AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO RAQUITISMO DA
SOQUEIRA E A ESCALDADURA DAS FOLHAS PELO
MÉTODO DE VAZÃO DE ÁGUA EM COLMOS DE
CANA-DE-AÇÚCAR.

MARCELO DE MENEZES CRUZ

Orientador: Prof. Dr. HASIME TOKESHI

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho, 1983

Aos meus pais e sogros,
pelos exemplos,

MEU RECONHECIMENTO.

A Rosa e a Mariana,

DEDICO.

A G R A D E C I M E N T O S

O autor expressa seus agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr. Hasime Tokeshi, pela eficiente orientação, oportunidade de treinamento, sugestões e estímulo constante.

À esposa Rosa Maria Prudente Cruz, pelo companheirismo, incentivo e sacrifícios, durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-Açúcar, IAA-PLANALSUCAR, pela possibilidade do treinamento e condições oferecidas durante a realização deste trabalho.

Ao Engº Agrº Jarbas Elias da Rosa Oiticica, ex-Coordenador Regional Nordeste do IAA-PLANALSUCAR, pelas facilidades e apoio concedido.

À Seção de Melhoramento da Coordenadoria Regional Sul do IAA/PLANALSUCAR, e em especial ao Dr. Sizuo Matsuoka, pela excelente colaboração, fornecimento de material e disponibilidade do laboratório.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ-USP e especialmente ao Prof. Dr. Hiroshi Kimati pelos ensinamentos e sugestões.

Ao Engº Agrº Dr. Yodiro Masuda pelas correções e sugestões sugeridas.

Ao Engº Agrº Norberto Antonio Lavorenti, pelas sugestões e colaboração prestadas nas análises estatísticas.

À Divisão Agroquímica da Ciba Geigy Química S/A e em especial ao Engº Agrº José Maria Brandão Costa, pela impressão das cópias fotográficas.

Aos Engºs Agrºs Antonio Maria Cardoso Rocha e Carlos Eduardo Lins e Silva Pires, pela solidariedade, convívio e amizade.

Aos colegas de curso e em especial aos Engºs Agrºs Dra. Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Flávio Franco Corte Brilho, pelas sugestões, amizade e apoio recebidos.

À Sra. Maria do Carmo Maluli Delgado, secretária da Supervisoria de Melhoramento do IAA-PLANALSUCAR, pelos auxílios prestados e pela versão do resumo para o inglês.

Ao Prof. João Ribeiro Lemos, pela revisão de português.

Às bibliotecárias Lucia B. de Melo e Helena Cristina do V. Pimentel, pela revisão da citação bibliográfica.

Ao Sr. Luiz Omena de Lucena, pelos trabalhos datilográficos.

Ao Sr. Pedro da Silva, funcionário do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pela colaboração nos trabalhos de campo e laboratório.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.	4
2.1. Agente Causal	4
2.2. Métodos para diagnose	8
2.2.1. Diagnose através de reprodução dos sin- tomas.	9
2.2.2. Diagnose através de testes químicos e biológicos	11
2.2.3. Diagnose através de testes serológicos	12
2.2.4. Diagnose através de microscopia.	14
2.3. Isolamento da bactéria.	16
2.4. Testes para seleção de variedades resistentes	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Obtenção do inóculo e inoculação.	21
3.2. Avaliação da resistência ao raquitismo da so- queira (RS) e a escaldadura das folhas (EF) pe- lo método de vazão de água.	23
3.3. Contagem dos vasos funcionais do xilema	24
4. RESULTADOS.	26
4.1. Avaliação da resistência ao raquitismo da so- queira (RS) e a escaldadura das folhas (EF) pelo método de vazão de água.	26
4.2. Correlação entre a vazão de água e número de vasos funcionais do xilema.	28
5. DISCUSSÃO.	31
5.1. Avaliação da resistência ao raquitismo da so- queira (RS) e a escaldadura das folhas (EF) pelo método de vazão de água.	31
5.2. Correlação entre a vazão de água e número de vasos funcionais do xilema.	34
6. CONCLUSÕES.	40
7. LITERATURA CITADA.	42

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO RAQUITISMO DA SOQUEIRA
E A ESCALDADURA DAS FOLHAS PELO MÉTODO DE VAZÃO DE
ÁGUA EM COLMOS DE CANA-DE-AÇÚCAR.

