**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA DIAGNOSE DO RAQUITISMO DA
SOQUEIRA DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) E
APLICAÇÃO NA SELEÇÃO DE VARIEDADES RESISTENTES**

MARILENE TENGUAN IMAUTI
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. HASIME TOKESHI

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Fitopatologia.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 1990

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Iamauti, Marilene Tengan
I11c - Comparação de métodos para diagnose do raquitismo
da soqueira da cana-de-açúcar (Clavibacter xyli subsp.
xyli) e aplicação na seleção de variedades resistentes.
Piracicaba, 1990.
132p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar - Doença - Resistência 2. Cana-
de-açúcar - Variedade - Seleção 3. Raquitismo da so-
queira da cana-de-açúcar - Diagnóstico I. Escola Su-
perior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.61

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA DIAGNOSE DO RAQUITISMO DA
SOQUEIRA DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) E
APLICAÇÃO NA SELEÇÃO DE VARIEDADES RESISTENTES

Marilene Tengan Iamauti

Aprovado em 01.02.1991

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Hasime Tokeshi

ESALQ/USP

Profa. Dra. Lilian Amorim

ESALQ/USP

Dr. Álvaro Sanguino

COPERSUCAR

Prof. Dr. Hasime Tokeshi

Orientador

Aos meus pais, irmãos
e Wilson

AGRADECIMENTOS

À todos que colaboraram neste trabalho e em especial:

- Ao Prof. Dr. Hasime Tokeshi, pela orientação, estímulo, amizade e apoio.

- Aos Professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP, pelos ensinamentos.

- À Cooperativa dos Fornecedores do Estado de São Paulo e a Associação dos Fornecedores de Cana-de-açúcar de Piracicaba pelo auxílio financeiro neste trabalho.

- Ao Engenheiro Agrônomo Silvio G. Bertolati e ao Tecnólogo Weber G. Valério, que tornaram possível a execução deste trabalho.

- Ao Engenheiro Agrônomo José Luiz A. Cervi, aos técnicos agrícolas Sebastião F. da Silva, Pedro G. Bessi e Pedro R. Bombach pela colaboração durante a condução dos ensaios.

- Aos colegas e funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP.

- À Engenheiro Agrônomo Sônia M. De Stefano Piedade pela orientação nas análises estatísticas.

- À Prof. Dra. Lilian Amorim por suas sugestões e auxílio no decorrer deste trabalho.

- À Engenheiro Agrônomo Maria Edna T. Nunes pelo constante estímulo e amizade.

- Ao jornalista Alfredo Iamauti pela revisão dos originais.

- Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

PÁGINA

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
Resumo.....	viii
Summary.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Agente causal.....	5
2.2. Métodos de diagnose do RS.....	7
2.2.1. Baseados em sintomas.....	8
2.2.2. Testes biológicos.....	10
2.2.3. Testes químicos.....	13
2.2.4. Testes microscópicos.....	14
2.2.4.1. Utilização de microscópio eletrônico.....	15
2.2.4.2. Utilização de microscópio de contraste de fase.....	16
2.2.4.3. Utilização de microscópio de fluorescência.....	22
2.2.5. Testes baseados em reações serológicas.....	24
2.2.6. Testes baseados no transporte de seiva bruta.....	26
2.3. Controle.....	32
2.3.1. Tratamento térmico.....	32
2.3.2. Desinfecção de ferramentas.....	34
2.3.3. Variedades resistentes.....	35
2.3.4. Antibióticos.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1. Local e variedades.....	37
3.2. Delineamento experimental.....	38
3.3. Obtenção de inóculo e inoculação.....	39

3.4. Tratamento térmico.....	41
3.5. Métodos de diagnóstico testados.....	41
3.5.1. Método da coloração do xilema.....	43
3.5.2. Observação da bactéria do RS em microscópio de contraste de fase.....	46
3.5.3. Autofluorescência do metaxilema.....	48
3.6. Análise estatística dos dados.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1. Comparações entre os três métodos de diagnóstico do RS.....	51
4.1.1. Comparação entre os métodos de coloração do xilema e autofluo- rescência do metaxilema para determi- nação da incidência do RS.....	51
4.1.2. Comparação entre autofluorescência do metaxilema e observação da bacté- ria em microscópio de contraste de fase.....	55
4.1.3. Comparação entre coloração do xilema e observação da presença da bactéria do RS em microscópio de contraste de fase.....	57
4.2. Índice de contaminação do RS aplicado nos ensaios e viveiros.....	61
4.2.1. Índice de contaminação dos três ensaios nos campos I e II.....	61
4.2.2. Comprovação da baixa eficiência do tratamento térmico utilizado no campo II, através da avaliação de viveiros.....	70
4.3. Avaliação de resistência ao RS das variedades comerciais testadas.....	72
5. DISCUSSÃO GERAL.....	80

5.1. Comparação entre o método de coloração do xilema (CL) e autofluorescência do metaxilema (FL) avaliado no ensaio R1.....	80
5.2. Comparação entre o método de coloração do xilema (CL) e observação de bactéria (CT) avaliado no ensaio R2.....	81
5.3. Comparação entre autofluorescência do metaxilema (FL) e observação da bactéria (CT).....	82
5.4. Índice de contaminação do RS aplicado nos ensaios e viveiros de mudas.....	83
5.4.1. Índice de contaminação nos ensaios R1, R2 e R3 do campo II.....	83
5.4.2. Índice de contaminação em viveiros de mudas.....	86
5.5. Avaliação da resistência ao RS das variedades comerciais testadas.....	86
5.5.1. Avaliação de resistência ao RS no campo I.....	87
5.5.2. Avaliação de resistência ao RS no campo II.....	88
6. CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
APÊNDICE.....	104

FIGURA N°

PÁGINA

1. Representação dos I.C.(%) determinados nas
parcelas sadias e doentes do campo I.
Variedades CB47-355, NA56-79, SP70-1078..... 62
2. Representação dos I.C.(%) determinados nas
parcelas sadias e doentes no campo II.
Variedades CB47-355, IAC64-257, IAC70-22..... 63
3. Representação dos I.C.(%) determinados nas
parcelas sadias e doentes no campo II.
Variedades NA56-79, SP70-1078, SP70-1143..... 64
4. Representação dos I.C.(%) determinados nas
parcelas sadias e doentes do campo II.
Variedades SP70-1284, SP71-1406, SP71-6163..... 65
5. Representação dos I.C.(%) determinados nas
parcelas sadias e doentes do campo II.
Variedades RB76-5418 e RB78-5148..... 66

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº

PÁGINA

1.	Resumo das condições experimentais apresentadas nos ensaios R1, R2 e R3 no método de coloração do xilema (CL).....	45
2.	Comparação dos métodos de coloração do xilema (CL), autofluorescência do metaxilema (FL) e observação de bactérias (CT) no ensaio R1 do campo I.....	52
3.	Comparação dos métodos de coloração do xilema (CL), autofluorescência do metaxilema (FL) e observação de bactéria (CT) no ensaio R1 do campo II.....	54
4.	Comparação do método de coloração do xilema (CL) e observação de bactérias (CT) avaliados no ensaio R2 do campo I.....	58
5.	Comparação do método de coloração do xilema (CL) e observação de bactérias (CT) avaliados no ensaio R2 do campo II.....	59
6.	Índice de Contaminação (%) de RS no campo I nos três ensaios (R1, R2 e R3).....	67
7.	Índice de Contaminação (%) de RS no campo II nos três ensaios (R1, R2 e R3).....	68
8.	Índice de Contaminação (%) da variedade NA56-79 antes e após a cura pela termoterapia.....	71
9.	Resistência varietal ao raquitismo da soqueira (RS) através dos métodos de coloração (CL), autofluorescência do metaxilema (FL) e observação da bactéria (CT) no campo I.....	73
10.	Resistência varietal ao raquitismo da soqueira (RS) através dos métodos de coloração (CL), autofluorescência do metaxilema (FL) e observação da bactéria (CT) no campo II.....	74

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA DIAGNOSE DO RAQUITISMO DA
SOQUEIRA DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) E
APLICAÇÃO NA SELEÇÃO DE VARIEDADES RESISTENTES.

Autora: Marilene Tenguan Iamauti

Orientador: Prof. Dr. Hasime Tokeshi

RESUMO

O raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar (RS) é uma das doenças mais importantes desta cultura, ocorrendo, se não em todas, na maioria das áreas de produção comercial do mundo.

A falta de sintomas característicos tem dificultado uma avaliação rápida da intensidade do RS em campos comerciais e durante o melhoramento genético das variedades.

Muitos métodos de diagnóstico são citados na literatura, porém não foram devidamente estudados quanto a sua eficiência e praticidade. Sendo assim, este trabalho se propôs a elucidar alguns pontos a fim de determinar um método que possua características desejáveis como praticidade na execução, economia de tempo, baixo custo e precisão. Concomitante a esta comparação de métodos, avaliou-se a resistência ao RS de algumas variedades comerciais de cana-de-açúcar para verificar a validade dos métodos na seleção de variedades resistentes.

Três métodos foram avaliados: coloração do xilema através do fluxo transpiratório (CL), observação da bactéria do RS em suco extraído do xilema (CT) e autofluorescência do metaxilema (FL).

Verificou-se que os métodos (CL e CT) são equivalentes no diagnóstico do RS quando aplicados em plantas cujo processo de transporte de seiva bruta já sofreu interferência da bactéria. Nas condições testadas esta interferência ocorreu em torno de dez meses após a brotação.

O método CT mostrou maior sensibilidade por detectar o patógeno em colmos na fase inicial do processo patológico.

A simplicidade de execução e o baixo custo do método CL permitem a sua utilização para avaliação de campos comerciais, viveiros de mudas e seleção de variedades resistentes nos programas de melhoramento genético.

COMPARISON OF METHODS FOR DIAGNOSIS OF RATOON STUNTING
DISEASE OF SUGARCANE (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) AND
APPLICATION ON SCREENING OF RESISTANT VARIETIES.

Author: Marilene Tengan Iamauti

Adviser: Prof. Dr. Hasime Tokeshi

SUMMARY

The ratoon stunting disease of sugarcane (RSD) is one of the most important diseases of this crop, occurring, if not in all, in most of the commercial production areas of the world.

The lack of characteristic symptoms has made more difficult a quick evaluation of the intensity of RSD in commercial fields and during the breeding of the varieties.

Many diagnostic methods are mentioned in the literature. However, they were not properly studied regarding their efficiency and practicability. Therefore, this work was proposed to illustrate some points, in order to determine a method that has desirable characteristics such as, practicability in execution, economy of time, low cost and accuracy. Simultaneously with this comparison of methods, the resistance to RSD was evaluated in some commercial varieties of sugarcane in order to verify the validity of the screening method of resistant varieties.

Three methods were evaluated: staining of the xylem by means of the transpiratory flow (CL), observation of the RSD bacterium in juice extracted from the xylem (CT) and alkaline-induced metaxylem autofluorescence (FL).

It was verified that the methods (CL and CT) are equivalent in diagnosis of RSD when applied in plants where

the bacterium had already interfered in the transport of xylem sap. Under the conditions tested, this interference occurred in approximately ten months after sprouting.

The CT method showed greater sensitivity for detecting the disease in stalks in the initial phase of the pathological process.

The simplicity of execution and the low cost of the CL method permit its utilization for evaluation of commercial fields and nurseries and screening of resistant varieties in the breeding programs.

1. INTRODUÇÃO

O raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar (RS) é uma das doenças mais importantes desta cultura, ocorrendo, se não em todas, na maioria das áreas de produção comercial do mundo.

O primeiro relato da doença ocorreu em 1944-45, em Queensland (Austrália), na variedade Q28, sendo que subsequentemente foi identificada como o principal fator de declínio da produção de muitas variedades (GILLASPIE Jr. & TEAKLE, 1989). A ausência de sintomas externos específicos é a principal característica da doença, o que colaborou para a sua disseminação às áreas produtoras de cana-de-açúcar do mundo todo.

A manifestação da doença ocorre de modo mais evidente em soqueiras de variedades de cana-de-açúcar mais suscetíveis, pela produção de colmos finos e internódios curtos, redução do número de perfilhos e maior suscetibilidade ao estresse hídrico devido aos efeitos da doença no sistema de transporte de água da planta. Estes sintomas são, na maioria das vezes, confundidos com aqueles causados por tratos culturais inadequados e ou insuficiência de água e nutrientes, sendo, portanto, não específicos da doença.

Os danos decorrentes do RS foram discutidos por HUGHES (1974), que considerou os danos diretos e indiretos da doença, além de seus efeitos nos programas de melhoramento. Os danos indiretos são impossíveis de se

quantificar com exatidão, porém o autor considerou germinação pobre e raquítica da planta, necessidade de maior número de cultivos na cana-planta e socas, aumento dos custos de colheita em razão da maior presença de plantas daninhas e diminuição da vida útil do canavial como sendo danos indiretos devido ao RS. Os danos diretos da doença seriam os custos com tratamento térmico de mudas para cura da doença, perdas na produção de cana-de-açúcar e morte de soqueiras. Nos programas de melhoramento, cuidados para que não ocorra infecção do material a ser propagado devem ser tomados, necessitando-se então esterilizar os implementos durante os tratos culturais e principalmente na colheita.

No Brasil, SANGUINO (1987) considerou que 90% dos canaviais estão infectados com RS, em diferentes intensidades, e verificou em experimentos que colmos tratados termicamente produziram de 20 a 60% a mais em peso de cana que os colmos doentes.

A dificuldade de se associar um microrganismo com o caldo infectivo de plantas doentes, assim como as tentativas frustradas de isolar e cultivar o microrganismo, levou os pesquisadores a acreditar que o agente causal do RS era um vírus (STEINDL, 1961; GILLASPIE Jr. *et alii*, 1966; GILLASPIE Jr., 1970). Em 1973 os primeiros relatos da presença de uma pequena bactéria corineforme associada a plantas de cana-de-açúcar com sintomas de RS foram publicados (GILLASPIE Jr. *et alii*, 1973; TEAKLE *et alii*, 1973; Maramorosch *et alii*, 1973¹ citados por GILLASPIE Jr. & TEAKLE, 1989), intensificando os vários estudos da

1 MARAMOROSCH, K.; PLASIVIC-BANJAC, B.; LIU, L.J. Electron microscopy of ratoon stunted sugarcane: microorganisms in xylem. *Phytopathol. Z.*, 77: 270-3, 1973.

localização e morfologia desta bactéria associada a plantas com RS "in situ" e em extratos de vasos do internó (BAILEY, 1976; Chen *et alii*, 1975²; Damann & Derick, 1976³, citados por GILLASPIE Jr. & TEAKLE, 1989; KAO & DAMANN, 1980; RICAUD *et alii*, 1974; TEAKLE, 1974; WEAVER *et alii*, 1977; WORLEY & GILLASPIE Jr., 1975). Somente em 1980, NAVIAGER *et alii* reportaram o sucesso do isolamento e do cultivo da bactéria associada ao RS, que posteriormente também foi relatado por DAVIS *et alii* (1980) e LIAO & CHEN, 1981. No Brasil, o isolamento da bactéria foi descrito por CARDOSO (1986).

A ausência de sintomas característicos tem obstaculizado uma avaliação rápida da intensidade do RS em canaviais comerciais e durante o melhoramento genético das variedades, pois a falta de métodos para diagnosticar o RS de forma rápida e passível de ser utilizada para avaliação de grande número de clones tem dificultado a exploração da resistência genética da cana-de-açúcar à doença.

Um método para determinar o efeito do RS é comparar a produção de parcelas sadias e doentes, mas isso é impraticável num programa de melhoramento devido ao elevado número de clones, o que resultaria num alto custo e grande consumo de tempo.

Apesar de a literatura citar diversos métodos de diagnóstico para o RS, poucos foram avaliados quanto à sua eficiência e praticidade, assim como a sua validade na seleção de variedades resistentes em programas de melhoramento de cana-de-açúcar. Ademais, muitos desses

2 CHEN, C.T.; LEE, S.M.; CHEN, M.J. Small coryneform bacteria in ratoon stunted sugarcane. Sugarcane Pathol. Newsl., 13/14: 6-8, 1975.

3 DAMANN Jr., K.E. & DERRICK, K.S. Bacterium associated with ratoon stunting disease in Louisiana. Sugarcane Pathol. Newsl., 15/16: 20-7, 1976.

métodos necessitam de equipamentos sofisticados e técnicos especializados, tornando-os incompatíveis com a realidade da pesquisa nacional, carente de recursos.

Assim sendo, o presente trabalho se propôs a determinar a eficiência dos métodos de diagnóstico disponíveis, quais sejam, coloração do xilema pelo fluxo transpiratório (CHAGAS,1986), contagem de bactérias (BAILEY & FOX,1985 e SANGUINO *et alii*,1984) e autofluorescência do metaxilema (DAMANN Jr.,1988). A escolha do melhor método é fundamentada na praticidade de sua execução, uso de equipamento de baixo custo e sensibilidade suficiente para detectar a doença. Concomitante a esta comparação de métodos, avaliou-se a resistência ao RS de alguns clones comerciais de cana-de-açúcar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Agente causal

Atualmente considera-se que o agente causal do raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar é uma bactéria corineforme, habitante do xilema, taxonomicamente designada *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (Davis *et alii*, 1984⁴ citados por HARRISON & DAVIS, 1986).

Suas células são usualmente retas ou bastonetes levemente curvadas, algumas vezes infladas no final, medindo aproximadamente 0,15-0,35 X 1-4 micrometros, e quando observadas em microscópio eletrônico é possível definir células divididas por um septo e presença de mesossomas (TEAKLE, 1983).

Podem ocorrer cadeias de células bacterianas, e estas estão localizadas nos feixes vasculares do xilema da cana-de-açúcar embebidos em uma matriz amorfa, que, observados em microscópio eletrônico, apresentam-se como microcolônias (KAO & DAMANN, 1978). Características fisiológicas da bactéria, assim como da colônia isolada em meio de cultura SC (soybean corn), foram descritas por DAVIS *et alii* (1980).

4 DAVIS, M.J.; GILLASPIE Jr., A.G.; VIDAVER, A.K.; HARRIS, R.W. *Clavibacter*: A new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov, pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermuda grass stunting disease. Int. J. Syst. Bacteriol. 34:107-17, 1984.

Logo após a descoberta da doença na variedade Q28 e da descrição da presença de sintomas internos nos colmos maduros, determinou-se o caráter infectivo da doença (STEINDL, 1961), provando que esta poderia ser transmitida pelo suco de plantas doentes e, também, que o principal agente transmissor era o próprio homem com suas ferramentas de trabalho, como facões utilizados na colheita. Um facão utilizado no corte de soqueiras doentes poderia contaminar até 60 novas plantas. Como nenhum microrganismo pôde ser associado com a alta infectividade do caldo de plantas doentes por transmissão mecânica e por outros agentes infecciosos, mesmo depois de altamente diluído, STEINDL (1961) sugeriu que o agente causal do RS fosse um vírus e alguns autores trabalharam no sentido de caracterizá-lo (GILLASPIE Jr. *et alii*, 1966; MATSUOKA, 1972).

TEAKLE (1974) discute os principais agentes cogitados como causadores do RS, entre eles vírus, micoplasma, viróide e bactérias, considerando que as evidências demonstravam ser uma bactéria o agente causal.

Outros autores tentaram identificar e classificar a bactéria do RS como *Xanthomonas vascularum* (LIU *et alii*, 1974) e TOKESHI *et alii* (1974) evidenciaram ser o agente causal da escaldadura (*Xanthomonas albilineans*) o mesmo do RS.

Em 1973 uma pequena bactéria corineforme foi encontrada associada com o RS (GILLASPIE Jr. *et alii*; TEAKLE *et alii*, 1973; Maramorosch *et alii*, 1973 estes citados por GILLASPIE Jr. & TEAKLE, 1989), sendo observada somente em extrações do conteúdo do xilema de plantas doentes, primeiramente em microscópio eletrônico; posteriormente, verificou-se ser possível observar tal bactéria em microscópio de contraste de fase e ou de campo escuro.

Detalhes a respeito de isolamento, cultivo, testes de patogenicidade e comparação da bactéria associada ao RS com a bactéria isolada em cultura foram descritos por DAVIS *et alii* (1980). LIAO & CHEN (1981) também reportaram o isolamento, cultivo da bactéria e a inoculação em sorgo "sudan grass", conseguindo o reisolamento mas não o desenvolvimento dos sintomas. NAYIAGER *et alii* (1980) foram os primeiros a isolar a bactéria, mas não conseguiram evidências da sua patogenicidade.

TEAKLE (1983) e GILLASPIE Jr. & TEAKLE (1989) compilaram as principais informações a respeito do agente causal do RS.

2.2. Métodos de diagnose do RS

A diagnose do RS é dificultada pela falta de sintomas específicos externos ou internos em plantas infectadas de cana-de-açúcar. A inexistência de um método rápido para avaliar o RS tem limitado a seleção de variedades resistentes durante o programa de melhoramento, além de não permitir o levantamento de incidência da doença em campos comerciais e o monitoramento da qualidade do tratamento térmico para viveiros.

Os métodos visando à diagnose do RS podem ser divididos segundo TEAKLE (1983) em diagnose presuntiva e diagnose confirmatória. O autor considera que a diagnose presuntiva é aquela baseada em sintomas externos, porém para o RS não é possível, devido à habilidade de outros agentes de causar sintomas semelhantes. A diagnose confirmatória é aquela baseada na observação da bactéria extraída do xilema.

Para DAVIS e DEAN (1984) o RS nem sempre pode ser diagnosticado em campo e, portanto, técnicas de laboratório

têm sido desenvolvidas para determinar a presença ou a ausência da bactéria em extratos do suco do xilema utilizando microscópios óticos e eletrônicos, combinados com técnicas serológicas ou não.

Observa-se um aumento no número de trabalhos procurando técnicas de diagnose passíveis de ser utilizadas na prática e baseadas em diferentes reações como: sintomas, testes biológicos e bioquímicos, observação da bactéria, reações serológicas e a interferência da bactéria no sistema de transporte de água da planta.

2.2.1. Baseados em sintomas

Após a descoberta do RS na variedade Q28 em 1944-45 em Queensland, Steindl(1950)⁵ citado por GILLASPIE Jr. & TEAKLE (1989) associou o RS com sintomas internos em colmos maduros, possíveis de ser observados quando os colmos eram cortados longitudinalmente. Os sintomas internos se caracterizavam pela presença de pontos ou vírgulas de coloração avermelhada que contrastavam com a cor pálida dos tecidos dos nós. Ocorria variação da coloração destas vírgulas (com 1 a 3 mm de comprimento) que nada mais são que os feixes vasculares do xilema cheios de uma substância gomosa de coloração variável.

Tal descrição foi importante para que a doença passasse a ser diagnosticada em diferentes países do mundo (e que posteriormente foi confirmada pela observação da

5 STEINDL, D.R.L. Ratoon stunting disease. In: CONGRESS OF INTERN. SOC. SUG. CANE TECH., Proceedings, 7., 1950, p.457-65.

bactéria). No Brasil a constatação do RS coube a VEIGA (1956). RICAUD *et alii* (1989) publicaram uma lista de todas as áreas do mundo onde o RS já foi reportado, indicando que a bactéria se encontra disseminada em todas as áreas produtoras de cana-de-açúcar do mundo.

Verificou-se posteriormente que este sintoma interno em colmos maduros não é específico da doença, constatando-se que outros danos mecânicos, ataque de pragas e patógenos podem provocar sintomas semelhantes, como podridão causada por *Fusarium* sp., *Xanthomonas albilineans*, podridão de *Colletotrichum* e Estria clorótica (RICAUD, 1974); além de alguns clones nunca desenvolverem estes sintomas. Apesar disso alguns autores consideram que para estas outras doenças a descoloração pode ser encontrada em nós jovens de colmos, enquanto os sintomas devidos ao RS são usualmente encontrados em nós maduros da base dos colmos (Hughes & Steindl, 1955⁶ citados por RICAUD, 1974). A confirmação de que este sintoma interno dos colmos não é específico do RS foi feita após a constatação de Hughes *et alii* (1964⁷ e 1967⁸) citados por RICAUD (1974), que verificaram a presença do sintoma nas variedades H48-3166, NCo 310 e Q68 livres de qualquer agente patogênico.

Sintomas de RS em colmos imaturos ou brotos com 1 a 2 meses ocorrem em alguns clones e sob certas condições,

6 HUGHES, C.G. & STEINDL, D.R.L. Tech. Comm. Bur. Sug. Expt. Stat. Qd., N° 2, 1955, 54p.

7 HUGHES, C.G.; STEINDL, D.R.L.; STURGESS, O.W.; EGAN, B.T. Disease investigations: ratoon stunting disease. Ann. Rep. Sug. Expt. Stat. Qd., 64:76-8, 1964.

8 HUGHES, C.G.; STEINDL, D.R.L.; EGAN, B.T. Disease investigations: ratoon stunting disease. Ann. Rep. Bur. Sugar Expt. Stat. Qd., 67:58-9, 1967.

como foi descrito por Irvine(1976⁹) citado por GILLASPIE Jr. & TEAKLE (1989). A descoloração ocorre numa zona difusa próxima ao meristema apical até a zona de alongação dos internós, sendo possível observá-la quando os brotos são cortados longitudinalmente.

Avaliando sintomas juvenis na variedade CP44-101, GILLASPIE *et alii*(1966) verificaram que, em material inoculado, plantas com 4 a 7 semanas de idade (no estágio de 4-5 folhas), quando cortadas longitudinalmente na região do palmito, apresentavam uma descoloração salmão, possível de ser observada somente logo após o corte, pois exposto ao ar escurecia rapidamente. Irvine(1976), citado por GILLASPIE Jr. & TEAKLE (1989), determinou que em 14 clones testados apenas na CP44-101 o sintoma juvenil era produzido uniformemente e que era influenciado por vários fatores como a fertilidade do solo e o tempo após a inoculação (a frequência e a intensidade dos sintomas diminuíram após 7 meses da inoculação).

Como os sintomas em colmos maduros não são específicos, sendo que alguns clones raramente mostram descoloração, enquanto outros a possuem na ausência do RS, e os sintomas juvenis também não são confiáveis, o diagnóstico de plantas baseado em sintomas não é aconselhável quando se trata de identificar o RS.

2.2.2. Testes biológicos

Na tentativa de estabelecer sintomas inequívocos para caracterizar o RS, vários autores procuraram determinar plantas indicadoras.

9 IRVINE, J.E. Factors affecting the expression of juvenile symptoms of the ratoon stunting disease. Proc. Am. Soc. Sugar Cane Tech., 5(new series): 109-13, 1976.

O uso de plantas indicadoras para a realização de testes biológicos é um método bastante utilizado na fitovirologia e a suspeita de que o agente causal do RS pudesse ser um vírus fez com que as pesquisas caminhassem por algum tempo nesta direção.

Hughes & Steindl(1956¹⁰), citados por RICAUD(1974), falharam ao inocular tomate, zinnia, *Nicotiana glutinosa* e berinjela com suco de canas doentes. Na inoculação de gramíneas (milho, sorgo, "sweet sudangrass" e mais 10 outras gramíneas) a infecção foi obtida, porém sem expressão de sintomas, o que foi provado por reinoculação na variedade Q28.

A própria cana-de-açúcar foi utilizada como indicadora para o RS, inoculando-se suco de plantas suspeitas em variedades suscetíveis como Q28 (Hughes & Steindl,1955 citados por RICAUD,1974); CP44-101 (GILLASPIE Jr. *et alii*,1956); CP36-105 (Schexnayder,1960¹¹, citado por RICAUD,1974); e Co421 (SINGH, 1969).

Os sintomas em tecidos imaturos eram observados 6 semanas após a inoculação e ocorria a descoloração dos vasos do xilema na região do nó em colmos maduros após 2-6 meses. Além disso, na utilização da cana-de-açúcar como indicadora, não se podia inocular uma baixa concentração do suposto vírus, pois, apesar do sucesso da infecção, as plantas não apresentavam sintomas (STEINDL, 1961).

A utilização do capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) como planta indicadora, testado por MATSUOKA

10 HUGHES,C.G. & STEINDL,D.R.L. Some further developments in the study of ratoon stunting disease in Queensland. Proc. ISSCT, 9:1012-22, 1956.

11 SCHEXNAYDER,C.A. The use of the sugarcane "test plant" as a means of detecting the presence of ratoon stunting disease in sugarcane. Proc. ISSCT, 10: 1068-71, 1960.

(1972), mostrava sintomas de descoloração vascular na região basal do broto em 20-30 dias após a inoculação, o que era extremamente vantajoso sob o ponto de vista de economia de tempo com relação a outras plantas indicadoras testadas anteriormente. As variedades que produziram melhor os sintomas no Brasil (MATSUOKA, 1972) foram Napier e Merker. Como na Austrália estes clones não eram comuns, STEINDL & TEAKLE (1974) descrevem que 30 clones foram obtidos e testados como indicadoras, e o mais satisfatório foi um clone local conhecido como "bana-grass" e que se suspeitava ser um híbrido entre *Pennisetum purpureum* e *P. typhoides*.

