MOSAICO DA CANA-DE-AÇÚCAR: ALGUMAS ESTIRPES DO PATÓGENO OCORRENTES NO ESTADO DE SÃO PAULO E SUA CARACTERIZAÇÃO

JOSÉ CARLOS MATYIS
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. ARMANDO BERGAMIN FILHO

Tese apresentada à Escola
Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", da Uni-
versidade de São Paulo pa-
ra obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área
de Concentração: Fitopato-
logia.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Abril - 1988

Matyis, José Carlos

M446m Mosaico da cana-de-açúcar; algumas estirpes de
patógeno ocorrentes no Estado de São Paulo e sua
caracterização. Piracicaba, 1988.
85p.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar - Doença - São Paulo (Estado)
2. Mosaico da cana-de-açúcar - São Paulo (Estado)
3. Vírus fitopatogênico - Caracterização - São
Paulo (Estado) I. Escola Superior de Agricultura
Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.61

MOSAICO DA CANA-DE-AÇÚCAR: ALGUMAS ESTIRPES DO PATÓGENO
OCORRENTES NO ESTADO DE SÃO PAULO E SUA CARACTERIZAÇÃO

JOSÉ CARLOS MATYIS

Aprovado em: 20/05/88

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Armando Bergamin Filho	ESALQ/USP
Prof. Dr. Clélio Lima Salgado	ESALQ/USP
Prof. Dr. Darcy Martins da Silva	ESALQ/USP
Prof. Dr. Eduardo Castanho Ferraz	ESALQ/USP
Dra. Neusa de Lima Nogueira	CENA

Prof. Dr. Armando Bergamin Filho
Orientador

AGRADECIMENTOS

- Ao meu Orientador Prof. Dr. Armando Bergamin Filho pela sugestão do trabalho e orientação no desenvolvimento do mesmo.
- Ao Prof. Dr. Darcy Martins da Silva pelas sugestões nas áreas de Microscopia Eletrônica, Purificação e Serologia, bem como da utilização de aparelhos do Laboratório de sua chefia.
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura por permitir parte do desenvolvimento do trabalho, nos Laboratórios desse Centro de Pesquisa.
- Ao Planalsucar que, através do Dr. Sizuo Matsuoka, forneceu materiais para o desenvolvimento da pesquisa.
- Ao Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP, pela utilização de seus laboratórios.
- Ao Prof. Dr. Clélio Lima Salgado pelos incentivos e atendimento nas horas necessárias.
- À Dra. Neusa de Lima Nogueira e ao Sr. José Elias Gomes pela ajuda nos serviços de laboratório.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Fontes de vírus	26
3.2. Transmissão	27
3.3. Separação de estirpes	28
3.4. Diferenciação de sintomas	28
3.5. Plantas de milho	29
3.6. Característica física	30
3.6.1. Ponto final de diluição infectiva...	30
3.6.2. Ponto final de inativação térmica...	31
3.7. Purificação	31
3.7.1. Método I (HANDOJO & NOORDMAN (1971)).	32
3.7.2. Método II (GILLASPIE JR., 1971) modifi-	
cado)	35
3.8. Microscopia eletrônica	36
3.9. Espectrofotometria	37
3.10. Frequência de dimensões das partículas.....	37
3.11. Serologia	38
3.12. Infectividade em variedades comerciais	40

4. RESULTADOS	41
4.1. Separação de estirpes	41
4.2. Sintomas em variedade diferenciadora.....	42
4.3. Purificação física	43
4.4. Microscopia eletrônica.....	49
4.5. Espectrofotometria	50
4.6. Dimensão de partículas.....	51
4.7. Serologia	55
4.8. Propriedades físicas.....	58
4.9. Testes de infectividade em variedades co- merciais	59
5. DISCUSSÃO	62
5.1. Sintomas em variedade diferenciadora.....	62
5.2. Separação de estirpes	64
5.3. Purificação física	64
5.4. Espectrofotometria	65
5.5. Dimensionamento e frequência de partículas.	66
5.6. Serologia	68
5.7. Propriedades físicas	69
5.8. Comportamento em variedades comerciais.....	71
6. CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE TABELAS

TABELAS Nº	Página
01 Isolados de variedades de cana-de-açúcar com sintomas de mosaico	26
02 Aparecimento de sintomas visuais em plantas de milho inoculadas com diferentes isolados com sintomas de mosaico.... ..	41
03 Média de comprimento de partículas de vírus e frequência em diferentes faixas de medidas dos isolados I, III e IV... ..	53
04 Análise de variância para comprimento de partículas do vírus do mosaico da cana para diferentes isolados	54
05 Intensidade de reação de microprecipitina de antígeno de vírus do mosaico proveniente do isolado IV (AS-IV) com preparações purificadas dos isolados I, III e IV e também de plantas sadias	55
06 Intensidade de reação de microprecipitina de anti-soro de vírus do mosaico proveniente de isolado (AS-IV) com extratos de folhas dos isolados I, III e IV	56
07 Propriedades físicas do vírus do mosaico da cana provenientes dos isolados I, III e IV..	59
08 Intensidade e evolução de sintomas em variedades comerciais de cana NA 56-79, CB 40-13 e CB 47-355, inoculadas com os isolados I, III e IV, por um período de 30 dias após o início de sintomas	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS Nº	Página
01 Sintomas de mosaicos em variedades CP 28-60, inoculado com isolado I.....	44
02 Sintomas de mosaico em variedade CP 28-60, inoculado com o isolado III.....	45
03 Sintomas de mosaico em variedade CP 28-60, inoculado com o isolado IV	46
04 Diferentes sintomas de mosaico em variedade CP 28-60, inoculadas com os isolados I, III e IV, comparados com folha sadia (T).....	47
05 Partículas do vírus do mosaico da cana-de-açúcar de material purificado pelo Método I, modificado (58.200 x).....	49
06 Partículas do vírus do mosaico da cana-de-açúcar de material purificado pelo Método II (58-200 x).....	50
07 Curva de absorção na faixa de luz ultravioleta de isolados I, III e IV... ..	52
08 Distribuição de comprimento das partículas do vírus do mosaico da cana para os diferentes isolados	54
09 Testes em difusão em ágar dos purificados do vírus do mosaico da cana proveniente dos isolados I, III e IV. As: anti-soro do isolado IV; 1 - Purificado do isolado I; 2 - Purificado do isolado III ; 3 - Purificado do isolado IV	57

MOSAICO DA CANA-DE-AÇÚCAR: ALGUMAS ESTIRPES DO PATÓGENO OCORRENTES NO ESTADO DE SÃO PAULO E SUA CARACTERIZAÇÃO

Autor: JOSÉ CARLOS MATYIS

Orientador: Prof. Dr. ARMANDO BERGAMIN FILHO

RESUMO

Plantas de cana-de-açúcar com sintomas de mosaico foram coletadas no campo, e, com os extratos das folhas, foram efetuadas diluições em série e inoculações sucessivas em plantas de milho, com a finalidade de separar prováveis misturas de estirpes. Posteriormente, isolados provenientes das plantas de milho foram inoculados na variedade de cana diferenciadora CP 28-60. Três sintomas diferentes foram obtidos e denominados de estirpes I, III e IV. O ponto final de diluição para esses isolados foram, respectivamente, 10^{-2} , 10^{-1} e 10^{-3} , e o ponto de inativação térmica 54° , 52° e 56°C . Esses isolados também apresentaram comportamentos diferentes em variedades comerciais CB 40-13, NA 56 - 79 e CB 47-355.

Para a purificação física dos vírus de cada isolado, foram utilizadas plantas de milho inoculadas, cujas folhas, com sintomas, foram colocadas em nitrogênio líquido e solução de sulfito de sódio 0,01M, para obtenção de extrato. Este foi clarificado com centrifugações, éter etílico, ajuste do pH a 4,7 com HCl 0,1M e centrifugação, troca para pH 7,0 com tampão Tris-HCl 0,2M pH 9,0. A preparação purificada foi obtida depois de dois ciclos de centrifugação-ultra centrifugação e resuspensão em tampão fosfato 0,01M pH 7,0. A curva de absorção em luz ultravioleta revelou um pico a 265 nm e um mínimo a 245 nm. A microscopia eletrônica revelou partículas alongadas com média de 719, 732 e 747 nm, respectivamente, para os isolados I, IV e III. Anti-soro foi obtido, injetando, intramuscularmente, em coelho, emulsão contendo preparações do vírus. Para os estudos serológicos, o antígeno foi resuspenso em tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 em solução salina. Testes de microprecipitina, embaixo de óleo mineral, revelaram títulos diferentes entre os três isolados. A difusão, em gel-ágar, contendo SDS, NaCl em tampão Tris 0,1M pH 9,0, apresentou reações semelhantes entre os três isolados.

SUGARCANE MOSAIC: SOME STRAINS OF SAO PAULO STATE AND THEIR CHARACTERIZATION

Author: JOSÉ CARLOS MATYIS

Adviser: Prof. Dr. ARMANDO BERGAMIN FILHO

SUMMARY

Sugarcane plants showing mosaic symptoms were collected in the field and, using leaf extracts, a series of dilution and successive inoculations into corn plants were made with the objective of separating probable strain into the differentiating sugarcane variety CP 28-60. Three different symptoms were obtained, which were called Isolates I, III, and IV. The final dilution for these isolates were, respectively, 10^{-2} , 10^{-1} , and 10^{-3} , and the thermal inactivation points, 54° , 52° , and 56°C . These isolates also showed different behaviors on commercial varieties CB 40-13, NA56-79, and CB 47-355.

Inoculated corn plants were utilized for the physical purification of the virus of each isolate; corn leaves showing symptoms were placed in liquid nitrogen and 0.01M sodium sulfite solution for obtaining extract. The

extract was clarified through centrifugations, ethyl ether, pH adjustment to 4.7 with 0.1M HCl and centrifugation, change to pH 7.0 with 0.2M Tris HCl pH 9.0 buffer. The purified preparation was obtained after two centrifugation-ultracentrifugation cycles and resuspended in 0.01M phosphate pH 7.0 buffer. The ultraviolet light absorption curve revealed a peak at 265 nm and a minimum at 245 nm. Electronic microscopy revealed elongated particles averaging 719, 732, and 747 nm, respectively, for isolates I, IV, and III. Antiserum was obtained by intramuscular injection of emulsion containing virus preparation in rabbits. For the serological studies the antigen was resuspended in 0.01M tris HCl pH 7.2 buffer, in saline solution. Microprecipitin tests, under mineral oil, revealed different titers for the three isolates. Diffusion in gel-agar containing SDS, NaN_3 , and NaCl in 0.1M tris-HCl pH 9.0 buffer presented similar reactions for the three isolates.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar apresenta, atualmente, enorme valor econômico-social, havendo também uma grande difusão geográfica com numerosas aplicações diretas ou indiretas, levando consigo indústrias correlatas, constituindo-se assim, sem dúvida, no maior suporte da indústria agrícola do mundo.

Para o Brasil, a cana-de-açúcar, naturalmente, assume importância ainda maior, por ser o primeiro produtor mundial de cana e também pelo novo conceito de cana-energia, sendo esse o caminho mais curto para resolver o problema da esperada escassez de todas as fontes não renováveis de energia.

A cana-de-açúcar, em todo o mundo, apresenta inúmeros problemas fitossanitários que acarretam considerável queda de produção, sendo o mosaico a doença que se encontra entre as de maior distribuição nos países produtores (ABBOTT, 1961). Aqui no Brasil, entre os anos de 1922 a 1930, o vírus do mosaico causou uma severa epidemia nos ca-

naviais paulistas. A produção de São Paulo, que na época se situava em torno de 3.000.000 de sacas, com a destruição dos canaviais pelo mosaico, reduziu-se a apenas 220.000 sacas. A partir dessa época, foi iniciada a introdução de variedades tolerantes ao vírus e esse fato, associado ao trabalho de multiplicação e distribuição de mudas isentas do vírus, manteve o mosaico num nível não muito prejudicial até os dias atuais (MATSUOKA, 1978). Contudo, mesmo sendo a maioria das variedades cultivadas resistentes ao mosaico, considerando em termos de propriedades ou mesmo de regiões, onde variedades suscetíveis vêm sendo cultivadas em proporções elevadas e por longos períodos, são observados níveis elevados de infecção mostrando prejuízos consideráveis e causando perigo em potencial de disseminação do vírus para as variedades de cana que apresentam boa resistência. Esse cultivo de variedades suscetíveis ou intermediárias se deve ao fato de serem elas mais ricas em açúcar (MATSUOKA, 1978). Iniciou-se, assim, um plantio exagerado de CB 40-13, CB 46-47, CO 740 e Na 56-79. Caminha-se, dessa maneira, para um largo surto de mosaico dentro de poucos anos, onde houver predominância de variedades suscetíveis (MATSUOKA, 1978).

O aparecimento de novas estirpes do vírus do mosaico da cana, capazes de infectar variedades previamente resistentes, faz com que o mosaico seja de extrema importância econômica, sendo, atualmente, descritas mais de onze es-

tirpes e, dentro de cada uma, diversas sub-estirpes. As diferentes estirpes do mosaico da cana podem ser identificadas em variedades diferenciadoras que apresentam diferentes sintomas para cada uma, tais como: tipo de clorose; presença de necrose; descoloração; retardamento do crescimento; período de incubação; etc. Resultados de alguns trabalhos mostram também que duas estirpes podem estar em uma mesma planta, produzindo sintomas mais severos (SUMMERS et alii, 1948).

Variedades consideradas resistentes ao mosaico da cana podem tornar-se suscetíveis com a introdução de uma nova estirpe do vírus na região, sendo este um problema bastante sério para o futuro nas áreas onde se cultiva a cana-de-açúcar.