MARCELO DE MENEZES CRUZ

HASIME TOKESHI
Orientador

RESUMO

Este trabalho teve a finalidade de dar prosse
guimento aos estudos de avaliação de resistência ao Raquitismo
da Soqueira (RS) pela vazão de água em colmos de cana-de-
açúcar e avaliar a interferência da Escaldadura das Folhas
(EF), causada por *Xanthomonas albilineans* (Xa) no método em
estudo.

Objetivando a correlação entre a vazão de água
e o número de vasos funcionais do xilema, estes foram colori
dos com safranina e fotografados em diapositivos, para a cont
agem em projeção.

Os resultados obtidos mostraram que o método
da vazão de água em colmos de cana-de-açúcar é eficiente,
prático e mais preciso do que o método da avaliação pela produ
ção no campo.

Por este método, as variedades CB47-355, IAC48/65
e IAC51/205 podem ser consideradas tolerantes e as CB41-76 e

NA56-79 apresentaram suscetibilidade ao RS.

As variedades CB41-76, CB47-355 e NA56-79 apresentaram correlação positiva entre vazão e número de vasos funcionais do xilema, não ocorrendo o mesmo com a IAC48/65 e IAC51/205, confirmando que apenas o número de vasos funcionais e anatomia vascular não são suficientes para explicar as diferentes reações de resistência ao RS.

Foi possível observar que EF pode interferir na avaliação de resistência ao RS e que a EF apresenta um mecanismo diferente de patogenicidade, pois, ocasiona um aumento de vazão no xilema, provavelmente devido à desintegração das paredes celulares do xilema e tecido parenquimatoso adjacente.

Pela coloração dos vasos funcionais, demonstrou-se que o tratamento térmico ($50,5^{\circ}\text{C}$ / 2 horas) não apresenta eficiência total no controle do RS, pois foi possível detectar touceiras contaminadas provenientes de rebolos curados pela termoterapia.

EVALUATION OF RESISTANCE TO RATOON STUNTING DISEASE AND LEAF SCALD THROUGH WATER FLOW IN SUGARCANE STALKS

MARCELO DE MENEZES CRUZ

HASIME TOKESHI
Adviser

SUMMARY

The objective of this work was to carry on studies of evaluation of resistance to Ratoon Stunting Disease (RSD) by water flow in sugarcane stalks and the interference of Leaf Scald Disease (LSD), caused by *Xanthomonas albilineans* (Xa).

In order to determine the correlation between water flow and number of functional xylem vessels, these were safranin dyed and photograph slides were made for to be projected so that the functional vessels could be counted on the screen.

The results obtained showed that the method of water flow through sugarcane stalks is efficient, practical and more accurate than the yield method under field conditions.

According to this method, varieties CB47-355, IAC48/65 and IAC51/205 may be considered tolerant and CB41-76 and NA56-79 susceptible to RSD.

Varieties CB41-76, CB47-355 and NA56-79 showed positive correlation between water flow and number of functional xylem vessels, which was not true for varieties IAC48/65 and IAC51/205. This confirms that only the number of functional vessels and vascular anatomy are not sufficient to explain different resistance reactions to RSD.

It was observed that LSD may interfere in evaluation of resistance to RSD, since LSD presents a different mechanism of pathogenicity increasing water flow in stalks, probably due to disintegration of xylem cell walls and adjacent parenchymatous tissue.

By dying functional vessels, it was demonstrated that the hot water treatment ($50:5^{\circ}\text{C}$ for 2 hours) does not completely eliminate RSD. It was possible to detect contaminated stools produced from hot water treated setts.