O capim elefante possuía características muito desejáveis como planta indicadora e representava economia de tempo por reproduzir os sintomas mais rapidamente que outras indicadoras testadas. Entretanto SUDO (1980) detectou a não especificidade do sintoma, que podia ser causado por outros microrganismos patogênicos ou não à cana-de-açúcar. O capim elefante, cultivar Merker, reagiu positivamente através do aparecimento de descoloração vascular quando inoculado com *Erwinia herbicola*, *E. carotovora*, *Pseudomonas rubrisubalbicans*, *P. mori*, *Xanthomonas albilineans*, *Fusarium moniliforme*, *Candida cruzei*, *Hansenula anomala* e *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que os sintomas internos observados eram idênticos aos induzidos pelo caldo bruto extraído do colmo de cana-de-açúcar com RS. O mesmo efeito de inespecificidade foi observado por BETTI *et alii* (1980), que inocularam suspensões de culturas puras de diversas bactérias de diferentes hospedeiros.

Verificou-se, então, que o capim elefante reagia inespecificamente, por descoloração vascular, quando inoculado por diferentes microrganismos, não sendo

recomendável sua utilização como planta indicadora para diagnóstico do RS.

O único ensaio baseado em sintomas externos foi reportado por Benda(1971¹²), citado por GILLASPIE Jr. & TEAKLE (1989), que utilizou "sudan grass" híbrido NB 2805 e verificou, 9 semanas após a inoculação, a produção de uma murcha característica dos brotos. A avaliação dos sintomas é feita de modo não destrutivo, diferente dos outros testes propostos, e que foi considerado pelo autor como vantagem do método.

2.2.3. Testes químicos

Diagnóstico do RS através de testes químicos tem sido avaliado. Testes que permitem avaliar a presença de vírus nos tecidos das plantas foram realizados com a finalidade de encontrar uma combinação química cuja reação indicasse mudança de cor e, conseqüentemente, presença do RS na cana-de-açúcar. FARRAR (1957) detectou RS através de cortes longitudinais da região periférica dos nós basais, tratando-os com uma combinação de peróxido de hidrogênio e ácido clorídrico, verificando após 20-30 segundos que canas sadias desenvolviam coloração azul-esverdeada no tecido parenquimatoso ao redor dos feixes fibrovasculares, enquanto em canas doentes não ocorria reação.

Uso de 2,3,5-trifenil tetrazolium chloride para detectar a presença de vírus em plantas (BEAL *et alii*, 1955) e para localizar o sítio de atividade de redução da cana-de-açúcar (DUFRENOY & PRATT, 1948) tem sido relatado. ANTOINE (1958) verificou que, em secções do tecido maduro do nó

12 BENDA, G.T.A. Wilting and death in the ratoon stunting disease of sudangrass hybrid uprights. Proc. Am. Soc. Sugar Cane Tech., 1(new series):39-47, 1971.

incubadas a 35°C no escuro em uma solução de 0,5% de 2,3,5-trifenil tetrazolium chloride, uma mudança de coloração foi encontrada (vermelha). Esta mudança era mais rápida em tecidos infectados com o vírus do RS do que em tecidos sadios. O autor considerou ainda que uma limitação do método era a sua aplicabilidade somente em colmos maduros e que muitas variedades ainda necessitam ser testadas.

Porém nenhum destes métodos se mostrou confiável, tampouco se tornou de uso generalizado.

2.2.4. Testes microscópicos

Dos métodos desenvolvidos para a diagnose do RS, os testes que utilizam microscopia têm-se mostrado rápidos e suficientemente sensíveis para detectar plantas doentes.

Comparando-se os métodos quanto à questão do tempo necessário à diagnose, tem-se que avaliações baseadas nos sintomas de colmos maduros requerem de 2-6 meses (Schexnayder, 1960 citado por GILLASPIE Jr. *et alii*, 1976), sintomas juvenis de 4 a 6 semanas (GILLASPIE Jr. *et alii*, 1966); plantas indicadoras demandam de 2 ou mais semanas (MATSUOKA, 1972); diagnóstico através de observação da bactéria em microscópio eletrônico é realizado em uma hora, tempo necessário ao preparo do material e observação (TEAKLE *et alii*, 1973); e a técnica utilizando microscópio de contraste de fase para observar bactérias presentes no extrato do xilema, descrito por GILLASPIE Jr. *et alii* (1973), necessita apenas de alguns minutos.

O uso de microscopia de contraste de fase também se mostrou específico para o RS, sendo muito citado na literatura internacional, onde se encontram diversas variações da técnica, principalmente quanto à metodologia

de extração do caldo de plantas. Já a utilização do microscópio eletrônico ficou limitada apenas a pesquisas, pois, devido ao custo do equipamento, não era viável como método rotineiro de diagnose.

2.2.4.1 Utilização de microscópio eletrônico

Desde que não foi possível, com o auxílio do microscópio ótico comum, observar quaisquer microrganismos associados ao RS, assim como o fracasso em isolar o agente causal desta doença, alguns pesquisadores se utilizaram do microscópio eletrônico no intuito de elucidar o problema.

Vários autores haviam concluído que um vírus deveria estar envolvido com o RS, mas PLASIVIC-BANJAC & MARAMOROSCH (1972) observaram, com o auxílio de microscópio eletrônico, corpos pleomórficos que definiram ser "bactérias muito pequenas ou corpos de organismo tipo micoplasma".

TEAKLE *et alii* (1973), após tentativas frustradas de isolamento ou detecção de vírus ou outro agente causal em caldo de colmos de cana-de-açúcar infectados por RS, decidiram utilizar a seiva fibrovascular por conhecer que esta era altamente infectiva e continha menor quantidade de restos celulares. A metodologia para o preparo do material foi detalhadamente descrita pelos autores, que determinaram a associação constante de uma bactéria com plantas doentes, que apresentavam sintomas internos em colmos maduros, confirmando que o uso de microscópio eletrônico permite uma diagnose rápida e simples.

Comparando a identificação de plantas com RS por sintomas internos, inoculação na variedade Q28 e uso de

capim elefante como planta indicadora, STEINDL & TEAKLE (1974) discutiram que o uso de microscópio eletrônico é um método de diagnóstico relativamente rápido (em torno de uma hora) mas requer equipamentos caros (bomba de vácuo, centrífuga e microscópio eletrônico) e técnicos altamente habilitados.

A utilização do microscópio eletrônico teve importante participação na associação de uma bactéria muito semelhante ao do RS da cana-de-açúcar em capim sudão ("sudan grass" híbrido NB 280 S) descrito por WORLEY & GILLASPIE Jr. (1975), na observação de microcolônias de bactérias na matriz do xilema de plantas de cana-de-açúcar com RS (KAO & DAMANN Jr., 1978) e nos estudos de localização e morfologia da bactéria do RS (KAO & DAMANN Jr., 1980), possuindo um papel mais importante na pesquisa do que como método de diagnóstico.

2.2.4.2. Utilização de microscópio de contraste de fase

A constatação da possibilidade de utilização do microscópio de contraste de fase para o diagnóstico do RS feita por GILLASPIE Jr. *et alii* (1973), uma vez que com este equipamento foi possível observar o spiroplasma, agente causal do "corn stunt disease" (realizado por DAVIS, 1973), conduziu rapidamente a um método específico, rápido e menos dispendioso que o uso do microscópio eletrônico.

O método consiste em extrair o caldo dos colmos ou suco dos vasos do xilema, colocar algumas gotas sobre uma lâmina, cobrir com lamínula e observar em microscópio de contraste de fase com aumento de 1000-1200 vezes. Porém é preciso atentar para alguns detalhes, como idade do colmo amostrado e condições de crescimento das plantas. A maior

variação nos trabalhos está na metodologia de extração do suco do xilema ou caldo dos colmos e na sua purificação.

GILLASPIE Jr. *et alii* (1973) extraíram caldo moendo os colmos de canas com 6 meses de idade das variedades CP44-101, CP65-357, L62-96 e L65-69. Retiraram também exsudatos de raiz da variedade CP44-101 com 6 meses ou mais, verificando que dessa maneira se obtinha uma amostra com menos sujeira, sendo mais fácil identificar a bactéria. Verificaram a aplicabilidade do método e concluíram que a parte basal (principalmente os nós) dos colmos continha mais bactérias, que as amostras poderiam ser conservadas em baixas temperaturas até 2 semanas e que a observação não necessitava ser feita imediatamente após a extração. O número de bactérias não foi igual nas diferentes variedades e entre as plantas da mesma variedade, sendo que canas apresentando sintomas conspícuos do RS continham mais bactérias do que aqueles com sintomas indistintos.

Extração do suco vascular do internó de colmos de cana mediante bomba de vácuo, centrifugação a 3000 rpm por uma hora, suspensão do pellet em água destilada estéril e observação em aumento de 1250 vezes foi a metodologia empregada por STEINDL (1976), que modificou a extração utilizada por GILLASPIE Jr. *et alii* (1973). A presença de movimento browniano devido ao reduzido tamanho da bactéria do RS foi notada por todos os autores.

Teakle *et alii* (1975¹³) citados por BAILEY (1976) e RICAUD *et alii* (1975), propuseram outra alteração no método de extração da bactéria do RS, onde os colmos eram lavados, desinfectados superficialmente, descascados e finas secções dos nós e internós eram retiradas assepticamente e deixadas em 25 ml de água destilada estéril por duas horas. Após

13 TEAKLE, D.S.; SMITH, P.M.; HAYWARD, A.C.; STEINDL, D.R.L.
Diagnosis of RSD by electron microscopy of sugarcane
tissue diffusates. Proc. QSSCT, 42: 115-6, 1975.

este período, a água contendo as bactérias era filtrada e centrifugada a 14000 g por 30 minutos a 5°C para manter a assepsia, os pellets ressuspensos em água estéril e observados em microscópio de contraste de fase com aumento de 1000 vezes. Com esta técnica foi possível eliminar bactérias saprófitas e outros habitantes do sistema vascular dos colmos de cana-de-açúcar concomitante à obtenção de uma adequada concentração da bactéria associada ao RS. BAILEY (1976) confirmou a associação da bactéria ao RS em 22 variedades, sua distribuição sistêmica e a diferença de concentração dentro da planta quando observou material retirado de diferentes partes da planta da variedade N53/216. Notou-se que a região dos nós basais do colmo possui o maior número de bactérias e encontrou dificuldades em observar a bactéria em tecidos jovens e imaturos. Concluiu que o método é bastante útil para o diagnóstico do RS particularmente em variedades de sintomas distintos. A única limitação da técnica, segundo o autor é a não possibilidade de diagnose utilizando tecidos jovens.

Correlação entre número de bactérias encontradas e injúria devido ao RS em cana-de-açúcar foi avaliada por GILLASPIE Jr. *et alii* (1976). Verificaram que em clones suscetíveis, onde ocorria injúria devido ao RS, o número de bactérias encontradas era maior que em clones resistentes. Os autores observaram duas gotas de caldo extraído dos colmos por moagem num aumento de 1000 vezes e contaram o número de bactérias em 10 campos do microscópio de contraste de fase. Acreditaram que o método pode ser útil para a seleção de variedades resistentes ao RS, porém o número de bactérias aumenta durante a estação de crescimento da cana, não sendo aconselháveis avaliações durante o início do crescimento, por incorrer em erro, como foi o caso da CP36-105, avaliada como resistente em junho/setembro e suscetível em outubro/novembro. Tal fato

deve ser considerado para propósitos de seleção de variedades.

Comparação entre o uso de suco extraído dos vasos do xilema (GILLASPIE *et alii*, 1973) e a técnica utilizada por BAILEY (1976) não mostrou diferenças (BAILEY, 1977), sendo adotada rotineiramente para diagnose do RS, com a vantagem de obter amostras relativamente livres de restos de tecido. BAILEY (1977) observou, da mesma forma que GILLASPIE Jr. *et alii* (1976), um aumento no número de bactérias, verificando que ocorria diferença do número de bactérias dentro da mesma variedade observada aos 2, 8 e 11 meses de idade, assim como ocorreu variação de colmo para colmo na mesma variedade com idade igual.

KOIKE *et alii* (1982) estabeleceram relação entre produção e contagem de bactérias, na tentativa de encontrar um método rápido e aplicável em larga escala para avaliar resistência de clones ao RS. Para estes autores, testes de campo avaliando produção são confiáveis para determinar os efeitos do RS sobre um pequeno número de clones, porém condições ambientais que afetam o crescimento e a produção podem variar com o ano e são limitantes para o método.

Como alternativa, avaliaram a possível correlação entre produção e contagem de bactérias em microscópio de contraste de fase durante 3 anos, verificando que a correlação existia para os cultivares resistentes (que não sofreram perdas de produção e apresentaram pequeno número de bactérias) e cultivares suscetíveis (perda de produção e grande número de bactérias). Para os cultivares intermediários os resultados não se mostraram consistentes, e os dados de produção sugerem que dentro do grupo dos intermediários existem cultivares resistentes e suscetíveis. A contagem se mostrou eficiente para identificar os cultivares extremamente resistentes e ou suscetíveis, e apesar desta limitação os autores

consideraram-na útil para seleção de variedades resistentes ao RS. Um detalhe interessante observado na metodologia de extração e contagem de bactérias é que amostras congeladas para observação posterior e amostras frescas apresentaram resultados semelhantes.

BAILEY & FOX (1985) publicaram o mais interessante artigo a respeito do uso de microscópio de contraste de fase para observação do agente causal do RS em um serviço de diagnóstico para agricultores na África do Sul desde 1977. Definiram vários parâmetros, como o tamanho de amostra a ser avaliada, influência do armazenamento sobre o número de bactérias, processamento da amostra, escala de doenças e número de pessoas envolvidas no serviço, que são essenciais para a aplicabilidade do método em larga escala. O método tem sido utilizado para inspeção de canaviais comerciais e viveiros.

Quanto aos parâmetros definidos pelos autores, o tamanho de amostra indicada foi a coleta proposital de colmos finos (supostamente devido a infecção por RS), sendo 20 colmos por campo ou aumento progressivo em campos maiores. Devido à possibilidade de certas áreas possuírem baixas incidências de doença, e como o objetivo é detectar a doença para atestar qualidade de mudas e campos comerciais, os autores consideraram que não havia problema nesta amostragem viciada. O suco do xilema era extraído de um internó basal de cada um dos 20 colmos através de um compressor de ar utilizando pressão positiva. Posteriormente o mesmo era observado num aumento de 1000 vezes em microscópio de contraste de fase.

O armazenamento dos colmos após a colheita é um fator limitante à extração, constatando-se que o número de colmos detectados com RS declinava após 4 dias de estocagem em temperatura ambiente, sendo que no nono dia não era

possível detectar nenhuma bactéria. Sob refrigeração (5°C) este declínio foi menos acentuado.

Períodos prolongados de seca no campo dificultaram a extração do suco do xilema dos colmos; isto, conjugado com o atraso no processamento da amostra, pode comprometer o resultado. Portanto, os agricultores são orientados para que não ocorra um período maior que 24 horas entre a coleta no campo, o processamento e a diagnose.

As amostras são classificadas de acordo com o número de colmos (dentre os 20 amostrados) que apresentaram a bactéria do RS, sendo: SADIO, nenhum colmo com RS; LEVE, de 1 a 2 colmos; MODERADO, de 3 a 6 colmos; SEVERO, de 7 a 12 colmos; e MUITO SEVERO, de 13 a 20 colmos com RS.

Na rotina de trabalho, um técnico corta os colmos e prepara as lâminas com o suco extraído do xilema, enquanto 2 técnicos treinados as examinam. Desta maneira é possível observar 40 amostras; como 20 lâminas representam uma amostra, observam-se 800 lâminas por dia.

No Brasil, trabalho semelhante vem sendo desenvolvido (SANGUINO *et alii*, 1984) com algumas variações: tamanho da amostra de 50 colmos/ha, extração do terceiro nó, armazenamento não superior a 12 horas, extração por pressão negativa (30 polegadas de Hg por 15 segundos), utilizando bomba de vácuo, e observação da bactéria em aumento de 1000 vezes. A classificação da amostra era feita segundo o número de bactérias do RS encontradas, porém recentemente MORAES (1990 in comunicação pessoal¹⁴) informou a utilização de uma classificação

14 MORAES, V.A. (Centro de Tecnologia COPERSUCAR, Piracicaba/SP). Comunicação Pessoal, 1990.

semelhante à citada por BAILEY & FOX(1985) baseada no número de colmos doentes detectados.

Um método para detectar *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* em folhas de cana-de-açúcar foi desenvolvido por GILLASPIE Jr.(1987). O objetivo do autor era oferecer um método de detecção que não destruísse a planta amostrada para ser utilizado principalmente em indexação de material de quarentena e sanidade de viveiros. Observou ser plenamente viável, descrevendo a metodologia utilizada e comparando os resultados com aqueles obtidos na extração de bactérias dos internós retiradas por centrifugação (1000 g por minuto). Embora o número de bactérias extraídas da folha fosse menor que as do colmo, o método é confiável e alcançou os objetivos propostos.

2.2.4.3.Utilização de microscópio de fluorescência

Diagnóstico de RS utilizando microscópio de fluorescência é mais comumente citado na literatura associado a reações serológicas (DAVIS & DEAN,1984), porém DAMANN Jr. (1983) e DAMANN Jr. *et alii* (1984) têm relatado o uso de microscópio de fluorescência para detectar autofluorescência do metaxilema de plantas infectadas com *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, agente causal do RS.

DAMANN Jr. (1988) descreve detalhadamente a metodologia utilizada e os resultados obtidos com esta técnica que procura avaliar a resposta do hospedeiro (através da presença ou não da fluorescência do xilema) quando este apresenta ou não a bactéria nos vasos. O autor associou a presença da bactéria do RS em colmos utilizando os entrenós basais descascados e limpos, centrifugados por 3 minutos a 1,000 g para retirar o conteúdo dos vasos do

xilema e observou-os em microscópio de contraste de fase. Utilizando estes mesmos colmos, preparou cortes transversais (com o auxílio de bisturi), colocou-os sobre uma lâmina e tratou inicialmente com várias substâncias. Concluiu que a melhor reação obtida foi tratando os cortes de colmos com uma solução alcalina (0,1 M Tris), os quais, observados em microscópio de epifluorescência Leitz Ortholux (12 V, lâmpada de Hg 100 W), e utilizando filtro bloqueador N2 (recomendado para fluorescência com rodamina), apresentavam uma fluorescência das paredes do metaxilema de coloração vermelha quando o colmo estava infectado pela bactéria do RS e nenhuma fluorescência se a amostra se originava de colmos sadios.

Testes adicionais comprovaram a associação da autofluorescência do metaxilema com a presença da bactéria extraída de plantas doentes e que esta reação era constante para diferentes variedades. Entretanto, para algumas variedades, houve autofluorescência do metaxilema em amostras em que não foi detectada a presença da bactéria do RS. O autor interpretou que este resultado pode indicar a maior sensibilidade do método para detectar plantas com RS ou a presença de outros fatores que também possam causar fluorescência, sendo esta hipótese viável, pois não se avaliou adequadamente a habilidade ou não de outros patógenos da cana-de-açúcar de induzir a reação. Foi observado somente, em condições de ensaio, que a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) causou uma intensa reação de fluorescência de coloração vermelha, mas possível de distinguir da apresentada pelo RS, porque a fluorescência não ficou confinada às paredes do metaxilema.

A fluorescência, segundo DAMANN Jr. (1988), é uma reação do tecido do hospedeiro quando infectado pela bactéria do RS *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, e não do talo bacteriano. Isto foi constatado observando-se que colônias

da bactéria isolada em meio de cultura SC (soybean corn) desenvolvido por DAVIS *et alii* (1980) não apresentavam fluorescência quando tratadas com solução 0,1 M de Tris.

Os resultados obtidos indicam, segundo DAMANN Jr. (1988), que o teste de autofluorescência do metaxilema permite uma avaliação precisa da presença ou ausência do RS em colmos de cana-de-açúcar.

2.2.5. Testes baseados em reações serológicas

As tentativas para produção de um antissoro para auxiliar na diagnose de plantas infectadas pelo RS iniciaram-se antes mesmo do sucesso do isolamento e cultivo do agente causal.

Técnicas serológicas já eram amplamente utilizadas para indexação de vírus em material propagativo de várias culturas quando GILLASPIE Jr. (1977) relatou o desenvolvimento de um antissoro contra a bactéria associada ao RS, e apesar dos relatos de GILLASPIE Jr. *et alii* (1973) do uso de microscópio de contraste de fase para diagnosticar a doença, este possuía limitação quanto ao número de amostras possíveis de ser examinadas. O autor relata a preparação do antissoro contra a bactéria do RS a partir do caldo concentrado de plantas de cana-de-açúcar doentes, o uso deste antissoro para estudar possível relação serológica entre a bactéria associada ao RS e outros organismos e tentativas do uso do método para propósitos de diagnóstico. Concluiu que o teste de microaglutinação não pode ser aplicado para diagnose do RS utilizando caldo cru de plantas devido ao baixo número de células por mililitro, não ocorrendo reação serológica visível.

HARRIS & GILLASPIE Jr. (1978) produziram antissoro, mas ainda a partir de caldo de plantas com RS (sorgo híbrido NB 280S) parcialmente concentrado e purificado, e testaram sua aplicação na diagnose do RS empregando a técnica de fluorescência indireta do anticorpo (IFA). Comparado com a contagem de bactérias em microscópio de contraste de fase, o teste serológico (IFA) foi 100 vezes mais sensível, podendo ser utilizado rotineiramente em amostras de caldo cru de plantas, mesmo contendo baixas concentrações da bactéria. E foi através do uso desta técnica que BAUDIN & CHATENET (1983) detectaram a presença da bactéria do RS extraída dos vasos do xilema, em plantas de cana-de-açúcar provenientes de Haute-Volta (Alto Volta, hoje denominado Burkina Fasso), na África Ocidental.

O desenvolvimento e uso de E.L.I.S.A. (Enzyme-Lynked Immunosorbent Assay) foi reportado inicialmente para detecção de vírus em plantas, sendo testado por GILLASPIE Jr. & HARRIS (1979) para detecção da bactéria associada ao RS. Observaram-se, entretanto, limitações no uso desta técnica para diagnose, pois não ocorria correlação entre a absorbância e o número de bactérias presentes, sendo o método impróprio para uso na seleção de variedades resistentes ao RS por sua não especificidade. Somente após isolamento e cultivo da bactéria do RS e preparo do antissoro a partir de colônias isoladas é que se conseguiu otimizar os parâmetros envolvidos no teste de E.L.I.S.A., dentre eles a concentração do anticorpo e do conjugado, diluição do antígeno, procedimentos de lavagem, temperatura de incubação para amostra e conjugado, pH e tempo, descritos por PILLAY & OELLERMANN (1988), que detectaram bactérias provenientes de cultivo em meio de cultura na concentração de 1×10^4 células/ml, demonstrando que o método é sensível, permitindo uma avaliação qualitativa e quantitativa.

Pela comparação entre observação da bactéria do RS em microscópio de contraste de fase, isolamento em meio de cultura e reação serológica (Fluorescent Antibody Stains on Membranes- FASM), para determinação da incidência de RS em campos comerciais da Flórida, demonstrou-se que 79% das amostras de 20 campos comerciais estavam infectadas pelo RS, e foi detectado pelo menos por um destes 3 métodos. Porém, o FASM detectou 20% a mais que os outros métodos, e, possuindo as características necessárias a todas as técnicas de diagnóstico (sensibilidade, especificidade e confiabilidade), foi considerado por DAVIS & DEAN (1984) o melhor método.

Os trabalhos mais recentes de técnicas de diagnóstico para o RS são na sua maioria baseados em reações serológicas, utilizando as mais diversas técnicas (DAVIS,1985b; OELLERMANN *et alii*, 1987; OELLERMANN & PILLAY,1987; HARRISON & DAVIS, 1988; DAVIS *et alii*,1988).

Porém o uso de técnicas serológicas requer material e técnicos especializados para sua utilização, implicando um custo elevado dos métodos, o que torna proibitiva a sua utilização principalmente para os países do Terceiro Mundo.

2.2.6. Testes baseados no transporte de seiva bruta

TEAKLE *et alii* (1975) testaram a hipótese de que a resistência ao movimento de água estava relacionada com o deslocamento da bactéria do RS. Baseados em relatos anteriores de patossistemas, onde a anatomia vascular da planta interferia na movimentação dos conídios no interior desta (ELGERSMA,1970; McNABB *et alii*,1970) ou influenciava

diretamente na resistência do hospedeiro ao patógeno (CHO *et alii*, 1973), realizaram estudos para comprovar se o mesmo ocorria para o RS da cana-de-açúcar.

Na metodologia utilizada para verificar a resistência à passagem de água, os autores coletaram colmos maduros de cana-de-açúcar de 11 clones com diferentes reações de imunidade, tolerância e suscetibilidade relatadas na literatura; cortando os colmos em nós isolados (com respectivas partes do entrenó), mediram o fluxo de água que os atravessava quando se aplicava vácuo de 27 mm de Hg. De maneira similar, porém utilizando dois nós, mediu-se a habilidade da tinta da índia (suspensão coloidal de partículas de carbono) de atravessar os vasos, avaliando-se o número de feixes vasculares escurecidos pela passagem desta. Resultados dos dois testes demonstraram ocorrer a correlação entre resistência ao movimento da água através dos feixes vasculares e resistência à bactéria, sugerindo que estudos sobre a anatomia vascular poderiam elucidar os mecanismos envolvidos. Um resultado interessante obtido pelos autores foi que não há correlação entre o diâmetro dos colmos e o fluxo de água. A utilização deste teste para detecção de variedades resistentes ao RS seria interessante, uma vez que, como foi relatado por CHO *et alii* (1973), a resistência baseada em caracteres morfológicos (como anatomia vascular) é muito valiosa, por ser extremamente estável.

Nos estudos sobre as bases anatômicas envolvidas na resistência ao RS em cana-de-açúcar TEAKLE *et alii* (1978) utilizaram metodologia similar à citada por TEAKLE *et alii* (1975) para verificar os efeitos do diâmetro dos colmos e de outras doenças (podridão vermelha causada por *Physalospora tucumanensis*) na taxa de fluxo de água para diferentes clones. Realizaram investigações sobre a anatomia dos feixes vasculares e dos feixes do xilema em microscópio ótico

comum e utilizaram o microscópio eletrônico na implementação desses estudos. Verificaram que os clones resistentes (que possuíam fluxo de água lento) apresentavam maior ramificação nos vasos do metaxilema na região nodal se comparadas aos clones suscetíveis. Para os autores, era plenamente compreensível que tal fenômeno ocorresse, pois os vasos ramificados têm diâmetro e poros pequenos, o que determinava uma vazão pequena de água. Não ocorreu diferença entre o número de feixes e a quantidade de ramificação destes feixes.

Observaram ainda que o menor poro existente nas células do metaxilema é maior que a bactéria do RS, de maneira que apenas diferenças anatômicas não são suficientes para explicar a imunidade frequentemente apresentada pela variedade H60-6909 (um dos clones testados), sendo possível que reações fisiológicas da cana-de-açúcar, como a produção de gomas e tiloses, estejam envolvidas na resistência ao RS.

VALARINI (1978) trabalhou na hipótese levantada por TEAKLE *et alii* (1975), adaptando o equipamento descrito e determinando vários fatores que afetavam a precisão do método como: pressão de vácuo, posição do nó nos colmos e localização, período de armazenamento, doenças vasculares ou ataque pela broca da cana-de-açúcar (*Diatrea saccharalis*), idade do colmo e distribuição da doença dentro da touceira (VALARINI & TOKESHI, 1981). O diâmetro do colmo não interferiu na vazão, pois, segundo TANIMOTO (1964), o diâmetro é uma característica varietal, que depende de inúmeros fatores culturais e ambientais, e o número de feixes vasculares é constante para cada clone. Os dados obtidos por VALARINI (1978) demonstraram que em variedades tolerantes a queda de vazão de água entre colmos sadios e doentes era pequena, sendo que o oposto ocorria para os cultivares suscetíveis. A vazão de água em colmos é

diretamente proporcional ao número de vasos funcionais do xilema, ou seja, o método avalia a interferência da bactéria do RS no transporte de seiva bruta da planta e variedades tolerantes ao RS têm menor perda na sua capacidade de transporte de água, enquanto nas suscetíveis a perda é grande, sendo maior a diferença no fluxo entre colmos sadios e doentes para estas variedades. Os resultados obtidos com o método do fluxômetro indicam ser possível avaliar cultivares quanto a suscetibilidade ao RS, sendo um método eficiente, seguro e exequível em programas de melhoramento.

