pelo coeficiente de variação (C)* e intervalo de confiança / erro padrão da média (D)**, considerando 21 colmos avaliados por linha de plantio

Incidência Média(%)	$N = \frac{s^2}{\bar{x}C^2}$			$N = \frac{1}{\bar{x}C^2}$			$N = \frac{t_{(p/2)}^2}{D^2\bar{x}}$		
	1%*	5%*	10%*	1%*	5%*	10%*	1%**	5%**	10%**
13	473	19	5	769	31	8	22215	889	222
19	360	14	4	526	21	5	24700	988	247
23	208	8	2	424	17	4	17265	691	173
28	230	9	2	357	14	3	23207	928	232
Média	317,75	12,5	3,25	519	20,75	5	21846,75	874	218,5

Número de entradas no talhão (N); variância (s); incidência média de *Lxx* (x), citando Campbell e Madden (1990).

* Coeficiente de variação aceitável (C)

**Erro padrão aceitável (D)

5. DISCUSSÃO

Com o presente levantamento foi possível fazer um diagnóstico regional quanto à prevalência da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*), agente causal do raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar em áreas de multiplicação de cana do Espírito Santo, Oeste Mineiro e Sul da Bahia.

Os elevados índices de incidência da bactéria *Lxx* verificados nos dois anos de amostragem em áreas de multiplicação de cana-de-açúcar nas regiões acima citadas, confirmaram que a bactéria encontra-se amplamente disseminada nestas regiões. Apesar de não haver registros anteriores da incidência da bactéria *Lxx* na região de abrangência do levantamento, estes resultados eram esperados, devido a uma série de fatores, tais como desuso de medidas fitossanitárias recomendadas para o controle, como exemplo o sistema de tratamento térmico para produção de mudas sadias que era rotineiramente utilizado na década de 80 e intercâmbio de material propagativo com outros Estados.

Observou-se, no geral, que a incidência de *Lxx* foi maior em 2004 que em 2003. De todo modo, a prevalência e a incidência foram altas nos dois anos, evidenciando-se que o raquitismo da soqueira não tem sido controlado, quer seja pela produção de mudas sadias, desinfecção de ferramentas de corte ou tratamento térmico.

A maior parte das mudas utilizadas na região litorânea provém de plantios comerciais ou áreas de multiplicação, muitas das quais, como consta no levantamento, apresentam alta incidência de raquitismo, mesmo em cana-planta

(mínimo de 1,19% e máximo de 59,52%, considerando os dois anos de levantamento). Como canaviais comerciais estão sendo reformados ou implantados com elevada contaminação, perdas significativas na produtividade devido ao RSD podem vir a ocorrer em anos de estiagem prolongada.

As variedades que tiveram maior número de talhões amostrados no ano de 2003 foram SP 79-1011 (IC=11,6%), SP 80-1842 (IC=11,54%), RB 72454 (IC=3,5%), RB 835486 (IC=6%) e SP 71-1406 (IC=2,41%), as quais, são as mais plantadas nas regiões de abrangência do levantamento. Já no ano de 2004 as variedades mais analisadas foram RB 72454 (IC=5,5%), SP 80-1842 (IC=13,49%), SP 81-3250 (IC=4%), SP 79-1011 (IC=15,87%), RB 855536 (IC=16,66%), RB 855538 (IC=21,42%) e RB 867515 (IC=8,87%).

Ros (2004), avaliando a resistência de variedades de cana-de-açúcar ao raquitismo da soqueira com base na taxa de colonização dos colmos por *Lxx*, em condições de casa-de-vegetação, mostrou que as variedades SP 80-1842 e SP 81-3250 apresentaram nível de resistência intermediário. Sanguino (1993), avaliando a reação de variedades de cana-de-açúcar em condições de campo por três cortes, no Estado de São Paulo, observou que a variedade SP 71-1406 apresentou altas taxas de infecção, mas foi considerada tolerante à presença da bactéria.