1. INTRODUÇÃO

A importância econômica e social da cana-de-açúcar acentua-se à medida que as dificuldades econômicas crescem conjuntamente com a crise energética mundial. A recente expansão da agro-indústria sucro-alcooleira estendeu a área dos canaviais brasileiros para mais de 3,2 milhões de hectares, elevando a produção de álcool para 5,8 bilhões de litros. Esta expansão na produção de álcool permitiu a produção de mais 700 mil veículos movidos exclusivamente a álcool e a adição de 20% de álcool em toda a gasolina consumida no ano 1982. A substituição da gasolina pelo álcool de cana tornou possível economizar o equivalente a 80.000 barris de petróleo por dia em 1982.

Não obstante o Brasil ser considerado o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, a sua produtividade é considerada relativamente baixa quando comparada ao potencial genético de produtividade que a planta oferece. Os recordes de produção de açúcar, por área, são pelo menos três vezes maiores que as 4,5 a 7,7 tonelada/hectare obtidas atualmente, no Nordeste e em São Paulo, respectivamente.

Para se atingir a meta governamental de 1985, que é a produção de 8,3 bilhões de litros de álcool e mais de 9 milhões de tonelada de açúcar, será necessário corrigir algumas distorções, obtendo-se um incremento na produtividade.

Entre os fatores que causam baixa produtividade agro-industrial da cana-de-açúcar, destacam-se as doenças e entre estas, sobressai o Raquitismo da Soqueira (RS). Segundo HUGHES (1978), ela está disseminada por toda região canavieira do mundo e as avaliações de perdas indicam reduções que oscilam entre 10 a 60% MATSUOKA (1976) e TOKESHI (1980).

Sendo o RS uma doença que não apresenta sintomas visuais específicos, não se detecta a sua ocorrência. A identificação de variedades resistentes constitui um problema difícil que demanda 2 a 3 anos de controle de produção de parcelas sadias e doentes. Além disso, estes resultados podem ser inteiramente mascarados nos anos chuvosos. Como a metodologia de cura das mudas com RS apresenta eficiência parcial, ocorrem contaminações experimentais que alteram os resultados dos testes de produção.

Buscando solucionar os problemas levantados e desenvolver uma metodologia de seleção de variedades resistentes ao RS, deu-se prosseguimento aos trabalhos desenvolvidos no Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, na avaliação de resistência ao RS, pelo método da vazão de água em colmos de cana-de-açúcar. Esta pesquisa foi realizada com a finalidade de averiguar com maior precisão os resultados obtidos anteriormente, quanto à interferência da *Xanthomonas albilineans* (Ashby)

Dowson, agente da Escaldadura das Folhas (EF) neste método, e a correlação entre número de vasos funcionais do xilema e a vazão de água em colmos de cana-de-açúcar com RS.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. AGENTE CAUSAL

Durante anos, vários pesquisadores relataram como sendo vírus, o agente causal do Raquitismo da Soqueira (RS) da cana-de-açúcar, possivelmente pela dificuldade de se demonstrar a presença de microorganismo associado à doença e ainda pela facilidade de disseminação (STEINDLER e HUGHES, 1953; HUGHES e STEINDLER, 1955; SCHEXNAYDER, 1956; STEIB e FORBES, 1957).

FORBES e LING (1960) utilizando microscopia eletrônica, observaram a presença de partículas aproximadamente de forma esférica. Posteriormente, LIU (1963) tentou reproduzir os sintomas do RS a partir de inoculações com uma nucleoproteína, obtida de canas infectadas por esta doença, entretanto, não obteve êxito.

GILLASPIE *et alii* (1966) através de técnica de centrifugação em gradiente de densidade, observaram a presença de partículas virais esféricas com alto teor de ácido nucleico. STEIB e TANTERA (1970) suspeitaram estar o RS associado a um organismo do tipo micoplasma, porém não conseguiu

ram mostrar qualquer efeito no uso de tetraciclina para o controle da doença. GILLASPIE (1970) também afirma que a tetraciclina não elimina a infectividade do agente, afastando a hipótese de ser um micoplasma e reforça a possibilidade de ser mesmo um vírus a causa do RS.