Com a descoberta de novas estirpes, os melhoristas que trabalham com resistência ao mosaico enfrentam no vos problemas, pois não se sabe ao certo quais as estirpes predominantes no país e quais as mais virulentas. O conheci mento das estirpes existentes em uma determinada área geográfica torna-se de grande importância nos programas de melhora mento, visando resistência ao mosaico.

No Brasil, muito pouco se tem realizado sob este aspecto. É de grande importância em estudo básico sobre o mosaico da cana, principalmente quanto à existência

ou não de diferentes estirpes dos vírus, para que os programas de melhoramento sejam conduzidos em bases mais sólidas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O primeiro autor a reconhecer, como uma anomalia da cana-de-açúcar, a atual doença denominada de mosaico, foi Van Musschenbroek, em Java, no ano de 1892, o qual a denominou de doença de listras-amarelas (ABBOTT, 1961a). Foi ele um dos primeiros a notar o aspecto destrutivo da doença, mas não conseguiu transmitir a mesma para plantas sadias pelas técnicas existentes na época.

LYON (1908) foi o primeiro a preconizar a natureza infecciosa da doença das listras-amarelas de Java e a denominou de clorose infecciosa, semelhante à doença do mosaico do fumo.

EARLE (1918) foi o primeiro a utilizar o termo "mosaico" para esta doença da cana-de-açúcar. STEVENSON (1919) determinou a doença em Porto Rico, depois em Cuba e na Louisiana, onde foi confirmada por BRANDES (1919). Severas perdas foram ocasionadas pela moléstia para as indústrias correlatas, causando grande alarme e estimulando a pesquisa sobre a doença.

BRANDES (1919, 1920a,b) determinou a origem de natureza viral e transmitiu a doença de plantas contaminadas para plantas sadias com afídeos da folha de milho, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), determinado como vetor, e fez a inoculação também por técnica artificial. BRANDES & KLAPHAAK (1923) relataram que muitos cultivares e capins eram suscetíveis ao mosaico da cana. Com relação à origem do mosaico, SUMMERS et alii (1948) afirmam, pelas observações realizadas, que hospedeiro e vírus tiveram o mesmo ponto comum de origem na Nova Guiné, afirmando também que, nessa região, a doença se apresentava endêmica devido às florestas que ali existem, que dificultam a locomoção do vetor nas diversas áreas próximas, e que a disseminação para outras regiões, inclusive Java, foi feita através de mudas contaminadas do ponto de origem. Já em Java a doença apresentou características epidêmicas.

O mosaico é identificado pelos sintomas existentes na folha, os quais variam em intensidade nas diferentes variedades de cana, sendo, algumas vezes, também influenciados pelas estirpes do vírus. O mosaico causa vários graus de distribuição da clorofila e em geral os sintomas produzidos são áreas com verde normal, alternadas com verde mais pálido, sendo a proporção entre elas bastante variável. Às vezes, há somente listas alongadas amareladas mas o mais comum é a predominância de áreas cloróticas em relação ao verde normal e, comumente, uniformemente distribuídas na folha.

Geralmente, as áreas cloróticas são difusas, mas em algumas variedades (ou com certas estirpes do vírus), são claramente definidas e acompanhadas com variação de verde, vermelho ou necroses. Os sintomas de mosaico são geralmente mais distintos na porção basal de folhas novas. Podem estar presentes também na bainha e nos colmos, mas não apresentam importância na identificação da doença, pois estes sintomas se realçam mais em variedades muito suscetíveis, podendo causar também depressões ou cancos. Nos colmos, poderão aparecer áreas alongadas necróticas (ABBOTT, 1961b).

O efeito do mosaico no crescimento da planta varia muito com a variedade e com a estirpe do vírus presente. Algumas variedades podem ser extremamente afetadas e outras podem apresentar pouca ou nenhuma redução aparente no crescimento. Perdas elevadas já foram causadas no passado à cultura canavieira, devido ao vírus do mosaico, provocando quase que total destruição da cultura no Estado de São Paulo (ARRUDA, 1941). Este problema foi contornado com a substituição de variedades. Contudo, nunca foi total esse controle, devido às novas variedades serem apenas tolerantes e houve ocasiões nas quais, devido ao esquecimento das lições anteriores, muitos canaviais chegaram a apresentar 100% de infecção pelo vírus (ARRUDA, 1946), com conseqüentes prejuízos (ARRUDA & ARRUDA, 1949).

MATSUOKA & COSTA (1974) realizaram experimento

tos com as variedades IAC 50-134 e CB 46-47 em duas localidades, simultaneamente, e demonstraram que a primeira foi bastante tolerante à moléstia, sofrendo perdas significativas apenas nas parcelas 100% afetadas, sendo esta perda de 18%, igual nas duas localidades testadas. A variedade CB 46-47 mostrou-se bastante intolerante ao mosaico, sofrendo perdas significativas quando com 25% de infecção na muda, e com uma redução na produção de 71% quando totalmente afetada. O mesmo MATSUOKA & DODSON (1975), conduziram experimentos similares com as variedades CB 40-13 e CO 740, e estas mostraram perdas significativas a partir de 20% de infecção na muda. A queda na produção atingiu 27,8% e 53,8%, respectivamente, nas duas variedades, quando com 60% de infecção inicial. MATSUOKA, em 1978, comentando esses resultados, diz que as perdas ocasionadas pelo mosaico são consideráveis e que infecções nas mudas, em torno de 20%, já acarretam perdas significativas nas variedades intolerantes, como CB 40-13, CB 46-47 e CO 740. Considerando a disseminação que ocorre durante o ciclo da cultura, com as conseqüentes perdas, estima-se que mudas com mais de 10% de infecção já sofrem perdas significativas no cômputo dos 3 a 4 cortes usuais de uma lavoura de cana. No caso da NA 56-79, apesar de apresentar-se com uma resistência intermediária, não há perdas de produção pelo mosaico (DAL PICCOLO et alii, 1981; SORDI et alii, 1983).

O mosaico é uma das mais amplamente distribuídas doenças da cana-de-açúcar. Em todos os principais

países produtores esta doença está presente, com exceção da Guiana Britânica, Mauritius e Tailândia (ABBOTT, 1961a).

No Estado de São Paulo o problema é mais sério na região de Ribeirão Preto ou em propriedades isoladas, nas quais o plantio de variedades suscetíveis vem sendo realizado em proporções demasiadamente altas e por longo tempo ou sem nenhuma medida de controle. Se existem regiões ou propriedades do Estado onde a moléstia não ocorrem ou o faz em nível desprezível, é uma questão varietal (MATSUOKA, 1978). As condições mesológicas do Estado de São Paulo são altamente favoráveis à disseminação do vírus (ARRUDA, 1962).

O mosaico é transmitido naturalmente por inseto vetor e, artificialmente, por inoculação mecânica. O vírus é carregado também através de toletes utilizados para a propagação que é o mais importante meio de transmissão de uma cultura para outra. BRANDES (1920a) foi o primeiro a demonstrar tanto a transmissão natural como a inoculação mecânica artificial. Ele determinou que o pulgão *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), coletado em folhas de milho, era capaz de transmitir o mosaico para plantas saudáveis, após sua alimentação em plantas contaminadas. Posteriormente, o pulgão da ameixeira, *Hysteroneura setariae* (Thos.) (INGRAM & SUMMERS, 1938), mostraram-se vetores na Louisiana, e *Carolinaria cyperii* Ainslie em Porto Rico (TATE & VANDERBERG, 1939).

Com relação às inoculações mecânicas, elas podem ser realizadas de três maneiras: 1. Pelo método idealizado por SEIN JR.(1930), no qual porção de folha com sintomas envolve uma parte da folha sadia, sendo feitas várias picadas com agulha; 2. MATZ (1933) modificou esse método, utilizando extrato de folhas doentes, colocado no cartucho da folha sadia e sendo feitas várias perfurações com agulha; 3. Pelo método por abrasão, idealizado por BAIN (1944), utilizando-se extrato de folhas doentes misturado com carborundum ou areia fina.

O vírus do mosaico da cana-de-açúcar (SCMV) é transmitido de algumas das cinco espécies de *Saccharum*, para um número de outros cultivares e algumas pastagens. As canas nobres, *Saccharum officinarum*, são, em geral, muito suscetíveis. As canas indianas, *S. barberi*, são suscetíveis, mas geralmente mais tolerantes que as canas nobres. O mesmo acontece com as variedades de *S. robustum* que têm sido estudadas. As canas chinesas, *S. sinense*, são, em parte, bastante resistentes ou imunes (ABBOTT, 1961a) e somente ocasionalmente, tem-se observado sintomas do mosaico (YODER, 1926). LIU & Li (1953) encontraram duas variedades de *S. sinense* suscetíveis a uma estirpe do vírus. Muitas formas de *S. spontaneum* possuem também alta resistência ou são imunes (ABBOTT, 1961a).

Outras gramíneas cultivadas ou selvagens são hospedeiras do vírus do mosaico da cana e, algumas vezes,

são muito importantes na disseminação da doença. SUMMERS, et alii (1948) determinaram 10 plantas cultivadas e 38 gramíneas selvagens, dentro de 24 gêneros, que são hospedeiros do vírus do mosaico da cana. TEAKLE & GRYLLS (1973), coletando materiais em diversas regiões da Austrália, encontraram 23 espécies de gramíneas infectadas naturalmente com o vírus do mosaico da cana. ROSENKRANZ (1978), estudando 57 espécies de gramíneas, dentro de 26 gêneros, determinou que 50 espécies eram suscetíveis ao vírus do mosaico da cana, sendo oito gêneros ainda não relatados e muitas das novas espécies de gramíneas sendo perenes. Entre as gramíneas mais cultivadas estão o milho e o sorgo que favorecem grandemente a disseminação do vírus para as culturas de cana-de-açúcar próximas a essas culturas, servindo como fonte de inóculo e abrigo de vetores, principalmente *Rhopalosiphum maidis*. Muitos hospedeiros suscetíveis são gramíneas anuais muito importantes na disseminação do mosaico (ABBOTT, 1961a). O *Sorghum halepenses* não é suscetível ao mosaico, mas pode ser fator muito importante na disseminação do vírus por ser hospedeiro do pulgão vetor, *Rhopalosiphum maidis* (SUMMERS, et alii, 1948). Mais recentemente, em estudos realizados por ABBOTT & TIPPETT (1964), foi determinado ser o *S. halepense* suscetível a uma das estirpes do vírus do mosaico da cana.

EDGERTON & TACCART (1924) selecionaram plantas das variedades de cana D-74 e Louisiana púrpura com man-

chas de sintomas de mosaico mais severo dentro dos padrões para outras plantas e interpretaram como variantes de clones de cana-de-açúcar. BRANDES (1927) comentou que esses resultados seriam devido à existência de mais de uma estirpe do vírus do mosaico. TIMS & EDGERTON (1931) sugeriram que as diferenças no grau de infecção do mosaico, que observaram em quatro variedades de cana-de-açúcar em duas localidades na Louisiana, indicariam a presença de duas estirpes do vírus do mosaico. Essa hipótese de estirpe ocorreu mais com base na diferença de taxa de incidência do mosaico na localidade do que nas diferenças dos padrões de sintomas. TIMS *et alii* (1935), posteriormente, relataram diferenças na virulência entre as viroses ocorrentes em grandes áreas com mosaico mais leve e nas áreas com intensa infecção, e concluíram que havia dois tipos distintos de mosaico com sintomas distintos na Louisiana.

SUMMERS (1934, 1935) foi o primeiro a diferenciar, definitivamente, estirpes do vírus do mosaico da cana. Descreveu quatro estirpes pelos sintomas produzidos em variedades de cana CP 28-60. Posteriormente, o mesmo SUMMERS (1939) descreveu sete estirpes e designou A, B, C, D, E, F e G, e três sub-estirpes de D, baseando-se em sintomas produzidos em três variedades, CP 31-294, CP 29-291 e CO 281. SUMMERS *et alii* (1948) diferenciaram 10 estirpes e sub-estirpes e publicaram uma chave de identificação, sendo que este trabalho teve grande contribuição para o conheci-

mento do vírus do mosaico da cana-de-açúcar e suas relações com as variedades de cana (ABBOTT & TIPPETT, 1966).

LIU (1953) descreveu quatro estirpes do vírus do mosaico em Formosa, designando-as de A, B, C e D, mas os hospedeiros diferenciais foram diferentes dos utilizados por SUMMERS, sendo impossível estabelecer uma relação entre as estirpes ocorrentes nos dois países. Posteriormente LIU & LI (1953) mencionaram somente três estirpes designadas como "Tipo Listras Curtas, Tipo Listras Amarelas e Tipo Listras Finas".

Do estudo do mosaico realizado nos Estados Unidos, após um período de quarentena, com materiais provenientes de outros países, determinou-se a existência de outras estirpes diferentes das que ocorriam na Louisiana (MATZ, 1938). BENNETT (1941) transferiu mosaico de sete variedades de cana-de-açúcar na Argentina para hospedeiros diferenciais utilizados por SUMMERS e identificou todos como sendo do tipo B. BRUEHL (1953, 1954) identificou estirpes A, B e D de diversas variedades de cana-de-açúcar de Porto Rico e a estirpe B foi a que prevalecia em quase todas as variedades.

Com a identificação dessas diversas estirpes, vários critérios foram adotados, e SUMMERS (1934, 1935) e SUMMERS et alii (1948) seguiram as seguintes características nas variedades hospedeiras: 1. Natureza da clorese,

se coloração suave ou padrões severos das manchas cloróticas ou listras; 2. Presença ou ausência de necrose nas lesões; 3. Descoloração na bainha da folha; 4. Retardamento no crescimento; 5. Recuperação e germinação; 6. Índice de infecção e 7. Período de incubação.