A equipe de Fitopatologia da Estação Experimental de cana-de-açúcar do Carpina (EECAC), em trabalhos desenvolvidos na região Nordeste do país utilizando-se do teste sorológico "Dot Blot" encontraram na variedade SP 79-1011 altos índices de incidência de *Lxx* 11 e 18% no Estado do Rio Grande do Norte e Pernambuco, respectivamente (Chaves et al., 2002). Ros (2004) considerou esta variedade suscetível a *Lxx* e neste levantamento foram detectados índices de até 34% de incidência de *Lxx*. Levando-se em consideração que tanto a densidade populacional (Davis et al 1988) como a disseminação do RSD no campo (Damann, 1992) apresentam correlação direta com suscetibilidade, podemos então considerar esta variedade como suscetível, não podendo afirmar quanto à sua tolerância, pois, além de apresentar alta incidência, em diferentes regiões, permite alta multiplicação do patógeno.

Todavia a variedade SP 71-1406, relatada por Tokeshi (1997) como resistente a *Lxx* no Estado de São Paulo, apresentou incidência de *Lxx* de até 14% na região de abrangência do presente levantamento. Sabe-se que a cana-

de-açúcar desenvolveu naturalmente, ao longo de sua evolução, a resistência horizontal para a maioria das suas doenças (Matsuoka et al., 1999) e que o ambiente nas variedades comerciais tem capital importância no comportamento produtivo. Esta talvez seja a causa da produtividade média regional estar abaixo da produtividade média obtida em São Paulo. Não é possível caracterizar as variedades quanto à tolerância de acordo com dados obtidos no presente levantamento, uma vez que não se avaliou a produtividade e, para isso, ter-se-ia que lançar mão de experimentação apropriada, comparando-se parcelas tratadas e não-tratadas por termoterapia.

Faz-se, assim, necessário à caracterização das variedades quanto as reações a diferentes doenças nestas regiões e em anos diferentes, pois, no caso do raquitismo, por exemplo, a resistência e a tolerância são dependentes de fatores edáficos e do regime hídrico (Tokeshi, 1997).

A bactéria estava presente e em altas incidências tanto em áreas de cana planta quanto em cana soca. Cerca de 47% dos talhões amostrados no ano de 2003 foram de cana-planta. Nestes, a incidência variou de zero a 34,2%. Esta alta incidência em cana-planta demonstra que as mudas utilizadas nos novos plantios foram obtidas de talhões com níveis elevados de contaminação. Para o mesmo ano detectou-se que a incidência média aumentou de cana-planta (4,8%) para cana de quinto corte (10,3%), o que era esperado, devido à epidemia ser monocíclica e poliética. Resultados semelhantes foram encontrados em levantamentos feitos por Baudin e Chatenet (1983) em Haute-Volta – França, utilizando a técnica de “Imunofluorescência”.

O genótipo, a idade da cultura, além das condições climáticas, pode determinar a presença e a intensidade dos sintomas causados pela bactéria *Lxx*. Nesse sentido, sintomas externos podem ser tanto aumentados como mascarados pela disponibilidade de água para planta, por isso, alguns cultivares sob condições ambientais apropriadas, podem suportar alta densidade populacional de *Lxx* sem mostrar qualquer sintoma visível. Isso foi observado no ano de 2004, onde o regime hídrico esteve entre 1500 a 1700 mm, o que foi bastante favorável à cultura da cana-de-açúcar. Sendo assim, devido ao efeito do vigor e possível diluição da bactéria no xilema, não se esperava detectar elevadas incidências de *Lxx*, especialmente em cana-planta ou nos primeiros cortes. No entanto, a incidência média foi de 18% em cana-planta no ano de 2004,

confirmando que o material propagativo utilizado na renovação dos talhões amostrados neste ano estava igualmente contaminado e foi obtido de campos comerciais com alta incidência da bactéria. Ademais, a maioria das variedades de cana-planta amostradas em 2004 são materiais lançados para cultivo comercial nos últimos anos. Portanto, com base no levantamento, observa-se que os materiais multiplicados são todos suscetíveis a *Lxx*. Resta-se saber, como estes materiais responderão em termos de produtividade, nos anos de seca na região. A caracterização destes cultivares quanto à tolerância ao raquitismo deverá ser um critério para facilitar o manejo varietal na cultura canavieira.

Com relação aos talhões de 1º a 3º corte amostrados no ano de 2004, observou-se um aumento gradativo da incidência de colmos infectados, corroborando com os resultados obtidos em 2003. Estes resultados evidenciam a necessidade de se implementar a multiplicação especial da cana-de-açúcar, utilizando-se material limpo por tratamento térmico, cultura de meristemas e, no caso de materiais-elites, altamente produtivos, mas intolerantes ao raquitismo, preconiza-se a necessidade de se obter material indexado (Prof. Silvaldo Felipe da Silveira, informação pessoal).