DAVIS & HARRISON (1985) propuseram uma modificação no método de VALARINI & TOKESHI (1981). Utilizaram pressão hidrostática para avaliar o fluxo de água que atravessava uma secção do nó de colmo de cana-de-açúcar, em vez da bomba de vácuo. Compararam os resultados com perdas na produção utilizando a metodologia de "single-stool" proposta por DEAN (1983), sendo que não houve correlação entre a condutividade e a suscetibilidade à doença, mas ocorreu diferença entre plantas sadias e doentes (na mesma variedade), ou seja, redução na condutividade devido ao RS. Estes resultados estão em concordância com os relatados por VALARINI & TOKESHI (1981). DAVIS & HARRISON (1985) concluíram que este método, melhor que a medição da vazão de água, pode ser útil na avaliação de resistência dos clones ao RS. Porém, não se encontraram outros relatos a respeito do desenvolvimento do método de condutividade hidráulica que comprovassem a maior praticidade sugerida pelos autores.

Em continuação ao trabalho de VALARINI (1978), DOUGLAS (1981) correlacionou a vazão de água e resistência ao RS. Acrescentou mais dois fatores que influenciam no método: armazenamento do colmo por 24 horas e umidade do solo. Observou correlação entre a resistência

obtida pelo método da vazão e a relatada através do método de pesagem em canas de segundo corte (medidas de produção). A principal diferença com relação à avaliação de resistência através da vazão de água utilizada por TEAKLE *et alii* (1975) e TEAKLE *et alii* (1978) foi a comparação realizada entre cultivares, enquanto a adaptação do método feita por VALARINI (1978) e confirmada por DOUGLAS (1981) comparou as diferenças dentro dos cultivares. DAVIS (1985a) verificou que, na comparação da diferença na condução de água em plantas infectadas e não infectadas com RS entre variedades, a correlação com a resistência a essa doença não é verdadeira. Somente comparação dentro da mesma variedade foi diretamente correlacionada com resistência à doença, porém diferenças significativas somente foram encontradas em 2 ou 3 variedades intolerantes.

CRUZ (1983) prosseguiu com os estudos de avaliação de resistência ao RS através da vazão de água, verificando que a ocorrência de escaldadura das folhas (*Xanthomonas albilineans*) ocasionava um aumento na vazão de água, provavelmente devido à desintegração das paredes celulares do xilema e tecido parenquimatoso adjacente, possuindo um mecanismo de patogenicidade diferente da bactéria do RS. Correlacionou a vazão de água com o número de vasos funcionais, introduzindo uma modificação na metodologia utilizada por VALARINI (1978) e DOUGLAS (1981): em vez de utilizar somente água para medir a vazão, CRUZ (1983) empregou água mais corante. Isto permitiu ao autor realizar duas avaliações concomitantes, medição do fluxo e contagem dos vasos funcionais, porque o corante coloria os vasos pelos quais a água passava, sendo possível contá-los.

Prosseguindo na mesma linha de pesquisa, baseada na avaliação da interferência da bactéria no transporte de seiva bruta da planta, CHAGAS (1986), a partir dos resultados obtidos por VALARINI (1978), DOUGLAS (1981) e

CRUZ(1983), desenvolveu o método de coloração do xilema. A principal alteração com relação aos outros autores foi a eliminação da bomba de vácuo, que succionava a água através dos colmos, e a utilização da própria planta como "bomba de sucção".

A coloração dos vasos do xilema era realizada coletando-se a planta (colmo e folhas) e colocando-a dentro de uma solução corante (safranina o), na qual permanecia por 60 minutos, realizando fotossíntese. Desse modo, através do fluxo transpiratório da planta, a solução corante era succionada e seus vasos funcionais eram coloridos. Na avaliação desta metodologia, verificou-se que os melhores resultados eram obtidos com as seguintes condições: altura de recorte no quarto nó (para anular o efeito da cavitação), colheita do colmo e aplicação do método às 8 horas da manhã, tempo entre o recorte e a colocação do colmo no balde contendo a solução corante (tempo de cavitação) inferior a 5 segundos (para evitar a entrada de ar), tempo de permanência mínima na solução corante de 60 minutos, utilização de colmos sem ataque de broca (*Diatrea saccharalis*) e umidade do solo no momento da colheita em torno da capacidade de campo.

Após os 60 minutos os colmos são retirados da solução e a avaliação é realizada observando-se a quantidade de vasos funcionais coloridos, comparando com uma escala desenvolvida por CHAGAS (1986). Toda a metodologia encontra-se detalhadamente descrita por CHAGAS (1986), CHAGAS & TOKESHI (1988).

A modificação proposta e avaliada por CHAGAS(1986), eliminando o uso da bomba de vácuo, transformou a metodologia de avaliação de RS pela vazão de água num método mais eficiente, econômico e prático, sem perder a precisão necessária para quantificar a infecção de RS em viveiros e canaviais comerciais. Por ser um método

realizado em campo e num tempo relativamente curto (60 minutos), sua utilização no controle de qualidade de viveiros e campos comerciais, na seleção de variedades em programas de melhoramento e na avaliação da eficiência do tratamento térmico é altamente promissora.

2.3. Controle

O controle do RS é dificultado pela facilidade de transmissão mecânica (via ferimento) que ocorre durante as operações de plantio e colheita. Alia-se a este fato a dificuldade de diagnose da doença, impossibilitando medidas de controle como "roquing" em viveiros, bastante eficiente para várias doenças da cana-de-açúcar.

As principais medidas de controle para o RS são: plantio de material sadio, prevenção da disseminação da doença e uso de variedades resistentes (STEINDL,1961; TEAKLE,1983).

Para a obtenção de material sadio, a principal medida de controle utilizada é a termoterapia do material que servirá de muda; a prevenção da disseminação da doença nas operações de colheita inclui principalmente a desinfecção de ferramentas.

2.3.1. Tratamento térmico

O tratamento térmico ou a termoterapia no material de plantio é utilizado para eliminar a bactéria do RS presente e obter mudas sadias. Como o único meio de disseminação da doença é através de ferimentos, ou seja, a transmissão só ocorre quando o suco infectado de uma planta doente entra em contato com o tecido sadio de outra, o uso

de mudas sadias é um método de controle bastante eficiente para diminuir a doença. Se cuidados posteriores na colheita forem tomados, o canavial permanece sadio durante boa parte do seu ciclo.

Tem-se utilizado tratamento via água quente, ar quente e vapor (Benda & Ricaud, 1978¹⁵ citados por GILLASPIE Jr. & TEAKLE, 1989), e dois problemas estão associados ao uso do tratamento térmico: redução da germinação e falta de um controle completo.

O problema da redução da germinação tem sido contornado através do uso de fungicidas durante ou após o tratamento térmico, pelo cuidado no manuseio da cana tratada e resfriamento das gemas logo após o tratamento, cujo sucesso depende de fatores biológicos e também de um adequado monitoramento do sistema de tratamento térmico utilizado, verificando-se fatores como circulação de água e controle de temperatura.

A falta de um controle completo implica a realização de vários ciclos de tratamento térmico, a fim de eliminar parte das bactérias que escaparam do tratamento anterior, bem como as reinfestações que possam ocorrer (TOKESHI, 1980; CHAGAS & MATSUOKA, 1988).

Tratamento, temperatura e duração de termoterapia mais comumente citados e utilizados são: água quente (50°C) por duas horas, ar quente (58°C) por 8 horas e vapor a 53°C por 4 horas. Vantagens e desvantagens, características e cuidados necessários a cada um destes métodos têm sido revistos por diversos autores (ABBOTT, 1958; STEINDL, 1961; TEAKLE, 1983; DHILLON *et alii*, 1983; WARAITCH, 1984; LOUISIANA COOPERATIVE EXTENSION SERVICE, 1986; GILLASPIE Jr. & TEAKLE, 1989).

15 BENDA, G.T.A. & RICAUD, C. The use of heat treatment for sugarcane disease control. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Techn., 16: 483-96, 1978.

Avaliação e comparação dos diferentes métodos de tratamento térmico foram efetuadas, sendo que DAMANN & BENDA (1983) avaliaram os métodos de água quente (50°C por 2 horas) e ar quente (53°C por 4 horas) utilizados para o controle de RS, comprovando que ambos os métodos são similares e eficientes, porém ocorre sempre decréscimo do RS, mas não eliminação completa.

No Brasil, o tratamento térmico mais utilizado é através de água quente 50,5°C aplicada por duas horas em mudas de cana-de-açúcar com 3 gemas (MATSUOKA, 1984). Uma variação neste sistema foi proposto por SILVA (1976 a e b), onde a termoterapia era realizada em gemas isoladas. GHELLER (1986) avaliou a eficiência desses dois sistemas concluindo que são iguais, sendo que em nenhum deles a cura é absoluta.

Recentemente outra variação no binômio tempo e temperatura para o controle do RS tem sido proposta, utilizando gemas isoladas e tratamento de 52°C por 30 minutos (COOPERATIVA CENTRAL DOS PRODUTORES DE AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO- COPERSUCAR, 1989).

2.3.2. Desinfecção de ferramentas

Todas as ferramentas utilizadas, principalmente na colheita, como podões, facas e lâminas de colhedeiros mecânicos, que podem servir para infectar plantas, devem ser descontaminadas.

Deve-se preferencialmente utilizar os implementos primeiro em talhões saudáveis e depois naqueles suspeitos de possuir o RS.

A desinfecção pode ser feita através de calor ou do uso de produtos químicos. Água fervente e flambagem são os métodos mais comuns da descontaminação por calor.

Produtos químicos como solução de Lysol 5-15 % (uma solução de ácido cresylic), Deltol 1% (mistura que inclui óleo de pinho e para-clorometaxilenol), etanol 50% ou compostos de quaternária de amônia a 1%, pulverizados nas superfícies ou mergulhando-se as ferramentas, desde que os produtos permaneçam em contato por pelo menos 5 minutos nas superfícies, são suficientes para uma completa desinfecção (STEINDL,1961; TEAKLE,1983; GILLASPIE Jr. & TEAKLE,1989).

Uma desinfecção mais grosseira pode ser realizada esfregando-se os facões na terra (ABBOTT,1958; TEAKLE,1983).

2.3.3. Variedades resistentes

Ausência de variedades resistentes tem sido citada na literatura (ABBOTT,1958), bem como o emprego destas para o controle do RS (STEINDL,1961; Wismer,1971¹⁶; Wismer & Urata¹⁷, 1967, citados por CHAGAS & MATSUOKA,1988). COELHO & RAMOS (1980), baseados nos dados de vários autores de que o tratamento térmico não é total, sugerem que a resistência varietal seria o método ideal de controle para o RS.

Para GILLASPIE Jr. & TEAKLE (1989) o uso de variedades resistentes como medida de controle para o RS tem sido considerado de importância secundária. Este método de controle tem recebido menos importância que o merecido, devido à ausência de métodos para sua detecção, tradicionalmente observada através de ensaios de produção,

16 WISMER,C.A. A sugarcane clone apparently immune to RSD. Sugarcane Pathologists Newsletter, 6: 46, 1971.

17 WISMER,C.A. & URATA,R. Ratoon stunting disease (RSD). Hawaiian Sugar Planters Association. Annual Report 1967, Honolulu, 1967. 37p.

e apesar das alterações propostas do uso de microparcelas (MATSUOKA,1980) ou de "single-stool" (DEAN,1983) ainda há necessidade de métodos mais rápidos e possíveis de ser utilizados na seleção de variedades resistentes.

Vários métodos de diagnose, como os citados anteriormente em outros itens desta revisão, têm como objetivo final detecção de fontes de resistência e seleção destas durante programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

2.3.4. Antibióticos

GILLASPIE Jr. & TEAKLE (1989) citam vários autores que têm testado a sensibilidade "in vivo" da *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, agente causal do RS, a antibióticos. Há relatos da sensibilidade da bactéria a compostos como chloramphenicol, demaclocycline, erythromycin, oleandomycin, rifampicin e vancomycin.

Os estudos de sensibilidade da bactéria "in vitro" a diferentes antibióticos e de métodos de aplicação destes compostos podem levar ao desenvolvimento de um novo método de controle para o RS da cana-de-açúcar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local e variedades

Os experimentos foram conduzidos em duas áreas distintas. O campo I foi instalado em uma área do campo experimental do Departamento de Fitopatologia da ESALQ-USP, em Piracicaba/SP, onde 3 variedades foram plantadas:

Padrão resistente: CB47-355

Padrão suscetível: NA56-79

Variedade de resistência desconhecida: SP70-1078

No campo II instalado na Estação Experimental da Associação dos Plantadores de Cana-de-Açúcar de Piracicaba, localizada no referido município, as variedades plantadas foram:

Padrão suscetível: NA56-79

Padrões resistente: CB47-355

Variedades de resistência desconhecida: IAC64-257

IAC70-22

SP70-1078

SP70-1143

SP70-1284

SP71-1406

SP71-6163

RB76-5418

RB78-5148

A escolha dos padrões foi baseada nos resultados apresentados nos trabalhos de VALARINI (1978), DOUGLAS (1981), CRUZ (1983) e CHAGAS (1986), e a das variedades de

resistência desconhecida coube ao corpo técnico do Departamento Agrônômico da Associação dos Plantadores de Cana-de-Açúcar de Piracicaba, e que representavam o interesse comercial dos fornecedores da região, uma vez que um dos objetivos do trabalho era determinar a resistência varietal das variedades comerciais.

O espaçamento utilizado no campo I foi 1,30 metro entre linhas e no campo II 1,10 metro. Todos os tratamentos culturais, como controle de plantas daninhas, adubação e irrigação, foram realizados nas épocas recomendadas, a fim de propiciar um bom desenvolvimento das plantas.

3.2. Delineamento experimental

Com a finalidade de avaliar os métodos de diagnóstico do RS instalou-se uma área no campo experimental do Departamento de Fitopatologia (campo I) em 15/09/88 e na Estação Experimental da Associação dos Plantadores de Cana-de-Açúcar de Piracicaba (campo II) em 13/09/88.

No campo I, cada variedade possuía duas linhas de 10 metros de comprimento com colmos sadios e outras três de igual tamanho com colmos doentes. A unidade experimental era representada por cada touceira de cana-de-açúcar existente na linha, sendo coletados, em cada ensaio, colmos de touceiras diferentes de cada um dos tratamentos (sadio e doente) .

O campo II apresentava a mesma distribuição de parcelas doentes ao lado das sadias, sendo apenas que as linhas eram de 20 metros de comprimento. Os padrões resistente e suscetível, além de mais duas variedades (SP70-1078 e SP71-1406) possuíam duas linhas sadias e duas doentes e, nas demais variedades, uma linha de cada

tratamento. A área útil do campo II era maior devido ao número mais elevado de variedades.

Em nenhum dos dois campos houve necessidade de utilizar um delineamento em blocos ao acaso, pois a incidência da doença no campo e os métodos que foram testados para avaliá-la independem de fatores que podem ser controlados por esse tipo de delineamento.

O croqui dos campos I e II encontra-se nos apêndices 1 e 2, respectivamente.

3.3. Obtenção do inóculo e inoculação

As mudas que deram origem às parcelas doentes eram provenientes de canaviais comerciais de segundo corte que não foram tratados termicamente a 50,5°C por duas horas e ainda inoculadas.

O inóculo foi obtido de canavial comercial (2º corte) da variedade SP70-1078, que apresentava plantas subdesenvolvidas e sintomas de vírgulas nos nós, possíveis de ser observados quando se cortava os colmos longitudinalmente. Extraiu-se então o caldo destes colmos, que foi diluído na proporção de 1:5 com água destilada. Isso não interferiu na concentração do patógeno no caldo ou na sua infectividade, pois segundo MATSUOKA (1972) este pode ser diluído na proporção de até 1:625.000.

A primeira inoculação foi realizada em 4/11/88 no campo I e em 01/12/88 no campo II. O inóculo foi injetado no palmito de cada uma das plantas (1 ml de caldo) com o auxílio de uma seringa. A literatura cita vários métodos de inoculação do RS, sendo que RAM *et alii* (1983) verificaram ser o corte com faca mergulhada em caldo contaminado um dos

melhores métodos, coincidindo com a forma de contaminação que ocorre em canaviais comerciais.

Porém, baseado no trabalho de MATSUOKA (1972), que verificou ser o corte do cartucho com tesoura mergulhada no inóculo o mais eficiente método de inoculação e o que apresentava maior regularidade de plantas doentes, optou-se por este método para a obtenção de plantas doentes. Entretanto, o corte do cartucho atrasa o crescimento das plantas, que necessitam recuperar-se e emitir novas folhas. Como a operação de corte visa apenas à colocação do inóculo em contato com os tecidos do meristema apical da planta, preferiu-se o método de injeção, por interferir menos no desenvolvimento e, como na cana-planta ocorria uma média de 4 plantas/metro linear, considerou-se viável a utilização deste método de inoculação.

Uma segunda inoculação foi realizada após o corte da cana-planta em 13/12/89 no campo I e em 21/12/89 no campo II. Por ocasião do corte das parcelas sadias, o facão foi desinfectado após o corte de cada touceira com uma solução de 0,1% de Hyamina 1622 (composto de quaternário de amônia) em água. Nas parcelas doentes nenhum cuidado foi tomado com o propósito de efetuar uma reinoculação natural. Nesta segunda inoculação utilizou-se como inóculo caldo de colmos doentes de NA56-79, sabidamente infectada com RS. A inoculação foi realizada através do corte do cartucho de plantas com tesoura de poda que era mergulhada a cada corte no caldo de cana contaminado diluído na proporção de 1:5 em água. A mudança do método de inoculação deveu-se ao grande número de perfilhos existentes, impossibilitando a injeção do inóculo no palmito de cada uma das plantas, como realizado na primeira inoculação. Alterou-se também a variedade da qual o inóculo foi retirado, pois, após a primeira colheita dos campos, suspeitou-se da baixa infectividade do inóculo da SP70-1078.

3.4. Tratamento térmico

Para obtenção de plantas sadias utilizou-se o tratamento térmico antes do plantio dos toletes.

Para implantação do campo I, foram cortados os colmos com uma gema, ficando então com 5 cm de tamanho. Estes toletes de uma gema foram tratadas termicamente com água quente a 50,5°C por duas horas a fim de curá-las do RS. Após o resfriamento dos toletes e antes do plantio, realizou-se um tratamento com produtos à base de benomyl (Benlate 500) na dose de 65 g do princípio ativo/ 100 litros de água, mergulhando os toletes nesta solução por 1 minuto à temperatura ambiente, visando ao controle de doenças, principalmente podridão abacaxi (*Ceratocystis paradoxa*).

No campo II o tratamento térmico foi realizado na própria Estação Experimental da Associação dos Plantadores de Cana-de-Açúcar, que possui uma unidade de tratamento térmico. Toletes contendo 3 gemas foram colocados em sacos apropriados e imersos em água quente (50,5°C) por duas horas.

3.5. Métodos de diagnóstico testados

Três métodos de diagnóstico de RS foram avaliados: coloração do xilema através do fluxo transpiratório (CL), observação de bactérias (avaliação da presença de bactérias do RS em suco extraído dos vasos do xilema e observado em microscópio de contraste de fase) (CT) e autofluorescência do metaxilema (FL).

Segundo o levantamento bibliográfico realizado, verificou-se serem estes três métodos os mais promissores

para a seleção de variedades resistentes ao RS. Não se consideraram os testes de diagnose baseados em reações serológicas por apresentarem um alto custo, exigindo material e técnicos especializados, e o objetivo do presente trabalho era avaliar métodos que se mostrassem sensíveis, de baixo custo e exeqüíveis, possíveis de ser utilizados para seleção de variedades e diagnose do RS em campos comerciais.

Portanto, segundo as informações obtidas, o método da coloração do xilema (CHAGAS,1986) apresentava tais características, sendo também a sua avaliação bastante rápida. O método de observação de bactérias foi escolhido para ser testado e principalmente para confirmar os resultados obtidos pela coloração, uma vez que este oferece um diagnóstico presuntivo, baseado na reação do hospedeiro à doença, enquanto a contagem observa diretamente o patógeno, agente causal do RS e é um dos métodos mais consagrados na literatura internacional, sendo utilizado em avaliações rotineiras na África do Sul (BAILEY & FOX,1985) e no Brasil (SANGUINO *et alii*,1984). Além disso, é bastante específico, tendo-se correlacionado os resultados obtidos com a contagem de bactérias, ensaios de produção (KOIKE *et alii*,1982) e avaliações de resistência e suscetibilidade das variedades (GILLASPIE Jr. *et alii*,1976).

O método de autofluorescência do metaxilema (DAMANN Jr.,1988) apresentava indicações de ser bastante eficiente e prático, apesar de exigir equipamentos caros (microscópios de epifluorescência, filtros). Os resultados obtidos indicavam que a reação observada era a do

hospedeiro à doença, sendo o mesmo princípio válido para a coloração, parecendo ser interessante compará-los, apesar de não estar comprovada a sua especificidade para o RS.

3.5.1. Método da coloração do xilema

A metodologia para utilização do método da coloração do xilema pelo fluxo transpiratório para determinação do RS foi descrita detalhadamente por CHAGAS (1986), CHAGAS & TOKESHI (1988).

Com base nestes trabalhos, os colmos eram colhidos de manhã, tendo o campo sido irrigado no dia anterior. A coleta era iniciada sempre às 8 horas da manhã, os colmos coletados tinham sua parte basal cortada com o auxílio de uma guilhotina no terceiro nó, e colocados dentro de uma solução corante de safranina O, diluída em água na proporção de 1:10, antes de 5 segundos para evitar a entrada de ar nos vasos. Permaneciam dentro desta solução por uma hora, e sendo avaliados segundo o padrão fotográfico apresentado por CHAGAS (1986).

Com o objetivo de comparar a coloração com autofluorescência do metaxilema, realizou-se um primeiro ensaio no estádio de cana-planta, designado ensaio R1, onde se avaliou uma média de 60 colmos (entre sadios e doentes) por variedade nos campos I (Fitopatologia) e II (Cooperativa).

O método da coloração do xilema requer que se retirem os três nós basais do colmo para eliminar o efeito da cavitação nos vasos. Isso permitiu que, com o mesmo colmo, se testassem a coloração e a autofluorescência, o que foi efetuado utilizando-se a parte basal dos colmos. No mesmo ensaio, utilizou-se a contagem de bactérias em microscópio de contraste de fase para confirmar alguns

resultados considerados duvidosos (onde não ocorria concordância entre o diagnóstico realizado pelos três métodos testados).

O número de colmos avaliados foi sempre limitado pelos testes efetuados em laboratórios (autofluorescência e contagem), que não permitiam um armazenamento prolongado do material, necessitando que a avaliação fosse feita o mais breve possível.

Num segundo ensaio, no estádio de cana-soca, designado R2, a coloração foi comparada à contagem de bactérias, avaliando-se uma média de 100 colmos (50 sadios e 50 doentes) no campo I e 80 colmos (40 sadios e 40 doentes) no campo II para cada uma das variedades. No campo I sempre se avaliaram todas as variedades, enquanto no campo II, devido à diferença de crescimento característico das diversas variedades, todas as 11 variedades somente foram avaliadas no ensaio R1. No ensaio R2 apenas 7 variedades apresentavam tamanho de colmo dentro das exigências do método da coloração.

A colheita do ensaio R1 (cana-planta) realizou-se 5 meses após a inoculação no campo I e 9 meses no campo II, e no ensaio R2 (cana-soca) 3 meses nos campos I e II. Num terceiro ensaio, R3, avaliou-se apenas através da coloração se ocorreu um aumento da doença em função do maior período em que a bactéria permaneceu nos colmos, pois a única diferença entre os ensaios era que R2 foi colhido 3 meses após a inoculação e R3 9 meses, para os campos I e II.

Na tabela 1 é apresentada uma síntese das condições dos ensaios R1, R2 e R3, como a idade dos colmos por ocasião da colheita dos ensaios (meses após a inoculação) e número de colmos avaliados.

TABELA 1: Resumo das condições experimentais
apresentadas nos ensaios R1, R2 e R3,
nos campos I e II.

ENSAIO	Campo	Inoculação*		Idade após Inoculação (meses)	Nº de Colmos Avaliados	
		Época	Método		Sadia	Doente
R1	I	4/11/88	injeção	5	30	30
	II	1/12/88	injeção	9	30	30
R2	I	13/12/89	corte- folhas	3	50	50
	II	21/12/89	corte- folhas	3	40	40
R3	I	13/12/89	corte- folhas	9	50	50
	II	21/12/89	corte- folhas	9	50	50

* R1= Inóculo da variedade SP70-1078

R2= Inóculo da variedade NA56-79

3.5.2. Observação da bactéria do RS em microscópio de contraste de fase

Dentre os vários métodos de extração citados na revisão bibliográfica, dois foram utilizados para retirar o suco do xilema dos entrenós basais dos colmos avaliados: centrifugação e pressão negativa (bomba de vácuo).

Extração através de centrifugação foi efetuada no ensaio R1, que avaliou um menor número de amostras. Empregou-se a metodologia utilizada por DAMANN Jr. (1988) para comparar a autofluorescência com a contagem. Os internós basais dos colmos (descartados na avaliação da coloração) foram descascados (com o auxílio de um vazador de rolhas), pesados e centrifugados a 1,000 g por 5 minutos. O suco dos vasos do xilema foi extraído no dia da colheita ou no máximo no dia seguinte, ficando os colmos neste caso estocados a 5°C, segundo a recomendação de BAILEY & FOX (1985). Após a extração, acondicionou-se o suco em tubos de cultura com tampa que permaneceram em "freezer" numa temperatura de -10 a -2°C até a data da avaliação.

Por ocasião da observação da bactéria do RS em microscópio de contraste de fase, o suco foi descongelado em temperatura ambiente e uma gota colocada em uma lâmina, coberta por lamínula e observado num aumento de 1000 vezes. Avaliou-se apenas a presença ou ausência das bactérias do RS, observando-se de 10 a 15 campos, para cada um dos colmos (ou amostras).

Na segunda extração (ensaio R2) utilizou-se pressão negativa e o equipamento foi descrito e empregado por VALARINI (1978) para medição do fluxo de colmos, sendo que SANGUINO *et alii* (1984) vêm utilizando esta metodologia

para extração do suco do xilema em avaliações rotineiras de RS em microscópio de contraste de fase.

Este método se mostrou mais rápido que a centrifugação e foi utilizado no ensaio R2, onde um grande número de amostras necessitava ser processado.

Utilizaram-se da mesma maneira os internós basais dos colmos (que eram descartados na avaliação da coloração). Um internó era cortado com o auxílio de uma guilhotina e o corte avivado com uma faca afiada como navalha. A seguir, encaixava-se o internó na luva de borracha e esta no funil e kitassato. A saída do kitassato estava ligada através de uma árvore ao reservatório de vácuo, o qual era responsável por uma pressão negativa constante de 70 mm de Hg por 5 a 10 segundos fornecida pela bomba de vácuo. Coletava-se o suco do xilema em tubos de cultura colocados na saída do funil de alumínio e dentro dos kitassatos. O armazenamento da amostra foi efetuado da mesma maneira que no ensaio R1, assim como a avaliação em microscópio de contraste de fase.

No ensaio R1 a observação da bactéria do RS foi utilizada apenas para um diagnóstico confirmatório, e os dados obtidos foram comparados com os da autofluorescência. No ensaio R2 comparou-se a coloração do xilema e a observação em microscópio de contraste de fase a fim de verificar a validade do diagnóstico presuntivo apresentado pela coloração.

Verificou-se a presença ou ausência da bactéria no suco do xilema extraído de cada um dos colmos, e para efeito de comparação com a coloração foi atribuída a nota 3 quando a bactéria não era encontrada, indicando planta sadia, e nota 1 se a presença da bactéria era notada (planta doente). Desta maneira, pôde-se efetuar as comparações com as classes de notas da coloração, onde se modificou a escala proposta por CHAGAS (1986), reunindo as

notas em 3 classes: notas 1 e 2 (doente) em uma classe 1; notas 3 e 4 (reação intermediária de doença) em uma classe 2; notas 5 e 6 (sadia) em classe 3, apenas para efetuar as análises estatísticas.

3.5.3. Autofluorescência do metaxilema

Toda a metodologia utilizada para avaliar a autofluorescência do metaxilema encontra-se descrita por DAMANN Jr.(1988).

O método da coloração do xilema foi comparado com a autofluorescência no ensaio R1. Utilizaram-se os internós basais descartados pela coloração para realizar o método da autofluorescência, podendo-se verificar, desta forma, a resposta que os dois métodos apresentavam para o mesmo colmo. Estes internós foram descascados e, com uma faca afiada como navalha, retiraram-se finas secções transversais, que foram tratadas com uma solução 0,1 M de Tris a pH=10 e observado em microscópio de epifluorescência Leitz Ortholux II (12v, lâmpada de Hg de 100 W) com filtro bloqueador N2. As amostras foram avaliadas no mesmo dia da colheita, pois não se conhece o efeito do armazenamento sobre a fluorescência, mas sabe-se que influencia em outros métodos como contagem de bactérias (BAILEY & FOX,1985) e vazão de água (DOUGLAS,1981).