KHURANA (1972) sugeriu que o RS podia ser causado por um complexo de pelo menos dois patógenos, um vírus e um organismo semelhante a micoplasma, tendo em vista o material do hospedeiro perder a infectividade quando centrifugado, com baixa velocidade e quando tratado termicamente, mas não pela ação de antibióticos.

Através de fotoeletromicrografia, PLAVSIC-BANJAC e MARAMOROSCH (1972) revelaram a presença de corpos pleomórficos no xilema de canas maduras afetadas, semelhantes a uma pequena bactéria ou organismo do tipo micoplasma. MARAMOROSCH *et alii* (1973), através de estudos com microscopia eletrônica, observaram a presença de um microorganismo semelhante à bactéria ou talvez ricketsia no xilema de plantas infectadas com o RS.

TEAKLE *et alii* (1973) ao examinarem extrato do xilema de plantas de cana-de-açúcar afetadas pelo RS, em microscópio eletrônico, observaram a presença de células de uma pequena bactéria corineforme, comumente Gram positivo e com mesossomos espiralados e a sugerem como o possível agente causal do RS. GILLASPIE *et alii* (1973) confirmaram esta possibilidade através de microscopia de contraste de fase ao examinarem exsudados do xilema ou caldo extraído de cana-de-açúcar com RS.

Conforme TEAKLE (1974) o agente do RS é inativado quando exposto a muitos bactericidas químicos, incluindo clorofórmio, azina de sódio ou fenol, mas não por antibióticos como tetraciclina ou estreptomicina. Afirma ainda que o agente do RS não é afetado quando exposto a RNase e DNase. Estas propriedades fazem com que provavelmente não esteja envolvido um vírus, um viróide ou micoplasma na etiologia do RS. A pequena bactéria associada ao RS na Austrália é possivelmente igual ao microorganismo observado em canas doentes, em Porto Rico por PLAVSIC-BANJAC e MARAMO ROSCH (1972), devido às semelhanças nas propriedades por serem propensas à sedimentação durante a centrifugação, dificuldade na passagem através de filtros bacteriológicos e sensibilidade para bactericidas, mas não a enzimas de ácidos nucleicos (TEAKLE, 1974).

LIU *et alii* (1974) isolaram um organismo semelhante a *Xanthomonas vasculorum* de feixes vasculares de colmos de cana-de-açúcar afetados pelo RS. TOKESHI *et alii* (1974) confirmam a hipótese da presença de bactéria em canas com sintomas do RS e afirmam que há fortes evidências de que *Xanthomonas albilineans* seja um dos agentes da doença.

CHEN *et alii* (1975) utilizaram o mesmo método usado por TEAKLE *et alii* (1973) e observaram também uma bactéria corineforme associada ao RS, porém diferente do tamanho das bactérias relatadas anteriormente. GILLASPIE *et alii* (1975) após tentativas de purificação, estudos de microscopia e experimentos com filtração, sugerem que uma pequena bactéria em forma de bastonete, sem mobilidade, está presen

te em plantas de cana-de-açúcar com RS. Esta bactéria possui septo, o que indica ser do grupo corineforme. Os autores levantaram ainda a hipótese de que plantas infectadas com RS favorecem o desenvolvimento de bactérias e que a referida bactéria pode ser consequência da infecção.

WORLEY e GILLASPIE (1975) constataram a presença de uma bactéria com septo, pertencente ao grupo corineforme, ao estudarem em microscópio eletrônico, finas secções do tecido basal de colmos de um híbrido de sorgo-capim sudão, com sintomas do RS. Na África do Sul, BAILEY (1976a) observou com microscopia eletrônica e microscopia de contraste de fase, uma bactéria nos tecidos de cana-de-açúcar, atacados pela doença e com maiores evidências nas variedades suscetíveis ao RS. DAMANN e DERRICK (1976) com o auxílio de microscopia eletrônica, relataram a associação de uma bactéria corineforme em plantas de cana-de-açúcar atacadas pelo RS na Louisiana.