A técnica sorológica utilizada na diagnose da doença (“Dot Blot”), foi sensível o suficiente para avaliar a necessidade de se utilizar medidas de controle como tratamento térmico de material propagativo para formação de viveiros saudáveis, bem como avaliar a incidência da bactéria em campos comerciais.

No estudo do arranjo espacial da doença esperava-se que nos níveis de incidência obtidos nos quatro talhões testados, a distribuição da doença fosse fortemente agregada, dado à disseminação mecânica da doença por meio dos instrumentos de corte. No entanto, a distribuição da doença foi aleatória, na maioria das linhas e talhões levantados. Atribui-se isso ao baixo nível de detecção da bactéria nos extratos (2×10^6 bactérias/ml no extrato), o que pode resultar aumento no número de amostras com resultados falso-negativos. Acrescenta-se a isto tudo, o fato de no ano de 2004, o regime hídrico ter sido muito propício ao desenvolvimento da cultura, acarretando, para essa variedade, a diluição da bactéria nos extratos. Conclui-se que para análise da distribuição espacial do raquitismo da soqueira, a técnica de detecção utilizada neste trabalho não foi satisfatória. A utilização de métodos mais sensíveis, como PCR

(Reação de Polimerase em Cadeia) deverá gerar resultados mais satisfatórios para a análise do arranjo espacial da doença no campo.

Na determinação do tamanho ideal de amostras para quantificação da incidência de *Lxx* em talhões de cana-de-açúcar, como não se evidenciou estabilização, mas apenas redução dos desvios em função do número de entradas (linhas de plantio amostradas) pelo método gráfico, buscou-se definir um número aceitável de linhas de plantio a serem amostradas mediante modelos de distribuição baseados no coeficiente de variação da média e em equação de probabilidade, segundo Campbell e Madden (1990). Verificou-se que o número de linhas de plantio a serem amostradas reduziu significativamente com a elevação do coeficiente de variação ou erro padrão aceitável, bem como com a elevação da incidência média de *Lxx*. Números reduzidos de entradas ou de caminhamentos são satisfatórios, nos níveis de incidência de raquitismo acima de 20% de colmos infectados, para coeficiente de variação de 10%, até um único caminhamento, coletando-se 42 amostras, é suficiente para se garantir a detecção da doença em talhões com níveis de incidência acima de 20%.

Na análise baseada na equação de probabilidade, o número de entradas foi superior ao estimado quando a análise foi efetuada somente pelo coeficiente de variação da média e aumentou com a redução do erro padrão da média. Considerando a média dos quatro talhões, avaliados o número de entradas quando o erro aceitável é de 10% na quantificação de *Lxx* seriam necessárias 201 entradas (Tabela 4).

Considerando a média dos quatro talhões, em futuros levantamentos da incidência de *Lxx* em áreas de multiplicação de cana-de-açúcar, recomenda-se a coleta de três linhas de plantio com 21 colmos/linha/talhão, quando o erro aceitável for 10%, o que é considerado satisfatório em levantamento de campo. No entanto o número de linhas se eleva para 13 e 314 quando diminui o erro aceitável para 5 e 1%, respectivamente (Tabela 5).

Deve-se considerar que o tamanho da amostra depende do objetivo do levantamento, dos níveis de acurácia e precisão desejados além da disponibilidade de recursos (Amorim, 1995). Sendo o raquitismo da soqueira uma epidemia poliética, ou seja, a intensidade da doença aumenta a cada ciclo de cultivo, sugere-se então que o tamanho da amostra diminua com o acréscimo no número de colheita. No entanto, para estabelecer um número de amostra

confiável para cada ciclo de cultivo e que satisfaça as mais diversificadas situações, se faz necessário um plano de amostragem em diferentes variedades de diferentes idades de corte a fim de se chegar a um denominador mínimo que atenda tanto a um plano de controle fitossanitário e que seja exeqüível.