Verificou-se que três reações ocorriam: fluorescência vermelha intensa, fraca e não fluorescência. Avaliou-se o método considerando a reação de fluorescência intensa como doente (nota 1), fraca como uma reação intermediária de doença (nota 2) e sem fluorescência como sadio (nota 3), estando desta maneira de acordo com as

reações obtidas pela coloração, onde, para efeito de comparação dos métodos, modificou-se a escala de notas proposta por CHAGAS (1986) em três classes, como foi explicado no item 3.5.2.

3.6. Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados por estatística não paramétrica, devido ao fato de os resultados obtidos através da avaliação por notas nos três métodos testados não se enquadrarem nas exigências do modelo matemático, necessárias para realização da análise através da estatística paramétrica.

Utilizou-se o teste do sinal, apropriado à análise de dados pareados e descrito por CAMPOS (1983) para comparar os métodos de diagnóstico.

Como mencionado anteriormente, para cada um dos colmos amostrados e avaliados atribuiu-se notas de 1 a 3. Para efeito de comparação direta entre os métodos, a análise foi feita com estas classes e não com as notas originais obtidas nos métodos.

No teste do sinal, a hipótese H_0 testada foi de que $X=Y$, ou seja, de que os métodos de diagnóstico eram iguais, isto é, apresentavam a mesma eficiência. Compararam-se sempre as parcelas de mesmo tratamento (sadia ou doente) entre os métodos empregados e dentro da mesma variedade. Assim, os resultados obtidos pelo método de coloração (CL) na parcela sadia foram comparados com os da autofluorescência (FL) na mesma parcela (CL X FL), no caso do ensaio R1, sendo que o mesmo foi feito para as parcelas doentes. Neste mesmo ensaio ainda foram comparadas parcelas sadias da fluorescência (FL) e da contagem (CT), e

as parcelas doentes para estes dois métodos (CT X FL). No ensaio R2 realizou-se a comparação entre as parcelas sadia da coloração (CL) e sadia da contagem (CT), bem como parcelas doentes (CL) X doente (CT).

Quando o objetivo foi verificar a reação varietal de cada uma das variedades testadas ao RS, compararam-se parcelas sadias e doentes dentro de cada um dos três métodos avaliados e sempre na mesma variedade. Isto porque o teste do sinal testaria a hipótese $H_0: X=Y$, ou seja, verificaria se ocorre ou não diferença entre as parcelas sadia e doente para cada um dos métodos. Com este resultado, e utilizando o critério proposto por VALARINI (1978), DOUGLAS (1981) e CRUZ (1983), que constataram ausência de diferença entre parcelas sadia e doente por vazão de água ou por número de vasos coloridos nas variedades resistentes, as variedades foram testadas.

Os métodos de diagnóstico empregados não têm validade para seleção de variedades quando não ocorre a cura das mudas que constituem as parcelas sadias, pois, sendo assim, parcelas sadias e doentes apresentam comportamento semelhante, verificando-se elevado número de bactérias no suco do xilema, grande número de vasos obstruídos e autofluorescência do metaxilema nos dois tratamentos. A análise estatística não-paramétrica através do teste do sinal não detectaria qualquer diferença neste caso, pois as parcelas sadia e doente eram semelhantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Comparações entre os três métodos de diagnóstico do RS

4.1.1. Comparação entre os métodos de coloração do xilema e autofluorescência do metaxilema para determinação da incidência de RS

No ensaio R1 realizou-se a comparação entre os métodos de diagnóstico pela coloração do xilema (CL) e autofluorescência do metaxilema (FL) em cana-planta. Os dados originais obtidos neste ensaio estão nos apêndices 3 (campo I) e 4 (campo II), onde se encontram as classes de notas (1, 2 e 3) utilizadas na análise estatística dos dados, as notas segundo a escala proposta por CHAGAS(1986) para avaliação da coloração dos vasos do xilema e a avaliação através da observação da bactéria em microscópio de contraste de fase.

A tabela 2 sumariza os resultados encontrados no campo I após a análise pelo teste do sinal (CAMPOS,1983), apresentando a equivalência ou não dos métodos avaliados (CL= coloração dos vasos do xilema pelo fluxo transpiratório; FL= autofluorescência do metaxilema; e CT= observação de bactérias em microscópio de contraste de fase), para cada uma das variedades testadas. Os resultados referentes ao campo II encontram-se na tabela 3, onde:

Sinal de igualdade (=): significa que não foi rejeitada a hipótese $H_0: X=Y$, e os métodos são equivalentes (iguais)

Sinal de desigualdade ($\neq$): significa que foi rejeitada a hipótese $H_0: X=Y$, e os métodos não são equivalentes (diferentes).

TABELA 2: Comparação dos métodos de coloração do xilema (CL), autofluorescência do metaxilema (FL) e observação de bactérias (CT) avaliados no ensaio R1* do campo I.

VARIEDADES	Parcela	Comparação dos Métodos	
		CL X FL	CT X FL**
CB47-355	Sadia	CL = FL	CT $\neq$ FL
	Doente	CL = FL	CT $\neq$ FL
NA56-79	Sadia	CL $\neq$ FL	CT $\neq$ FL
	Doente	CL $\neq$ FL	CT $\neq$ FL
SP70-1078	Sadia	CL $\neq$ FL	CT = FL
	Doente	CL $\neq$ FL	CT = FL
Número e		= 2 (33%)	= 2 (33%)
Porcentagem		$\neq$ 4 (67%)	$\neq$ 4 (67%)

= : Métodos são equivalentes

$\neq$: Métodos não são equivalentes

* Inóculo da variedade SP70-1078 e colmos avaliados 5 meses após inoculação

** Comparação realizada com menor número de repetições

Com base nos resultados apresentados na tabela 2, observa-se, na comparação entre CL e FL para as variedades SP70-1078 e NA56-79, que rejeita-se $H_0: X=Y$, ou seja, para estas duas variedades um colmo da parcela sadia, e que

assim foi considerada pelo método da coloração (CL), não obteve a mesma resposta quando se utilizou o método FL, e o mesmo ocorreu para a parcela doente. Reação oposta foi encontrada na variedade CB47-355, onde a hipótese $H_0: X=Y$ não foi rejeitada, e as canas das parcelas sadia ou doente, quando avaliadas pelo método CL ou FL, apresentaram o mesmo resultado.

Os métodos CL e FL foram equivalentes em 2 (33%) dos testes e não equivalentes em 4 (67%) dos testes, indicando existência de problemas que interferiram no ensaio.

A tabela 3 apresenta um maior número de variedades nas quais foram testados os três métodos (CL, FL e CT) em cana-planta (ensaio R1) no campo II. Os dados originais constam no apêndice 4.

TABELA 3: Comparação dos métodos de coloração do xilema (CL), autofluorescência do metaxilema (FL) e observação de bactéria (CT) avaliados no ensaio R1* do campo II.

VARIEDADES	Parcela	Comparação dos Métodos	
		CL X FL	CT X FL
CB47-355	Sadia	CL = FL	CT ≠ FL
	Doente	CL ≠ FL	CT ≠ FL
IAC64-257	Sadia	CL = FL	CT ≠ FL
	Doente	CL = FL	CT = FL
IAC70-22	Sadia	CL ≠ FL	CT ≠ FL
	Doente	CL = FL	CT ≠ FL
NA56-79	Sadia	CL = FL	CT ≠ FL
	Doente	CL = FL	CT = FL
SP70-1078	Sadia	CL = FL	CT = FL
	Doente	CL = FL	CT = FL
SP70-1143	Sadia	CL = FL	CT ≠ FL
	Doente	CL = FL	CT ≠ FL
SP70-1284	Sadia	CL = FL	CT ≠ FL
	Doente	CL = FL	CT ≠ FL
SP71-1406	Sadia	CL = FL	CT ≠ FL
	Doente	CL = FL	CT = FL
SP71-6163	Sadia	CL = FL	CT = FL
	Doente	CL ≠ FL	CT ≠ FL
RB76-5418	Sadia	CL = FL	CT ≠ FL
	Doente	CL = FL	CT = FL
RB78-5148	Sadia	CL = FL	CT ≠ FL
	Doente	CL = FL	CT = FL
Número e		= 19 (86%)	= 8 (36%)
Porcentagem		≠ 3 (14%)	≠ 14 (64%)

= : Métodos são equivalentes

≠ : Métodos não são equivalentes

* Inóculo da variedade SP70-1078 e colmos avaliados 9 meses após a inoculação

Nas 22 comparações efetuadas entre os métodos CL X FL, em 19 (86%) dos casos houve equivalência e apenas em 3 (14%) a equivalência não ocorreu.

Das 11 variedades testadas, em 8 (SP70-1078, NA56-79, SP71-1406, IAC64-257, SP70-1143, RB76-5418, RB78-5148 e SP70-1284) a hipótese $H_0: X=Y$ não foi rejeitada, quando se comparou CL e FL, significando que os métodos foram equivalentes, tanto nas parcelas sadias como nas doentes para estas variedades. Nas variedades CB47-355 e SP71-6163 a CL foi igual a FL na parcela sadia e diferente na doente, sendo que o inverso ocorreu para a variedade IAC70-22, isto é, CL diferente de FL na parcela sadia e igual na doente.

4.1.2. Comparação entre autofluorescência do metaxilema e observação da bactéria em microscópio de contraste de fase

O número de colmos avaliados por estes dois métodos foi bastante reduzido e diferente para cada variedade, pois, conforme explicado no item 3.5.1, a avaliação observando a presença (+) ou ausência (-) da bactéria do RS no suco extraído do xilema teve por objetivo inicial confirmar resultados considerados duvidosos. Como o teste do sinal não permitia uma avaliação conjunta dos três métodos (CL, FL e CT) e devido ao pequeno número de amostras, efetuou-se a comparação apenas entre a CT e FL para verificar a evidência de correlação entre estes dois métodos.

Os dados da comparação entre CT e FL foram obtidos na colheita do ensaio R1, cujo principal objetivo foi comparar a CL e a FL. As tabelas 2 e 3, referentes aos

campos I e II, respectivamente, contêm também os resultados da comparação entre CT e FL.

No campo I, a reação encontrada foi de equivalência entre os métodos (CT e FL), nas parcelas sadia e doente na variedade SP70-1078. Para as variedades NA56-79 e CB47-355 os resultados demonstraram que os métodos CT e FL não foram equivalentes (tabela 2). Em resumo, os métodos CT e FL foram equivalentes em 2 (33%) dos testes e não foram equivalentes em 4 (67%), indicando a existência de outros fatores, não controlados, interferindo nos métodos. Os testes foram efetuados 5 meses após as inoculações com inóculo da variedade SP70-1078.

Comparação entre CT e FL no campo II demonstrou que em 22 comparações efetuadas os métodos não foram equivalentes em 14 (64%) e equivalentes em 8 (36%). Os métodos foram aplicados 9 meses após a inoculação utilizando o caldo infectado da variedade SP70-1078.

Observou-se neste campo II, na variedade SP70-1078, que os dois métodos foram equivalentes nas parcelas sadia e doente. Para SP71-6163, apenas na parcela doente os métodos diferiram, e nas variedades SP71-1406, NA56-79, IAC64-257, RB76-5418 e RB78-5148 os métodos só diferiram na parcela sadia.

Verificou-se que os métodos diferiram nas duas parcelas (sadia e doente) nas variedades CB47-355, SP70-1143, IAC70-22 e SP70-1284.

4.1.3. Comparação entre coloração do xilema e observação da presença da bactéria do RS em microscópio de contraste de fase

No ensaio R2 comparou-se a coloração do xilema pelo fluxo transpiratório (CL) com a observação da presença da bactéria do RS em microscópio de contraste de fase (CT), para verificar a validade do diagnóstico presuntivo apresentado pela CL.

Os dados originais obtidos no campo I encontram-se no apêndice 5 e os do campo II no apêndice 6, onde se encontram as notas baseadas na escala de CHAGAS(1986) e as classes de nota utilizadas para a análise estatística dos dados.

A comparação entre os métodos CL e CT efetuada pelo teste do sinal está sumarizada nas tabelas 4 e 5, para os campos I e II, respectivamente.

TABELA 4: Comparação do método de coloração do xilema (CL) e observação de bactérias (CT) avaliados no ensaio R2* do campo I.

VARIEDADES	Parcela	Comparação dos Métodos CL X CT
CB47-355	Sadia	CL = CT
	Doente	CL = CT
NA56-79	Sadia	CL = CT
	Doente	CL ≠ CT
SP70-1078	Sadia	CL = CT
	Doente	CL ≠ CT
Número e		= 4 (67%)
Porcentagem		≠ 2 (33%)

= : Métodos são equivalentes

≠ : Métodos não são equivalentes

* Inóculo de NA56-79 utilizado na reinoculação. Colmos avaliados 3 meses após a reinoculação.

TABELA 5: Comparação do método de coloração do xilema (CL) e observação de bactérias (CT) avaliados no ensaio R2* do campo II.

VARIEDADES	Parcela	Comparação dos Métodos CL X CT
CB47-355	Sadia Doente	CL = CT CL ≠ CT
IAC64-257	Sadia Doente	CL = CT CL = CT
NA56-79	Sadia Doente	CL = CT CL = CT
SP70-1078	Sadia Doente	CL = CT CL ≠ CT
SP71-1406	Sadia Doente	CL ≠ CT CL = CT
RB76-5418	Sadia Doente	CL = CT CL = CT
RB78-5148	Sadia Doente	CL = CT CL = CT
Número e Porcentagem		= 11 (79%) ≠ 3 (21%)

= : Métodos são equivalentes

≠ : Métodos não são equivalentes

* Inóculo de NA56-79 utilizado na reinoculação do campo, colmos avaliados 3 meses após a reinoculação.

Baseados nos resultados do ensaio R2 do campo I (tabela 4) observa-se que em 4 (67%) dos testes os métodos foram equivalentes e em 2 (33%) não houve equivalência entre os métodos. Na variedade CB47-355 os dois métodos (CL e CT) foram equivalentes, tanto na parcela sadia como na doente. As variedades SP70-1078 e NA56-79 mostraram equivalência dos métodos apenas na parcela sadia, diferindo na doente.

No campo II, das 7 variedades avaliadas, em 11 (79%) dos testes, os dois métodos foram equivalentes e em 3 (21%) não ocorreu a equivalência. Nas variedades NA56-79, IAC64-257, RB76-5418 e RB78-5148 os métodos testados foram sempre equivalentes, enquanto nas variedades CB47-355 e SP70-1078 os métodos diferiram na parcela doente. Na variedade SP71-1406 os métodos foram diferentes na parcela sadia.

O fato de os métodos diferirem na avaliação das parcelas doentes na variedade SP70-1078 pode ser devido ao pequeno tempo decorrido entre a segunda inoculação e a colheita do ensaio (3 meses), tempo este não suficiente para que a bactéria do RS colonizasse os vasos do xilema e interferisse no transporte de água da planta, que é o processo fisiológico que o método de coloração do xilema (CL) avalia.

Pressupunha-se que o tamanho do colmo era o fator limitante ao método da coloração, e desde que as variedades possuíssem de 7 a 10 nós o método poderia ser aplicado. Porém, os resultados obtidos mostram que o período de incubação e a idade dos colmos interferiram nos resultados apesar de o colmo possuir o número de internós adequado.

4.2. Índice de contaminação do RS aplicado nos ensaios e viveiros

4.2.1. Índice de contaminação dos três ensaios nos campos I e II

O índice de contaminação (IC) do RS foi proposto por CHAGAS (1986) como um parâmetro para avaliar a sanidade de campos comerciais e viveiros, empregando o método da coloração dos vasos do xilema (CL).

É calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de vasos coloridos (VC)} = \frac{\sum \text{das notas} \times 100}{\text{N}^{\circ} \text{ total de colmos testados} \times 6}$$

$$\text{Índice de contaminação (IC)} = 100 - \text{VC} (\%)$$

Utilizando-se estes parâmetros (IC %) verificou-se para todas as variedades, nos campos I e II, qual era a quantidade de doença encontrada nos 3 ensaios (R1, R2 e R3). Neste cálculo, empregaram-se as notas originais baseadas na escala proposta por CHAGAS(1986) e contidas nos apêndices 3 a 8. A tabela 6 apresenta o IC (%) encontrado nas parcelas sadia e doente de cada uma das variedades no campo I, e a tabela 7 mostra o IC (%) do campo II. Os dados contidos nas tabelas 6 e 7 estão representadas em histogramas (figuras 1 a 5).

Figura 1. Representação dos I.C. (%) determinados nas parcelas sadias e doentes do campo I (Fitopatologia) das variedades CB47-355, NA56-79 e SP70-1078.

Figura 2. Representação dos I.C. (%) determinados nas parcelas sadias e doentes das variedades CB47-355, IAC64-257 e IAC70-22 no campo II (Cooperativa).

Figura 3. Representação dos I.C. (%) determinados nas parcelas sadias e doentes das variedades NA56-79, SP70-1078, SP70-1143 no campo II (Cooperativa).

Figura 4. Representação dos I.C. (%) determinados nas parcelas sadias e doentes das variedades SP70-1284, SP71-1406, SP71-6163 no campo II (Cooperativa).

Figura 5. Representação dos I.C. (%) determinados nas parcelas sadias e doentes das variedades RB76-5418, RB78-5148.

TABELA 6: Índice de contaminação (%) de RS no campo I nos três ensaios (R1, R2 e R3).

VARIEDADES	Parcela	Índice de Contaminação em % nos Ensaios do Campo I		
		R1	R2	R3
CB47-355	Sadia	25,00	10,00	33,00
	Doente	27,22	12,33	27,89
NA56-79	Sadia	15,56	19,00	34,62
	Doente	31,04	27,00	54,32
SP70-1078	Sadia	17,82	8,70	26,34
	Doente	31,11	23,00	57,06

$$IC = 100 - \frac{\sum \text{das notas} \times 100}{N^{\circ} \text{ total de colmos avaliados} \times 6}$$

R1, R2 e R3 = Ensaios avaliados aos 5, 3 e 9 meses, respectivamente, após a inoculação

R1 = inóculo da variedade SP70-1078

R2 e R3 = reinoculação com inóculo da variedade NA56-79

TABELA 7: Índice de contaminação (IC %) de RS no campo II nos três ensaios (R1, R2 e R3).

VARIEDADES	Parcelas	Índice de Contaminação em % nos Ensaios do Campo II		
		R1	R2	R3
CB47-355	Sadia	17,78	19,17	27,00
	Doente	9,50	23,33	27,67
IAC64-257	Sadia	26,11	15,83	34,88
	Doente	31,11	18,75	18,57
IAC70-22	Sadia	49,45	—	—
	Doente	40,00	—	—
NA56-79	Sadia	28,33	18,33	31,48
	Doente	33,89	21,25	28,43
SP70-1078	Sadia	26,67	21,25	25,82
	Doente	36,67	22,08	40,00
SP70-1143	Sadia	21,11	—	23,08
	Doente	23,89	—	32,73
SP70-1284	Sadia	35,56	—	—
	Doente	31,67	—	—
SP71-1406	Sadia	21,67	27,08	30,87
	Doente	22,41	22,92	25,00
SP71-6163	Sadia	28,89	—	43,59
	Doente	39,45	—	32,73
RB76-5418	Sadia	27,78	17,92	26,67
	Doente	28,89	22,92	32,41
RB78-5148	Sadia	22,78	17,08	35,29
	Doente	29,45	18,75	30,00

$$IC = 100 - \frac{\sum \text{das notas} \times 100}{N^{\circ} \text{ total de colmos avaliados} \times 6}$$

R1 = inóculo da variedade SP70-1078

R2 e R3 = reinoculação com inóculo da variedade NA56-79

R1, R2 e R3 = ensaios avaliados aos 9, 3 e 9 meses respectivamente, após as inoculações

Observando-se estes dados, comprovou-se que ocorreram duas falhas durante a instalação dos experimentos: baixa eficiência do tratamento térmico efetuado e utilização de inóculo pouco agressivo (retirado da variedade SP70-1078).

No campo I, o tratamento realizado foi mais eficiente e ocorreu uma maior diferença entre o IC(%) das parcelas sadias e doentes. Somente no ensaio R3, devido à não desinfecção das ferramentas durante a colheita dos ensaios R1 e R2, ocorreu inversão do IC(%) na variedade CB47-355, existe mais doença na parcela sadia que na doente. Porém, no campo II a falha do tratamento térmico prejudicou a avaliação das variedades, sendo que a IAC70-22 e SP70-1284 apresentavam um IC(%) maior nas parcelas sadias que nas doentes. Dessa maneira, eliminaram-se estas duas variedades dos ensaios posteriores, pois o pressuposto inicial de parcela isenta de doença e parcela doente não foi obedecido, ficando prejudicada a avaliação dos métodos de diagnóstico.

Apesar da baixa eficiência do tratamento térmico no campo II (demonstrada no item 4.2.2), era de esperar que as parcelas doentes apresentassem um índice de contaminação bem maior que as sadias, pois não foram tratadas termicamente e ainda inoculou-se caldo bruto de canas contendo a bactéria do RS. Isto levantou a segunda falha, a da pouca agressividade do inóculo retirado de colmos da variedade SP70-1078, que apresentavam sintomas em colmos maduros, indicando estar altamente infectados por RS.

Verificou-se, entretanto, que a variedade era extremamente sensível à bactéria do RS, e deve haver diferença na patogenicidade das bactérias retiradas de diferentes variedades, pois em variedades resistentes as bactérias precisariam ser mais agressivas para vencer as

barreiras impostas pela resistência, enquanto nas variedades suscetíveis a bactéria não encontraria barreiras para efetuar a colonização dos tecidos dos vasos. Por isso, a segunda inoculação foi feita utilizando-se caldo de colmos da variedade NA56-79 que apresentavam IC= 40%, comprovando-se no ensaio R3 que houve aumento de doença nas diversas variedades testadas. Escolheu-se inóculo da NA56-79 também, porque foi a utilizada por CHAGAS(1986) durante o desenvolvimento do método de coloração (CL).

4.2.2. Comprovação da baixa eficiência do tratamento térmico utilizado no campo II através da avaliação de viveiros

Um campo comercial da variedade NA56-79 que iria ser destinada para muda foi avaliada com o método de coloração dos vasos do xilema (CL) em 27/11/89, para verificar o IC(%) do campo. O número de colmos amostrado foi 185.

Os dados originais obtidos através da escala de notas (CHAGAS, 1986) encontram-se no apêndice 9, e foram utilizados para calcular o índice de contaminação (IC%) empregando a fórmula citada no item 4.2.1.

Obteve-se que o índice de contaminação do campo original era de 40,9% e, sendo considerado bastante alto, realizou-se tratamento térmico (50,5°C por duas horas) no equipamento da Cooperativa dos Plantadores de Cana-de-Açúcar de Piracicaba. Conhecendo o trabalho da Cooperativa Central dos Produtores de Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo- COPERsUCAR (1989) que propunha um novo binômio tempo X temperatura de 52°C por 30 minutos, realizou-se numa parcela das mudas um teste para verificar a eficiência do binômio em toletes com 3 gemas.

Avaliação da eficiência do tratamento térmico nas duas temperaturas foi efetuada em 11/10/90 em viveiros de mudas com 11 meses de idade, utilizando-se o método de coloração (CL), cujos dados obtidos estão nos apêndices 10 e 11. Amostrou-se 180 colmos na área onde o tratamento térmico realizado foi 50,5°C por duas horas e 190 para 52°C por 30 minutos. A tabela 8 contém os IC(%) encontrados para as duas temperaturas de tratamento térmico empregadas e a respectiva eficiência calculada em relação ao IC inicial do campo (40,9%).

TABELA 8: Índice de contaminação (IC%) da variedade NA56-79 antes e após a cura pela termoterapia.

TRATAMENTOS	Nº de colmos avaliados	IC(%)	% de colmos doentes curados
CAMPO COMERCIAL (Doente)	185	40,90	—
Água Quente 50,5°C por 120 minutos	180	20,65	49,50
Água Quente 52°C por 30 minutos	190	27,63	32,44

Comprovou-se, portanto, que a eficiência do tratamento térmico realizado com o equipamento da Cooperativa era bastante baixa, pois ocorreu uma diminuição inferior a 50% no índice de contaminação após o tratamento. Isto se deve provavelmente à não calibração do equipamento

com termômetro de precisão, no início de cada ciclo de tratamento, com o objetivo de aferir os sensores elétricos do banho térmico. Provavelmente a temperatura esteja abaixo do necessário ($50,5^{\circ}\text{C}$), de modo que a cura não é efetuada adequadamente.

4.3. Avaliação da resistência ao RS das variedades comerciais testadas

Concomitante à comparação entre os métodos de diagnóstico, avaliou-se a resistência das variedades comerciais de cana-de-açúcar ao RS, nos três ensaios conduzidos (R1, R2 e R3) e nos dois campos (I e II).

Como foi descrito anteriormente no item 3.6, utilizou-se o teste do sinal (CAMPOS, 1983) para avaliar as diferenças entre parcelas sadias e doentes dentro de cada variedade, em todos os métodos e variedades testadas. A tabela 9 apresenta os resultados obtidos após a análise estatística dos dados no campo I, enquanto os resultados referentes ao campo II se encontram na tabela 10.

TABELA 9: Resistência varietal ao raquitismo da soqueira (RS) através dos métodos de coloração (CL), autofluorescência do metaxilema (FL) e observação da bactéria (CT) no campo I.

Resistência ao RS comparando parcelas sadias e doentes				
Ensaio Avaliados (meses)	Parcelas comparadas	Métodos testados e classificação		
		CL	FL	CT
VARIEDADE CB47-355				
R1 (5)	Sadia Doente	= (RESIS)	= (RESIS)	_____
R2 (3)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	=(RESIS)
R3 (9)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	_____
VARIEDADE NA56-79				
R1 (5)	Sadia Doente	≠ (SUSC)	= (RESIS)	_____
R2 (3)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	≠ (SUSC)
R3 (9)	Sadia Doente	≠ (SUSC)	_____	_____
VARIEDADE SP70-1078				
R1 (5)	Sadia Doente	≠ (SUSC)	≠ (SUSC)	_____
R2 (3)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	≠ (SUSC)
R3 (9)	Sadia Doente	≠ (SUSC)	_____	_____

= : Parcelas estatisticamente equivalentes (RESIS-resistentes)

≠ : Parcelas estatisticamente diferentes (SUSC-suscetíveis)

_____ : Dados não obtidos

TABELA 10: Resistência varietal ao raquitismo da soqueira (RS) através dos métodos de coloração (CL), autofluorescência do metaxilema (FL) e observação da bactéria (CT) no campo II.

		Resistência ao RS comparando parcelas sadias e doentes		
Ensaio Avaliados (meses)	Parcelas	Métodos testados e classificação		
		CL	FL	CT
VARIEDADE CB47-355				
R1(9)	Sadia Doente	= (RESIS)	= (RESIS)	_____
R2(3)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	= (RESIS)
R3(9)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	_____
VARIEDADE IAC64-257				
R1(9)	Sadia Doente	= (RESIS)	= (RESIS)	_____
R2(3)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	= (RESIS)
R3(9)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	_____
VARIEDADE NA56-79				
R1(9)	Sadia Doente	= (RESIS)	= (RESIS)	_____
R2(3)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	= (RESIS)
R3(9)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	_____

Continua...

Continuação TABELA 10: Resistência varietal ao raquitismo da soqueira (RS) através dos métodos de coloração (CL), autofluorescência do metaxilema (FL) e observação da bactéria (CT) no campo II.

		Resistência ao RS comparando parcelas sadias e doentes		
Ensaio Avaliados (meses)	Parcelas	Métodos testados e classificação		
		CL	FL	CT
VARIEDADE SP70-1078				
R1(9)	Sadia Doente	= (RESIS)	= (RESIS)	_____
R2(3)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	≠ (SUSC)
R3(9)	Sadia Doente	≠ (SUSC)	_____	_____
VARIEDADE SP70-1143				
R1(9)	Sadia Doente	= (RESIS)	= (RESIS)	_____
R2(3)	Sadia Doente	_____	_____	_____
R3(9)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	_____
VARIEDADE SP71-1406				
R1(9)	Sadia Doente	= (RESIS)	= (RESIS)	_____
R2(3)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	= (RESIS)
R3(9)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	_____

Continua...

Continuação TABELA 10: Resistência varietal ao raquitismo da soqueira (RS) através dos métodos de coloração (CL), autofluorescência do metaxilema (FL) e observação da bactéria (CT) no campo II.