A estirpe A produz em CP 31-294 padrão irregular, mosqueado suave, moderado atrofiamento no crescimento e não produz necrose. Em CP 31-588, o padrão de mosqueamento é similar, mas, nessa variedade, a estirpe A produz numerosas manchas e listras curtas, as quais são estreitas, apresentando uma clorose pálida para amarelo-esbranquiçada.

A estirpe B produz em CP 31-294 um padrão de listras cloróticas severas que, caracteristicamente, coalescem, dando um aspecto esbranquiçado, principalmente na base da folha e a necrose está sempre, variando de leve para severo. A estirpe B causa marcante atrofiamento em variedades diferenciadoras CP 31-294, CP 31-586 e CP 31-588, mas o grau de retardamento varia consideravelmente.

A estirpe C produz sintomas semelhantes em todas as variedades observadas. Primeiro, aparecem manchas amarelo-esbranquiçadas isoladas, há um alongamento e se coalescem em longas listras ao longo de toda a folha. As listras podem seguir a nervura principal e são acompanhadas usualmente por necrose. Plantas de CP 31-294 ficam pequenas e há um excessivo perfilhamento. Possui também um baixo ín-

dice de infecção. É diferenciado de outras estirpes por produzir severa clorose e necrose em variedade CO 281.

Sintomas da estirpe D em CP 31-294 são alongados, com clorose severa e esbranquiçada, listras discretas que se estendem ao longo da folha. Necroses, usualmente, aparecem inicialmente, e são caracteristicamente severas, muitas vezes conferindo às plantas novas um aspecto avermelhado.

A estirpe E em variedades diferenciadora CP 31-294 produz pouca elongação, listras severamente clorôticas com características pronunciadamente avermelhadas dos tecidos adjacentes. Causa pouco ou nenhum retardamento no crescimento dessa variedade.

A estirpe F é diferenciada da estirpe A em CP 31-294 pelas manchas de mosaico muito finas com pronunciadas áreas verdes. Igualmente, as estirpes A e H não produzem necrose nas variedades estudadas.

SUMMERS (1939) utilizou CP 29-291 para diferenciar as estirpes B e G, mas ABBOTT & TIPPETT (1966) consideram a estirpe G uma variante da estirpe B.

A diferenciação da estirpe H em relação à A em variedade CP 31-588 é feita pelas manchas mosqueadas difusas em contraste para as bem demarcadas ou grosseiras da es-

tirpe A e pela ausência de listras cloróticas e manchas que caracterizam a estirpe A.

Após a descrição dessas sete estirpes do vírus do mosaico da cana, ABBOTT & TIPPETT (1966) comentam que não pode ser assumido que essas estirpes representam os limites da variação do mosaico da cana. Por causa do grande número de unidades infecciosas envolvidas, é impossível presumir que um dado isolado represente a cultura pura de uma estirpe ou que todos os isolados referidos para uma estirpe são de igual virulência.

Posteriormente à descrição dessas estirpes, TIPPETT & ABBOTT (1968) identificaram uma outra estirpe denominada estirpe I, baseando-se nos sintomas produzidos em variedades diferenciadoras, CP 31-294 e CP 31-588, além da combinação de outros hospedeiros indicadores. Em CP 31-294 a estirpe I produziu severo atrofiamento, mas as plantas não ficaram tão cloróticas como as infectadas com estirpes B e D. Estirpes A e H produziram sintomas mais suaves e nunca clorose e necrose como a estirpe I em plantas novas inoculadas. Em CP 31-588 a porcentagem de infecção da estirpe I foi geralmente grande, mas não se revelou uma boa hospedeira diferenciadora. Doze variedades de cana comerciais foram testadas também para realizar a diferenciação, além de *Sorghum vulgare*, *Sorghum halepense*, "Sudan grass" e milho. TIPPETT & KOIKE (1970) fizeram também uma análise da evolução de in-

festação no campo da estirpe I nas regiões onde se cultivava a cana-de-açúcar, na Louisiana, mostrando uma tendência de aumento de infecção nessas áreas por esta estirpe.

ZUMMO & STOKES (1973) identificaram uma nova estirpe do vírus do mosaico da cana em Meridian, Mississippi, a qual chamaram de estirpe K. Em variedade CP 31-294 esta estirpe produziu um mosaico severo com algumas listras vermelhas. Manchas isoladas amareladas apareciam nas folhas. A lesão aparecia em ambos os lados ou no centro da folha de tecido sadio. As plantas tinham um mínimo de atrofiamento, mas a estirpe B produziu mosaico severo com intenso atrofiamento. Em CP 31-588, a estirpe K produziu mosaico bem demarcado com leve colorido e numerosas lesões isoladas, as quais se coalesciam. As lesões apareciam em halos ou listras, não ocorrendo avermelhamento como em CP 31-294. As plantas também apresentavam atrofiamento severo. A estirpe B, nessa variedade, apresentou padrões grosseiros e severos em toda a folha. A planta possuía atrofiamento leve. As propriedades físicas, entre as estirpes B e K, foram semelhantes.

Uma nova estirpe do vírus mosaico da cana foi identificado por ZUMMO, em 1974, capaz de infectar todas as variedades comerciais que se desenvolviam nas regiões do sul da Georgia e norte da Flórida. Pelos sintomas produzidos nas variedades diferenciadoras, CP 31-294 e CP 31-588, foram separadas das estirpes B e K. Em CP 31-294 produziu severo

atrofiamento com encurtamento dos internódios. Os padrões de mosaico foram bastante severos. Os sintomas iniciais são de pequenas listras verde-claro que se coalescem posteriormente, causando clorose severa, formando listras esbranquiçadas na base da folha. Também se desenvolvem necrose na base da folha. Em CP 31-588 causou pequeno atrofiamento. Inicialmente, a infecção apareceu como pequenas áreas levemente cloróticas e alongadas que posteriormente se coalesciam e ficavam bem demarcadas. Em algumas folhas as lesões pareciam estar restritas a um lado das folhas.

LAUDEN (1974) fez rápidos comentários a respeito do surgimento de nova estirpe do vírus do mosaico da cana-de-açúcar, na Louisiana, designando-a de estirpe M. KOIKE & GILLASPIE JR.(1976) também relatam a estirpe M como uma nova estirpe, mas comentam resultados de experimentos em diversos hospedeiros diferenciadas tanto em cana-de-açúcar como em sorgo, dando, portanto, um trabalho completo sobre o assunto. O vírus isolado produziu sintomas em *Sorghum bicolor* cultivares Rio, Roma e Mer. 70-5, distintos dos produzidos por outras estirpes do vírus A, B, D, H, I e J, presentes na Louisiana. Em variedades de cana CP 31-294, CP 31-588 e C0 281, os sintomas assemelharam-se aos produzidos pela estirpe H, mas diferiu dos demais. KONDAIAH & NAYUDU (1984) apresentaram a descoberta de uma nova estirpe na Índia, a que chamaram de N. O ponto de inativação térmica foi de 58°C,

o ponto final de diluição chegou a 10^{-4} e ocorreram as inclu
sões citoplasmáticas tipo catavento nas células do hospedei-
ro, típicas do potyvirus.

ABBOTT & STOKES (1966) desenvolveram extensi-
vos trabalhos de pesquisa, em Maryland, os quais foram reali-
zados em cooperação com outros pesquisadores, envolvendo na-
da menos que 15 países, visando determinar as estirpes pre-
sentes em cada um. Esses autores concluíram que dos 29 mate-
riais coletados, nesses respectivos países, 7 eram portado-
res da estirpe A, a estirpe B também se apresentou em 7 amo-
stras e o mesmo acontecendo com a estirpe D, sendo que 5 mate-
riais revelaram estirpes diferentes das encontradas nas di-
versas regiões dos Estados Unidos e 3 não puderam ser testa-
das. GILLASPIE JR. et alii (1977) coletaram amostras de
materiais de cana-de-açúcar com sintomas de mosaico, sendo
duas provenientes do Camarões 7 amostras do Irã e 10 prove-
nientes do Paquistão e as estirpes foram parcialmente carac-
terizadas. Os sintomas em hospedeiros diferenciadores in-
dicaram que uma amostra do Camarões continha a estirpe D e
outra provavelmente atípica de D. As provenientes do Irã,
revelaram ser da estirpe B, sendo que 6 das amostras do Pa-
quistão revelaram a presença da estirpe F e as restantes pro-
vavelmente continham uma mistura da estirpe A com F. Os iso-
lados do Camarões e Irã reagiram, fortemente, com anti-soro
das estirpes A, B, D, H e I. Nove dos isolados do Paquistão
deram fraca reação com anti-soro para as estirpes conhecidas

do vírus do mosaico da cana. BHARGAVA et alii (1971) relataram a ocorrência das estirpes A e F em condições da Índia, sendo que a estirpe A sempre se comportou como mais severa do que a F. KHURANA & SINGH (1972) constatarem no mesmo país as estirpes E e C. ORDOSGOITTII (1982) identificou estirpes A, B e H na Venezuela, usando a sintomatologia nas variedades diferenciadoras. Recentemente RAMALO (1981) reportou a ocorrência nas estirpes A, B e F na Argentina. ABBOTT & STOKES (1966) comentaram a necessidade de se confinar o movimento de material propagativo, de uma área para outra, pois a movimentação desses materiais, sem a vigilância dos órgãos de quarentena, pode disseminar estirpes virulentas de vírus do mosaico da cana.

O conhecimento das estirpes, existentes em determinadas áreas geográficas, tornou-se, portanto, de grande importância nos programas de melhoramento, visando resistência ao mosaico.

Segundo BREAU & DUNCKELMAN (1969), foi atribuída a primeira epidemia de mosaico, a Louisiana, a presença da estirpe E, na década de vinte. No fim da década, as variedades nobres foram substituídas por variedades POJ que logo foram infectadas com a estirpe D. Na opinião de SUMMERS et alii (1948), as variedades POJ não teriam sucumbido tão rapidamente se a estirpe dominante fosse somente a E. Com o aumento de plantio com outras variedades,

a estirpe B tornou-se outro fator de epidemia entre 1931 e 1936.

As estirpes também apresentam efeitos variados nas diversas variedades comerciais plantadas. KOIKE & TIPPETT (1971), estudando os efeitos das estirpes A, H e I em três variedades comerciais, concluíram que a estirpe I produziu no "stand" efeitos característicos de perfilhamento e produção de variedades, maiores do que A e H, sendo que as plantas infestadas por A não diferiram em produção das plantas sadias. Vê-se que o conhecimento das estirpes presentes na região torna-se de grande importância e necessário à identificação das dominantes na área. No entanto, a identificação das estirpes é um problema bastante difícil, pois, muitas vezes, as diferenças sintomatológicas são muito pequenas. TIPPETT & ABBOTT (1968) reconhecem essa dificuldade e a necessidade também de hospedeiros diferenciais mais adequados. GILLASPIE JR. & MOCK (1984) relataram que o melhor método para identificação de estirpes do SCMV ainda continua sendo o emprego das variedades de cana-de-açúcar, mais o sorgo cultivar Rio e o capim massambarã (*Sorghum halepense*).

ZUMMO (1974) descreve a estirpe L, semelhante à D, causando redução no crescimento na variedade diferenciadora CP 31-294, mas diferindo desta porque a primeira não causa a morte da gema apical. Também a estirpe L infeta a variedade CP 36-111, a qual é altamente resistente às estir-

pes B e D. DEAN (1970) indica a variedade do sorgo Atlas como possível hospedeira diferenciadora para a estirpe E, mostrando lesões discretas e localizadas, enquanto que as estirpes A, B e D provocam em "Atlas" mosaico severo e necrose.

TOSIC & FORD (1972) realizaram extenso trabalho com grande número de gramíneas, visando encontrar hospedeiros diferenciais para distinguir o vírus do mosaico da cana e o vírus do mosaico anão do milho. PERDOMO & FORBES (1968) estudaram 15 variedades de cana-de-açúcar e concluíram que nenhuma seria adequada como diferenciadora. A diferença de estirpes através da sintomatologia ainda não está bem definida, podendo conduzir a erros de identificação. Além dessas dificuldades, com respeito aos hospedeiros diferenciais, a determinação de estirpes pode ainda ser afetada por outros fatores. As condições ambientais podem influir na manifestação de sintomas tanto na intensidade como na velocidade. ABBOTT & TIPPETT (1966) concluíram que a temperatura não possui efeito aparente na manifestação de sintomas, mas PERDOMO & FORBES (1968) relatam desaparecimento de sintomas três dias após as plantas serem submetidas a 30°C e os sintomas reapareciam quando as plantas eram submetidas novamente a 25°C. As condições climáticas também afetam o índice de infecção, segundo observou RISHI (1973), sendo que a infecção máxima ocorreu em condições de temperatura e umidade altas e decresceu quando um ou outro fator era baixo. KOLOBREUV (1974) concluiu que plantas mantidas em casa de

vegetação, antes da inoculação e posteriormente colocadas sob condições de viveiro, são mais suscetíveis do que as mantidas permanentemente sob condições de viveiro.

Os diferentes estágios de desenvolvimento da planta também influem na infecção, segundo DEAN & COLEMAN (1965), pois as plantas em estágio de "seedling" mostram-se mais suscetíveis que plantas jovens provenientes de toletes. BENDA (1969) afirma que, à medida em que a planta envelhece, o sucesso de inoculação decresce. O autor sugere que quando o vírus infeta a planta em uma folha mais velha ao atingir o floema ele move passivamente com os demais materiais para os tecidos de armazenamento onde fica retido.