RESUMO E CONCLUSÕES

O trabalho teve como objetivos avaliar a incidência da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) agente causal do raquitismo da soqueira de cana-de-açúcar em áreas de multiplicação na região canavieira do Norte do Estado do Espírito Santo, Oeste Mineiro e Sul da Bahia utilizando a técnica sorológica “Dot Blot”, e determinar estatisticamente um tamanho mínimo de amostras de colmos a serem coletados, para fins de diagnose.

Para tal coletaram-se colmos com idade superior a 9 meses. Em talhões com área inferior a 5 ha retiravam-se 45 amostras e nos talhões com áreas superiores a 5 ha retiravam-se 90 amostras. A seiva do xilema foi extraída do segundo internódio basal, segundo Carneiro et al. (2003).

No município de Campos dos Goytacazes-RJ selecionou-se quatro talhões comerciais (aproximadamente 8 ha cada) da variedade SP 80-1842 com diferentes níveis de incidência de *Lxx* para realização de ensaios afim de determinar o arranjo espacial da doença e o número mínimo de colmos a serem coletados em áreas de cana-de-açúcar para análise sorológica.

Considerando as áreas de multiplicação como a base da formação dos plantios comerciais, conclui-se que a incidência de *Lxx* na maioria das variedades amostradas está alta.

Apesar das áreas comerciais não terem sido foco desta pesquisa, pode se supor que a bactéria esteja contribuindo para a baixa produtividade média registrada nestas regiões. Nesse sentido o conhecimento do nível de resistência

ou tolerância das variedades mais cultivadas nestas regiões facilitaria o manejo varietal e cultural, visando manter a doença em um nível que não comprometa a produtividade das variedades mais sensíveis.

Aplicando-se a análise de “Ordinary Runs” (Campbell e Madden, 1990), todos os quatro talhões amostrados em Campos apresentaram arranjo espacial predominantemente aleatório, independente da incidência média do talhão.

Ainda, evidencia-se a necessidade de se empregar material propagativo sadio, e de se incrementar a utilização de variedades mais adaptadas e resistentes/tolerantes ao RSD.

Com relação à técnica sorológica utilizada na diagnose da doença (“Dot Blot”), esta se mostrou sensível para avaliar a incidência da bactéria. No entanto, para análise de arranjo espacial da doença o método sorológico não apresenta nível de detecção satisfatório, possivelmente a utilização de métodos mais sensíveis como PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) poderia gerar resultados mais satisfatórios para este tipo de análise.

Para quantificação de *Lxx* pelo teste sorológico “Dot Blot”, a amostragem de 3 linhas de plantio com 21 colmos/linha/talhão, parece ser apropriada para quantificar a incidência de *Lxx* quando o erro aceitável for 10%, em levantamentos de campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL (2005) Anuário estatístico da agricultura Brasileira. São Paulo: FNP. Consultoria e Comércio. p. 261-277.
- Amorin, L. (1995) Avaliação de doenças. *In*: Bergamim Filho, A., Kimati, H., Amorim, L. (eds.) Manual de Fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres. 1: 647- 671.
- Barbosa, M. H. P. (2000) Perspectivas para o melhoramento da cana-de-açúcar. *In*: Simpósio de Atualização em genética e Melhoramento de Plantas. Lavras. 1:1-17.
- Baudin, P., Chatenet, M. (1983) Présence de la maladie du rabougrissement des repousses de la canne à sucre en Haute-Volta. *L'Agronomie tropicale* 38 (3): 241-243.
- Baylei, R. A, McFarlane, S. A. (1999) The incidence and effects of ratoon stunting disease of sugarcane in southern and central Africa. www.sasta.co.za/1999Congress/1999AgricAbstracts/incidence_and_effects_of_ratoon_.htm consultado dia 20/01/2005