		Resistência ao RS comparando parcelas sadias e doentes		
Ensaio Avaliados (meses)	Parcelas	Métodos testados e classificação		
		CL	FL	CT
VARIEDADE SP71-6163				
R1(9)	Sadia Doente	≠ (SUSC)	= (RESIS)	_____
R2(3)	Sadia Doente	_____	_____	_____
R3(9)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	_____
VARIEDADE RB76-5418				
R1(9)	Sadia Doente	= (RESIS)	= (RESIS)	_____
R2(3)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	= (RESIS)
R3(9)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	_____
VARIEDADE RB78-5148				
R1(9)	Sadia Doente	= (RESIS)	= (RESIS)	_____
R2(3)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	= (RESIS)
R3(9)	Sadia Doente	= (RESIS)	_____	_____
= : Parcelas estatisticamente equivalentes (RESIS- resistentes)				
≠ : Parcelas estatisticamente diferentes (SUSC- suscetíveis)				
: Dados não obtidos				

A reação de resistência ou suscetibilidade das variedades baseou-se no critério proposto por VALARINI (1978), DOUGLAS (1981) e CRUZ (1983). Estes autores verificaram não haver diferença de fluxo de água ou número de vasos coloridos quando se compararam parcelas sadias e doentes em variedades resistentes, sendo que tais conclusões estavam em concordância com resistência relatada, utilizando o método da pesagem com canas de 2º corte, como demonstrou DOUGLAS (1981).

Baseando-se neste critério e nos resultados fornecidos pelo teste do sinal, que verificava se ocorriam ou não diferenças entre as parcelas sadia e doente para todos os métodos, observou-se que em certas variedades os métodos apresentaram resultados constantes, como é o caso da variedade CB47-355, que não apresentou diferença entre parcelas sadias e doentes em todos os métodos testados e nos dois campos, sendo considerada resistente.

Observando-se a tabela 9, comprova-se que o método da coloração (CL) diferenciou no campo I as variedades que anteriormente conhecia-se reagir diferentemente ao RS.

A variedade CB47-355, utilizada como padrão resistente, assim foi classificada pelo CL neste ensaio. A variedade NA56-79 é considerada suscetível ao RS (VALARINI, 1978; DOUGLAS, 1981; CRUZ, 1983) e reagiu desta forma nos ensaios R1 e R3. Não foi considerado aconselhável utilizar os dados obtidos no ensaio R2 em razão do pequeno tempo decorrido entre a reinoculação e a colheita do ensaio (3 meses). No ensaio R3 (9 meses após a reinoculação), a doença teve tempo para se manifestar, sendo então utilizada para comprovação dos resultados obtidos em R1. A variedade SP70-1078 tem resistência desconhecida, porém com indícios de suscetibilidade, pois foi verificada diminuição no porte entre as parcelas sadia e doente no campo I, além da

constatação de sintomas conspícuos em colmos maduros (o que geralmente é relatado nas variedades extremamente sensíveis ao RS). Os dados obtidos com o método da coloração (CL) confirmou estas suspeitas, sendo que até os métodos de FL e CT indicaram a suscetibilidade da variedade.

O método de autofluorescência do metaxilema (FL) apresentou os mesmos resultados que a CL para as variedades CB47-355 e SP70-1078, e a CT diferiu da CL na variedade SP70-1078 e NA56-79. Isto pode ser devido ao fato de o método CT observar a presença da bactéria do suco extraído do xilema, e desde que ocorreu inoculação a bactéria provavelmente estava presente mas em número não suficiente para causar distúrbios no transporte de água e autofluorescência do metaxilema. Ao contrário do método de coloração, que necessita de um elevado número de bactérias para o processo de transporte de água ser afetado e assim possa ser medido pelo método.

A tabela 10, que apresenta os dados obtidos no campo II, confirma os resultados indicando a resistência da variedade CB47-355. A variedade SP71-1406, que se esperava ser resistente, assim se comportou. Levantou-se a hipótese da resistência desta variedade ao RS verificando-se o seu desempenho em solos de média fertilidade e a sua tolerância ao estresse hídrico (COPERSUCAR, 1983). Baseando-se nestes critérios, esperava-se que a variedade SP70-1143 também fosse resistente ao RS como a SP71-1406, fato este confirmado tanto pelos métodos de coloração dos vasos (CL) como de autofluorescência do metaxilema (FL).

Segundo informações fornecidas pelo Instituto do Açúcar e do Alcool (1988), as novas variedades RB76-5418 e RB78-5148 são consideradas tolerantes ao RS, sendo que a variedade RB78-5148 se destacou por seus resultados expressivos em solos de baixa fertilidade e disponibilidade de água. As informações foram confirmadas nos três ensaios

(R1, R2 e R3), que classificaram as duas variedades como resistentes pelos três métodos (CL, FL e CT).

Como comentado no item 4.2.2, o tratamento térmico no campo II apresentou baixa eficiência no controle do RS, o que prejudicou as avaliações de diversas variedades quanto a sua resistência ao RS. Constatou-se isto verificando-se principalmente o padrão suscetível NA56-79, que foi classificada como resistente em todos os ensaios e nos três métodos testados, reação contrária à conhecida e que também foi encontrada no campo I. O método nesta variedade foi afetado pela falha na termoterapia, falta de controle adequado do RS nas parcelas sadias (observou-se um alto índice de contaminação no ensaio R3) e pela falha na primeira inoculação realizada com inóculo da variedade SP70-1078.

Encontrou-se também resultado contraditório ao do campo I na variedade SP70-1078, que do mesmo modo deve ter sido prejudicada pelas falhas do tratamento térmico e inoculação.

Devido à insuficiência da cura por termoterapia e baixa patogenicidade do inóculo empregado no ensaio R1, considerou-se que a avaliação da resistência foi prejudicada, e estando os dados em desacordo preferiu-se não concluir sobre a reação de algumas variedades ao RS, sendo necessários maiores estudos.

Consideraram-se apenas os resultados uniformes, como no caso da variedade CB47-355, que apesar da contaminação da parcela sadia, apresentou resultados constantes.

5. DISCUSSÃO GERAL

O trabalho foi executado com o objetivo de comparar a eficiência e equivalência de três métodos de diagnóstico do RS da cana-de-açúcar e a viabilidade do uso destes métodos na seleção de variedades resistentes a esta doença.

Com base nos resultados da comparação entre os três métodos de diagnóstico do RS executados nos campos I e II e em três ensaios, efetuaram-se comparações pareadas entre os métodos que serão discutidos a seguir.

5.1. Comparação entre o método de coloração do xilema (CL) e autofluorescência do metaxilema (FL) avaliado no ensaio R1

As comparações entre os métodos de coloração do xilema (CL) com a autofluorescência do metaxilema (FL) mostraram no ensaio R1 (tabela 2) que os resultados foram equivalentes em 2 (33%) dos testes e não sendo equivalentes em 4 (67%).

Os resultados discordantes indicam a ocorrência de fatores não controlados que interferiram nos resultados experimentais. Entre outros destaca-se a baixa patogenicidade do inóculo extraído da variedade SP70-1078, baixa eficiência da cura das mudas e o período de incubação

insuficiente para a plena manifestação dos distúrbios fisiológicos avaliados pelos métodos CL e FL.

Observando-se os resultados do ensaio R1 no campo II, avaliado 9 meses após a inoculação, verificou-se que, apesar da baixa eficiência da cura das mudas que compunham as parcelas sadias, os métodos CL e FL foram equivalentes em 19 (86%) dos testes e não equivalentes em 3 (14%). Com o aumento do período de incubação, ocorreu um incremento na equivalência entre os métodos. No padrão NA56-79 e na variedade SP71-1406 os métodos CL e FL foram concordantes.

Os problemas de baixa patogenicidade do inóculo e ineficiência da termoterapia das mudas do campo II foram em parte eliminados pelo maior período de incubação empregado. Isto indica que o período após a inoculação em que os colmos são avaliados é mais um fator que interfere no método CL, pois o comportamento das variedades suscetíveis NA56-79 e SP70-1078 sofreu inversão dos resultados nas avaliações aos 5 e 9 meses de incubação no ensaio R1.

5.2. Comparação entre o método de coloração do xilema (CL) e observação da bactéria (CT) avaliado no ensaio R2

De acordo com os resultados obtidos nos campos I e II apresentados nas tabelas 4 e 5, os métodos CL e CT foram equivalentes em 67% e 79% dos testes e não equivalentes em 33% e 21%, respectivamente. Como os colmos avaliados eram muito novos e o período de incubação curto (3 meses), após a reinoculação, acredita-se que a não

equivalência dos métodos CL e CT seja devida a esses fatores.

Pressupunha que o tamanho do colmo era o fator limitante ao método CL e desde que a variedade possuísse 7 a 10 nós visíveis o método poderia ser aplicado. Porém, verificou-se que é necessário um tempo maior para que os distúrbios fisiológicos se intensifiquem e, assim, a avaliação possa ser realizada com sucesso. Os resultados encontrados estão de acordo com o relatado por GILLASPIE Jr. *et alii* (1976). Estes autores, utilizando a contagem de bactérias em microscópio de contraste de fase (CT) para a caracterização das variedades, verificaram que, por avaliações realizadas no início do ciclo de crescimento, as variedades se comportam como resistentes, apresentando pequeno número de bactérias. De 2 a 4 meses mais tarde o comportamento se alterou, sendo consideradas suscetíveis pelo elevado número de bactérias presente no xilema.

Os dados obtidos no ensaio R2 indicam que a idade dos colmos em cada ciclo vegetativo e o período de incubação interferem no nível de doença e nas comparações dos métodos CL e CT. À medida que os danos no transporte de seiva se acentuam ocorre maior concordância entre os métodos.

5.3. Comparação entre autofluorescência do metaxilema (FL) e observação da bactéria (CT)

As comparações entre os métodos CT e FL avaliadas no ensaio R1 não foram muito confiáveis devido ao pequeno número de colmos amostrados.

Nestas comparações não se observou tendência de elevação da equivalência dos métodos CT e FL com o aumento do período de incubação de 5 para 9 meses. Observa-se na tabela 2 que aos 5 meses os métodos CT e FL foram equivalentes em 2 (33%) dos testes e não equivalentes em 4 (67%). Com 9 meses de incubação os métodos CT e FL foram equivalentes em 8 (36%) e não equivalentes em 14 (64%), estando em concordância com os resultados obtidos aos 5 meses.

Os resultados estão em desacordo com aqueles obtidos por DAMANN Jr.(1988), que observou correlação entre os métodos CT e FL na maioria dos colmos maduros de cana-de-açúcar infectados com RS. Porém, o mesmo autor não descarta a possibilidade da não especificidade do método para o diagnóstico do RS.

Os dados obtidos podem indicar uma possível falta de especificidade do método, que necessita ser confirmada.

5.4. Índice de contaminação do RS aplicado nos ensaios e viveiros de mudas

5.4.1. Índice de contaminação nos ensaios R1, R2 e R3 do campo II

O índice de contaminação (IC%) do RS foi proposto por CHAGAS(1986) como um parâmetro para avaliar o nível de contaminação dos campos comerciais e viveiros de mudas. Este IC(%) representa a média ponderada das notas de doença atribuída aos colmos que é subtraída do valor 100 para expressar a porcentagem média de vasos doentes encontrados.

A sua utilização ainda é limitada, pois não se estabeleceram as porcentagens de vasos coloridos que

indicariam o nível de prejuízo sofrido pela planta em função do RS.

Com o emprego do IC é possível verificar o nível de contaminação das plantas e acompanhar a eficiência dos tratamentos térmicos de mudas.

Nas tabelas 6 e 7, que apresentam os resultados obtidos nos ensaios R1, R2 e R3 dos campos I e II, é visível a elevação da intensidade de RS em todas as variedades testadas. O IC no campo II indicou que o tratamento térmico foi ineficiente, pois o IC das parcelas sadias que deveria avizinhar-se de zero era muito elevado, aproximando-se dos IC das parcelas doentes e inoculadas.

No ensaio R2 dos campos I e II verificou-se uma tendência de queda do IC devido à aplicação do teste 3 meses após a reinoculação em colmos muito novos.

O exame dos IC em variedades resistentes não apresenta diferenças estatisticamente significativas. Isto pode ser devido a características da bactéria do RS, que é um parasita obrigatório do xilema, e para que o patógeno e planta sobrevivessem, devem ter evoluído em constante associação. Dessa maneira, o vegetal provavelmente desenvolveu um mecanismo de resistência horizontal, permitindo a sobrevivência da bactéria do RS no xilema, provocando o mínimo de dano à planta. Esta co-evolução é observada em outros patossistemas (ROBINSON, 1987) e em cana-de-açúcar o autor descreve que variedades no Hawái possuem alto nível de resistência horizontal para os principais patógenos locais. No Brasil vários exemplos desse alto nível de resistência horizontal na cana-de-açúcar aos principais patógenos são encontrados (TOKESHI 1983, 1984, 1986a, 1986b).

Verifica-se na tabela 7 que a variedade utilizada como padrão resistente CB47-355 apresentou no ensaio R3 um IC de 27,0% e 27,67% nas parcelas sadia e doente,

respectivamente. Apesar destes IC a variedade não sofre danos aparentes devido à presença do RS, pois o número de amostras com bactérias é pequeno (apêndices 4 e 6). A análise dos IC do padrão suscetível NA56-79, nas mesmas condições, acusou IC de 31,48% e 28,43% nas parcelas sadia e doente, respectivamente. Neste caso, os danos do RS eram visíveis nas condições do campo, e ensaios de produtividade realizados anteriormente sempre acusaram perdas de produção devido à presença do RS nesta variedade (DOUGLAS, 1981). Se a análise for estendida a outras variedades tidas como resistentes (SP71-1406, RB76-5418 e RB78-5148), observa-se que os IC estão abaixo de 30% nas parcelas sadia e doente, sem que ocorram danos aparentes devido à presença do RS.

É importante destacar que inicialmente se suspeitou que a igualdade encontrada pelos métodos entre parcelas sadias e doentes nas variedades resistentes poderia ter sido causada pela falha na termoterapia e inoculação. Verificou-se, porém, que nessas variedades o IC (%) não ultrapassava um certo patamar (próximo de 30%), enquanto variedades consideradas suscetíveis, como a NA56-79, apresentaram IC= 54,32% no campo I. Na variedade SP70-1078, que reagiu como variedade suscetível, o IC(%) encontrado no campo I foi de 57,06% e 40% no campo II nas parcelas doentes (tabelas 6 e 7).

Isto pode indicar que a resistência das variedades ao RS seja do tipo quantitativa, diferente de uma resistência qualitativa, onde ocorre ou não a doença. Este nível de ocorrência do RS provavelmente possa ser indicado pelo IC(%), haja vista que foi diferente nas variedades resistentes e suscetíveis.

A análise conjunta dos dados do método de observação de bactérias (CT) com os métodos CL e FL mostrou que a bactéria estava presente em menor número nas variedades resistentes ao RS (apêndices 5 e 6).

5.4.2. Índice de contaminação em viveiros de mudas

O exame dos dados da tabela 8 obtidos com tratamento de mudas da variedade NA56-79 mostrou a baixa eficiência na termoterapia das mudas realizada com o equipamento da Cooperativa, utilizado para o tratamento de mudas do campo II. A baixa eficiência da termoterapia na cura das mudas sadias empregada nos ensaios interferiu na avaliação de resistência ao RS, mas não invalidou os testes comparativos entre os métodos de diagnóstico do RS.

O grande número de colmos examinados neste caso, variando de 180 a 190, associado ao elevado IC, permitiu inferir que este erro experimental interferiu na avaliação da resistência ao RS nas variedades suscetíveis.

O índice de contaminação de campos comerciais e viveiros de mudas pode ser empregado como medida de eficiência do equipamento e do pessoal na cura de plantas com RS.

5.5. Avaliação da resistência ao RS das variedades comerciais testadas

Um dos objetivos do trabalho era verificar a validade do método de coloração do xilema (CL) na seleção de variedades resistentes ao RS. O método parte do princípio de que o fluxo de água e o número de vasos funcionais não são afetados nas plantas doentes quando a variedade é resistente ao RS de acordo com VALARINI(1978), DOUGLAS(1981), CRUZ(1983) e CHAGAS(1986). Se a variedade é suscetível ao RS estes parâmetros são modificados e as plantas doentes apresentam fluxo de água e número de vasos funcionais muito menor que as plantas sadias. As diferenças

de vazão e coloração dos vasos (CL) entre plantas sadias e doentes são estatisticamente significativas nas análises não paramétricas através do teste do sinal. Para que este teste tenha validade há necessidade da presença das plantas sadias e doentes para permitir a comparação entre elas. Como foi verificado pela avaliação dos IC de viveiros, antes e após o tratamento térmico na variedade NA56-79 (item 4.2.2) a cura das mudas doentes não foi eficiente (49,5% de cura), e como este equipamento foi usado no tratamento térmico das mudas no campo II, as parcelas sadias estavam contaminadas, fato que prejudicou em certo ponto a determinação da resistência ao RS nas variedades testadas.

5.5.1. Avaliação de resistência ao RS no campo I

Os resultados obtidos no campo I mostraram que no padrão resistente CB47-355 os métodos CL, CT e FL foram semelhantes, indicando a resistência da variedade ao RS.

Na variedade padrão suscetível NA56-79, eliminando-se os resultados obtidos no ensaio R2 devido ao erro da idade dos colmos, verifica-se que nos ensaios R1 e R3 o método CL confirmou esta suscetibilidade.

A variedade SP70-1078, que exibia sintomas evidentes de RS, apresentou-se como suscetível nos ensaios R1 e R3 pelo método CL e mostrou evidências de que a idade do colmo interfere no resultado do teste.

O método CT provou ser mais sensível, pois mesmo em colmos novos detectou a resistência ou suscetibilidade das variedades estudadas. Esta sensibilidade é devida ao fato de o método examinar diretamente a presença da bactéria e não os seus efeitos na fisiologia do colmo.

Porém, neste método existem problemas na quantidade de tecido avaliado, uma vez que apenas se extrai o suco de um entrenó (2 a 5 ml) e dessa quantidade somente uma gota é observada. Existe, portanto, uma diminuição progressiva do tecido afetado amostrado. No método CL, no qual se avaliam todos os vasos de uma secção do colmo, parece ser mais provável detectar plantas doentes, além de o método permitir a avaliação de um número elevado de plantas num período de tempo curto.

Estas características colocam o método CL em vantagem com relação aos outros dois métodos testados, CT e FL, apresentando-o como um método de diagnóstico do RS exequível em programas de melhoramento visando à seleção de variedades resistentes. É importante salientar que devido as características de cada método, para fins de diagnose do RS, o melhor método é o CT enquanto para seleção de variedades o método CL apresenta-se mais eficiente.

O método FL foi aplicado só uma vez no ensaio R1 e apresentou resultados contraditórios, pois não identificou a variedade NA56-79 como suscetível.

5.5.2. Avaliação de resistência ao RS no campo II

O campo II foi planejado basicamente para a aplicação do método CL na seleção de variedades resistentes ao RS.

Apesar da contaminação das mudas sadias o método CL identificou nos ensaios R1, R2 e R3 o padrão CB47-355 e as variedades SP70-1143, SP71-1406, RB76-5418 e RB78-5148 como resistentes ao RS. Isto demonstra que o método CL possivelmente pode ser aplicado na seleção de variedades resistentes sem o uso de parcelas sadias, verificando-se

também o IC apresentado somente em parcelas inoculadas (doentes).

O método CT apresentou resultados semelhantes aos obtidos no método CL, confirmando a validade do seu uso na seleção de variedades resistentes ao RS, como recomendado por GILLASPIE Jr. *et alii* (1976).

A concordância entre os métodos CL e CT na seleção de variedades resistentes ao RS confirmou a resistência das variedades CB47-355, SP70-1143, SP71-1406, RB76-5418 e RB78-5148 e as informações do IAA-PLANALSUCAR (1988).

Devido à contaminação das mudas sadias, as avaliações das variedades suscetíveis, como NA56-79 e SP70-1078, ficaram prejudicadas, pois na realidade os testes estatísticos fizeram a comparação entre duas parcelas doentes da mesma variedade, e com isto demonstrou serem igualmente doentes.

Analisando-se estes resultados em associação com aqueles das tabelas 3 a 8 e figuras 1 a 5, verifica-se que as variedades NA56-79 e SP70-1078 não possuíam parcelas sadias no campo II e por isso os resultados dos testes estatísticos estão perfeitamente de acordo com os resultados esperados.

Fazendo-se idêntica análise nas variedades IAC64-257, SP70-1284 e SP71-6163, encontraram-se resultados contraditórios que exigem a repetição dos testes para a avaliação do nível de resistência ao RS. Muito provavelmente estas são variedades com resistência intermediária, que normalmente apresentam resultados inconstantes nos testes de resistência a doenças.

Com base nos resultados obtidos com o método CL usado no cálculo do IC na variedade IAC70-22, verifica-se que ela apresenta no ensaio R1 o mais alto índice de contaminação nas parcelas sadias e doentes, 49,45% e 40,0%

respectivamente, isto provavelmente pode indicar elevada suscetibilidade da variedade ao RS.

Os resultados globais da avaliação do método CL para seleção de variedades resistentes ao RS evidenciam que o método separa com eficiência as variedades resistentes e suscetíveis e apresenta resultados contraditórios nas variedades com resistência intermediária. Parece haver indícios de que o tipo de resistência predominante na cana-de-açúcar para o RS é quantitativa, haja vista que nas variedades resistentes o número de plantas com bactérias é sempre menor que nas variedades suscetíveis.

A eficiência do método CL sofre influência da idade do colmo, mostrando que a idade mínima deve ser superior a 9 meses de crescimento vegetativo.

6. CONCLUSÕES

Respeitando-se as condições experimentais usadas nos ensaios, os resultados estatísticos, discussão e revisão de literatura, foram obtidas as seguintes conclusões:

- Os métodos de diagnóstico do raquitismo da soqueira, coloração do xilema (CL) e observação da bactéria (CT) são equivalentes no diagnóstico do RS quando aplicados em colmos com idade e condições de manifestação dos distúrbios fisiológicos em que se baseiam.

- O método de coloração do xilema (CL) permitiu a seleção de variedades resistentes quando se compararam parcelas sadias e doentes dentro da mesma variedade, e apresentou indícios da possibilidade de comparar somente parcelas doentes se o IC(%) também for considerado.

- A simplicidade e o baixo custo do método CL permitem a recomendação para a seleção de variedades resistentes nos programas de melhoramento genético de variedades.

- O método de observação da bactéria (CT) mostrou ser de maior sensibilidade, pois foi capaz de detectar suscetibilidade de variedades em colmos na fase inicial do processo patológico.

- As variedades com resistência intermediária ao RS não são facilmente identificadas pelo método CL.

- A idade dos colmos interfere na eficiência do método CL e deve ser acrescida aos fatores descritos por CHAGAS(1986).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOT, E.V. El raquitismo del retoño de la caña de azúcar y forma de dominarlo. Boletim Oficial de la Asociacion de Tecnicos Azucareros de Cuba, Havana, 17:457-66, 1958.
- ANTOINE, R. A staining technique for detecting ratoon stunting disease in sugar cane. Nature, London, 181: 276-7, 1958.
- BAILEY, R.A. Some observations on the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. Proceedings of The South African Technologists' Association, Natal, 5:1-5, 1976.
- BAILEY, R.A. The systemic distribution and relative occurrence of bacteria in sugarcane varieties affected by ratoon stunting disease. Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association, Natal, 6(9):466-7, 1977.
- BAILEY, R.A. & FOX, P.H. A large-scale diagnostic service for ratoon stunting disease. Sugar Journal, New Orleans, 48(2): 12-7, 1985.
- BAUDIN, P. & CHATENET, M. Presence de la maladie du rabougrissement des repousses de la canne à sucre en Haute-Volta. Agronomie Tropicale, Paris, 38(3): 241-3, 1983.
- BEAL, J.M.; PRESTON, W.H.; MITCHEL, J.W. Use of 2,3,5-triphenil tetrazolium chloride to detect the presence of viruses in plants. Plant Disease Reporter, St. Paul, 39(7): 558-60, 1955.

- BECHET, G.R. Ratoon stunting disease and rapid diagnostic techniques. *The South African Sugar Journal*, Durban, 60(10):539-45, 1976.
- BETTI, J.A.; COSTA, A.S.; PARADELA, F.O.; SOAVE, J.; MATSUOKA, S. Descoloração vascular na região dos nós em capim elefante causada por várias espécies de bactérias. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 5(2): 139-47, 1980.
- CAMPOS, H. Testes apropriados a dados pareados, teste do sinal. In: CAMPOS, H. *Estatística experimental não-paramétrica*. 4.ed. Piracicaba, FEALQ, 1983. cap.3, p.65-76.
- CARDOSO, C.O.N. Isolamento da bactéria do raquitismo no Brasil. *Boletim Técnico COPERSUCAR*, São Paulo, 34:48-52, 1986.
- CHAGAS, P.R.R. Método de coloração do xilema, pelo fluxo transpiratório, aplicado na determinação da infecção do raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar. Piracicaba, 1986. 123p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- CHAGAS, P.R.R. & MATSUOKA, S. Medidas de controle do raquitismo da soqueira. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, 106(1): 40-4, 1988.
- CHAGAS, P.R.R. & TOKESHI, H. Método alternativo de coloração do índice de contaminação do raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, 106(4): 16-24, 1988.
- CHO, Y.S.; WILCOXSON, R.D.; FROSHEISER, F.I. Differences in anatomy, plant-extracts and movement of bacteria in plants of bacterial wilt resistant and susceptible varieties of alfafa. *Phytopathology*, St. Paul, 63: 760-5, 1973.

- COELHO, R.S.B. & RAMOS, R.L.B. Raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar: etiologia e controle através da resistência. Caderno Ômega, Recife, 4(1): 13-28, 1980.
- COOPERATIVA CENTRAL DOS PRODUTORES DE AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Novas variedades Copersucar. São Paulo, 1983. 59p. (Boletim técnico COPERSUCAR).
- COOPERATIVA CENTRAL DOS PRODUTORES DE AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Binômio tempo x temperatura no controle do raquitismo da soqueira (RSD) da cana-de-açúcar, pelo processo de termoterapia em gemas isoladas. São Paulo, 1989. 5p. (Cadernos COPERSUCAR, Série Melhoramento, 25).
- CRUZ, M.M. Avaliação de resistência ao raquitismo da soqueira pela vazão de água em colmos de cana-de-açúcar e a interferência da escaldadura das folhas no método. Piracicaba, 1983. 51p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- DAMANN Jr., K.E. Detection of ratoon stunting disease of sugarcane by metaxylem autofluorescence. Phytopathology, St. Paul, 73(3): 500, 1983.
- DAMANN Jr., K.E. Alkaline-induced metaxylem autofluorescence: a diagnostic symptom of ratoon stunting disease of sugarcane. Phytopathology, St. Paul, 78(2): 233-6, 1988.
- DAMANN Jr., K.E. & BENDA, G.T.A. Evaluation of commercial heat-treatment methods for control of ratoon stunting disease of sugarcane. Plant Disease, St. Paul, 67(9): 966-7, 1983.
- DAMANN Jr., K.E.; OGUNWOLU, E.O.; REAGAN, T.E. Incidence of ratoon stunting disease in Louisiana. Phytopathology, St. Paul, 74(5): 627, 1984.
- DAVIS, M.J. Water conduction in sugarcane varieties as related to resistance to RSD. Phytopathology, St. Paul, 75(10): 1176, 1985a.

- DAVIS, M.J. Direct-count techniques for enumerating *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* which causes ratoon stunting disease of sugarcane. *Phytopathology*, St. Paul, 75(11): 1226-31, 1985b.
- DAVIS, M.J. & DEAN, J.L. Comparison of diagnostic techniques for determining incidence of ratoon stunting disease in Florida. *Plant Disease*, St. Paul, 68(10): 896-9, 1984.
- DAVIS, M.J. & HARRISON, N.A. Hydraulic conductivity in sugarcane clones as related to resistance to RSD. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 6., Maryland, 1985. Abstracts. Derr Haag, Martinus Nighoff, 1985. p.613-6. (Current Plant Science on Biotechnology in Agriculture).
- DAVIS, M.J.; GILLASPIE Jr., A.G.; HARRIS, R.W.; LAWSON, R.H. Ratoon stunting disease of sugarcane: isolation of causal bacterium. *Sciences*, New York, 210(4476): 1365-7, 1980.
- DAVIS, R.E. Occurrence of a spiroplasma in corn stunt-infected plants in Mexico. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 57(4): 333-7, 1973.
- DEAN, J.L. Single-stool plots for estimating relative yield losses caused by ratoon stunting disease of sugarcane. *Plant Disease*, St. Paul, 67(1): 47-9, 1983.
- DHILLON, P.S.; KANWAR, R.S.; BEDI, J.S. Effect of moist hot air treatment on the control of GSD and RSD and productivity of sugarcane. *Indian Sugar Crops Journal*, Ghaziabad, 9(2): 3-6, 1983.
- DOUGLAS, R.A. Correlação entre vazão de água e resistência ao raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar. Piracicaba, 1981. 57p. (Mestrado- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- DUFRENOY, J. & PRATT, R. Histo-physiological localization of the site of reducing activity in stalks of sugarcane. *American Journal of Botany*, Columbus, 35(6): 333-4, 1948.
- ELGERSMA, D.M. Length and diameter of xylem vessels as factors in resistance of elms to *Ceratocystis ulmi*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, Wageningen, 76: 179-82, 1970.
- FARRAR, L.L. A chemical test for ratoon stunting disease of sugarcane. *Phytopathology*, St. Paul, 47:10, 1957.
- GHELLER, A.C.A. Avaliação da eficiência de dois sistemas de tratamento térmico para inativação da bactéria causadora do raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar. Piracicaba, 1986. 99p. (Mestrado- "Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GILLASPIE Jr., A.G. Evidence that ratoon stunting disease of sugarcane is caused by a virus and not mycoplasma. *Phytopathology*, St. Paul, 60: 1448-50, 1970.
- GILLASPIE Jr., A.G. Ratoon stunting disease of sugarcane: serology. *Phytopathology*, St. Paul, 68(3): 529-32, 1978.
- GILLASPIE Jr., A.G. Method for detecting *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* from sugarcane leaves. *Plant Disease*, St. Paul, 71(8): 691-3, 1987.
- GILLASPIE Jr., A.G. & HARRIS, R.W. Limitations of E.L.I.S.A. for detection of the RSD associated bacterium in sugarcane and sudangrass. *Sugarcane Pathologists' Newsletter*, Beltsville, 22: 25-8, 1979.
- GILLASPIE Jr., A.G. & TEAKLE, D.S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE Jr., A.G.; HUGHES, C.G. ed. *Diseases of sugarcane, major diseases*. Amsterdam, Elsevier, 1989. Cap. 4, p.58-80.