Sintomas misturados de mais de uma estirpe podem ocorrer, como relatam ABBOTT & TIPPETT (1966), que observaram que a mistura de estirpe A com estirpe C, inoculadas em variedade CQ 251, apresentou sintomas misturados, havendo um menor crescimento da planta quando somente em presença de C. Às vezes, algumas plantas apresentavam somente sintomas de estirpe A, outras somente de estirpe C.

Estudando o efeito de mistura do mosaico anão do milho com o mosaico da cana, GILLASPIE JR. & KOIKE (1973) concluíram que os sintomas poderiam ser confundidos com o de uma nova estirpe do vírus no mosaico anão do milho. Foi observado por KOIKE (1973), que inoculou a estirpe H em varie-

dade CP 52-68 e L 60-25, antes ou após as plantas serem inoculadas com estirpe A do mosaico anão do milho, que a taxa de infecção foi maior quando inoculadas primeiro com a estirpe A do mosaico anão do milho. Esse tipo de infecção mista também pode influir na determinação de estirpes do mosaico da cana, portanto, um fator importante a ser considerado.

Com a descoberta dessas estirpes, os melhoristas, que trabalham com resistência ao mosaico, enfrentam problemas, tais como: quais as estirpes existentes no país? Quais as mais virulentas? Deve-se obter variedades resistentes para todas as estirpes existentes no país ou somente às estirpes mais prevalentes na região a que se destina esta variedade? Nos programas de melhoramento, visando a resistência ao vírus do mosaico da cana-de-açúcar, os exemplos, apresentados por ABBOTT & TIPPETT (1966) e BREAUX & DUNCKELMAN (1969), mostraram que o ideal seria obter-se uma variedade que englobe resistência para todas as estirpes que prevaleçam em determinada área geográfica, devido ao vírus ser de fácil disseminação no campo.

No Brasil, pouco se tem realizado em melhoramento de cana-de-açúcar, visando o aspecto de resistência a diferentes estirpes do vírus do mosaico. MATSUOKA & DODSON (1975) e MATSUOKA (1978) apontaram que muitas usinas de açúcar e álcool, pela absoluta falta de boas variedades, estão ampliando o plantio de variedades mais suscetíveis ao mosai-

co, podendo, assim, aumentar a incidência da doença nas principais regiões produtoras, principalmente devido às condições climáticas do Estado de São Paulo serem altamente favoráveis à disseminação e ocorrência do vírus (ARRUDA, 1962).

Os órgãos de pesquisas em cana-de-açúcar, aqui no Brasil, devem considerar, como problemas fundamentais, a existência ou não de diferentes estirpes do vírus do mosaico nas principais regiões produtoras da cana-de-açúcar no país, assim como as principais fontes de resistência às estirpes prevalentes e a herança desta resistência. Embora os programas de melhoramento tem levado em consideração a obtenção de variedades resistentes ao SCMV (MATSUOKA *et alii*, 1983), as estirpes prevalentes no país ainda não foram perfeitamente caracterizadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. FONTES DE VÍRUS

Todos os isolados utilizados foram obtidos a partir de plantas apresentando sintomas de mosaico, enviadas pela Coordenadoria Regional Sul do Planalsucar. Os isolados foram coletados, na região de Araras (SP), de diferentes variedades de cana cultivadas comercialmente e cada isolado foi designado com numeração como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Isolados de variedades de cana-de-açúcar com sintomas de mosaico.

Isolado	Variedades	Procedência
I	NA 56-79	Araras
II	CB 47-355	Araras
III	CB 40-13	Araras
IV	CB 44-95	Araras
V	Co 421	Araras
VI	Co 740	Araras

3.2. TRANSMISSÃO

Os isolados originais de cana-de-açúcar com sintomas de mosaico foram transmitidos, mecanicamente, com carborundum "600 mesh" para plantas de milho, com a finalidade de realizar separação de prováveis misturas de estirpes.

Para obtenção de extrato para inoculação, as folhas tinham sua nervura central retiradas e o limbo foliar era picado em pedaços pequenos e colocados em almofariz de porcelana para trituração, contendo solução tampão na proporção de 1:5 (peso/volume) (COSTA & PENTEADO, 1951). O mesmo tipo de extração foi utilizado para inoculações em variedades de cana-de-açúcar diferenciadoras e também comerciais, bem como plantas de milho utilizadas na purificação física e determinação de algumas propriedades físicas.

O extrato, obtido pela trituração, era então filtrado em pano de malha fina para eliminação das impurezas mais grosseiras, em seguida centrifugado a 8000 rpm por 15 minutos em centrífuga SORVAL SS-4, ROTOR SS-34. O precipitado era descartado e o sobrenadante, aproveitado para as inoculações, armazenado a 4°C. A solução tampão utilizada foi a de fosfato de sódio em concentração de 0,01M a pH 7,0, contendo 0,01M de sulfito de sódio (DEAN, 1977). As plantas a serem inoculadas tanto de cana-de-açúcar como de milho estavam no estágio de 2 a 3 folhas (COSTA & PENTEADO, 1951). Imediatamente após a inoculação, as folhas foram lavadas com água.

3.3. SEPARAÇÃO DE ESTIRPES

Todos os materiais coletados no campo, com sintomas de mosaico, antes de serem inoculados na variedade diferenciadora de cana, eram transmitidos por dois ciclos consecutivos em plantas de milho, para eliminar possíveis misturas de estirpes do vírus do mosaico na mesma planta. Obtinha-se o extrato para inoculação do isolado na diluição 10^{-1} (peso/volume) e fazia-se diluição em série para 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Inoculava-se cada uma das diluições em plantas de milho. No primeiro ciclo, plantas que apresentavam sintomas nas maiores diluições foram utilizadas para se fazer novo extrato, também nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Novamente as plantas que apresentaram sintomas na maior diluição eram utilizadas como fonte de inóculo sendo que, após esse segundo ciclo, o material foi inoculado em variedade de cana-de-açúcar diferenciadora (GILLASPIE JR. & KOIKE, 1973).

3.4. DIFERENCIAÇÃO DE SINTOMAS

A variedade diferenciadora de cana-de-açúcar utilizada foi a CP 28-60, sendo o material vegetal obtido na Estação Experimental do Planalsucar, em Araras, após a certificação de ausência de contaminação em mosaico. Os toletes tratados, provenientes do Planalsucar, eram cortados em pequenos discos, na região da gema, e colocados em câmara

úmida e estufa a 24°C por um período de 2 a 3 dias, para serem selecionadas as gemas com melhor início de desenvolvimento e enraizamento. Em seguida, eram transferidos para bandejas, contendo areia esterilizada e mantidos em casa de vegetação. Finalmente, após um período de 1 a 2 semanas, as plantas, que apresentaram um melhor desenvolvimento, eram, então, transferidas para vasos de alumínio, contendo uma mistura esterilizada de solo, areia e matéria orgânica.

Após duas a três semanas do transplante das mudas de cana-de-açúcar em vasos de alumínio, as mesmas eram inoculadas com os extratos obtidos de folhas de plantas de milho com sintomas, provenientes do ensaio de separação de estirpes.

3.5. PLANTAS DE MILHO

Plantas de milho eram obtidas com a finalidade de serem utilizadas na purificação biológica dos diferentes materiais coletados em campo, bem como serem trabalhadas em purificações físicas, testes de infectividade e para determinações de algumas características físicas. As sementes de milho tratadas eram provenientes do Departamento de Genética da ESALQ e o cultivar utilizado foi o Piranão VD-2. Foram colocadas 7 a 8 sementes por vaso que continham uma mistura esterilizada de solo, areia e material orgânico. Após

alguns dias de germinação, procedia-se a um desbaste para deixar 5 plantas em cada vaso. As mesmas eram inoculadas após 13 a 15 dias de germinação (COSTA & PENTEADO, 1951) e os primeiros sintomas foram observados 5 a 7 dias decorridos da inoculação.

3.6. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

As principais características observadas foram o ponto final de diluição infectiva e o ponto final de inativação térmica.

3.6.1. Ponto final de diluição infectiva

O material vegetal utilizado constituia-se de plantas de milho com sintomas de mosaico com 3 a 4 semanas após a inoculação. A diluição inicial de 10^{-1} era obtida triturando-se 1 g de folhas com sintomas e adicionando-se 9 ml de solução tampão. O processamento do extrato, em seguida, foi semelhante ao descrito no item 3.2. Em seguida, realizou-se uma diluição em série com solução tampão, obtendo-se diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Cada diluição foi inoculada em plantas de milho, mantidas em casa de vegetação, e observados os resultados.

3.6.2. Ponto final de inativação térmica

Para obtenção do extrato para tratamento térmico e inoculação, eram utilizadas folhas de milho com sintomas de mosaico como no processo anterior, mas a diluição do extrato foi 1:5 (peso/volume). As temperaturas utilizadas foram: 50°C, 52°C, 54°C e 56°C. Os extratos dos diferentes isolados eram colocados em tubo de 8 mm de diâmetro interno para cada tratamento. Todos os tratamentos eram realizados ao mesmo tempo, por um período de 10 minutos, em diferentes aparelhos de banho de temperatura constante e cada tubo era colocado dentro de um anel de metal resistente dentro do banho para melhor manter a temperatura desejada. A cada 2 minutos de tratamento eram verificadas as temperaturas em termômetro mergulhado no banho.

Após o tratamento, os tubos eram colocados imediatamente em gelo para abaixar a temperatura e depois mantidos a 4°C para inoculação. Eram utilizadas plantas de milho, mantidas em casa de vegetação.

3.7. PURIFICAÇÃO FÍSICA

O material utilizado para purificação constituiu-se de folhas de milho com sintomas de mosaico, previamente inoculadas com os isolados selecionados, após um período de 3 a 4 semanas da inoculação. Diferentes métodos de

purificação eram utilizados com algumas modificações e são descritos em seguida.

3.7.1. Método I

Método baseado no trabalho de HANDOJO & NOORDAM (1971)

Folhas com sintomas de mosaico eram colocadas em solução de sulfito de sódio 0,01M na proporção de 1 g para cada 2 ml e homogeneizadas em liquidificador. Uma alternativa foi picar as folhas em almofariz, adicionar nitrogênio líquido para obtenção de pó-vegetal, o qual era colocado em solução de sulfito de sódio. As preparações eram conduzidas a 4°C, aproximadamente, bem como as etapas posteriores da clarificação.

O extrato homogeneizado era filtrado em pano de malha fina para retirada das impurezas mais grosseiras e centrifugado a 8000 rpm por 15 minutos em centrífuga SORVAL SS-4 ROTOR SS-34. O sobrenadante era então misturado em éter etílico na proporção de 1:1 (v/v) em funil separador de 500 ml. A fase aquosa era separada e centrifugada a 8000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante era separado e ajustou-se o pH a 4,7 com HCl 0,1N e logo em seguida novamente centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante era separado e ajustado a pH 7,0, com tampão Tris-HCl (NELHANDS & STUMPF, 1958) 0,2M pH 9,0. Uma alternativa era a correção do pH somente com Tris (Hidroxemetil)-aminometano 0,2M. O pH - metro

utilizado era o Micronal B 374. Em seguida, o clarificado sofreu uma ultracentrifugação a 28000 rpm em ultracentrífuga BECKMANN, utilizando-se ROTOR SW-30, por um período de 90 minutos. O material sedimentado era diluído em 2,0 ml de tampão Mc Ilvan 0,05M pH 7,0. A suspensão sofreu uma centrifugação a 8000 rpm por 15 minutos para eliminar o material não solúvel. Em seguida, novo ciclo de ultracentrifugação e baixa centrifugação era realizado. Uma modificação era a utilização de tampão fosfato 0,01M pH 7,0 ao invés de tampão Mc Ilvan. Quando o purificado era utilizado para os testes serológicos, o "pellet" era resuspenso em tampão Tris-HCl pH 7,2 (NOORDAN, 1973).

ESQUEMA: Método I**FOLHAS COM SINTOMAS**

- Adicionado sulfito de sódio 0,01M
- Homogeneização
- Filtragem em pano de malha fina
- 8000 rpm/15 minutos

PRECIPITADO

Descartado

SOBRENADANTE

- Adicionado éter (v/v) em funil separador

FASE NÃO AQUOSA

Descartado

FASE AQUOSA

- 8000 rpm/15 minutos

PRECIPITADO

Descartado

SOBRENADANTE

- Ajustado a pH 4,7 com HCl 0,1N
- 8000 rpm/15 minutos

PRECIPITADO

Descartado

SOBRENADANTE

- Ajustado a pH 7,0 com Tris-HCl
- 28000 rpm/90 minutos

"PELLET"

- Resuspenso em 2,0 ml solução tampão
- 8000 rpm/15 minutos

SOBRENADANTE

Descartado

PRECIPITADO

Descartado

SOBRENADANTE

- 28000 rpm/90 minutos

"PELLET"

- Resuspenso em 2,0 ml solução tampão
- 8000 rpm/15 minutos

SOBRENADANTE

Descartado

PRECIPITADO

Descartado

PURIFICADO

3.7.2. Método II

Método baseado no trabalho de GILLASPIE JR. (1971)

Folhas com sintomas de mosaico eram colocadas em solução de citrato de sódio 0,5M e sulfato de sódio 0,2M na proporção de 1 g para 2 mL e homogeneizadas em liquidificador. A preparação era conduzida a 4°C, aproximadamente, bem como as etapas posteriores. O extrato homogeneizado era filtrado em pano de malha fina para retirar as impurezas mais grosseiras e centrifugado a 8000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante era adicionado a clorofórmio na proporção volume/volume em funil separador de 500 mL. A emulsão e a fase aquosa eram separadas através de centrifugação a 8000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa separada sofreu, então, outra centrifugação a 8000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante separado era centrifugado a 28000 rpm por 60 minutos em ROTOR SW-30. O material peletado era resuspenso em tampão de Mc Ilvan 0,05M, pH 7,0, em volume de 2 mL. Em seguida, o material sofreu um ciclo em gradiente de sacarose (BRÄCKE, 1960) com concentração de 5%, 10%, 20%, 30% e 40% e 10 mL de cada, totalizando 50 mL em cada tubo de gradiente. Ultracentrifugou-se a 24000 rpm por 120 minutos em ROTOR SW-25.