- Betti, J. A., Costa, A. S., Paradela Filho, O., Soave, J., Matsuoka, S. (1980) Descoloração vascular na região dos nós em capim-elefante causada por várias espécies de bactéria. *Fitopatologia Brasileira*. 6: 139-147.
- Campbell, C. L., Madden, L. V. Introduction to Plant Disease Epidemiology. New York: John Wiley, 1990. 532p.
- Carneiro, J. B., Ponte, 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* 8º Encontro de Iniciação Científica, 3º Mostra de Pós-Graduação e 1º Mostra de Extensão, resumos [CDROM] Campos dos Goytacazes pg 116-117.
- Carneiro, J. B., Ponte, E. C., Silveira, S. F. (2004a) Levantamento fitossanitário da região norte capixaba e oeste mineiro. *Fitopatologia brasileira (Suplemento)*. In: XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia p.191.
- Carneiro, J. B., Silveira, S. F., Souza Filho, G. A., Olivares, F. L., Giglioti, E. A. (2004b) Especificidade de anti-soro policlonal a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Fitopatologia Brasileira*. 29(6): 614-619.
- Chagas, P. R. R., Matsuoka, S. (1988) Medidas de controle do raquitismo da soqueira. *Brasil açucareiro*, Rio de Janeiro, 106 (1): 40-44.
- Chagas, P. R. R., Tokeshi, H. (1988) Método alternativo de coloração do xilema para a avaliação do índice de contaminação do raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar. *Brasil açucareiro*, Rio de Janeiro, 106(4): 16-25.
- Chagas, P. R. R., Tokeshi, H. (1994) Comparison between methods for diagnosis of ratoon stunting disease: I. Water flow, flow and staining by transpiration. In: Festschrift, K.S.B. *Current trends in sugarcane pathology*. Delhi: International Books & Periodicals Supply Service, p. 163-171.

- 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 em cana-planta. *Anais do 8º congresso Nacional da STAB*. Pernambuco p.27-34.
- Comstock, J. C., Shine Jr, J. M., Davis, M. J., Dean, J. L. (1996) Relationship between resistance to *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* colonization in sugarcane and spread of ratoon stunting disease in the field. *Plant Disease*. 80(6): 704-708.
- Comstock, J. C., Perdomo, R., Powell, G., Wang, Z. (1997) Ratoon stunting disease in Florida sugarcane fields: relationship between disease incidence and cultivar resistance. *Journal American of Sugarcane Technologists*, 17:95-101
- Damann, K. E., Benda, G. T. A. (1983) Evaluation of commercial heat-treatment methods for control of ratoon stunting disease of sugarcane. *Plant disease*. 67(9): 966-967.
- Damann, K. E. (1988) Alkaline induced metaxylem autofluorescence: a diagnostic symptom of ratoon stunting disease of sugarcane. *Phytopathology*, St. Paul, 78 (2): 23-26.
- Damann, K. E. (1992) Effect of sugarcane cultivar susceptibility on spread of ratoon stunting disease by the mechanical harvester. *Plant disease*. 76: 1148-1149.
- 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, including

Clavibacter xyli subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, 34 (2): 107-117.

Davis, M.J., Dean, J. L., Harisson, N. A. (1988) Quantitative variability of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* populations in sugarcane cultivars differing in resistance to ratoon stunting disease. *Phytopathology*. 78: 462-468.

Davis, M.J., Dean, J. L., Miller, J. D. Shine Jr, J. M. (1994) A method to screen for resistance to ratoon stunting disease of sugarcane. *Sugar Cane*. 6: 9-16.

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*, 5: 371-380.

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

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, R. E., Worley, J. F. (1976) Nature of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. *Sugarcane Pathologists Newsletter*, Redit, (15/16): 11-15.

Gillaspie, A. G. (1978) Ratoon stunting disease of sugarcane serology. *Phytopathology*, St. Paul, 68: 529-532.

- Gillaspie, A. G., Harris, R. W. (1979) Limitations of Elisa for detection of the RSD - associated bacterium in sugarcane and sudangrass. *Sugarcane Pathologists' Newsletter*, Réduit, 22: 25-28.
- Guzmán, M. L., Victoria, J. I. (1992) Incidencia del raquitismo de la soca (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) en semilleros de la caña de azúcar y evaluación de metodos para su diagnostico. *Fitopatologia Colombiana*, 16 (1): 126-134.
- Guzmán, M. L., Victoria, J. I. (1993) Empleo del metodo de inmunofluorescencia directa en la detección del raquitismo de la soca (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*). *Fitopatologia colombiana*. 17(1): 21-30.
- Harrison, N. A., Davis, M. J. (1986) Infectivity titrations of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. *Plant disease*. 70(6): 556-558.
- Harrison, N. A., 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*, 78 (6): 722-727.
- Jiménez, L. G., Fernández, B. (1987) Distribuicion, incidência y comparacion fenotipica de cepas de *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causante Del raquitismo Del retoño de la caña de azúcar en Costa Rica. *Agronomia Costarricense*. 11(1): 103-108.
- Jornal da cana; <http://www.jornalcana.com.br/Conteudo/conheça%20%20Setor.asp>. Consultado em 01/05/2004
- Matsuoka, S. (1971) Incidência do vírus do raquitismo da soqueira em canas provenientes de material propagativo tratado termicamente. *Revista da sociedade Brasileira de Fitopatologia*, Piracicaba, 4: 63-64.
- Matsuoka, S. (1972) Ratoon stunting disease diagnosis whit elephant-grass as an indicator plant. *Sugarcane Pathologist's Newsletter*, 8: 10-11.