- GILLASPIE Jr.,A.G.; DAVIS,R.E.; WORLEY,J.F. Diagnosis of ratoon stunting disease based on presence of a specific microorganism. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 57(12): 987-90, 1973.
- GILLASPIE Jr.,A.G.; FLAX,G.; KOIKE,H. Relationship between numbers of diagnostic bacteria and injury by ratoon stunting disease in sugarcane. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 60(7): 573-5, 1976.
- GILLASPIE Jr.,A.G.; IRVINE,J.E.; STEERE,R.L. Ratoon stunting disease virus assay technique and partial purification. *Phytopathology*, St. Paul, 56: 1426-7, 1966.
- HARRIS,R.W. & GILLASPIE JR.,A.G. Immunofluorescent diagnosis of ratoon stunting disease. *Plant Disease Reporter*, St. Paul, 62(3): 193-6, 1978.
- HARRISON,N.A. & DAVIS,M.J. Infectivity titrations of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. *Plant Disease*, St. Paul, 70(6): 556-8, 1986.
- HARRISON,N.A. & DAVIS,M.J. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. *Phytopathology*, St. Paul, 78(6): 722-7, 1988.
- HUGHES,C.G. The economic importance of ratoon stunting disease. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 15., Durban, 1974. *Proceedings*, Durban, ISSCT,1974. v.1,p.213-7.
- INSTITUTO DO AÇÚCAR E DO ÁLCOOL. Novas variedades RB para a região centro sul do Brasil. Araras, 1988. 31p.
- KAO,J. & DAMANN Jr.,K.E. Microcolonies of the bacterium associated with RSD found in Sugarcane xylem matrix. *Phytopathology*, St. Paul, 68: 545-51, 1978.

- KAO, J. & DAMANN JR., K.E. In situ localization and morphology of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 58(3): 310-5, 1980.
- KOIKE, H.; GILLASPIE Jr., A.G.; BENDA, G.T.A. Cane yield response to ratoon stunting disease. *International Sugar Journal*, West Glamorgan, 84(1001): 131-3, 1982.
- LIAO, C.H. & CHEN, T.A. Isolation, culture and pathogenicity to sudan grass of a corynebacterium associated with ratoon stunting of sugarcane and with bermuda grass. *Phytopathology*, St. Paul, 71(12): 1303-6, 1981.
- LIU, L.J.; CORTÉS-MONLLOR, A.; MARAMOROSCH, K.; HIRUMI, H.; PÉREZ, J.E.; BIRD, J. Isolation of an organism resembling *Xanthomonas vasculorum* from sugarcane affected by ratoon stunting disease. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 15., Durban, 1974. *Proceedings*, Durban, ISSCT, 1974. v.1, p.234-40.
- LOUISIANA COOPERATIVE EXTENSION SERVICE. Controlling ratoon stunting disease in sugar cane. *The Sugar Bulletin*, New Orleans, 64(23): 12-8, 1986.
- MCNABB, H.S.; HEYBROEK, H.M.; MACDONALD, W.S. Anatomical factors in resistance to Dutch elm disease. *Netherland Journal of Plant Pathology*, Wageningen, 76: 194-204, 1970.
- MATSUOKA, S. Raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar: diagnose da moléstia e estudos sobre o seu agente causal. Piracicaba, 1972. 77p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- MATSUOKA, S. Microplots for screening sugarcane varieties for tolerance to ratoon stunting disease. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 17., Manila, 1980. *Proceedings*, Manila, ISSCT, 1980. p.1628-38.

- MATSUOKA, S. Benefícios da prática de tratamento térmico da muda de cana-de-açúcar e eficiência dos dois métodos existentes no Brasil. *Cadernos PLANALSUCAR*, Piracicaba, 3(3): 22-4, 1984.
- NAYIAGER, M.P.; OELLERMANN, R.A.; ROTH, G. The isolation, culture and morphology of the bacteria associated with RSD of sugarcane. *Journal of Phytopathology*, Hamburg, 99: 273-81, 1980.
- OELLERMANN, R.A. & PILLAY, D. Immunological methods for the detection of a coryneform isolated from ratoon stunted sugarcane. *Journal of Phytopathology*, Hamburg, 118: 59-67, 1987.
- OELLERMANN, R.A.; SEETAL, A.; PILLAY, D.; ROTH, G. Preparation and characterization of membranes from a coryneform isolated from ratoon stunted sugarcane. *Journal of Phytopathology*, Hamburg, 118: 50-8, 1987.
- PILLAY, D. & OELLERMANN, R.A. E.L.I.S.A. of a coryneform isolated from RSD. *Journal of Phytopathology*, Hamburg, 121(2): 166-74, 1988.
- PLAVSIC-BANJAC, B. & MARAMOROSCH, K. Electron microscopy of the xylem of ratoon stunted sugarcane. *Phytopathology*, St. Paul, 65(5): 498-9, 1972.
- RAM, R.B.; MISRA, S.R.; SINGH, K. Comparative efficiency of three inoculation techniques for RSD of sugarcane. *Indian Sugar*, New Delhi, 32(11): 785-90, 1983.
- RICAUD, C. Problems in the diagnosis of ratoon stunting disease. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 15., Durban, 1974. *Proceedings*. Durban, ISSCT, 1974. v.1, p.241-8.
- RICAUD, C.; SULLIVAN, S.; AUTREY, J.C. Systemic infection of sugarcane by bacterium associated with symptoms of ratoon stunting disease. *Revue Agricole et Sucriere de l'le Maurice, Reduit*, 55:37-9, 1975.

- RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE Jr., A.G.; HUGHES, C.G. Sugarcane diseases and their world distribution. In: _____, ed. Diseases of sugarcane; major diseases. Amsterdam, Elsevier, 1989. cap.22, p.341-76.
- ROBINSON, R.A. Clonal field crops. In: _____, ed. Host management in crop pathosystems. New York, Mac Millan Publishing Company, 1987. cap.11, p.185-202.
- SANGUINO, A. Principais moléstias da cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B. Cana-de-açúcar; cultivo e utilização. Campinas, Fundação Cargill, 1987. cap.6, p.741-57.
- SANGUINO, A.; MORAES, V.A.; SANTOS, O.T. Diagnóstico do raquitismo da soqueira em colmos de cana-de-açúcar. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRÔNOMICA, 2., Piracicaba, 1984. Anais. São Paulo, COPERSUCAR, 1984. p.250-3.
- SILVA, W.M. Termoterapia em gemas isoladas assegura o controle do raquitismo. Boletim Técnico COPERSUCAR, São Paulo, (1):12-5, 1976a.
- SILVA, W.M. Novo equipamento aperfeiçoa termoterapia de gemas. Boletim Técnico COPERSUCAR, São Paulo, (3):2, 1976b.
- SINGH, G.R. An indicator sugarcane variety for ratoon stunting disease. Current Science, Bangalore, 38(9): 221-2, 1969.
- STEINDL, D.R.L. Ratoon stunting disease. In: MARTIN, J.P.; ABBOT, E.V.; HUGHES, C.G., ed. Sugarcane diseases of the world. Amsterdam, Elsevier, 1961. v.1, cap. 20, p.433-59.
- STEINDL, D.R.L. The use of phase contrast microscopy in the identification of ratoon stunting disease. In: QUEENSLAND SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 43., Cairns, 1976. Proceedings. Brisbane, Watson Ferguson, 1976. p.71-2.

- STEINDL,D.R.L. & TEAKLE,D.S. Recent developments in the identification of ratoon stunting disease. In: CONGRESS OF THE QUEENSLAND SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 1974. Proceedings, Queensland, QSSCT, 1974. p.101-4.
- SUDO,S. Bactérias associadas ao raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) e avaliação do capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) como indicadora. Piracicaba, 1980. 86p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- TANIMOTO,T. Microtome slice projections for histological examination of sugarcane. Hawaiian Planters' Records, Honolulu, 57(2): 119-32, 1964.
- TEAKLE,D.S. The causal agent of sugarcane ratoon stunting disease (RSD). In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 15., Durban,1974. Proceedings, Durban, ISSCT, 1974. v.1, p..225-31.
- TEAKLE,D.S. The sugarcane ratoon stunting disease bacterium. In: FAHY,P.C. & PERSLEY,G.J., ed. Plant bacterial diseases; a diagnostic guide. North Ryde, Academic Press,1983. Cap. 11, p.247-57.
- TEAKLE,D.S.; APPLETON,J.M.; STEINDL,D.R. An anatomical basis for resistance of sugarcane to ratoon stunting disease. Physiological Plant Pathology, London, 12: 83-91, 1978.
- TEAKLE,D.S.; SMITH,P.M.; STEINDL,D.R.L. Association of a small coryneform bacterium with the ratoon stunting disease of sugarcane. Australian Journal of Agricultural Research, East Melbourne, 24: 869-74, 1973.
- TEAKLE,D.S.; SMITH,P.M.; STEINDL,D.R.L. Ratoon stunting disease of sugarcane: possible correlation of resistance with vascular anatomy. Phytopathology, St. Paul, 65(2): 138-41, 1975.

- TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F., coord. *Manual de fitopatologia*. São Paulo, Agronômica Ceres, 1980. v.2, cap.12, p.141-206.
- TOKESHI, H. Carvão da cana-de-açúcar *Ustilago scitaminea*. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 9: 98-110, 1983.
- TOKESHI, H. Ferrugem da cana-de-açúcar: epidemias, mecanismo de resistência de variedades brasileiras. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 7., Botucatu, 1984. *Simpósios*, 1984. p.10-28.
- TOKESHI, H. Ferrugem da cana-de-açúcar, perigo potencial para o Nordeste. *Revista da Sociedade de Técnicos Açucareiros do Brasil*, Piracicaba, 4(3): 28-32, 1986a.
- TOKESHI, H. Occurrence or not of physiological races of *Xanthomonas albilineans* in sugarcane. *Revista dos Técnicos Açucareiros do Brasil*, Piracicaba, 4(6): 64-7, 1986b.
- TOKESHI, H.; SANGUINO, A.; AKIBA, F. *Xanthomonas albilineans*, provável agente causal de raquitismo da soqueira e escaldadura da cana-de-açúcar. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, 84(6): 28-40, 1974.
- VALARINI, P.J. Avaliação da resistência ao raquitismo da soqueira pelo método da vazão de água em colmos de cana-de-açúcar. Piracicaba, 1978. 78p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- VALARINI, P.J. & TOKESHI, H. Factors that interfere in evaluation of ratoon stunting disease resistance by water flow in sugarcane stalks. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 7(3/4): 51-6, 1981.
- VEIGA, F.M. Notas sobre o raquitismo das socas em campos. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, 47(1): 81-3, 1956.

WARAITCH,K.S. Control of sugarcane diseases with hot air treatment nd their build up in subsequent crops. Indian Sugar, New Delhi, 34(6): 509-13, 1984.

WEAVER,L.; TEAKLE,D.S.; HAYWARD,A.C. Ultrastructural studies on the bacterium associated with the ratoon stunting disease of sugarcane. Australian Journal of Agricultural Research, East Melbourne, 28:843-52, 1977.

WORLEY,J.F. & GILLASPIE Jr.,A.G. Electron microscopy in situ of the bacterium associated with ratoon stunting disease in sudangrass. Phytopathology, St. Paul, 65(3): 287-95, 1975.

Apêndice 1. Croqui do campo I (Fitopatologia)

CROQUI : CAMPO I (FITOPATOLOGIA)

LEGENDA :

S = PARCELA SADIA
D = PARCELA DOENTE

Apêndice 2. Croqui do campo II (Cooperativa)

CROQUI : CAMPO II (COOPERATIVA)

SP70-1284	S	_____
	D	_____

IAC 7022	S	_____
	D	_____

RD78-8148	S	_____
	D	_____

RD76-8418	S	_____
	D	_____

SP71-8163	S	_____
	D	_____

SP70-1143	S	_____
	D	_____

IAC 64-257	S	_____
	D	_____

NA56-79	S	_____
	D	_____

SP 70-1078	S	_____
	D	_____

SP71-1408	S	_____
	D	_____

CB47-355	S	_____
	D	_____

Apêndice 3: Dados obtidos do campo I (Fitopatologia) no Ensaio R₁ (Data: 26/4/89)

VARIEDADE: CB47-355

COLORAÇÃO (CL)				FLUORESCÊNCIA (FL)	
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	5 (3)	4 (2) (-)	(3)	(3)	(2)
2.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)	(2)
3.	4 (2) (-)	5 (3)	(3)	(3)	(2)
4.	5 (3)	4 (2) (-)	(3)	(3)	(3)
5.	5 (3) (-)	4 (2) (-)	(1)	(3)	(3)
6.	4 (2)	4 (2) (-)	(3)	(3)	(2)
7.	4 (2) (-)	4 (2)	(3)	(3)	(2)
8.	4 (2)	5 (3) (-)	(3)	(3)	(2)
9.	3 (2) (-)	5 (3)	(3)	(3)	(2)
10.	5 (3) (-)	4 (2) (-)	(2)	(2)	(3)
11.	5 (3)	5 (3)	(1)	(1)	(1)
12.	3 (2)	4 (2)	(1)	(1)	(1)
13.	2 (1)	4 (2)	(1)	(1)	(1)
14.	5 (3)	3 (2)	(1)	(3)	(3)
15.	6 (3)	4 (2)	(2)	(1)	(1)
16.	2 (1)	4 (2)	(1)	(1)	(1)
17.	5 (3)	5 (3)	(1)	(1)	(1)
18.	4 (2)	5 (3)	(2)	(1)	(1)
19.	6 (3)	6 (3)	(1)	(2)	(2)
20.	4 (2)	5 (3)	(1)	(2)	(2)
21.	6 (3) (-)	4 (2) (-)	(3)	(3)	(3)
22.	6 (3) (-)	5 (3) (-)	(2)	(3)	(3)
23.	4 (2)	4 (2) (-)	(3)	(2)	(2)
24.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)	(3)
25.	5 (3) (-)	5 (3)	(3)	(3)	(3)
26.	5 (3)	5 (3) (-)	(3)	(3)	(3)
27.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)	(3)
28.	4 (2) (-)	3 (2)	(2)	(3)	(3)
29.	5 (3)	3 (2)	(3)	(2)	(2)
30.	4 (2) (-)	4 (2) (-)	(2)	(2)	(2)

VARIEDADE: NA56-79

COLORAÇÃO (CL)				FLUORESCÊNCIA (FL)	
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	5 (3) (-)	3 (2) (-)	(3)	(1)	(1)
2.	5 (3) (-)	5 (3)	(1)	(3)	(3)
3.	5 (3) (-)	4 (2) (-)	(2)	(2)	(2)
4.	5 (3)	5 (3) (-)	(3)	(2)	(2)
5.	5 (3)	5 (3)	(3)	(2)	(2)
6.	5 (3) (-)	3 (2) (-)	(2)	(3)	(3)
7.	5 (3)	4 (2) (-)	(3)	(1)	(1)
8.	5 (3)	5 (3)	(2)	(2)	(2)
9.	4 (2) (-)	4 (2)	(3)	(2)	(2)
10.	5 (3)	4 (2) (-)	(3)	(2)	(2)
11.	5 (3)	4 (2)	(1)	(1)	(1)
12.	6 (3)	3 (2)	(2)	(1)	(1)
13.	4 (2)	4 (2)	(1)	(1)	(1)
14.	6 (3)	5 (3)	(2)	(2)	(2)
15.	5 (3)	4 (2)	(3)	(1)	(1)
16.	6 (3)	3 (2)	(2)	(2)	(2)
17.	6 (3)	3 (2)	(1)	(1)	(1)
18.	4 (2)	4 (2)	(2)	(2)	(2)
19.	5 (3)	4 (2)	(2)	(2)	(2)
20.	5 (3)	4 (2)	(1)	(2)	(2)
21.	6 (3) (-)	5 (3)	(3)	(2)	(2)
22.	5 (3)	5 (3) (-)	(3)	(2)	(2)
23.	4 (2) (-)		(2)	(2)	(2)
24.	6 (3)	4 (2) (-)	(3)	(2)	(2)
25.	5 (3)	4 (2)	(3)	(2)	(2)
26.	5 (3) (-)	4 (2)	(3)	(2)	(2)
27.	5 (3) (-)	4 (2) (-)	(2)	(2)	(2)
28.	4 (2) (-)	4 (2) (-)	(2)	(2)	(2)
29.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)	(3)
30.	6 (3)	5 (3) (-)	(2)	(2)	(2)

Apêndice 3: Dados obtidos do campo I (Fitopatologia) no Ensaio R₁ (Data: 26/4/89)

VARIEDADE: SP70-1078

COLORAÇÃO (CL)		FLUORESCÊNCIA (FL)	
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1. 5 (3) (-)	4 (2) (+)	(3)	(1)
2. 5 (3)	5 (3) (+)	(2)	(1)
3. 5 (3) (-)	5 (3)	(2)	(2)
4. 5 (3)	5 (3) (+)	(3)	(1)
5. 5 (3) (-)	4 (2) (+)	(2)	(1)
6. 4 (2) (-)	5 (3)	(3)	(1)
7. 5 (3)	4 (2) (+)	(3)	(1)
8. 5 (3) (-)	4 (2) (+)	(2)	(1)
9. 5 (3)	4 (2) (+)	(3)	(1)
10. 5 (3) (-)	4 (2) (+)	(2)	(3)
11. 5 (3)	5 (3)	(1)	(1)
12. 5 (3)	4 (2)	(1)	(1)
13. 4 (2)	5 (3)	(3)	(1)
14. 5 (3)	5 (3)	(1)	(1)
15. 5 (3)	5 (3)	(2)	(1)
16. 5 (3)	3 (2)	(1)	(1)
17. 5 (3)	3 (2)	(3)	(1)
18. 5 (3)	2 (1)	(1)	(1)
19. 5 (3)	5 (3)	(2)	(1)
20.	3 (2)		(1)
21. 5 (3) (-)	4 (2) (+)	(2)	(1)
22. 5 (3) (-)	3 (2)	(2)	(1)
23. 5 (3)	5 (3) (+)	(3)	(1)
24. 5 (3) (-)	4 (2)	(3)	(1)
25. 5 (3)	4 (2)	(3)	(1)
26. 5 (3)	4 (2)	(3)	(1)
27. 5 (3) (-)	4 (2) (+)	(3)	(1)
28. 5 (3)	3 (2)	(3)	(1)
29. 5 (3)	4 (2)	(2)	(1)
30. 5 (3)	5 (3) (+)	(2)	(1)

- Valores de 1 a 6: notas originais baseadas na escala proposta por CHAGAS (1986).

- Valores entre parênteses: classe de notas utilizadas na análise estatística.

- Sinal (+) ou (-): amostras onde avaliou-se a presença (+) ou ausência (-) da bactéria do RS.

Apêndice 4: Dados obtidos do campo II (Cooperativa) no ensaio R₁ (data:21/9/89)

VARIETADE:CB47-355

COLORAÇÃO (CL)				FLUORESCÊNCIA (FL)	
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	5(3)		6(3)	(3)	(3)
2.	6(3)		6(3)	(3)	(3)
3.	5(3)		6(3)	(3)	(3)
4.	5(3)		5(3)	(2)	(3)
5.	4(2) (-)		5(3)	(3)	(3)
6.	4(2)		5(3) (-)	(3)	(2)
7.	6(3)		6(3)	(3)	(3)
8.	5(3)		6(3)	(3)	(3)
9.	3(2)		5(3) (-)	(3)	(1)
10.	5(3)		6(3)	(3)	(3)
11.	6(3) (-)		6(3)	(3)	(3)
12.	6(3) (-)		6(3)	(2)	(3)
13.	6(3)		6(3)	(3)	(3)
14.	6(3)		6(3)	(3)	(1)
15.	6(3)		6(3) (-)	(3)	(3)
16.	5(3)		6(3)	(3)	(3)
17.	5(3)		6(3)	(3)	(2)
18.	6(3) (-)		6(3) (-)	(2)	(3)
19.	3(2)		6(3)	(3)	(3)
20.	6(3)		6(3) (-)	(3)	(3)
21.	5(3) (-)		5(3)	(2)	(2)
22.	5(3) (-)		5(3) (-)	(3)	(1)
23.	6(3)		5(3) (-)	(2)	(3)
24.	5(3)		5(3) (-)	(2)	(2)
25.	3(2) (-)		5(3) (-)	(3)	(2)
26.	5(3)		5(3)	(3)	(2)
27.	3(2) (-)		4(2)	(2)	(2)
28.	4(2) (-)		4(2) (-)	(2)	(1)
29.	4(2)		4(2)	(2)	(1)
30.	5(3)		5(3)	(2)	(1)

VARIETADE INC64-257

COLORAÇÃO (CL)				FLUORESCÊNCIA (FL)	
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	4(2)		4(2)	(3)	(3)
2.	4(2)		5(3)	(3)	(3)
3.	5(3)		5(3)	(3)	(3)
4.	5(3) (-)		5(3)	(3)	(3)
5.	4(2)		3(2) (+)	(3)	(3)
6.	5(3)		5(3)	(3)	(3)
7.	5(3)		3(2)	(3)	(3)
8.	4(2)		4(2) (-)	(3)	(3)
9.	4(2)		4(2)	(3)	(3)
10.	4(2)		5(3)	(3)	(3)
11.	5(3)		4(2) (-)	(3)	(2)
12.	5(3) (-)		4(2) (-)	(3)	(3)
13.	5(3) (-)		5(3)	(1)	(3)
14.	5(3)		5(3)	(3)	(3)
15.	5(3)		5(3)	(3)	(3)
16.	5(3)		4(2) (-)	(3)	(2)
17.	4(2)		5(3)	(3)	(3)
18.	5(3)		5(3)	(3)	(3)
19.	5(3)		4(2)	(3)	(3)
20.	5(3) (-)		4(2)	(2)	(3)
21.	5(3) (-)		3(2)	(1)	(2)
22.	3(2) (-)		3(2)	(3)	(2)
23.	4(2)		4(2) (-)	(2)	(2)
24.	4(2) (-)		4(2) (-)	(1)	(3)
25.	4(2) (-)		4(2)	(2)	(2)
26.	3(2) (-)		3(2)	(2)	(2)
27.	5(3) (-)		5(3) (-)	(3)	(2)
28.	4(2)		4(2) (-)	(2)	(1)
29.	3(2)		3(2) (-)	(3)	(1)
30.	5(3)		3(2) (-)	(1)	(2)

Apêndice 4: Dados obtidos do campo II (Cooperativa) no ensaio R₁ (data: 21/9/89)

VARIETADE IAC70-22

	COLORAÇÃO (CL)		FLUORESCÊNCIA (FL)	
	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	3(2) (-)	4(2)	(2)	(3)
2.	3(2)	3(2)	(3)	(3)
3.	2(1)	4(2)	(3)	(3)
4.	3(2)	5(3)	(3)	(3)
5.	4(2)	4(2)	(3)	(3)
6.	4(2)	1(1) (+)	(3)	(3)
7.	5(3)	4(2) (-)	(3)	(2)
8.	2(1) (-)	4(2)	(2)	(2)
9.	2(1) (-)	4(2) (-)	(3)	(2)
10.	3(2)	4(2)	(3)	(3)
11.	3(2) (+)	5(3) (-)	(2)	(3)
12.	1(1) (+)	5(3)	(2)	(3)
13.	2(1) (-)	3(2) (-)	(3)	(2)
14.	2(1) (-)	5(3) (-)	(1)	(1)
15.	2(1) (-)	3(2)	(2)	(3)
16.	3(2) (-)	3(2)	(3)	(3)
17.	5(3) (-)	5(3) (-)	(2)	(2)
18.	3(2) (-)	3(2) (-)	(2)	(2)
19.	5(3) (-)	3(2) (-)	(3)	(2)
20.	2(1) (-)	3(2) (-)	(1)	(3)
21.	2(1) (-)	5(3) (-)	(1)	(1)
22.	2(1) (-)	2(1) (-)	(3)	(1)
23.	4(2) (-)	2(1) (-)	(1)	(2)
24.	2(1) (-)	5(3) (-)	(2)	(2)
25.	3(2) (-)	4(2) (-)	(1)	(1)
26.	4(2) (-)	4(2) (-)	(2)	(2)
27.	4(2)	2(1)	(2)	(2)
28.	4(2)	3(2) (-)	(2)	(3)
29.	3(2) (-)	4(2) (-)	(2)	(3)
30.	4(2)	2(1)	(2)	(2)

VARIETADE NA56-79

	COLORAÇÃO (CL)		FLUORESCÊNCIA (FL)	
	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	4(2) (-)	4(2)	(2)	(3)
2.	3(2)	4(2) (+)	(3)	(3)
3.	4(2)	4(2)		(3)
4.	3(2)	3(2)	(3)	(3)
5.	3(2) (-)	4(2)	(2)	(3)
6.	4(2)	4(2) (-)		(2)
7.	4(2) (-)	2(1) (+)	(3)	(1)
8.	3(2) (-)	5(3)	(3)	(3)
9.	5(3)	4(2)	(3)	(3)
10.	4(2)	5(3) (-)	(2)	(2)
11.	5(3)	5(3) (-)	(3)	(2)
12.	5(3) (-)	3(2) (+)	(2)	(1)
13.	5(3)	3(2) (+)	(3)	(2)
14.	6(3)	5(3) (-)	(3)	(2)
15.	5(3)	4(2)	(3)	(3)
16.	5(3) (-)	5(3) (-)	(2)	(3)
17.	5(3) (-)	3(2) (+)	(2)	(1)
18.	6(3) (-)	5(3) (-)	(1)	(2)
19.	4(2) (-)	6(3)	(2)	(3)
20.	5(3) (-)	5(3) (-)	(3)	(2)
21.	5(3) (-)	3(2)	(3)	(2)
22.	1(1) (-)	4(2) (+)	(1)	(1)
23.	5(3)	3(2) (-)	(2)	(2)
24.	5(3) (-)	3(2) (-)	(2)	(3)
25.	5(3) (-)	4(2)	(1)	(2)
26.	3(2)	5(3) (-)	(2)	(2)
27.	3(2) (-)	3(2)	(2)	(2)
28.	5(3)	4(2) (-)	(2)	(2)
29.	4(2) (-)	5(3) (-)	(1)	(3)
30.	5(3)	2(1) (-)	(2)	(2)

Apêndice 4: Dados obtidos do campo II (Cooperativa) no ensaio R₁ (data: 21/9/89)