ESQUEMA: Método II**FOLHAS COM SINTOMAS**

- Adicionado em solução 0,02M de sulfato de sódio e 0,5M de citrato de sódio
- Homogeneização
- Filtragem em pano de malha fina
- 8000 rpm/15 minutos

PRECIPITADO

Descartado

SOBRENADANTE

- Adicionado clorofórmio (v/v) funil separador
- 8000 rpm/5 minutos

FASE NÃO AQUOSA

Descartada

FASE AQUOSA

- 8000 rpm/10 minutos

PRECIPITADO

Descartado

SOBRENADANTE

- 28000 rpm/10 minutos

"PELLET"

- Adicionado 2 mL tampão Mc Ilvan 0,05M, pH 7,0
- Colocado em **Gradiente de Sacarose**
- 24000 rpm/120 minutos

3.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Todas as preparações eram observadas em microscópio eletrônico SIEMENS, modelo ELMISKOP IA. O material a ser examinado era colocado em grades de cobre previamente cobertas com parlódio 1,5% e cobertas com uma pulverização de carvão (SANTANDER, 1969), com a finalidade de confe

rir uma maior resistênc ia ã mebrana de parlôdio. A cobertura era feita em metalizador SIEMENS modelo VBG 500. As pre-
parações do tipo DIP era constratadas, negativamente, com
ácido fosfotungstico 1,5% (BRENNER & HORNER, 1958) neutrali-
zado com KOH 5N ou, positivamente, com acetato de uranila 3%.

3.9. ESPECTROFOTOMETRIA

O espectro de absorção, na faixa de luz ultravioleta, era determinado em espectrofotômetro VARIAN TECH-
TRON modelo 635. A determinação era feita em solução tampão
de Mc Ilvan 0,01M, pH 7,0 (HANDOJO & NOORDAN, 1971). Utili-
zou-se também, como variação, solução tampão de fosfato de
sódio 0,01M pH 7,0.

3.10. FREQUÊNCIA DE DIMENSÕES DAS PARTÍCULAS

As dimensões das partículas de vírus dosdife-
rentes isolados utilizados e selecionados eram determinados
a partir das preparações finais do processo de purificação.

Todas as fotografias de cada série de medi-
ções eram feitas em um mesmo dia para todas as preparações
com a finalidade de minimizar as variações de magnificação
do microscópio eletrônico (TAYLOR & SMITH, 1968). De 3 a 4
fotografias de cada material eram examinadas, sendo utiliza-

das duas áreas diferentes para fotografar em uma mesma "grade" e também em 2 a 3 grades diferentes.

As dimensões das partículas, obtidas diretamente das fotografias de cada isolado, eram anotadas, e posteriormente, feito um diagrama de distribuição de frequência de tamanho de partículas para comparar os diversos isolados obtidos. De cada isolado eram medidas 100 partículas de vírus. Preparações purificadas de TMV também eram fotografadas para comparações do aumento do microscópio eletrônico e dimensões das partículas.

3.11. SEROLOGIA

O peletado final do material purificado era resuspenso em solução Tris-HCl 0,01M pH 7,2 (NOORDAN, 1973) em volume de 1,5 mL. O material vegetal, utilizado para purificação, constituiu-se de folhas de plantas de milho com sintomas de mosaico, as quais tinham sido inoculadas mecanicamente com o isolado IV, utilizando-se um total de 100 g de folhas. O purificado final era emulsionado em igual volume com adjuvante de Freud incompleto e injetado intramuscularmente em coelho em uma só aplicação, sendo metade do volume aplicado em uma perna e a outra metade na outra perna. O coelho era sangrado 15 dias após a aplicação e, do material retirado, mantido em geladeira por uma noite, separou-se o anti-soro. Este era centrifugado a 8000 rpm por 15 minutos.

Era aproveitado o sobrenadante, ao qual adicionou-se mertiolato 1%. O anti-soro, assim obtido, foi denominado de AS-IV. Para se fazer as reações serológicas dos diferentes isolados, utilizou-se tanto o preparo purificado como também simples extratos de folhas com sintomas de mosaico na proporção de 1:5 (peso/volume).

Tanto para resuspender o peletado final da purificação, como obtenção de extratos de folhas e realizar as diferentes diluições do anti-soro e antígeno, utilizou-se solução tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 contendo 0,85% de NaCl (NOORDAN, 1973). Os testes serológicos realizados eram feitos com a técnica de microprecipitina em placas de Petri com banho de óleo em silicone. Eram colocadas as gotas de anti-soro para serem, depois, misturadas com gotas de antígeno e, depois, cobertas com óleo mineral para evitar evaporação. Após um período de 30 a 60 minutos em temperatura ambiente, as placas eram observadas em lupa para verificar a intensidade de reação quando positiva.

Eram realizados também testes serológicos pela difusão em gel-ágar e em presença de sulfato de sódio dodecil (SDS). A composição do meio de gel-ágar consistiu de 0,7% de ágar (Difco), 0,1% de azide de sódio, 0,2% de SDS e 0,7% de cloreto de sódio em solução tampão Tris-HCl 0,1M, pH 9,0. Esse meio era vertido posteriormente em placas de Petri e, após sua solidificação, eram realizadas as perfurações tendo-se colocado o anti-soro (AS-IV) no orifício cen-

tral e os antígenos (material purificado) nos demais (GILLAS PIE JR. et alii, 1977). Os resultados eram observados após 24 a 48 horas, com as lâminas mantidas à temperatura ambiente.

3.12. INFECTIVIDADE EM VARIEDADES COMERCIAIS

Para os testes de infectividade, em variedades de cana-de-açúcar comerciais, das estirpes do vírus do mosaico diferenciadas em CP 28-60, eram utilizadas as variedades CB 40-13, CB 47-355 e NA 56-79. As mudas eram obtidas de plantas sadias provenientes da Estação Experimental do Planalsucar, em Araras, cortadas em pequenos discos na região da gema e mantidas por 2 a 3 dias em câmara úmida a 24°C para selecionar as melhores gemas e com bom enraizamento. Eram então transferidas em bandeja com areia esterilizada e mantidas por 1 a 2 semanas em casa de vegetação. As plantas selecionadas eram transferidas para vasos de alumínio contendo mistura esterilizada de solo, areia e matéria orgânica. Após duas a três semanas do transplante, as plantas eram inoculadas. Cada isolado foi inoculado, mecanicamente, em 3 vasos, contendo 2 plantas cada um.

4. RESULTADOS

4.1. SEPARAÇÃO DE ESTIRPES

Dos diferentes isolados, inoculados em plantas de milho nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , em dois ciclos consecutivos, o isolado IV foi o que causou sintomas típicos de mosaico nas diluições mais altas. Os isolados I, II, V e VI causaram sintomas em diluições inferiores, sendo que o isolado III foi o que causou sintomas somente na menor diluição. Esses resultados podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Aparecimento de sintomas visuais em plantas de milho inoculadas com diferentes isolados com sintomas de mosaico.

Isolados	Diluições			
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
I	+	+	-	-
II	+	+	-	-
III	+	-	-	-
IV	+	+	+	-
V	+	+	-	-
VI	+	+	-	-

+ Com sintoma de mosaico; - ausência de sintomas.

Os primeiros sintomas de mosaico em plantas de milho, inoculadas com os diferentes isolados, apareceram entre 5 a 15 dias após a inoculação, sendo o isolado IV o que apresentou menor período de incubação em relação aos demais, e o III o que apresentou maior período de incubação.

4.2. SINTOMAS EM VARIEDADE DIFERENCIADORA

Os isolados que apresentaram sintomas de mosaico nas diluições mais altas em plantas de milho eram inoculados em cana-de-açúcar da variedade CP 28-60 para diferenciação com base em sintomas. Dos seis isolados iniciais empregados, era possível distinguir, visualmente, em condições de casa de vegetação, três diferentes tipos de sintomas de mosaico nas folhas de cana, como podem ser observados nas Figuras 1, 2 e 3. Folhas inoculadas com os isolados I, II, V e VI apresentaram sintomas semelhantes e nos ensaios subsequentes, usou-se somente o isolado I. Com relação as folhas inoculadas com os materiais III e IV, os sintomas eram diferentes entre si e também diferiram do sintoma causado por I.

Pode-se observar, pela Figura 1, que o isolado denominado I apresenta um mosaico em que a clorose forma estrias bastante intensas e contínuas ao longo de todo o limbo foliar, sendo que, posteriormente, algumas áreas evoluem para manchas necróticas. O isolado denominado III também apresentou mosaico com estrias, não apresentando, entretanto,

uma continuidade como em I, sendo as estrias interrompidas dando um aspecto mais em forma de ilhas, evoluindo, posteriormente, também para necrose (Figura 2). O isolado IV, nos primeiros meses, apresentou um mosaico mais suave, não apresentando aspecto estriado e evolução para necrose (Figura 3). Após um ano em casa de vegetação, o isolado IV começou a apresentar aspectos de mosaico com estrias, nos meses mais quente, mas, nos meses mais frios, as brotações e novas folhas apresentaram novamente o aspecto anterior.

Na Figura 4 os três diferentes tipos de sintomas podem ser comparados com a testemunha não inoculada.

4.3. PURIFICAÇÃO FÍSICA

O material vegetal utilizado para a purificação do vírus do mosaico da cana dos três materiais, eram plantas de milho devido às mesmas exteriorizarem os sintomas mais rapidamente e as folhas serem de mais fácil manuseio nos processos de clarificação e purificação.

Figura 1. Sintomas de mosaico em variedade CP 28-60, inoculado com o isolado I.

Figura 2. Sintomas de mosaico em variedade CP 28-60, inoculado com o isolado III.

Figura 3. Sintomas do mosaico em variedade CP 28-60 inoculada com o isolado IV.

Figura 4. Diferentes sintomas de mosaico em variedade CP 28-60, inoculadas com os isolados I, III e IV, com parados com folha sadia (T).

O primeiro método utilizado, denominado de Método I, foi o que apresentou melhor resultado no final da purificação, tanto no aspecto de quantidade de partículas como também na eliminação de proteínas normais da planta. A alternativa no processamento inicial do material vegetal, utilizando-se nitrogênio líquido, melhorou sensivelmente o processo de clarificação do extrato e a quantidade de partículas do "pellet" final da purificação. Com relação à variação de tampão fosfato e tampão Mc Ilvan para suspender o material peletado, não se pôde observar qualquer alteração na eficiência.

A utilização do método II de purificação, quando comparado com o Método I, apresentou uma concentração menor de partículas de vírus após a primeira ultracentrifugação, levando também a resultados não satisfatórios, quando colocado em gradiente de densidade de sacarose, devido apresentar, após o ciclo de ultra-centrifugação, uma faixa bastante difusa e ampla.

Devido a esses resultados obtidos no processo de purificação, o método utilizado para o desenvolvimento dos trabalhos foi o método I com aplicação de nitrogênio líquido no processo inicial de clarificação e uso de tampão fosfato para resuspender o "pellet" final. Para os estudos serológicos, a utilização de tampão Tris HCl, no final, não trouxe qualquer alteração que pudesse ser notada.

4.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Partículas longas e flexíveis do vírus do mosaico da cana eram observadas em todas as preparações realizadas a partir de materiais vegetais com sintomas. A quantidade e frequência das partículas tiveram melhores resultados com as modificações e utilização do Método I (Figura 5), quando comparado com o Método II (Figura 6).

Figura 5. Partículas do vírus do mosaico da cana-de-açúcar de material purificado pelo Método I modificado. (58.200 x).

Figura 6. Partículas do vírus do mosaico da cana-de-açúcar de material purificado pelo Método II. (58.200 x).

4.5. ESPECTROFOTOMETRIA

O espectro de absorção da luz ultravioleta utilizado foi na faixa de 200 nm a 300 nm. Os melhores resultados obtidos com os três isolados purificados seleciona-

dos foram com o "pellet" final do Método I de purificação mo dificado e utilizando-se para resuspender solução tampão fosfato. Pode-se observar, pela Figura 7, que os três isola- dos apresentaram um pico de absorção em comprimento de onda ao redor de 265 nm e um mínimo ao redor de 245 nm, semelhantes a resultados obtidos por DELGADO-SANCHES & GROGAN (1966).

Pode-se observar também, pelos resultados obtidos, que, principalmente para os isolados III e IV, o ponto máximo e o mínimo apresentaram uma diferença bastante pequena, o mesmo ocorrendo em outras preparações, provavelmente devido a impurezas que provocam a dispersão da luz emitida. Para eliminar essas influências, tentou-se fazer a correção como a descrita por NOORDAN (1973), mas os resultados não fo ram satisfatórios, devido às baixas leituras obtidas na faixa de luz visível entre 300 nm a 600 nm.