- Matsuoka, S. (1975) Disseminação e controle do raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 1 (4): 245-257.
- Matsuoka, S. (1984) Longevidade do efeito do tratamento térmico em canas infectadas pelo raquitismo da soqueira. *Anais do III Congresso Nacional da STAB*, São Paulo, p. 244-249.
- Matsuoka, S., Garcia A.A.F., Arizono, H. (1999) Melhoramento da cana-de-açúcar. In Borém, A. (Ed). Melhoramento de espécies cultivadas. 2.ed. Viçosa: Editora UFV. P 2005-251.
- Miller, J. D., Comstock, J. C., Tai, P. Y. P., Glaz, B. (2002) A technique to breed for ratoon stunting disease in sugarcane. *Journal American of Sugarcane*. 22: 134.
- Pan, Y. B., Grisham, M. P., Burner, D. M. (1998) A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. *Plant disease*, 82 (3): 285-290.
- Pérez, J. R., Matos, M., Figueiredo, Y. (2001) Estudio de la resistencia de variedades comerciales de la caña de azúcar al raquitismo de los retoños empleando el método de tinción por transpiración. *Cultivos Tropicales*. 22(2): 39-42.
- Rago, A., Ullivarri, E. F., Mariotti, J. A. (2002) Raquitismo de las socas en el área de Tucumán.
[www.inta.gov/famailla/info/documentos/cana/raquitismo de las socas tucuman.pdf](http://www.inta.gov/famailla/info/documentos/cana/raquitismo_de_las_socas_tucuman.pdf) Consultado dia 20/01/2005
- Rodrigues, F. S. (2003) *Anuário da cana: a bíblia do setor*. ProCana Centro de Informações sucroalcooleiras. Ribeirão Preto, 243p.
- 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. Piracicaba. 58p.

- Sanguino, A., Moraes, V. A., Filho, O. T. S. (1984) Diagnóstico do raquitismo da soqueira em colmos de cana-de-açúcar. *Anais do II Seminário de tecnologia agrônômica*, Piracicaba, Copersucar, p. 250-253.
- Sanguino, A. (1993) Tolerância de variedades ao raquitismo da soqueira. *Anais do 5º Congresso Nacional da STAB*. p. 143-147.
- Sanguino, A. (1998 a) Situação atual da pesquisa em doenças da cana-de-açúcar. *Summa Phytopathologica*. 24 (1): 90-91.
- Sanguino, A. (1998 b) Diagnóstico e controle do raquitismo da soqueira causado pela bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*. *STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos*, Piracicaba, 17 (1): 26.
- Steindl, D. R.L. (1961) Ratoon stunting disease. *Plate XX, Internal symptoms of ratoon stunting disease*. Amsterdam, 20: 433-453.
- Steindl, D. R.L. (1976) The use of phase contrast microscopy in the identification of ratoon stunting disease. *Proceedings of the Conference of Queensland Society of Sugarcane Technologists*, p. 71-72.
- Tokeshi, H. (1997) Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H; AMORIM, A. L; Bergamin Filho, A. et al. (Ed.). *Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas*. São Paulo Agrônômica Ceres, 2, p. 207-225.
- Valarini, J. P., Tokeshi, H. (1981a) Evaluation of ratoon stunting disease resistance by water flow of sugarcane stalks. *Summa Phytopathologica*. 7: 45-50.
- Valarini, J. P., Tokeshi, H. (1981b) Factors that interfere in evaluation of ratoon stunting disease resistance by water flow in sugarcane stalks. *Summa Phytopathologica*. 7: 51- 56.

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