VARIETADE SP70-1078

COLORAÇÃO (CL)				FLUORESCÊNCIA (FL)	
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	4(2)	5(3)		(3)	(3)
2.	5(3) (+)	5(3)		(2)	(3)
3.	5(3)	3(2)		(3)	(3)
4.	2(1) (-)	4(2) (+)		(3)	(1)
5.	5(3) (-)	5(3) (-)		(2)	(2)
6.	4(2)	3(2) (+)		(3)	(1)
7.	5(3) (-)	5(3)		(3)	(3)
8.	4(2)	5(3) (-)		(3)	(2)
9.	4(2)	5(3) (-)		(3)	(3)
10.	6(3)	5(3) (+)		(3)	(1)
11.	5(3)	5(3)		(3)	(3)
12.	4(2) (-)	4(2)		(3)	(2)
13.	5(3)	2(1) (+)		(3)	(1)
14.	5(3)	3(2) (+)		(3)	(1)
15.	5(3)	5(3)		(3)	(3)
16.	5(3)	4(2) (+)		(3)	(1)
17.	5(3)	5(3)		(3)	(3)
18.	5(3) (-)	1(1) (-)		(3)	(1)
19.	5(3)	2(1) (-)		(3)	(3)
20.	3(2)	5(3)		(3)	(2)
21.	5(3) (-)	5(3) (-)		(3)	(1)
22.	4(2)	5(3) (-)		(3)	(2)
23.	3(2) (-)	3(2) (-)		(3)	(2)
24.	5(3) (-)	1(1) (+)		(2)	(3)
25.	4(2)	3(2) (-)		(2)	(2)
26.	3(2)	2(1) (+)		(2)	(2)
27.	4(2) (-)	3(2)		(1)	(2)
28.	6(3) (-)	4(2)		(2)	(2)
29.	3(2) (-)	2(2)		(2)	(2)
30.	4(2)	5(3)		(2)	(2)

VARIETADE SP70-1143

COLORAÇÃO (CL)				FLUORESCÊNCIA (FL)	
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	4(2)			(3)	(3)
2.	5(3)	5(3) (-)		(3)	(3)
3.	3(2) (-)	4(2) (-)		(3)	(3)
4.	5(3)	5(3)		(3)	(3)
5.	5(3)	5(3)		(3)	(3)
6.	6(3)	5(3)		(3)	(3)
7.	5(3)	5(3)		(3)	(3)
8.	5(3)	5(3)		(3)	(3)
9.	5(3) (-)	5(3)		(3)	(3)
10.	4(2) (-)	5(3)		(3)	(3)
11.	5(3) (-)	4(2) (-)		(1)	(2)
12.	5(3)	5(3) (-)		(3)	(1)
13.	5(3) (-)	5(3)		(2)	(3)
14.	5(3)	5(3)		(3)	(3)
15.	4(2) (-)	5(3)		(2)	(3)
16.	5(3)	5(3) (+)		(3)	(1)
17.	5(3) (-)	5(3) (-)		(3)	(2)
18.	6(3) (-)	5(3)		(2)	(3)
19.	5(3)	5(3)		(3)	(1)
20.	4(2) (-)	5(3)		(3)	(3)
21.	5(3) (-)	4(2) (-)		(1)	(1)
22.	5(3) (-)	5(3) (-)		(2)	(2)
23.	4(2)	5(3)		(1)	(2)
24.	5(3)	5(3)		(2)	(2)
25.	4(2) (-)	4(2)		(1)	(1)
26.	4(2) (-)	4(2)		(1)	(1)
27.	5(3)	5(3) (-)		(1)	(1)
28.	4(2)	4(2)		(1)	(1)
29.	5(3)	4(2) (-)		(1)	(1)
30.	5(3)	4(2) (-)		(2)	(2)

111

Apêndice 4: Dados obtidos do campo II (Cooperativa) no ensaio R₁ (data: 21/9/89)

VARIEDADE SP71-1106

	COLORAÇÃO (Cl.)		DOENTE	FLUORESCÊNCIA (Fl.)	
	SADIA	DOENTE		SADIA	DOENTE
1.	4(2)	5(3)		(3)	(3)
2.	3(2) (+)	5(3)		(3)	(3)
3.	5(3)	4(2) (-)		(3)	(3)
4.	5(3)	5(3)		(3)	(3)
5.	5(3)	5(3)		(3)	(3)
6.	5(3)	5(3)		(2)	(3)
7.	4(2)	5(3)		(3)	(3)
8.	5(3) (-)	5(3)		(2)	(3)
9.	4(2)	4(2)		(3)	(2)
10.	5(3)	5(3)		(3)	(3)
11.	5(3) (-)	5(3) (-)		(2)	(2)
12.	5(3) (-)	5(3)		(2)	(3)
13.	5(3) (-)	6(3)		(2)	(2)
14.	5(3) (-)	5(3)		(3)	(1)
15.	6(3) (-)	6(3) (-)		(2)	(3)
16.	6(3) (-)	5(3)		(3)	(3)
17.	6(3)	5(3) (-)		(3)	(1)
18.	6(3) (-)	5(3)		(2)	(3)
19.	6(3) (-)	5(3) (-)		(1)	(2)
20.	3(2) (+)	6(3) (-)		(2)	(2)
21.	5(3)			(1)	(1)
22.	4(2)	3(2) (-)		(2)	(1)
23.	5(3) (-)	4(2) (-)		(2)	(2)
24.	5(3) (-)	5(3)		(1)	(2)
25.	4(2)	3(2)		(2)	(3)
26.	4(2)	4(2)		(2)	(2)
27.	4(2)	4(2) (-)		(2)	(1)
28.	4(2)	3(2) (-)		(2)	(3)
29.	3(2) (-)	4(2)		(1)	(2)
30.	5(3)	4(2) (-)		(2)	(1)

VARIEDADE SP70-1204

	COLORAÇÃO (Cl.)		DOENTE	FLUORESCÊNCIA (Fl.)	
	SADIA	DOENTE		SADIA	DOENTE
1.	5(3) (-)	5(3) (-)		(2)	(3)
2.	5(3) (-)	5(3)		(3)	(3)
3.	5(3)	2(1)		(3)	(2)
4.	3(2) (-)	5(3)		(2)	(3)
5.	3(2) (-)	3(2) (+)		(3)	(2)
6.	4(2) (-)	4(2)		(2)	(1)
7.	5(3)	5(3) (-)		(3)	(2)
8.	4(2) (-)	5(3) (-)		(3)	(2)
9.	3(2)	4(2)		(3)	(3)
10.	3(2) (-)	4(2)		(2)	(3)
11.	3(2)	4(2)		(2)	(2)
12.	4(2) (-)	5(3) (+)		(1)	(3)
13.	5(3) (-)	4(2)		(3)	(2)
14.	4(2)	5(3) (-)		(1)	(2)
15.	5(3) (-)	3(2) (+)		(1)	(3)
16.	4(2) (-)	2(1) (-)		(3)	(3)
17.	5(3)	5(3)		(1)	(2)
18.	4(2) (-)	4(2) (-)		(2)	(2)
19.	4(2)	5(3)		(2)	(2)
20.	3(2) (-)	5(3)		(2)	(3)
21.	4(2)	3(2) (-)		(3)	(3)
22.	4(2)	4(2) (+)		(3)	(2)
23.	4(2)	3(2)		(3)	(3)
24.	3(2) (-)	5(3)		(3)	(1)
25.	3(2)	4(2) (-)		(2)	(3)
26.	4(2)	4(2)		(3)	(2)
27.	3(2)	3(2) (-)		(3)	(2)
28.	3(2)	4(2)		(1)	(2)
29.	3(2)	4(2)		(2)	(2)
30.	4(2)	5(3)		(3)	(3)

Apêndice 4: Dados obtidos do campo II (Cooperativa) no ensaio R₁ (data: 21/9/89)

VARIEDADE RH76-5418

VARIEDADE SP71-6163

COLORAÇÃO (CL)				FLUORESCÊNCIA (FL)			
SADIA		DOENTE		SADIA		DOENTE	
1.	3(2)	4(2)		3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
2.	3(2)	2(1)	(-)	3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
3.	5(3)	5(3)	(-)	3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
4.	5(3)	4(2)		3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
5.	4(2)	4(2)	(-)	3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
6.	5(3)	4(2)	(-)	3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
7.	3(2)	4(2)	(-)	3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
8.	3(2)	2(1)		3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
9.	4(2)	4(2)	(-)	3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
10.	4(2)	4(2)	(-)	3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
11.	5(3)	2(1)	(-)	3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
12.	4(2)	3(2)	(-)	3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
13.	4(2)	4(2)		3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
14.	5(3)	4(2)		3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
15.	4(2)	4(2)		3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
16.	5(3)	5(3)		3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
17.	5(3)	4(2)	(-)	3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
18.	4(2)	3(2)	(-)	3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
19.	4(2)	3(2)		3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
20.	4(2)	4(2)	(+)	3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
21.	5(3)	4(2)	(-)	3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
22.	2(1)	2(1)	(-)	3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
23.	4(2)	4(2)		3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
24.	5(3)	4(2)		3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
25.	5(3)	4(2)		3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
26.	5(3)	4(2)		3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
27.	4(2)	4(2)		3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
28.	6(3)	1(1)		3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
29.	4(2)	5(3)		3(2)	3(2)	3(2)	3(2)
30.	5(3)	4(2)		3(2)	3(2)	3(2)	3(2)

Apêndice 4: Dados obtidos do campo II (Cooperativa) no ensaio R₁ (data: 21/9/89)

VARIEDADE RB78-5148

	COLORAÇÃO (CL)		FLUORESCÊNCIA (FL)	
	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)
2.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
3.	4 (2)	5 (3)	(3)	(3)
4.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)
5.	5 (3) (+)	5 (3) (-)	(3)	(3)
6.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
7.	4 (2)	5 (3)	(3)	(3)
8.	4 (2)	4 (2)	(3)	(3)
9.	4 (2)	5 (3) (-)	(3)	(1)
10.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
11.	5 (3) (-)	3 (2) (+)	(2)	(3)
12.	4 (2) (-)	3 (2) (-)	(2)	(2)
13.	5 (3) (-)	4 (2) (+)	(3)	(3)
14.	4 (2) (-)	5 (3)	(3)	(3)
15.	4 (2) (-)	5 (3) (-)	(2)	(3)
16.	4 (2)	3 (2)	(2)	(3)
17.	5 (3) (-)	5 (3) (-)	(2)	(2)
18.	5 (3) (-)	4 (2)	(2)	(3)
19.	4 (2) (-)	4 (2) (-)	(2)	(2)
20.	5 (3)	4 (2) (-)	(3)	(1)
21.	5 (3) (-)	3 (2) (-)	(1)	(3)
22.	5 (3) (-)	2 (1) (+)	(3)	(1)
23.	5 (3) (-)	5 (3) (-)	(2)	(1)
24.	5 (3)	4 (2)	(2)	(2)
25.	5 (3)	4 (2)	(1)	(2)
26.	5 (3)	4 (2) (-)	(2)	(2)
27.	4 (2) (-)	4 (2)	(2)	(2)
28.	4 (2)	4 (2)	(2)	(2)
29.	5 (3)	5 (3)	(1)	(3)
30.	5 (3)	4 (2) (-)	(1)	(1)

- Valores de 1 a 6: notas originais baseadas na escala proposta por CHAGAS (1986).

- Valores entre parênteses: classe de notas utilizadas na análise estatística.

- Sinal (+) ou (-): amostras onde avaliou-se a presença (+) ou ausência (-) da bactéria do RS.

Apêndice 5: Dados obtidos de campo I (Fitopatologia)
no ensaio R_2 (data: 02/4/90)

115

VARIEDADE: CB47-355

COLORAÇÃO (CL)		CONTAGEM (CT)	
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	5(3)	5(3)	(3)
2.	5(3)	5(3)	(3)
3.	5(3)	5(3)	(3)
4.	6(3)	5(3)	(3)
5.	6(3)	5(3)	(3)
6.	5(3)	5(3)	(3)
7.	5(3)	5(3)	(1)
8.	6(3)	5(3)	(3)
9.	6(3)	5(3)	(3)
10.	6(3)	6(3)	(3)
11.	5(3)	6(3)	(3)
12.	6(3)	6(3)	(3)
13.	5(3)	5(3)	(3)
14.	6(3)	5(3)	(3)
15.	5(3)	5(3)	(3)
16.	5(3)	5(3)	(3)
17.	4(2)	5(3)	(3)
18.	6(3)	6(3)	(3)
19.	5(3)	5(3)	(3)
20.	6(6)	5(3)	(3)
21.	5(3)	5(3)	(3)
22.	6(3)	5(3)	(3)
23.	6(3)	5(3)	(3)
24.	6(3)	5(3)	(3)
25.	5(3)	6(3)	(1)
26.	5(3)	4(2)	(3)
27.	6(3)	5(3)	(3)
28.	6(3)	6(3)	(3)
29.	6(3)	6(3)	(3)
30.	5(3)	5(3)	(3)
31.	5(3)	6(3)	(3)
32.	6(3)	6(3)	(3)
33.	6(3)	5(3)	(3)
34.	6(3)	6(3)	(3)
35.	5(3)	5(3)	(3)
36.	6(3)	5(3)	(3)
37.	6(3)	6(3)	(3)
38.	5(3)	5(3)	(3)
39.	6(3)	6(3)	(3)
40.	6(3)	5(3)	(3)
41.	4(2)	6(3)	(3)
42.	5(3)	5(3)	(3)
43.	5(3)	5(3)	(3)
44.	5(3)	6(3)	(3)
45.	5(3)	5(3)	(3)
46.	5(3)	5(3)	(3)
47.	5(3)	5(3)	(3)
48.	5(3)	5(3)	(3)
49.	5(3)	5(3)	(3)
50.	5(3)	5(3)	(3)

- Valores de 1 a 6: notas originais baseadas na escala proposta por CHAGAS (1986).
- Valores entre parênteses: classe de notas utilizadas na análise estatística.

VARIEDADE: NA56-79

	COLORAÇÃO (CL)		CONTAGEM (CT)	
	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	5 (3)	2 (1)	(3)	(1)
2.	6 (3)	2 (1)	(3)	(1)
3.	5 (3)	4 (2)	(3)	(1)
4.	5 (3)	4 (2)	(3)	(1)
5.	4 (2)	3 (2)	(3)	(1)
6.	4 (2)	2 (1)	(3)	(1)
7.	4 (2)	5 (3)	(3)	(3)
8.	4 (2)	3 (2)	(3)	(3)
9.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
10.	4 (2)	5 (3)	(3)	(3)
11.	6 (3)	4 (2)	(3)	(1)
12.	3 (2)	5 (3)	(3)	(3)
13.	6 (3)	3 (2)	(3)	(1)
14.	3 (2)	5 (3)	(3)	(1)
15.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
16.	6 (3)	4 (2)	(3)	(3)
17.	6 (3)	3 (2)	(3)	(1)
18.	3 (2)	6 (3)	(3)	(3)
19.	2 (1)	5 (3)	(3)	(1)
20.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
21.	6 (3)	4 (2)	(3)	(1)
22.	5 (3)	4 (2)	(3)	(1)
23.	6 (3)	4 (2)	(3)	(1)
24.	5 (3)	3 (2)	(3)	(3)
25.	6 (3)	6 (3)	(3)	(3)
26.	5 (3)	6 (3)	(3)	(1)
27.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
28.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)
29.	5 (3)	4 (2)	(3)	(1)
30.	4 (2)	4 (2)	(3)	(1)
31.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
32.	3 (2)	4 (2)	(3)	(1)
33.	5 (3)	2 (1)	(3)	(3)
34.	3 (2)	5 (3)	(3)	(3)
35.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
36.	5 (3)	5 (3)	(1)	(3)
37.	6 (3)	2 (1)	(3)	(3)
38.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
39.	3 (2)	5 (3)	(3)	(1)
40.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
41.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
42.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
43.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
44.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
45.	4 (2)	5 (3)	(3)	(3)
46.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
47.	6 (3)	6 (3)	(3)	(3)
48.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
49.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
50.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)

- Valores de 1 a 6: notas originais baseadas na escala proposta por CHAGAS (1986).
- Valores entre parênteses: classe de notas utilizadas na análise estatística.

Apêndice 5: Dados obtidos de campo I (Fitopatologia) 117
no ensaio R₂ (data: 02/4/90)

VARIEDADE:SP70-1078

	COLORAÇÃO (CL)		CONTAGEM (CT)	
	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	4 (2)	3 (2)	(3)	(1)
2.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)
3.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
4.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)
5.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)
6.	6 (3)	6 (3)	(3)	(1)
7.	5 (3)	5 (3)	(3)	(2)
8.	6 (3)	4 (2)	(3)	(1)
9.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
10.	6 (3)	4 (2)	(3)	(1)
11.	6 (3)	6 (3)	(3)	(1)
12.	6 (3)	4 (2)	(3)	(1)
13.	4 (2)	4 (2)	(3)	(1)
14.	6 (3)	3 (2)	(3)	(1)
15.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
16.	4 (2)	5 (3)	(3)	(1)
17.	6 (3)	3 (2)	(3)	(1)
18.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)
19.	5 (3)	6 (3)	(1)	(1)
20.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)
21.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
22.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
23.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)
24.	6 (3)	6 (3)	(3)	(3)
25.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
26.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
27.	6 (3)	4 (2)	(3)	(1)
28.	6 (3)	4 (2)	(3)	(3)
29.	5 (3)	3 (2)	(3)	(1)
30.	6 (3)	3 (2)	(3)	(1)
31.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
32.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)
33.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)
34.	3 (2)	5 (3)	(1)	(1)
35.	6 (3)	5 (3)	(1)	(3)
36.	6 (3)	4 (2)	(3)	(1)
37.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)
38.	5 (3)	3 (2)	(3)	(1)
39.	6 (3)	4 (2)	(3)	(1)
40.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)
41.	5 (3)	4 (2)	(3)	(1)
42.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
43.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)
44.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)
45.	4 (2)	4 (2)	(3)	(1)
46.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)
47.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
48.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
49.	3 (2)	4 (2)	(3)	(1)
50.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)

- Valores de 1 a 6: notas originais baseadas na escala proposta por CHAGAS (1986).
- Valores entre parênteses: classe de notas utilizadas na análise estatística.

VARIEDADE: CB47-355

	COLORAÇÃO (CL)		CONTAGEM (CT)	
	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	5 (3)	2 (1)	(1)	(3)
2.	5 (3)	6 (3)	(3)	(3)
3.	5 (3)	6 (3)	(3)	(3)
4.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
5.	6 (3)	5 (3)	(3)	
6.	5 (3)	6 (3)	(3)	(3)
7.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
8.	6 (3)	4 (2)	(3)	(3)
9.	4 (2)	5 (3)	(3)	(3)
10.	6 (3)	5 (3)	(1)	(3)
11.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
12.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
13.	4 (2)	5 (3)	(1)	(3)
14.	4 (2)	3 (2)	(3)	(3)
15.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
16.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
17.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
18.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
19.	5 (3)	3 (2)	(3)	(3)
20.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
21.	4 (2)	5 (3)	(3)	(3)
22.	3 (2)	3 (2)	(1)	(3)
23.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
24.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
25.	3 (2)	2 (1)	(3)	(3)
26.	6 (3)	5 (3)	(1)	(3)
27.	4 (2)	5 (3)	(3)	(3)
28.	3 (2)	4 (2)	(3)	(3)
29.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)
30.	2 (1)	2 (1)	(3)	(3)
31.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
32.	5 (3)	4 (2)	(3)	
33.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
34.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
35.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)
36.	6 (3)	4 (2)	(3)	(3)
37.	4 (2)	4 (2)	(3)	(3)
38.	6 (3)	6 (3)	(3)	
39.	6 (3)	6 (3)		(3)
40.	5 (3)	6 (3)	(3)	(3)

- Valores de 1 a 6: notas originais baseadas na escala proposta por CHAGAS (1986).
- Valores entre parênteses: classe de notas utilizadas na análise estatística.

VARIEDADE: IAC64-257

COLORAÇÃO (CL)		CONTAGEM (CT)	
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	5(3)	5(3)	(3)
2.	5(3)	5(3)	(1)
3.	5(3)	6(3)	(3)
4.	5(3)	5(3)	(3)
5.	6(3)	6(3)	(3)
6.	5(3)	5(3)	(3)
7.	5(3)	5(3)	(3)
8.	5(3)	5(3)	(3)
9.	6(3)	5(3)	(3)
10.	4(2)	5(3)	(3)
11.	5(3)	5(3)	(3)
12.	5(3)	5(3)	(3)
13.	4(2)	5(3)	(3)
14.	5(3)	5(3)	(3)
15.	5(3)	5(3)	(3)
16.	5(3)	5(3)	(3)
17.	5(3)	5(3)	(3)
18.	5(3)	5(3)	(1)
19.	5(3)	5(3)	(3)
20.	5(3)	4(2)	(3)
21.	5(3)	4(2)	(3)
22.	6(3)	5(3)	(3)
23.	6(3)	5(3)	(3)
24.	6(3)	5(3)	(1)
25.	6(3)	3(2)	(3)
26.	6(3)	5(3)	(3)
27.	5(3)	5(3)	(3)
28.	5(3)	5(3)	(3)
29.	5(3)	5(3)	(3)
30.	6(3)	5(3)	(3)
31.	5(3)	5(3)	(3)
32.	4(2)	5(3)	(3)
33.	5(3)	5(3)	(3)
34.	3(2)	4(2)	(3)
35.	5(3)	5(3)	(3)
36.	5(3)	5(3)	(3)
37.	5(3)	5(3)	(3)
38.	5(3)	4(2)	(3)
39.	4(2)	4(2)	(3)
40.	5(3)	5(3)	(3)

- Valores de 1 a 6: notas originais baseadas na escala proposta por CHAGAS (1986).
- Valores entre parênteses: classe de notas utilizadas na análise estatística.

VARIEDADE: NA56-79

	COLORAÇÃO (CL)		CONTAGEM (CT)	
	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	3 (2)	5 (3)	(3)	(3)
2.	4 (2)	5 (3)	(3)	(3)
3.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
4.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
5.	5 (3)	4 (2)	(3)	(1)
6.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
7.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
8.	4 (2)	5 (3)	(3)	(3)
9.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
10.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
11.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
12.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
13.	5 (3)	5 (3)	(1)	(3)
14.	5 (3)	4 (2)	(1)	(3)
15.	5 (3)	2 (1)	(3)	(3)
16.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)
17.	4 (2)	5 (3)	(3)	(3)
18.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
19.	5 (3)	4 (2)	(3)	(1)
20.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
21.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
22.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)
23.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
24.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)
25.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
26.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
27.	4 (2)	5 (3)	(3)	(3)
28.	4 (2)	5 (3)	(1)	(3)
29.	6 (3)	5 (3)	(3)	(1)
30.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
31.	5 (3)	4 (2)	(3)	(1)
32.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
33.	4 (2)	5 (3)	(3)	(3)
34.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
35.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
36.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)
37.	6 (3)	4 (2)	(1)	(3)
38.	3 (2)	5 (3)	(3)	(3)
39.	5 (3)	5 (3)	(1)	(3)
40.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)

- Valores de 1 a 6: notas originais baseadas na escala proposta por CHAGAS (1986).
- Valores entre parênteses: classe de notas utilizadas na análise estatística.

Apêndice 6: Dados obtidos do campo II (Cooperativa)
no ensaio R₂ (data: 10/04/90)

121

VARIEDADE: SP70-1078

COLORAÇÃO (CL)		CONTAGEM (CT)		
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE	
1.	4 (2)	6 (3)	(3)	(1)
2.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)
3.	6 (3)	4 (2)	(3)	(3)
4.	6 (3)	3 (2)	(3)	(1)
5.	5 (3)	6 (3)	(3)	(1)
6.	5 (3)	6 (3)	(3)	(1)
7.	5 (3)	5 (3)	(1)	(3)
8.	6 (3)	4 (2)	(3)	(1)
9.	5 (3)	6 (3)	(3)	(3)
10.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
11.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
12.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
13.	5 (3)	5 (3)	(1)	(1)
14.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
15.	2 (1)	5 (3)	(3)	(1)
16.	4 (2)	5 (3)	(3)	(1)
17.	4 (2)	2 (1)	(3)	(1)
18.	3 (2)	2 (1)	(3)	(3)
19.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
20.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
21.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
22.	4 (2)	5 (3)	(3)	(3)
23.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
24.	5 (3)	4 (2)	(3)	(1)
25.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
26.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
27.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)
28.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)
29.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
30.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
31.	5 (3)	4 (2)	(3)	(1)
32.	4 (2)	5 (3)	(3)	(1)
33.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
34.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
35.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
36.	4 (2)	4 (2)	(3)	(3)
37.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
38.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
39.	3 (2)	5 (3)	(3)	(1)
40.	4 (2)	4 (2)	(3)	(1)

- Valores de 1 a 6: notas originais baseadas na escala proposta por CHAGAS (1986).
- Valores entre parênteses: classe de notas utilizadas na análise estatística.

VARIEDADE: SP71-1406

	COLORAÇÃO (CL)		CONTAGEM (CT)	
	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	4(2)	5(3)	(3)	(3)
2.	6(3)	3(2)	(3)	(3)
3.	6(3)	4(2)	(3)	(1)
4.	5(3)	5(3)	(3)	(3)
5.	6(3)	5(3)	(3)	(3)
6.	6(3)	6(3)	(3)	(3)
7.	5(3)	5(3)	(3)	(3)
8.	3(2)	5(3)	(3)	(1)
9.	4(2)	5(3)	(3)	(1)
10.	5(3)	5(3)	(3)	(3)
11.	4(2)	4(2)	(3)	(3)
12.	4(2)	4(2)	(3)	(3)
13.	4(2)	4(2)	(3)	(3)
14.	4(2)	5(3)	(3)	(3)
15.	4(2)	3(2)	(3)	(3)
16.	4(2)	5(3)	(1)	(3)
17.	5(3)	4(2)	(3)	(3)
18.	4(2)	5(3)	(3)	(3)
19.	4(2)	4(2)	(3)	(3)
20.	5(3)	5(3)	(3)	(3)
21.	2(1)	5(3)	(3)	(3)
22.	3(2)	4(2)	(3)	(3)
23.	4(2)	5(3)	(3)	(3)
24.	4(2)	5(3)	(3)	(3)
25.	5(3)	3(2)	(3)	(3)
26.	5(3)	2(1)	(3)	(3)
27.	3(2)	5(3)	(3)	(3)
28.	3(2)	5(3)	(3)	(3)
29.	5(3)	5(3)	(3)	(3)
30.	5(3)	5(3)	(3)	(3)
31.	5(3)	5(3)	(3)	(3)
32.	5(3)	5(3)	(3)	(1)
33.	4(2)	4(2)	(3)	(3)
34.	5(3)	5(3)	(3)	(3)
35.	3(2)	4(2)	(3)	(3)
36.	5(3)	5(3)	(3)	(3)
37.	3(2)	5(3)	(3)	(3)
38.	5(3)	5(3)	(3)	(3)
39.	4(2)	5(3)		(3)
40.	5(3)	5(3)	(3)	(3)

- Valores de 1 a 6: notas originais baseadas na escala proposta por CHAGAS (1986).
- Valores entre parênteses: classe de notas utilizadas na análise estatística.

VARIEDADE: RB76-5418

	COLORAÇÃO (CL)		CONTAGEM (CT)	
	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
2.	3 (2)	5 (3)	(3)	(3)
3.	4 (2)	4 (2)	(3)	(3)
4.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
5.	5 (3)	3 (2)	(3)	(3)
6.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
7.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
8.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
9.	6 (3)	4 (2)	(3)	(3)
10.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
11.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
12.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
13.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
14.	4 (2)	4 (2)	(3)	(3)
15.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
16.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)
17.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
18.	5 (3)	2 (1)	(3)	(3)
19.	5 (3)	3 (2)	(3)	(3)
20.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)
21.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
22.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
23.	5 (3)	6 (3)	(3)	(1)
24.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
25.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)
26.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
27.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
28.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
29.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
30.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)
31.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
32.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
33.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
34.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
35.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
36.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
37.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
38.	3 (2)	3 (2)	(3)	(3)
39.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
40.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)

- Valores de 1 a 6: notas originais baseadas na escala proposta por CHAGAS (1986).
- Valores entre parênteses: classe de notas utilizadas na análise estatística.

VARIEDADE: RB78-5149

	COLORAÇÃO (CL)		CONTAGEM (CT)	
	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)
2.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
3.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
4.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
5.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
6.	5 (3)	4 (2)	(3)	(3)
7.	5 (3)	4 (2)	(3)	(1)
8.	5 (3)	5 (3)	(1)	(3)
9.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
10.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
11.	3 (2)	4 (2)	(3)	(1)
12.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
13.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
14.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
15.	5 (3)	5 (3)	(1)	(3)
16.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
17.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
18.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
19.	6 (3)	5 (3)	(3)	(3)
20.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
21.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
22.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
23.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
24.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
25.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
26.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
27.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
28.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
29.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
30.	4 (2)	5 (3)	(3)	(3)
31.	5 (3)	4 (2)	(3)	(1)
32.	4 (2)	5 (3)	(1)	(1)
33.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
34.	5 (3)	5 (3)	(3)	(1)
35.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
36.	5 (3)	6 (3)	(3)	(3)
37.	5 (3)	5 (3)	(3)	(3)
38.	6 (3)	4 (2)	(1)	(3)
39.	4 (2)	4 (2)	(3)	(3)
40.	5 (3)	6 (3)	(3)	(3)

- Valores de 1 a 6: notas originais baseadas na escala proposta por CHAGAS (1986).
- Valores entre parênteses: classe de notas utilizadas na análise estatística.