4.6. DIMENSÃO DE PARTÍCULAS

Medidas comparativas das partículas do vírus do mosaico, obtidas da purificação dos três materiais selecionados, foram realizadas (Figura 8). A maior frequência de partículas para os três isolados está na faixa de 650 a 850 nm, sendo que o isolado IV apresenta uma frequência bem maior em 720 a 730 nm quando comparados com I e III, que pos suem uma maior distribuição na faixa de 650 a 850 nm. Os

Figura 7. Curva de absorção na faixa de luz ultravioleta de isolados I, III e IV.

isolados I e III apresentaram uma maior heterogeneidade no tamanho das partículas quando comparadas com o isolado IV.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados do comprimento médio das partículas de vírus em diferentes faixas, bem como suas frequências. Na faixa de maior frequência, a média do comprimento das partículas foi maior para o isolado III e menor para I, sendo que nas faixas inferiores, houve uma tendência de maior média para IV e pouca diferença entre I e III, com exceção para a faixa menor que 250 nm. Na frequência de comprimento de partículas de vírus na faixa de 650 a 850 nm, houve uma predominância de IV em relação a I e III, e nas faixas inferiores a frequência foi menor para IV.

Os cálculos estatísticos (Teste F) não revelaram diferenças significativas entre os comprimentos das partículas dos três isolados na faixa de maior frequência, entre 650 a 850 nm (Tabela 4).

Tabela 3. Média de comprimento de partículas de vírus e frequência em diferentes faixas de medidas, dos isolados I, III e IV.

Faixa (nm)	Isolados					
	Média (nm)			Frequência (%)		
	I	III	IV	I	III	IV
> 250	214	189	180	13	7	6
250 - 450	356	355	384	14	21	14
450 - 650	529	531	557	16	12	15
650 - 850	719	747	732	49	48	57
> 850				8	12	8

Figura 8. Distribuição de comprimento das partículas de vírus do mosaico da cana.

Tabela 4. Análise de variância para comprimento de partículas do vírus do mosaico da cana para os diferentes isolados.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Desvio Padrão	F
Tratamento	2	18255,88	9127,94	95,54	1,24 ^{ns}
Resíduo	45	331462,12	7365,82		
Total	47	349718,00			

4.7. SEROLOGIA

Os resultados dos testes serológicos estão indicados nas Tabelas 5 e 6, utilizando-se, respectivamente, antígenos de material vegetal purificado e extrato clarificado de folhas. Quando se utilizou antígeno de material purificado, partiu-se sempre de 50 g de folhas com sintomas de mosaico para os três isolados. Com extratos de folhas era obedecida sempre a proporção de 1:5 (peso/volume).

Tabela 5. Intensidade de reação de microprecipitina de anti-soro de vírus do mosaico proveniente do isolado IV (AS-IV) com preparações purificadas dos isolados I, III e IV e também de plantas sadias.

Antígenos Diluições		Anti-soro (AS-IV) - Diluições					
		1/1	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Material sadio	1/1	-	-	-	-	-	-
	1/4	-	-	-	-	-	-
	1/8	-	-	-	-	-	-
	1/16	-	-	-	-	-	-
Isolado I	1/1	++++	+++	+++	+++	++	+
	1/4	++++	++	++	++	-	-
	1/8	+++	+	+	-	-	-
	1/16	++	-	-	-	-	-
Isolado IV	1/1	++++	+++	+++	++	++	-
	1/4	+++	++	++	+	-	-
	1/8	++	+	+	-	-	-
	1/16	+	-	-	-	-	-
Isolado III	1/1	++++	+++	++	+	-	-
	1/4	+++	++	++	+	-	-
	1/8	+	+	+	-	-	-
	1/16	-	-	-	-	-	-

- Intensidade de reação: ++++ = muito forte
 +++ = forte
 ++ = média
 + = fraca
 - = ausente

Tabela 6. Intensidade de reação de microprecipitina de anti-soro de vírus do mosaico proveniente de isolado (AS-IV) com extratos de folhas dos isolados I, III e IV.

Antígenos	Anti-soro (AS-IV) - Diluições			
	1/1	1/8	1/16	1/32
Material sadio	++	+	-	-
Isolado I	++++	++++	+++	++
Isolado IV	+++	+++	++	+
Isolado III	+++	++	+	-

- Intensidade de reação: ++++ = muito forte

+++ = forte

++ = média

+ = fraca

- = ausente

Todos os três isolados purificados, obtidos de plantas doentes, apresentaram reações positivas com o anti-soro AS-IV, sendo o isolado I aquele que apresentou uma maior intensidade de reação em relação aos demais e seu título era de 1/128 quando não sofreu diluição. O isolado IV apresentou intensidade um pouco menor e seu título era até 1/64 e o isolado III era o que demonstrava menor intensidade de reação e seu título foi até 1/32 quando não diluído. Quando houve diluição dos antígenos, também ocorreu a mesma proporcionalidade de intensidade de reação entre eles. O material sadio, no período de observação, não apresentou reação perceptível.

Essa mesma proporcionalidade de intensidade de reação entre os três isolados foi mantida quando o antígeno era de extrato clarificado de folhas, mas com uma menor intensidade.

Os resultados do teste serológico de difusão em gel-ágar, dos três isolados purificados I, III e IV com o antisoro isolado IV (AS-IV) encontram na Figura 9.

Figura 9. Testes em difusão em ágar dos purificados do vírus do mosaico da cana proveniente dos isolados I, III e IV. AS: anti-soro do isolado IV; 1 - Purificado do isolado I; 2 - Purificado do isolado IV; 3 - Purificado do isolado IV.

Observou-se, pelos resultados expostos, que todos os três isolados produziram linha de precipitação com anti-soro do material IV, e não houve cruzamento dessas linhas entre si, indicando serem todos esses três materiais se rologicamente semelhantes. Essas reações ocorreram somente quando tanto anti-soro como antígenos não eram diluídos.

4.8. PROPRIEDADES FÍSICAS

Os resultados referentes às propriedades físicas estão resumidos na Tabela 7. Nas diferentes diluições utilizadas, o isolado IV era o que apresentava infectividade nas maiores diluições e o III na menor. Com relação ao ponto de inativação térmica da infectividade dessas estirpes, o isolado IV era o que suportava maiores temperaturas apresentando infectividade a 54°C e sendo inativado a 56°C. O isolado III suportou menores temperaturas apresentando infectividade a 50°C, mas perdendo a 52°C. O isolado I suportou temperaturas de 52°C, mas perdeu sua infectividade a 54°C.

Tabela 7. Propriedades físicas do vírus do mosaico da cana provenientes dos isolados I, III e IV.

Vírus	Ponto final de diluição	Ponto de inativação térmica
Isolado I	10^{-2}	54°C
Isolado III	10^{-1}	52°C
Isolado IV	10^{-3}	56°C

4.9. TESTES DE INFECTIVIDADE EM VARIEDADES COMERCIAIS

O resumo dos resultados se encontram na Tabela 8. Os primeiros sintomas tiveram início entre 15 a 20 dias após a inoculação.

Com a variedade NA 56-79, a qual apresenta uma suscetibilidade intermediária ao vírus do mosaico, as plantas inoculadas com o isolado I eram as que apresentaram sintomas iniciais mais intensos e uma evolução mais rápida. Nas plantas inoculadas com o isolado IV, os sintomas iniciais eram visualmente menos intensos, mas, posteriormente, chegaram a uma intensidade semelhante ao anterior. As plantas inoculadas com o isolado III eram as que apresentavam menor intensidade de sintomas, apresentando também um maior período de incubação.

Na variedade CB 40-13, considerada bastante

suscetível ao vírus do mosaico, as plantas inoculadas com o isolado III apresentaram resultados opostos àqueles da variedade NA 56-79, ou seja, apresentaram intensidade maior de sintomas e um período menor de incubação. Nas plantas inoculadas com os isolados I e IV, inicialmente a intensidade de sintomas foi menor em relação a III, mas, posteriormente, houve uma tendência de se igualar no período de observações.

Com a variedade CB 47-355 considerada resistente ao vírus do mosaico, os isolados I, III e IV tiveram um comportamento semelhante ao ocorrido em CB 40-13 com relação à intensidade e evolução de sintomas na planta.

Tabela 8. Intensidade e evolução de sintomas em variedades comerciais de cana NA 56-79, CB 40-13 e CB 47-355, inoculadas com os isolados I, III e IV, por um período de 30 dias após o início de sintomas.

Variedade	Período (dias)	Isolado Inoculado		
		I	III	IV
NA 56-79	5	++	-	+
	10-15	+++	+	++
	15-20	++++	++	+++
	20-30	++++	+++	++++
CB 40-13	5	+	++	+
	10-15	++	+++	++
	15-20	+++	++++	+++
	20-30	++++	++++	++++
CB 47-355	5	+	++	+
	10-15	++	+++	++
	15-20	+++	++++	+++
	20-30	++++	++++	++++

Intensidade de sintomas: ++++ = bastante intenso

+++ = intenso

++ = médio

+ = fraco

- = ausente

5. DISCUSSÃO

5.1. SINTOMAS EM VARIEDADE DIFERENCIADORA

Os três tipos de sintomas, como demonstram as Figuras 1, 2 e 3, obtidos com os isolados caracterizados neste trabalho, na variedade diferenciadora CP 28-60, definem três estirpes diferentes do vírus do mosaico da cana-de-açúcar. Relacionando os sintomas aqui obtidos com os descritos por SUMMERS *et alii* (1948) e ABBOTT & TIPPETT (1966), que caracterizaram as diferentes estirpes pela sua sintomatologia, pode-se afirmar que o isolado I corresponde à estirpe B, descrita por esses autores como produzindo estrias cloróticas severas que colaescem, dando à planta doente um aspecto esbranquiçado, com áreas necróticas, além de certo subdesenvolvimento à planta. O isolado IV pôde ser identificado como sendo a estirpe A, pela caracterização dos autores, apresentando um mosaico de padrão irregular e suave, com áreas de verde mais claro em alternância com áreas de verde normal, não produzindo sintomas necróticos. Com relação ao isolado III, trata-se da estirpe D em razão dos sintomas cloróticos

evoluiem para manchas alongadas amarelo-esbranquiçadas e de baixa infectividade.

Com a manutenção desses três isolados em casa de vegetação, o isolado IV foi o único que alterou a expressão dos sintomas no decorrer do tempo, passando de mosaico com alternância de cor verde mais escuro e mais claro em períodos de temperaturas mais amenas para, em épocas de calor mais intenso, listras amareladas e algumas necroses, similares às causadas pelo isolado I. Apesar da alteração de expressão dos sintomas, as propriedades físicas se mantiveram. SUMMERS *et alii* (1948) comentam sobre a mudança na expressão de sintomas de estirpe D para a estirpe A com o decorrer do tempo. ABBOTT & TIPPETT (1966), trabalhando com a estirpe D em variedade P0J 234, demonstraram a estabilidade dos sintomas por mais de 20 anos, o mesmo não ocorrendo em variedade CP 31-294 com a estirpe F, a qual se modificava para estirpe A. No entanto, na variedade P0J 234 isso não ocorreu e os autores afirmam ser isto devido ao hospedeiro e não a efeitos de temperatura. LIU & LII JANG (1970) obtiveram diferenciação na expressão dos sintomas de mosaico em variedade CP 31-294 a temperaturas de 65⁰C, 75⁰, 85⁰ e 95⁰F com estirpes A e B. Portanto, isso deve ser uma interação entre estirpe, hospedeiro e temperatura, podendo-se relacionar esses resultados com os obtidos neste trabalho, ou seja, o isolado denominado de IV foi o mais sujeito a essas variações, o que não ocorreu com I e III, sendo que essas modificações somente

ocorrem quanto ao tipo de sintomas, não envolvendo mudança na estirpe em si.

5.2. SEPARAÇÃO DE ESTIRPES

Para a separação de prováveis misturas de estirpes, citadas e comentadas por GILLASPIE JR. & KOIKE (1973), existem diferentes métodos. A separação por purificação física com gradiente de densidade e eletroforese não é eficiente porque as estirpes não são suficientemente diferentes nesses aspectos. A separação por reação serológica funcionaria se fosse conhecido com antecedência quais as estirpes existentes, o que não é o caso presente.

Portanto, optou-se pela separação por diluição em série, pois verificou-se que as diferentes estirpes podem apresentar diferentes pontos finais de diluição.

5.3. PURIFICAÇÃO FÍSICA

Nas tentativas de purificação do vírus do mosaico da cana, foram utilizados diferentes métodos descritos na literatura. SHEPHERD (1965) cita a utilização de citrato de sódio e mercaptoetanol; PIRONE & ANZALONE (1966) citam somente sulfito de sódio e pH 4,7; GILLASPIE JR. (1971) aplica o ácido ascórbico, dietilcarbamato de sódio e mercaptoetanol. O trabalho de HANDOJO & NOORDAN (1971) faz um estudo compara

tivo desses métodos, inclusive com a utilização de clorofórmio, éter etílico, tetracloreto de carbono e alterações no pH para o processo de clarificação, indicando que a utilização de clorofórmio (SHEPHERD, 1965) prejudica a purificação, aumentando a quantidade de partículas de vírus agregados, diminuindo assim a eficiência de purificação e infectividade. Neste trabalho, a metodologia de HANDOJO & NOORDAN (1971) foi a mais eficiente, e adicionou-se a utilização de nitrogênio líquido na extração inicial, aumentando sensivelmente a qualidade do processo de clarificação e o resultado final da purificação. Quando se utilizou a centrifugação em gradiente de densidade de sacarose, como SHEPHERD (1965), PIRONE & ANZALONE (1966) e GILLASPIE JR. (1971), não se conseguiram bons resultados, como citam esses autores, pois foi obtida uma faixa difusa e bastante larga, provavelmente devido ao rompimento das partículas.