Apesar de muitos trabalhos associarem o RS a uma bactéria, as dimensões exatas do talo, modo de multiplicação e mobilidade, ainda permanecem em controvérsias (GILLASPIE *et alii*, 1976b).

DAMANN (1976) após succionar água destilada esterilizada, através dos nós sadios e doentes de cana, observou em microscopia eletrônica, um organismo com tamanho e mesossomos coloridos, idêntico à bactéria descrita por TEAKLE *et alii* (1973). Afirma ainda, que somente quando se obtiver cultura pura da bactéria e se comprovar os postulados de Koch, a etiologia do RS será determinada.

GILLASPIE e BLIZZARD (1976) testaram o efeito

da penicilina G em caldo de canas infectadas com RS, porém não obtiveram êxitos na inativação. Isto, possivelmente, porque as concentrações utilizadas não foram suficientes para inibir a multiplicação, ou a bactéria não foi sensível ao antibiótico testado.

Vários outros pesquisadores, posteriormente, confirmaram a associação de bactéria com o RS. (RICAUD *et alii*, 1976a; WEAVER *et alii*, 1977; BAILEY, 1977; CHEN *et alii*, 1978; RISHI e NATH, 1978; LIU *et alii*, 1979).

KAO e DAMANN (1978) sugerem estar o RS associado a uma bactéria da ordem *Actinomycetales*, isto, por terem observado a presença em microcolônias filamentosas, de um organismo ramificado em extrato dos vasos do xilema de internódios do colmo de cana-de-açúcar. Quando o estudo foi realizado com extrato vascular de pedaços do colmo, com um ou dois nós, as microcolônias não apareciam, surgindo apenas células individuais ou em cadeia, com curtas ramificações. Segundo estes autores, as células individuais possuem as mesmas características da bactéria corineforme descrita anteriormente, associada à doença.

Em pesquisas no Brasil, SUDO (1980) constatou as bactérias *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas rubrisubalbicans* em material de cana-de-açúcar, com sintomas característicos do RS e evidenciou a possibilidade do RS, que no momento é considerado como sendo causado por bactéria, seja na verdade causado por um complexo de bactérias.

2.2. MÉTODOS PARA DIAGNOSE

2.2.1. DIAGNOSE ATRAVÉS DE REPRODUÇÃO DOS SINTOMAS

Devido a não apresentação de um sintoma externo típico para diagnose do RS, vários trabalhos têm sido relatados, nos quais os autores procuram solucionar o problema apresentando técnicas rápidas e práticas para uma perfeita identificação desta doença.

Os primeiros trabalhos para diagnose do RS, foram baseados nos sintomas de descoloração vascular, relatados como característicos da doença, segundo STEINDL (1950) e confirmado por HUGHES e STEINDL (1955), HUGHES e STEINDL (1956), ADSUAR e LOPEZ-ROSA, 1962).

Devido ao longo tempo necessário para a reprodução dos sintomas em cana-de-açúcar, várias plantas indicadoras foram testadas e sugeridas. HUGHES e STEINDL (1956) testaram tomate, beringela, *Nicotiana glutinosa*, *Emilia sonchifolia*, milho, sorgo e trigo, entre outras. STEIB e FORBES (1957) afirmaram que Johnson grass (*Sorghum halepense*) e milho podem ser portadores do agente do RS.

SCHEXNYDER (1959) relata ser possível efetuar o diagnóstico do RS em n^{os} imaturos na variedade CP36-105, dez a doze semanas após a inoculação. GILLASPIE *et alii* (1966) afirmam que a variedade CP44-101 possibilita fazer a diagnose em n^{os} imaturos quatro a seis semanas, após a inoculação. SINGH (1969) sugere a variedade Co421 como outra variedade indicadora da doença.