Apêndice 7: Dados obtidos do campo I (Fitopatologia) no ensaio R₃ (data: 12/9/90)

VARIEDADE: CB47-355

COLORAÇÃO (CL)			
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1. 4(2)	4(2)	31. 5(3)	5(3)
2. 5(3)	5(3)	32. 3(2)	5(3)
3. 4(2)	4(2)	33. 5(3)	4(2)
4. 5(3)	4(2)	34. 5(3)	4(2)
5. 2(1)	5(3)	35. 2(1)	4(2)
6. 2(1)	5(3)	36. 4(2)	4(2)
7. 4(2)	5(3)	37. 5(3)	3(2)
8. 4(2)	5(3)	38. 5(3)	5(3)
9. 5(3)	5(3)	39. 3(2)	5(3)
10. 3(2)	4(2)	40. 5(3)	3(2)
11. 5(3)	5(3)	41. 3(2)	3(2)
12. 1(1)	4(2)	42. 4(2)	2(1)
13. 2(1)	5(3)	43. 5(3)	3(2)
14. 2(1)	5(3)	44. 2(1)	5(3)
15. 5(3)	5(3)	45. 3(2)	4(2)
16. 3(2)	4(2)	46. 5(3)	3(2)
17. 2(1)	5(3)	47. 5(3)	4(2)
18. 2(1)	5(3)	48. 5(3)	5(3)
19. 5(3)	5(3)	49. 5(3)	5(3)
20. 3(2)	5(3)		
21. 5(3)	5(3)		
22. 5(3)	5(3)		
23. 5(3)	4(2)		
24. 5(3)	5(3)		
25. 5(3)	3(2)		
26. 5(3)	4(2)		
27. 5(3)	4(2)		
28. 5(3)	4(2)		
29. 5(3)	4(2)		
30. 5(3)	4(2)		

VARIEDADE: NA56-79

COLORAÇÃO (CL)			
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1. 1(1)	1(1)	30. 5(3)	5(3)
2. 2(1)	2(1)	31. 4(2)	2(1)
3. 6(3)	3(2)	32. 2(1)	3(2)
4. 3(2)	2(1)	33. 5(3)	3(2)
5. 4(2)	2(1)	34. 5(3)	4(2)
6. 6(3)	2(1)	35. 2(1)	1(1)
7. 5(3)	1(1)	36. 5(3)	5(3)
8. 5(3)	3(2)	37. 6(3)	3(2)
9. 4(2)	4(2)	38. 6(3)	2(1)
10. 6(3)	4(2)	39. 5(3)	5(3)
11. 6(3)	3(2)	40. 5(3)	2(1)
12. 2(1)	2(1)	41. 6(3)	4(2)
13. 6(3)	2(1)	42. 4(2)	3(2)
14. 1(1)	5(3)	43. 4(2)	2(1)
15. 5(3)	5(3)	44. 1(1)	2(1)
16. 2(1)	5(3)	45. 3(2)	1(1)
17. 4(2)	1(1)	46. 1(1)	3(2)
18. 3(2)	3(2)	47. 4(2)	2(1)
19. 5(3)	4(2)	48. 5(3)	3(2)
20. 4(2)	2(1)	49. 2(1)	1(1)
21. 5(3)	3(2)	50. 1(1)	1(1)
22. 5(3)	2(1)	51. 5(3)	1(1)
23. 3(2)	2(1)	52. 3(2)	3(2)
24. 6(3)	4(2)		
25. 5(3)	3(2)		
26. 3(2)	4(2)		
27. 4(2)	4(2)		
28. 3(2)	2(1)		
29. 2(1)	4(2)		

Apêndice 7: Dados obtidos do campo I (Fitopatologia) no ensaio R₃ (data: 12/9/90)

VARIETADE SP 70-1078

	COLORAÇÃO (CL)			
	SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	5 (3)	2 (1)	31. 3 (2)	2 (1)
2.	5 (3)	5 (3)	32. 4 (2)	4 (2)
3.	5 (3)	5 (3)	33. 1 (1)	1 (1)
4.	5 (3)	1 (1)	34. 2 (1)	4 (2)
5.	6 (3)	5 (3)	35. 6 (3)	3 (2)
6.	5 (3)	1 (1)	36. 4 (2)	2 (1)
7.	6 (3)	1 (1)	37. 6 (3)	1 (1)
8.	6 (2)	3 (2)	38. 2 (1)	3 (2)
9.	5 (3)	2 (1)	39. 5 (3)	2 (1)
10.	3 (2)	1 (1)	40. 5 (3)	2 (1)
11.	5 (3)	1 (1)	41. 5 (3)	1 (1)
12.	6 (3)	1 (1)	42. 5 (3)	2 (1)
13.	4 (2)	3 (2)	43. 2 (1)	4 (2)
14.	6 (3)	6 (3)	44. 4 (2)	4 (2)
15.	6 (3)	3 (2)	45. 5 (3)	5 (3)
16.	5 (1)	1 (1)	46. 2 (1)	2 (1)
17.	2 (1)	1 (1)	47. 4 (2)	2 (1)
18.	1 (1)	2 (1)	48. 6 (3)	5 (3)
19.	6 (3)	4 (2)	49. 6 (3)	1 (1)
20.	1 (1)	5 (3)	50. 2 (1)	1 (1)
21.	6 (3)	2 (1)		
22.	6 (3)	5 (3)		
23.	5 (3)	5 (3)		
24.	4 (2)	2 (1)		
25.	6 (3)	1 (1)		
26.	3 (2)	4 (2)		
27.	5 (3)	1 (1)		
28.	5 (3)	3 (2)		
29.	5 (3)	3 (2)		
30.	4 (2)	2 (1)		

- Valores de 1 a 6: notas originais baseadas na escala proposta por CHAGAS (1986).

- Valores entre parênteses: classe de notas utilizadas na análise estatística.

Apêndice 8: Dados obtidos de campo II (Cooperativa) no ensaio R₃ (data: 10/10/90)

VARIETADE: CR47-355

VARIETADE: IAC64-257

COLORAÇÃO (CL)			
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1. 5(3)	5(3)	31. 5(3)	5(3)
2. 5(3)	4(2)	32. 6(3)	5(3)
3. 5(3)	6(3)	33. 6(3)	5(3)
4. 5(3)	3(2)	34. 5(3)	6(3)
5. 2(1)	5(3)	35. 2(1)	2(1)
6. 4(2)	3(2)	36. 5(3)	5(3)
7. 6(3)	4(2)	37. 3(2)	4(2)
8. 6(3)	3(2)	38. 5(3)	5(3)
9. 5(3)	3(2)	39. 5(3)	5(3)
10. 5(3)	3(2)	40. 4(2)	5(3)
11. 5(3)	6(3)	41. 5(3)	2(1)
12. 5(3)	5(3)	42. 3(2)	3(2)
13. 4(2)	5(3)	43. 4(2)	4(2)
14. 5(3)	6(3)	44. 3(2)	5(3)
15. 4(2)	4(2)	45. 1(1)	5(3)
16. 5(3)	5(3)	46. 5(3)	2(1)
17. 4(2)	5(3)	47. 3(2)	5(3)
18. 5(3)	5(3)	48. 4(2)	4(2)
19. 2(1)	2(1)	49. 5(3)	5(3)
20. 5(3)	4(2)	50. 5(3)	6(3)
21. 5(3)	5(3)		
22. 5(3)	6(3)		
23. 5(3)	5(3)		
24. 5(3)	5(3)		
25. 3(2)	5(3)		
26. 3(2)	4(2)		
27. 3(2)	2(1)		
28. 4(2)	2(1)		
29. 3(2)	4(2)		
30. 5(3)	5(3)		

COLORAÇÃO (CL)			
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1. 2(1)	6(3)	31. 3(2)	5(3)
2. 2(1)	6(3)	32. 6(3)	3(2)
3. 2(1)	5(3)	33. 6(3)	3(2)
4. 5(3)	5(3)	34. 5(3)	5(3)
5. 4(2)	6(3)	35. 4(2)	3(2)
6. 2(1)	5(3)	36. 5(3)	5(3)
7. 2(1)	6(3)	37. 6(3)	5(3)
8. 5(3)	6(3)	38. 5(3)	5(3)
9. 2(1)	5(3)	39. 5(3)	5(3)
10. 3(2)	6(3)	40. 6(3)	6(3)
11. 4(2)	5(3)	41. 4(2)	5(3)
12. 2(1)	4(2)	42. 5(3)	4(2)
13. 2(1)	6(3)	43. 5(3)	4(2)
14. 3(2)	5(3)	44. 5(3)	4(2)
15. 4(2)	4(2)	45. 6(3)	5(3)
16. 3(2)	4(2)	46. 5(3)	5(3)
17. 4(2)	4(2)	47. 4(2)	5(3)
18. 4(2)	6(3)	48. 5(3)	5(3)
19. 3(2)	4(2)	49. 5(3)	5(3)
20. 4(2)	6(3)	50. 5(3)	4(2)
21. 5(3)	6(3)		
22. 3(2)	5(3)		
23. 4(2)	5(3)		
24. 4(2)	4(2)		
25. 5(3)	5(3)		
26. 2(1)	5(3)		
27. 3(2)	3(2)		
28. 4(2)	5(3)		
29. 4(2)	5(3)		
30. 5(3)	5(3)		

Apêndice 8: Dados obtidos de campo II (Cooperativa) no ensaio R₃ (data: 10/10/90)

VARIEDADE NA56-79

SADIA	COLORAÇÃO (CL)		
	DOENTE	SADIA	DOENTE
1.	2(1)	5(3)	4(2)
2.	5(3)	5(3)	2(1)
3.	2(1)	4(2)	5(3)
4.	5(3)	4(2)	4(2)
5.	1(2)	3(2)	5(3)
6.	5(3)	5(3)	5(3)
7.	5(3)	4(2)	5(3)
8.	5(3)	5(3)	5(3)
9.	5(3)	5(3)	5(3)
10.	5(3)	5(3)	4(3)
11.	5(3)	5(3)	5(3)
12.	5(3)	5(3)	5(3)
13.	2(1)	5(3)	4(2)
14.	4(2)	3(2)	4(2)
15.	5(3)	2(1)	5(3)
16.	4(2)	5(3)	5(3)
17.	5(3)	2(1)	3(2)
18.	5(3)	2(1)	5(3)
19.	4(2)	2(1)	5(3)
20.	4(2)	5(3)	5(3)
21.	4(2)	5(3)	2(1)
22.	5(3)	5(3)	5(3)
23.	5(3)	5(3)	5(3)
24.	5(3)	5(3)	5(3)
25.	5(3)	5(3)	5(3)
26.	5(3)	4(2)	5(3)
27.	5(3)	4(2)	5(3)
28.	2(1)	5(3)	5(3)
29.	5(3)	5(3)	5(3)
30.	5(3)	5(3)	5(3)

VARIEDADE: SP70-1078

SADIA	COLORAÇÃO (CL)		
	DOENTE	DOENTE	SADIA
1.	5(3)	3(2)	31.
2.	5(3)	2(1)	32.
3.	5(3)	2(1)	33.
4.	5(3)	2(1)	34.
5.	3(2)	6(3)	35.
6.	5(3)	3(2)	36.
7.	6(3)	5(3)	37.
8.	2(1)	5(3)	38.
9.	6(3)	5(3)	39.
10.	3(2)	5(3)	40.
11.	5(3)	3(2)	41.
12.	3(2)	2(1)	42.
13.	2(1)	2(1)	43.
14.	5(3)	6(3)	44.
15.	6(3)	2(1)	45.
16.	5(3)	2(1)	46.
17.	3(2)	2(1)	47.
18.	3(2)	6(3)	48.
19.	5(3)	3(2)	49.
20.	5(3)	5(3)	50.
21.	5(3)	2(1)	51.
22.	5(3)	2(1)	
23.	6(3)	3(2)	
24.	4(2)	6(3)	
25.	5(3)	3(2)	
26.	6(3)	2(1)	
27.	4(2)	3(2)	
28.	6(3)	3(2)	
29.	4(2)	6(3)	
30.	5(3)	3(2)	

Apêndice 8: Dados obtidos de campo II (Cooperativa) no ensaio R₃ (data: 10/10/90)

VARIETADE SP70-1143

VARIETADE: SP71-1406

COLORAÇÃO (CL)			
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1. 5 (3)	5 (3)	32. 5 (3)	1 (1)
2. 4 (2)	3 (2)	33. 5 (3)	3 (2)
3. 5 (3)	3 (2)	34. 5 (3)	5 (3)
4. 4 (2)	3 (2)	35. 5 (3)	5 (3)
5. 5 (3)	5 (3)	36. 5 (3)	3 (2)
6. 5 (3)	4 (2)	37. 5 (3)	3 (2)
7. 4 (2)	5 (3)	38. 5 (3)	4 (2)
8. 5 (3)	5 (3)	39. 5 (3)	4 (2)
9. 5 (3)	5 (3)	40. 5 (3)	5 (3)
10. 4 (2)	4 (2)	41. 5 (3)	4 (2)
11. 4 (2)	5 (3)	42. 4 (2)	4 (2)
12. 5 (3)	2 (1)	43. 5 (3)	5 (3)
13. 5 (3)	1 (1)	44. 4 (2)	5 (3)
14. 2 (1)	5 (3)	45. 4 (2)	4 (2)
15. 5 (3)	5 (3)	46. 4 (2)	3 (2)
16. 5 (3)	4 (2)	47. 5 (3)	3 (2)
17. 4 (2)	4 (2)	48. 5 (3)	3 (2)
18. 5 (3)	4 (2)	49. 5 (3)	5 (3)
19. 3 (2)	4 (2)	50. 5 (3)	5 (3)
20. 4 (2)	5 (3)	51. 5 (3)	3 (2)
21. 5 (3)	5 (3)	52. 4 (2)	5 (3)
22. 4 (2)	5 (3)		
23. 4 (2)	4 (2)		
24. 4 (2)	4 (2)		
25. 5 (3)	2 (1)		
26. 5 (3)	4 (2)		
27. 5 (3)	5 (3)		
28. 5 (3)	5 (3)		
29. 5 (3)	3 (2)		
30. 5 (3)	2 (1)		
31. 5 (3)	5 (3)		

COLORAÇÃO (CL)			
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1. 3 (2)	6 (3)	32. 3 (2)	3 (2)
2. 3 (2)	2 (1)	33. 5 (3)	2 (1)
3. 4 (2)	6 (1)	34. 2 (1)	6 (3)
4. 6 (3)	2 (1)	35. 5 (3)	4 (2)
5. 6 (3)	3 (2)	36. 5 (3)	5 (3)
6. 6 (3)	4 (2)	37. 4 (2)	4 (2)
7. 2 (1)	5 (3)	38. 4 (2)	5 (3)
8. 2 (1)	3 (2)	39. 6 (3)	3 (2)
9. 5 (3)	2 (1)	40. 5 (3)	3 (2)
10. 6 (3)	6 (3)	41. 3 (2)	6 (3)
11. 4 (2)	5 (3)	42. 2 (1)	4 (2)
12. 6 (3)	5 (3)	43. 6 (3)	5 (3)
13. 6 (3)	6 (3)	44. 6 (3)	4 (2)
14. 2 (1)	6 (3)	45. 3 (2)	5 (3)
15. 4 (2)	5 (3)	46. 3 (2)	5 (3)
16. 5 (3)	6 (3)	47. 6 (3)	2 (1)
17. 5 (3)	5 (3)	48. 2 (1)	6 (3)
18. 3 (2)	4 (2)	49. 6 (3)	6 (3)
19. 3 (2)	5 (3)	50. 2 (1)	5 (3)
20. 3 (2)	6 (3)	51. 2 (1)	4 (2)
21. 6 (3)	5 (3)	52. 6 (3)	3 (2)
22. 4 (2)	3 (2)		
23. 3 (2)	4 (2)		
24. 3 (2)	5 (3)		
25. 6 (3)	6 (3)		
26. 2 (1)	6 (3)		
27. 2 (1)	4 (2)		
28. 3 (2)	5 (3)		
29. 6 (3)	3 (2)		
30. 6 (3)	5 (3)		
31. 2 (1)	6 (3)		

Apêndice 8: Dados obtidos de campo II (Cooperativa) no ensaio R₃ (data: 10/10/90)

VARIEDADE SP71-6163

COLORAÇÃO (CL)			
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1. 2(1)	3(2)	31. 5(3)	5(3)
2. 2(1)	3(2)	32. 2(1)	5(3)
3. 4(2)	5(3)	33. 3(2)	2(1)
4. 2(1)	5(3)	34. 4(2)	3(2)
5. 2(1)	5(3)	35. 5(3)	5(3)
6. 3(2)	5(3)	36. 2(1)	5(3)
7. 2(1)	5(3)	37. 5(3)	3(2)
8. 3(2)	5(3)	38. 2(1)	5(3)
9. 4(2)	5(3)	39. 5(3)	5(3)
10. 4(2)	5(3)	40. 2(1)	3(2)
11. 5(3)	4(2)	41. 3(2)	4(2)
12. 5(3)	3(2)	42. 2(1)	1(1)
13. 4(2)	3(2)	43. 5(3)	3(2)
14. 2(1)	5(3)	44. 4(2)	4(2)
15. 3(2)	5(3)	45. 5(3)	4(2)
16. 1(1)	4(2)	46. 1(1)	5(3)
17. 5(3)	4(2)	47. 5(3)	5(3)
18. 2(1)	5(3)	48. 5(3)	3(2)
19. 4(2)	4(2)	49. 4(2)	2(1)
20. 5(3)	5(3)	50. 5(3)	4(2)
21. 5(3)	5(3)	51. 5(3)	5(3)
22. 2(1)	4(2)	52. 4(2)	4(2)
23. 5(3)	4(2)		
24. 2(1)	5(3)		
25. 1(1)	5(3)		
26. 3(2)	5(3)		
27. 3(2)	3(2)		
28. 2(1)	3(2)		
29. 3(2)	4(2)		
30. 3(2)	2(1)		

VARIEDADE RB76-5418

COLORAÇÃO (CL)			
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1. 5(3)	3(2)	31. 6(3)	5(3)
2. 5(3)	4(2)	32. 3(2)	3(2)
3. 5(3)	5(3)	33. 1(1)	5(3)
4. 4(2)	4(2)	34. 2(1)	5(3)
5. 5(3)	4(2)	35. 6(3)	5(3)
6. 4(2)	2(1)	36. 6(3)	5(3)
7. 5(3)	2(1)	37. 6(3)	3(2)
8. 3(2)	5(3)	38. 6(3)	2(1)
9. 3(2)	5(3)	39. 5(3)	5(3)
10. 5(3)	5(3)	40. 4(2)	5(3)
11. 5(3)	5(3)	41. 5(3)	2(1)
12. 5(3)	4(2)	42. 6(3)	3(2)
13. 3(2)	4(2)	43. 5(3)	3(2)
14. 5(3)	4(2)	44. 2(1)	3(2)
15. 5(3)	5(3)	45. 5(3)	5(3)
16. 2(1)	2(1)	46. 4(2)	2(1)
17. 3(2)	5(3)	47. 5(3)	5(3)
18. 2(1)	2(1)	48. 3(2)	4(2)
19. 5(3)	5(3)	49. 5(3)	4(2)
20. 5(3)	2(1)	50. 6(3)	5(3)
21. 5(3)	4(2)		
22. 3(2)	5(3)		
23. 4(2)	4(2)		
24. 3(2)	4(2)		
25. 2(1)	5(3)		
26. 5(3)	5(3)		
27. 6(3)	4(2)		
28. 5(3)	3(2)		
29. 6(3)	5(3)		
30. 6(3)	4(2)		

Apêndice 8: Dados obtidos de campo II (Cooperativa) no ensaio R₃ (data: 10/10/90)

VARIEDADE: R878-5148

COLORAÇÃO (CL)			
SADIA	DOENTE	SADIA	DOENTE
1. 5(3)	5(3)	31. 4(2)	2(1)
2. 5(3)	5(3)	32. 5(3)	4(2)
3. 5(3)	5(3)	33. 4(2)	2(1)
4. 2(1)	5(3)	34. 5(3)	5(3)
5. 3(2)	5(3)	35. 2(1)	5(3)
6. 2(1)	2(1)	36. 5(3)	4(2)
7. 3(2)	2(1)	37. 5(3)	5(3)
8. 5(3)	5(3)	38. 2(1)	5(3)
9. 5(3)	5(3)	39. 5(3)	3(2)
10. 5(3)	3(2)	40. 5(3)	5(3)
11. 2(1)	5(3)	41. 5(3)	5(3)
12. 5(3)	5(3)	42. 3(2)	4(2)
13. 1(1)	5(3)	43. 5(3)	3(2)
14. 3(2)	5(3)	44. 5(3)	2(1)
15. 5(3)	5(3)	45. 4(2)	5(3)
16. 5(3)	5(3)	46. 5(3)	2(1)
17. 5(3)	2(1)	47. 2(1)	4(2)
18. 2(1)	4(2)	48. 3(2)	4(2)
19. 2(1)	3(2)	49. 3(2)	5(3)
20. 3(2)	4(2)	50. 2(1)	5(3)
21. 5(3)	5(3)		
22. 3(2)	5(3)		
23. 4(2)	5(3)		
24. 5(3)	4(2)		
25. 5(3)	6(3)		
26. 2(1)	5(3)		
27. 3(2)	2(1)		
28. 4(2)	5(3)		
29. 5(3)	5(3)		
30. 5(3)	5(3)		

- Valores de 1 a 6: notas originais baseadas na escala proposta por CHAGAS (1986).

- Valores entre parênteses: classe de notas utilizadas na análise estatística.

APÊNDICE 9: Dados obtidos em campo comercial na variedade NA-5679 utilizando o método de coloração dos vasos (CL). Piracicaba/SP

1.	5	35.	5	69.	5	103.	4	137.	5	171.	4
2.	4	36.	5	70.	2	104.	5	138.	5	172.	3
3.	5	37.	4	71.	5	105.	3	139.	3	173.	2
4.	2	38.	5	72.	5	106.	3	140.	1	174.	3
5.	1	39.	2	73.	2	107.	1	141.	5	175.	4
6.	2	40.	2	74.	5	108.	5	142.	3	176.	2
7.	2	41.	2	75.	2	109.	2	143.	5	177.	3
8.	5	42.	1	76.	1	110.	5	144.	2	178.	5
9.	5	43.	5	77.	2	111.	2	145.	2	179.	1
10.	5	44.	5	78.	5	112.	2	146.	2	180.	2
11.	5	45.	3	79.	2	113.	5	147.	2	181.	3
12.	4	46.	4	80.	2	114.	3	148.	2	182.	4
13.	2	47.	5	81.	1	115.	4	149.	5	183.	3
14.	5	48.	5	82.	5	116.	5	150.	2	184.	2
15.	2	49.	2	83.	2	117.	2	151.	4	185.	3
16.	4	50.	2	84.	5	118.	2	152.	5	186.	3
17.	5	51.	3	85.	1	119.	2	153.	2	187.	5
18.	4	52.	2	86.	2	120.	2	154.	2	188.	5
19.	1	53.	5	87.	2	121.	4	155.	5		
20.	5	54.	5	88.	3	122.	5	156.	2		
21.	5	55.	2	89.	2	123.	5	157.	5		
22.	2	56.	5	90.	4	124.	5	158.	3		
23.	2	57.	3	91.	2	125.	2	159.	5		
24.	5	58.	2	92.	5	126.	5	160.	5		
25.	2	59.	4	93.	5	127.	5	161.	3		
26.	5	60.	2	94.	5	128.	5	162.	4		
27.	5	61.	3	95.	5	129.	4	163.	5		
28.	3	62.	5	96.	5	130.	3	164.	2		
29.	1	63.	3	97.	2	131.	2	165.	2		
30.	3	64.	1	98.	5	132.	3	166.	4		
31.	2	65.	2	99.	5	133.	3	167.	5		
32.	1	66.	5	100.	5	134.	5	168.	4		
33.	5	67.	1	101.	4	135.	2	169.	5		
34.	2	68.	3	102.	4	136.	5	170.	4		

APÊNDICE 10: Dados obtidos da variedade NA56-79 tratada termicamente a 50,5°C por 2 horas, utilizando o método de coloração de vasos (CL). Piracicaba, SP.

1.	5	35.	5	69.	3	103.	5	137.	5	171.	5
2.	5	36.	5	70.	5	104.	5	138.	5	172.	5
3.	4	37.	4	71.	5	105.	5	139.	5	173.	5
4.	5	38.	5	72.	5	106.	4	140.	5	174.	5
5.	5	39.	5	73.	4	107.	5	141.	5	175.	5
6.	5	40.	5	74.	5	108.	4	142.	4	176.	5
7.	5	41.	5	75.	5	109.	6	143.	5	177.	5
8.	5	42.	5	76.	5	110.	5	144.	4	178.	5
9.	5	43.	5	77.	5	111.	5	145.	6	179.	4
10.	5	44.	4	78.	5	112.	5	146.	5	180.	5
11.	5	45.	5	79.	5	113.	5	147.	5	181.	5
12.	5	46.	5	80.	5	114.	5	148.	1	182.	5
13.	5	47.	3	81.	5	115.	3	149.	5	183.	5
14.	5	48.	3	82.	4	116.	4	150.	5	184.	5
15.	5	49.	5	83.	5	117.	5	151.	5		
16.	5	50.	5	84.	5	118.	4	152.	5		
17.	4	51.	5	85.	2	119.	5	153.	5		
18.	5	52.	5	86.	5	120.	4	154.	5		
19.	5	53.	5	87.	5	121.	5	155.	5		
20.	5	54.	5	88.	4	122.	5	156.	5		
21.	5	55.	5	89.	5	123.	5	157.	5		
22.	5	56.	5	90.	5	124.	5	158.	5		
23.	4	57.	4	91.	5	125.	5	159.	5		
24.	5	58.	5	92.	5	126.	4	160.	5		
25.	2	59.	4	93.	5	127.	6	161.	5		
26.	5	60.	5	94.	5	128.	3	162.	5		
27.	5	61.	5	95.	5	129.	5	163.	5		
28.	4	62.	5	96.	5	130.	5	164.	3		
29.	5	63.	5	97.	5	131.	5	165.	3		
30.	5	64.	5	98.	4	132.	5	166.	5		
31.	5	65.	5	99.	5	133.	5	167.	5		
32.	5	66.	5	100.	5	134.	5	168.	5		
33.	5	67.	5	101.	4	135.	5	169.	5		
34.	5	68.	5	102.	5	136.	5	170.	5		

APÊNDICE 11: Dados obtidos da variedade NA56-79, tratada termicamente a 52°C por 30 minutos, utilizando o método de coloração dos vasos (CL). Piracicaba, SP.

1.	4	35. 5	69. 5	103. 4	137. 4	171. 5
2.	6	36. 4	70. 5	104. 2	138. 6	172. 5
3.	5	37. 4	71. 4	105. 4	139. 4	173. 5
4.	4	38. 4	72. 5	106. 2	140. 4	174. 5
5.	4	39. 4	73. 5	107. 4	141. 5	175. 6
6.	3	40. 5	74. 4	108. 5	142. 5	176. 4
7.	5	41. 5	75. 5	109. 5	143. 5	177. 3
8.	6	42. 5	76. 3	110. 5	144. 5	178. 5
9.	4	43. 6	77. 2	111. 5	145. 5	179. 5
10.	5	44. 5	78. 6	112. 5	146. 3	180. 2
11.	3	45. 4	79. 5	113. 5	147. 4	181. 5
12.	4	46. 3	80. 5	114. 4	148. 4	182. 2
13.	5	47. 5	81. 5	115. 4	149. 5	183. 5
14.	4	48. 4	82. 5	116. 6	150. 5	184. 4
15.	3	49. 4	83. 4	117. 5	151. 5	185. 5
16.	5	50. 4	84. 4	118. 5	152. 2	186. 5
17.	4	51. 5	85. 3	119. 6	153. 5	187. 5
18.	4	52. 3	86. 5	120. 4	154. 5	188. 5
19.	5	53. 5	87. 5	121. 4	155. 3	189. 4
20.	5	54. 2	88. 5	122. 5	156. 4	190. 3
21.	5	55. 4	89. 6	123. 2	157. 4	191. 5
22.	5	56. 4	90. 5	124. 5	158. 5	
23.	5	57. 4	91. 4	125. 4	159. 5	
24.	4	58. 5	92. 2	126. 3	160. 3	
25.	3	59. 3	93. 5	127. 5	161. 5	
26.	4	60. 4	94. 3	128. 5	162. 4	
27.	5	61. 5	95. 2	129. 5	163. 4	
28.	5	62. 5	96. 5	130. 5	164. 5	
29.	4	63. 3	97. 3	131. 2	165. 4	
30.	5	64. 4	98. 6	132. 4	166. 3	
31.	5	65. 4	99. 5	133. 2	167. 4	
32.	5	66. 3	100. 6	134. 5	168. 5	
33.	5	67. 5	101. 4	135. 4	169. 5	
34.	5	68. 2	102. 4	136. 5	170. 4	