5.4. ESPECTROFOTOMETRIA

Com os resultados obtidos para a determinação da curva de absorção característica na faixa de luz ultravioleta (220-300 nm) pôde-se observar um pico de intensidade bastante fraca no comprimento de onda em torno de 265 nm e um mínimo ao redor de 245 nm, semelhantes ao obtido por BOND & PIRONE (1971) e similares aos estudos de DELGADO-SANCHES & GROGAN (1966), que caracterizaram os vírus do Grupo PVY. Com

relação à pequena intensidade no pico de absorção GILLASPIE JR. (1971) cita também esse tipo de problema, sendo que PIRONE & AZALONE (1966) mencionam ser impossível obter-se pelo método de purificação utilizando uma curva típica de absorção no espectro de luz ultravioleta, devido à presença de materiais que interferem nesta faixa de luz. Tentativas no sentido de se fazer correções dessas interferências, devido à presença de impurezas e ao agregamento das partículas alongadas do vírus, semelhantes à utilizada por HANDOJO & NOORDAN (1971), foram realizadas, mas as leituras da absorção obtidas foram bastante baixas e não se conseguiram resultados satisfatórios.

5.5. DIMENSIONAMENTO E FREQUÊNCIA DE PARTÍCULAS

Com relação ao comprimento das partículas do vírus do mosaico da cana, os resultados indicam uma diferença na média entre os três isolados utilizados, na faixa de maior frequência (650-850 nm), mas não com uma diferença estatisticamente significativa. TAYLOR & SMITH (1968) relatam diferenças de comprimento entre o vírus do mosaico da ervilha e o mosaico amarelo do feijão, inclusive entre o material purificado e o extrato de folhas. CORBETT (1967) encontrou diferenças entre estirpes do TMV com relação aos comprimentos, inclusive eliminando a possibilidade da influência devido a tipos e estádios de desenvolvimento do hospedeiro.

A utilização do mesmo tipo de hospedeiro em mesmo estágio de desenvolvimento utilizado neste trabalho também elimina esta possibilidade. HARRISON & WOOD (1966) também relatam diferenças no comprimento de partículas entre isolados de Tobacco Rattle Virus da Europa e América.

Dos três materiais separados, pode-se observar que as partículas de vírus do isolado I apresentam um maior número de frações em relação às partículas do isolado III, sendo o isolado IV o que apresentou menor número de fracionamento, talvez podendo-se relacionar a esse fato sua maior capacidade de infecção, tanto nas maiores diluições como em tratamento térmico mais elevado. Trabalho de TEAKLE & GRYLLS (1973) com 4 estirpes deste vírus também relata diferenças na quantidade de quebras das partículas. TAYLOR & PARES (1968) comentam também uma grande tendência de quebra das partículas do vírus do mosaico da cana quando comparado com o "maize dwarf mosaic virus". Ainda com relação à integridade das partículas, TAYLOR & SMITH (1968), trabalhando com vírus do Grupo Y, notaram uma certa desintegração da capa protéica de certas partículas de vírus e, neste trabalho, as partículas de vírus dos três isolados também apresentavam uma certa tendência à desintegração da capa protéica.

Na faixa de maior frequência de partículas foi obtida uma média de comprimento do vírus de 719 nm para o isolado I, 732 nm para o isolado IV e 747 nm para o isolado

III. Para o mesmo vírus do mosaico da cana, HANDOJO & NOORDAN (1971) mencionam um comprimento médio de 750 nm. SHEPHERD (1965) obteve variações entre 695 a 770 nm em 40% das partículas. PIRONE & AZALONE (1966) relatam média de 775 nm, pouco diferente da média entre 750 a 755 nm de outro trabalho de BOND & PIRONE (1971). TAYLOR & PARES (1965) encontraram variações entre 650 e 750 nm em material de cana-de-açúcar e 700 a 750 nm em milho. TEAKLE & GRYLLS (1973) obtiveram média de 736 nm com variações de 17 nm, mas com grande variabilidade de partículas curtas e longas (entre 500 a 860 nm), semelhante ao ocorrido neste trabalho. Portanto, essas variações podem ser devido a estirpes diferentes do vírus ou diversificação de metodologia nas etapas de purificação, como comentam GOVIER & WOOD (1971) para certos vírus do Grupo Y. Quando os materiais observados em microscopia eletrônica eram provenientes de extratos de folhas sem purificação, GARDNER (1969) obteve partículas de 762 ± 12 nm e HEROLD & WEBE (1973) 760 ± 10 nm.

5.6. SEROLOGIA

As estirpes do vírus do mosaico da cana podem apresentar reações serológicas, formando grupos distintos como é demonstrado por SNAZELLE et alii (1971). Essas reações podem ser utilizadas também para a identificação de estirpes como foi demonstrado por GILLASPIE JR. et alii (1971) para identificações em

materiais provenientes de Irã, Paquistão e Camarões. Reações serológicas distintas entre isolados do mosaico da cana e mosaico do milho foram demonstradas por SHEPHERD (1965), WILLIAMS & ALEXANDER (1965) e WAGNER & DALE (1966), que obtiveram variação na intensidade de reação com microprecipitina, dando portanto títulos diferentes, o mesmo acontecendo neste trabalho com os três materiais utilizados, permitindo assim uma diferença entre eles, como demonstrado nas Tabelas 5 e 6. Outros trabalhos também apresentam resultados em reação de microprecipitina com títulos diferentes como os de BOND & PIRONE (1971) e GILLASPIE JR. (1977). Apesar do teste de reação em microprecipitina ser considerado mais sensível GILLASPIE, 1977), BOND & PIRONE (1970) comentam não ser suficiente para ser considerado significativo, havendo necessidade de se realizarem testes com difusão em gel-ágar. Baseando-se nesses comentários, foram realizados os testes em difusão e não foram encontradas diferenças nas reações serológicas entre os três materiais como se pode ver na Figura 9. Portanto, os isolados empregados, apesar de possuírem títulos diferentes, apresentam reações serológicas semelhantes.

5.7. PROPRIEDADES FÍSICAS

Pelos resultados obtidos, observa-se a existência de diferenças entre os três materiais com relação às características físicas de ponto final de diluição e ponto fi-

nal de inativação térmica. O isolado IV foi o que suportou maiores diluições e também maiores temperaturas. O isolado I manteve-se em posição intermediária e o III foi o mais sensível a altas diluições e altas temperaturas para se manter infectivo, caracterizando-se assim, diferenças entre esses três materiais. O ponto de inativação térmica esteve entre 52°C e 56°C , concordando com resultados de COSTA & PENTEADO (1951) e ADSUAR (1950), o mesmo acontecendo com as diluições entre 10^{-2} e 10^{-4} . TEAKLE & GRYLLS (1973) também encontraram diferenças entre quatro estirpes do vírus do mosaico da cana em suas propriedades físicas, e a estirpe que suportou maiores diluições também suportou maiores temperaturas. Esses autores comentam que a diluição é a responsável direta pelas diferenças na inativação térmica. Os resultados deste trabalho foram semelhantes, havendo uma relação direta entre maior diluição e maior ponto de inativação térmica. ZUMMO & GORDON (1971) encontraram diferenças entre as estirpes, mas não houve sempre uma correspondência direta entre maior resistência à diluição e maior resistência a temperaturas. BOND & PIRONE (1970) também determinaram o ponto final de diluição e inativação térmica na mesma faixa deste trabalho, mas não houve uma relação direta entre as diluições e as temperaturas aqui citadas anteriormente. TAYLOR & PARES (1968) encontraram diferenças nas propriedades físicas entre materiais com mosaico em cana-de-açúcar, milho e sorgo. TOSIC & FORD (1971) também relatam diferenças nas proprie

dades físicas entre estirpes do vírus do mosaico da cana e mosaico anão do milho, considerando estes critérios válidos para diferenciação de estirpes do vírus.

5.8. COMPORTAMENTO EM VARIEDADES COMERCIAIS

Em relação ao comportamento dos isolados I, III e IV do vírus do mosaico da cana-de-açúcar, quando inoculados nas variedades comerciais NA 56-79, CB 40-13 e CB 47-355, respectivamente de reações intermediárias, suscetível e resistente, foi observado existir uma diferença relativa na agressividade dos mesmos. Assim, o isolado I, caracterizado por apresentar período de incubação intermediário quando inoculado em milho (item 4.1), mostrou uma intensidade inicial de sintomas na variedade NA 56-79, maior em relação aos outros dois isolados. Pertinente à discussão deste fato, ressalta-se ter sido a própria NA 56-79, a origem deste isolado. O isolado III, caracterizado por apresentar período de incubação maior quando inoculado em milho (item 4.1), mostrou uma intensidade inicial de sintomas, nas variedades CB 40-13 e CB 47-355, maior em relação aos outros dois isolados. O isolado IV teve comportamento semelhante ao isolado I, desde que não se leve em conta a variedade NA 56-79.

Desta maneira, há razoáveis evidências da

existência de interações isolado-variedade, fato que deve ser levado em consideração pelos programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

6. CONCLUSÕES

- 6.1. A população do vírus do mosaico da cana-de-açúcar que ocorre no Estado de São Paulo não é homogênea.
- 6.2. Os isolados dos vírus podem ser diferenciados segundo diferentes critérios, como: sintomas em variedades diferenciadoras de cana-de-açúcar, resistência das partículas durante o processo de purificação física, títulos da reação serológica, ponto final de diluição, ponto de inativação térmica e sintomas em variedades comerciais.
- 6.3. Os sintomas causados pelos vírus na variedade diferenciadora CP 28-60, permitiram a identificação das estirpes A, B e D (*sensu* SUMMERS *et alii*, 1948 e ABBOTT & TIPPETT, 1966).
- 6.4. A não homogeneidade da população do vírus do mosaico da cana-de-açúcar em nossas condições e a especialização de determinados isolados em determinadas variedades trazem novas dificuldades dos programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

- 6.5. Os testes de resistência de clones desenvolvidos pelos programas de melhoramento de cana-de-açúcar de vem levar em conta a variabilidade da população do patógeno na região considerada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, E.V. Mosaic. In: MARTIN, J.P.; ABBOTT, E.V.; HUGHES, G.G. (eds.) Sugar-cane diseases of the world. New York Elsevier Publishing Co., 1961a. v.1, p.

ABBOTT, E.V. A new strain of sugar-cane mosaics virus. Phytopathology, 51: 642, 1961b.

ABBOTT, E.V. & STOKES, I.E. A world survey of sugar-cane mosaic virus strains. Sugar y Azúcar, 61: 27-9, 1966.

ABBOTT, E.V. & TIPPETT, R.L. Additional host of sugar-cane mosaic virus. Plant Dis. Rept., 48: 443-5, 1964.

ABBOTT, E.V. & TIPPETT, R.L. Strains of sugar-cane mosaic virus. U.S. Dept. Tech. Bul. (1340): 1-25, 1966.

ADSUAR, J. On the physical properties of sugar-cane mosaic virus. Phytopathology, 40: 214-6, 1950.

ARRUDA, S.C. A história das grandes epifitias da cana-de-açúcar. Biológico, 7: 131-8, 1941.

ARRUDA, S.C. As doenças da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo: II. Mosaico. Biológico, 12: 21-7, 1946.

- ARRUDA, S.C. & ARRUDA, H.C. Comportamento e produção da muda sã da variedade Co 290, no Estado de São Paulo. Arq. Inst. Biol., 19: 175-201, 1949.
- ARRUDA, S.C. Doenças da cana-de-açúcar. In: III SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA. FERMENTAÇÃO DO CALDO DE CANA. Piracicaba, Instituto Zimotécnico, 1962. v.1, p. (mimeografado).
- BAIN, D.C. The use of abrasives for inoculating sugar-cane seedling with the mosaic virus. Phytopathology, 34: 844-5, 1944.
- BENDA, G.T.A. Sugar-cane mosaic in Louisiana: some aspects of a chronic problem. Proc. Am. Soc. Sug. Tech., 16: 61-81, 1969.
- BENNETT, C.W. Informe sobre experimentos con el mosaico de la cana de azúcar en Tucumán, Argentina. Rev. Indus. y Agr. de Tucumán, 31: 427-37, 1941.
- BHARGAVA, K.S.; JOSHI, R.D.; RISHI, N. Occurrence of strains A & F of sugarcane mosaic virus in Uttar Pradesh (India). In: CONGR. INT. SOC. SUGARCANE TECHNOLOGY, 14. Proceedings, 1971. p.949-54.
- BOND, W.P. & PIRONE, T.P. Purification and properties of sugar-cane mosaic virus strains. Phytopathology Z., 71: 56-65, 1971.
- BRAKKE, M.K. Density gradient centrifugation and its application to plant diseases. In: Advances in virus research. New York, Academic Press, 1960. v.7, p.193-222.

- BRANDES, E.W. The mosaic disease of sugar-cane and other grasses. U.S. Dept. Agr. Bull., (829): 1-26, 1919.
- BRANDES, E.W. Artificial and insect transmission of sugar-cane mosaic. J. Agric. Res., 19: 131-8, 1920a.
- BRANDES, E.W. Mosaic diseases of corn. Jour. Agr. Res., 19: 517-22, 1920b.
- BRANDES, E.W. Sugar-cane mosaic. Int. Soc. Sug. Cane. Tech. 2: 83-5, 1927.
- BRANDES, E.W. & KLAPHAAK, P.J. Cultivated and wild hosts of sugar-cane or grass mosaic. Jour. Agr. Res., 24: 247-62, 1923.
- BREAUX, R.D. & DUNCKELMAN, P.H. Variety and mosaic strain interaction in sugar-cane. Sugar y Azúcar, 64(12): 21-4, 1969.
- BRENNER, S. & HORNER, R.W. A negative staining method for high resolution electron micrology of viruses. Bioch. Acta, 34:103-10, 1958.
- BRUEHL, G.W. Strains of sugar-cane mosaic in Puerto Rico. U.S. Agr. Res. Serv. Plant Dis. Retr., 37:479-81, 1953.
- BRUEHL, G.W. Identification, occurrence and distribution of strains of sugar-cane mosaic in Puerto Rico. Puerto Rico Univ. Jour. Agr., 38: 188-98, 1954.
- CORBETT, M.K. Some distinguishing characteristics of the orchid strain of tobacco mosaic virus. Phytopathology, 57:164-72, 1967.