MATSUOKA (1971) recomenda a diagnose do RS através do uso de variedades ou híbridos do capim elefante (*Pe*

inisetum purpureum), que são mais convenientes do que variedades de cana-de-açúcar. Em estudo posterior, MATSUOKA (1972) assegura que além de *P. purpureum*, outra série de gramíneas são hospedeiras do RS, como *Echinochloa colonum*, e *Panicum maximum*, entre outros. Em testes de patogenicidade, TOKESHI *et alii* (1974) utilizaram como plantas indicadoras o capim elefante, milho doce e algumas variedades de cana-de-açúcar.

STEINDL e TEAKLE (1974) obtiveram bons resultados com "bana grass", híbrido de *Peninsetum purpureum* e *P. americanum*. Segundo IRVINE (1975), a variedade CP44-101 quando adubada com nitrato de amônia ou com adubação completa e mantida na sombra, produz sintomas iniciais típicos do RS, e que esta expressão de sintomas pode indicar concentração do agente da doença.

WORLEY e GILLASPIE (1975) relataram que os sintomas do RS em um híbrido de sorgo x capim sudão são bastante acurados e são caracterizados pelo murchamento e morte da planta. BECHET (1976) sugere uma série de variedades de cana-de-açúcar como indicadoras do RS e um clone de "bana grass" como promissor hospedeiro e indicador para rápidas diagnoses do RS.

TEAKLE *et alii* (1978) afirmam que pela aparência, a variedade Q28 ou outras variedades que desenvolvam os sintomas característicos da doença, podem ser usadas para diagnoses rápidas e específicas do RS, em áreas onde esta doença ocorre normalmente e não existe possibilidade de avaliação por microscopia eletrônica ou de contraste de fase.

TOKESHI (1980) relata que artificialmente é possível infectar em torno de 14 espécies de gramíneas. Em

trabalhos recentes, SUDO (1980) afirma que o teste do ca pim elefante é inespecífico para a bactéria do RS, reagindo positivamente para diversas bactérias, fungos e leveduras. Conforme TOKESHI (1980), todos estes testes biológicos são falhos por não serem específicos à bactéria do RS.

2.2.2. DIAGNOSE ATRAVÉS DE TESTES QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

FARRAR (1957) desenvolveu um teste químico com a finalidade de diferenciar canas sadias de canas doentes. Este teste consistia em tratar as secções longitudinais, obtidas da periferia dos nós basais de colmos maduros, com peróxido de hidrogênio a 3%, combinado com ácido clorídrico hidratado. Em canas sem sintomas, ocorria uma coloração azul-esverdeada, na região do tecido parenquimatoso próximo aos feixes fibrovasculares, enquanto nada ocorria nos tecidos das canas afetadas.

Conforme ANTOINE (1957), o RS poderia ser diagnosticado por uma técnica colorimétrica, através do uso de 2, 3,5-cloreto trifenil tetrazólio. Este sal, quando em contato com tecido vivo, altera a sua coloração e esta alteração se processa de maneira mais rápida nos tecidos de cana com o RS do que nos tecidos sadios. Entretanto, HUGHES (1958) usou as técnicas descritas por FARRAR (1957) e ANTOINE (1957) e concluiu que nenhum dos testes oferece precisão nos resultados.

Estudos cromatográficos, desenvolvidos por FIFE e STOKES (1959), mostraram que extrato de folhas de plantas doentes tinha maior concentração de vários aminoácidos

quando comparado com extrato das folhas de planta sadia. Entretanto, os autores sugerem que o método seja mais estudado para melhorar a avaliação e eficiência das análises cromatográficas para avaliação do RS.

ROTH e WHITEHEAD (1965) realizaram uma técnica, na qual tratavam a parte periférica do colmo com a aplicação de uma solução de nitrato de prata e amônia ou uma solução a 20% de hidróxido de potássio. A reação consistia numa coloração amarela nos tecidos saudios, enquanto nos locais onde os feixes fibrovasculares estavam atacados, surgiam estrias avermelhadas no fundo amarelo. Os autores alertam quanto à necessidade de maiores estudos, devido a alguns resultados contraditórios.