- COSTA, A.S. & PENTEADO, M.P. Corn seedlings as test plants for the sugarcane mosaic virus. Phytopathology, 41: 758-63, 1951.
- DAL PICCOLO, C.R.; SORDI, R.A.; MATSUOKA, S. Efeito do virus do mosaico nas variedades de cana-de-açúcar IAC 52-150 e NA 56-79: I. cana planta. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, Rio de Janeiro, 1981. Anais. v.2, p.379-90.
- DEAN, J.L. & COLEMAN, O.H. Screening sugar-cane seedlings for mosaic resistance by mechanical inoculation. Proc. Int. Soc. Sug. Tech., 12: 1188-93, 1965.
- DEAN, J.L. A local lesion host for strain E of the sugarcane mosaic virus. Phytopathology, 60: 569-70, 1970.
- DEAN, J.L. Inoculation additives for sugar-cane mosaic virus. Proc. Int. Soc. Sug. Tech., 357-64, 1977.
- DELGADO-SANCHES, S. & GROGAN, R.G. Purification and properties of potato virus Y. Phytopathology, 56:1397-404, 1966.
- EARLE, F.S. Instrucciones para la erradicacion de la enfermedad mosaico dela caña. Purto Rico Insular Expt. Sta. Circ., 14, 1918.
- EDGERTON, C.W. & TACCART, W.G. Tolerance and resistance to the sugar-cane mosaic. Jour. Agr. Res., 29: 501-6, 1924.
- GARDNER, W.S. Ultrastructure of *Zea mays* leaf cells infected with Johnson-Grass strain of sugar-cane mosaic virus. Phytopathology, 59:1903-7, 1969.
- GILLASPIE JR., A.G. Sugar-cane mosaic virus: purification. Int. Soc. Sugar-Cane Tech.,: 961-70, 1971.

- GILLASPIE JR., A.G. & KOIKE, H. Sugar-cane mosaic virus and maize dwarf mosaic virus in mixed infections of sugar-cane and other grasses. Phytopathology, 63: 1300-7, 1973.
- GILLASPIE JR., A.G.; MOCK, R.G.; SMITH, F.F. Identification of sugar-cane mosaic virus and characterization of strains of the virus from Pakistan, Iran and Cameroon. Int. Soc. Sugar-Cane Tech.,: 347-55, 1977.
- GILLASPIE JR., A.G. & MOCK, R.G. Methods for identification of sugarcane mosaic virus strains. In: ISSCT PATHOLOGY WORKSHOP, Beltsville, Maryland, Oct. 29, Nov. 02, 1984. Abstracts of Papers.
- GOVIER, A.D. & WOODS, R.D. Changes induced by magnesium ions in the morphology of some plant viruses with filamentous particles. J. Gen. Virol., 13: 127-32, 1971.
- HANDOJO, H. & NOORDAN, D. Purification and serology of sugar-cane mosaic virus. Int. Soc. Sugar-Cane Tech.,: 973-84, 1971.
- HARRISON, B.D. & WOODS, R.D. Setotypes and particle dimensions of tobacco rattle viruses from Europe and America. Virology, 28610-20, 1966.
- HEROLD, F. & WEIBEL, J. Electron microscopic demonstration of sugar-cane mosaic virus particles in cells of *Saccharum officinarum* and *Zea mays*, Phytopathology, 53:469-71, 1963.
- INGRAM, J.W. & SUMMERS, E.M. Transmission of sugar-cane mosaic by the rusty plum aphid, *Hysteroneura setariae*. Jour. Ag. Res., 56: 537-40, 1938.

- INGRAM, J.W. & SUMMERS, E.M. Transmission of sugar-cane mosaic by the green bug (*Toxoptera graminum* Rond.) Jour. Agric. Res., 56: 537-40, 1938.
- KHURANA, S.M.P. & SINGH, S. Sugarcane mosaic strain S & C in India and new sorghum differentials sugarcane pathologists. Newsletter, 9: 6-10, 1972.
- KOIKE, H. & TIPPETT, R.L. Influence of strain of sugar-cane mosaic virus on stands, stubbling ability and yields of sugar-cane varieties. Proc. of Meet. Amer. Soc. Sugar-Cane Tech.,: 57-60, 1971.
- KOIKE, H. Mixed infections of sugar-cane with sugar-cane mosaic virus and maize dwarf mosaic virus. Proc. of Meet. Amer. Soc. Sugar-Cane Tech.,: 62-4, 1973.
- KOIKE, H. & GILLASPIE JR., A.G. Strain M, a new strain of sugar-cane mosaic virus. Plant Dis. Rep., 60: 50-4, 1976.
- KOLOBAEU, K.; MODIN, R.; CARVAJAL, O.; OTERO, I. Study of sugar-cane resistance to mosaic virus in Cuba. Proc. Int. Sug. Tech., 15: 310-8, 1974.
- KONDAIAH, E. & NAYUDU, M.V. Strain-N, a new strain of sugar cane mosaic virus (SCMU). In: ISSCT PATHOLOGY WORKSHOP, Beltsville, Maryland, Oct. 29 - Nov. 02, 1984. Abstracts Papers.
- LAUDEN. L.L. Cane mosaic. Sugar Bull., 52(12):4, 1974.
- LIU, H.P. & LI, H.W. Studies on the sugar-cane mosaic virus in Taiwan. I. Strains of the virus. Taiwan Sugar Expt. Sta. Rept., 5: 72-8, 1953.

- LIU, H.P. & LI, H.W. Studies on the sugar-cane mosaic virus in Taiwan. II. The mode of resistance of cane varieties and wild relatives to strains of mosaic. Taiwan Sugar Expt. Sta. Rept., 10: 89-104, 1953.
- LIU, LII-JANG. Effects of temperatures on symptom expression by sugar-cane infected with different strains of mosaic virus. J. Agric. Univ. Puerto Rico,: 128-32, 1970.
- LYON, H.L. Letter to Mr. L. Lewton-Brain, Director, Div. Path. and Phys. Expt. Sta. H.S.P.A., may 27. Project File 410. 1908.
- MATSUOKA, S. & COSTA, A.S. Perdas ocasionadas pelo vírus do mosaico da cana-de-açúcar em parcelas com diferentes níveis iniciais de infecção no material de plantio. I. Perdas na cana planta. Pesq. Agrop. Bras., Sér. Agron., 9: 89-92, 1974.
- MATSUOKA, S. & DODSON, A.K. Teste de infecção natural pelo vírus do mosaico da cana-de-açúcar. Brasil Açucareiro, 85: 18-22, 1975.
- MATSUOKA, S. Incidência e efeito do mosaico na cultura da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. Bol. Técnico do Planalsucar, 4: 1-32, 1978.
- MATSUOKA, S.; SORDI, R.A.; DAL PICCOLO, C.R.; TOKESHI, H. Influência do fenômeno de recuperação do teste precoce de mosaico em plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Summa Phytopathologica, 9(1,2): 72-3, 1983.
- MATZ, J. Artificial transmission of the sugar-cane mosaic. Jour. Agric. Res., 46: 821-40, 1933.

- MATZ, J. Comparative study of sugar-cane mosaic from different countries. Intern. Soc. Sugar-Cane Tech. Proc., 6: 572-80, 1938.
- NELHANDS, J.B. & STUMPF, P.K. Outlines of enzymes chemistry. 2.ed. New York, John Wiley and Sons, 1958.
- NOORDAN, D. Identification of plant viruses. Methods and experiments. Wageningen, Center for Agric. Publ. and Docum., 1973. 207p.
- ORDOSGOITTI, F.A.; ARONT, A.; GONZALES, V. Resultados sobre las investigaciones de las enfermedades de la caña de azúcar en Venezuela. FONIAP 1(2): 21-4, Caracas, 1982.
- PERDOMO, R. FORBES, I.L. Studies on sugarcane mosaic in Louisiana. Proc. Int. Soc. Sug. Tech., 13: 1138-40, 1968.
- PIRONE, T.P. & ANZALONE JR., L. Purification and electron microscopy of sugar-cane mosaic virus. Phytopathology, 56:371-3, 1966.
- RAMALO, N.E.V. Razas del mosaico de la caña de azúcar. Revista Industrial Y Agrícola de Tucumán, 58(2):57-8, 1981.
- RISHI, N. Climatic conditions and mechanical transmission of sugar-cane mosaic virus. Sug. Pathol Newl., 10: 37, 1973.
- ROSENKRANZ, E. Grasses native on adventive to the United States as New Hosts of maize dwarf mosaic and sugar-cane mosaic virus. Phytopathology, 68: 175-79, 1978.
- SANTANDER, R.G. Técnicas de microscopia eletrônica em biologia. Madrid, Aguilar S/A Ediciones, 1969. 666p.

- SEIN JR., A new mechanical methods for artificially transmitting sugar-cane mosaic. Jour. Dept. Agric. Puerto Rico, 14: 49-68, 1930.
- SHEPHERD, R.J. Properties of a mosaic virus of corn and Johnson grass and its relation to the sugar-cane mosaic virus. Phytopathology, 55L .250-6, 1965.
- SNAZELLE, T.E.; BRANCROFT, J.B.; ULLSTRUP, A.J. Purification and serology of mayze dwarf mosaic and sugar-cane mosaic virus. Phytopathology, 61: 1059-63, 1971.
- SORDI, R.A.; MATSUOKA, S.; DAL PICCOLO, C.R. Efeito do vírus do mosaico nas variedades de cana-de-açúcar, IAC 52-150 e NA 56-79 planta, soca e ressoca. Summa Phytopathologica, 9(1,2):11-2, 1983.
- STEVENSON, J.A. The meottling or yellow-stripe disease of sugar-cane. Jour. Dept. Agr. Puerto Rico, 3(3): 3 - 76, 1919.
- SUMMERS, E.M. Types of mosaic on sugar-cane in Louisiana. Phytopathology, 24: 1040-2, 1934.
- SUMMERS, E.M. Strains of the sugar-cane mosaic virus in Louisiana. Int. Soc. Sugar-Cane Tech. Proc., 5: 723-9, 1935.
- SUMMERS, E.M. A study of the common mosaic of sugar-cane with special reference to strain of the virus. Int. Soc. Sugar-Cane Tech. Proc., 6:564-5, 1939.
- SUMMERS, E.M.; BRANDES, E.W.; RANDS, R.D. Mosaic of sugar-cane in the United States, with special reference to strains of the virus. U.S. Dept. Agr. Bull., (955):1-124, 1948.

- TATE, H.D. & VANDENBERG, S.R. Transmission of sugar-cane mosaic by aphids. Jour. Agr. Res., 59: 73-9, 1939.
- TAYLOR, R.H. & SMITH, P.R. The relationship between bean yellow mosaic virus and pea mosaic virus. Aust. J. Biol. Sci., 21: 429-37, 1968.
- TAYLOR, R.H. & PARES, R.D. The relationships between sugar-cane mosaic virus and mosaic viruses of maize and Johnson grass in Australia. Aust. J. Agric. Res., 19: 767 - 73, 1968.
- TEAKLE, D.S. & GRYLLS, N.E. Four strains of sugar-cane mosaic virus infecting cereals and other grasses in Australia. Aust. J. Agr. Res., 24: 465-77, 1973.
- TIMS, E.C. & EDGERTON, C.W. Behavior of mosaic in certain sugar-cane varieties in Louisiana. Amer. Jour. Bot., 18: 649-57, 1931.
- TIMS, E.C.; MILLS, P.J.; EDGERTON, C.W. Studies on sugar-cane mosaic in Louisiana. La. Agr. Expt. Bull., (263): 1 - 39, 1935.
- TIPPETT, R.L. & ABBOTT, E.V. A new strain of sugar-cane mosaic in Louisiana. Plant Dis. Rept., 52: 449-51, 1968.
- TIPPETT, R.L. & KOIKE, H. Sugar-cane mosaic virus strain. I: Its incidence in Louisiana. Sugar Bull., 49: 72.3, 1970.
- TOSIC, M. & FORD, R.E. Direct comparison of physical properties of maize dwarf mosaic and sugar-cane mosaic virus strains. Phytopathology, 61: 1026, 1971.

- TOSIC, M. & FORD, R.E. Grasses differentiating sugar-cane mosaic and maize dwarf mosaic virus. Phytopathology, 62: 1466-70, 1972.
- WAGNER, G.W. & DALE, J.L. A serological comparison of maize dwarf mosaic virus isolates. Phytopathology, 56: 1422-3, 1966.
- WILLIAMS, L.F. & ALEXANDER, L.J. Maize dwarf, a new corn disease. Phytopathology, 55: 802-4, 1965.
- YODER, P.A. Rare cases of mosaic disease in highly resistant varieties of sugar-cane. U.S. Dept. Agric. Circ. (392): 1-7, 1926.
- ZUMMO, N. & GORDON, D.T. Comparative study of five mosaic virus isolates infecting corn, Johnson grass and sorghum in the United States. Phytopathology, 61: 389-94, 1971.
- ZUMMO, N. & STOKES, I.E. Sugar-cane mosaic strain K: A new strain of sugar-cane mosaic virus in Meridian, Mississippi. Sugar-Cane Pathol. Newsl., 10: 16-7, 1973.
- ZUMMO, N. Sugar-cane mosaic virus strain L: a new virulent strain of sugar-cane mosaic virus from Leigs, Georgia. Proc. Int. Soc. Sugar-Cane Tech., 15: 305-9, 1974.