2.2.3. DIAGNOSE ATRAVÉS DE TESTES SEROLÓGICOS

GILLASPIE *et alii* (1966) realizaram trabalhos de purificação do vírus tido como provável agente causal do RS, e, em adição a estas pesquisas tentaram desenvolver um anti-soro para este vírus, visando uma possível identificação no laboratório e no campo. Em tentativas de purificação, GILLASPIE (1971) produziu anti-soro, para adsorver as preparações infectivas de plantas doentes e alternativamente, frações de gama-globulina do anti-soro produzido de plantas saudias, foram separadas e usadas para adsorção dos preparados. Nenhum método obteve sucesso e cada um deles reduzia a infectividade. Afirma ainda o autor que o vírus poderia estar associado com partículas de origem do hospedeiro e ser removido junto com o antígeno do hospedeiro.

DAMANN *et alii* (1977) utilizaram a técnica de serologia específica e microscopia eletrônica (SSEM) e concluíram ser este método efetivo em mostrar uma bactéria característica associada com o RS e que tal técnica pode ser usada para diagnosticar esta doença por ser mais sensível do que microscopia eletrônica com imersão rápida.

HARRIS e GILLASPIE (1978) relatam o uso de têcnica indireta de anticorpos fluorescentes, usando anti-soro específico para a bactéria corineforme na diagnose do RS. Asseguram os autores que o teste é mais sensível que a microscopia de contraste de fase e pode ser usado rotineiramente com amostras de caldo cru, contendo baixas concentrações da bactéria.

Em estudos realizados com serologia, GILLASPIE (1978a) produziu anti-soro obtido da bactéria associada com o RS, em plantas doentes de cana-de-açúcar ou um híbrido de capim sudão (*Sorghum vulgare sudanensis*). O anti-soro causa um agregado da bactéria e remove a infectividade do caldo obtido da cana-de-açúcar ou do híbrido do capim sudão infectado pela bactéria. Nenhuma reação serológica foi detectada entre a bactéria associada ao RS e *Corynebacterium flaccumfaciens*, *C. michiganense* ou *C. fascians* através dos testes de microaglutinação.

Dando prosseguimento a estas pesquisas, GILLASPIE (1978b) afirma ainda que além das observações citadas anteriormente, não há evidência de reações homôlogas entre a bactéria do RS e *Mycobacterium paratuberculosis*, *M. tuberculosis*, *Erwinia amylovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas pruni*, *Streptomyces scabies* e

Streptomyces sp., usando o teste de microaglutinação. Conforme o autor, o anti-soro produzido da bactéria do RS, permite a utilização rápida e econômica para diagnósticos serológicos, fazer determinações serológicas relacionados entre a bactéria e outros organismos e auxiliar na tentativa de cultivar artificialmente o organismo causal do RS.

GILLASPIE e HARRIS (1978) sugerem um método de seleção para resistência ao RS em grande escala, baseados no teste ELISA (The Enzyme Linked Immunosorbent Assay), em que a intensidade do desenvolvimento da coloração é diretamente relacionado com o número de bactéria presente na amostra. O teste ELISA detectou em torno de 4×10^6 células por mililitro ou em torno de três bactérias por campo de microscopia de contraste de fase. Em trabalhos posteriores, GILLASPIE e HARRIS (1979), levantam possíveis limitações do método, como baixa sensibilidade, alta absorção de fundo e resultados inconsistentes.

2.2.4. DIAGNOSE ATRAVÉS DE MICROSCOPIA

Depois de PLAVSIC-BANJAC e MARAMOROSCH (1972) terem observado corpos pleomórficos (bactéria) nos xilema de canas, com RS, através de exames em microscópio eletrônico e eletromicrografia, vários autores sugeriram a mesma possibilidade. (MARAMOROSCH *et alii*, 1973; TEAKLE, 1973; CHEN, 1975; WORLEY e GILLASPIE, 1975).

GILLASPIE *et alii* (1973) e STEINDL (1976) afirmam que o RS pode ser diagnosticado através do exame de exsudatos do xilema, empregando-se microscopia de contraste de

fase ou campo escuro, e que estes métodos são mais acessíveis, menos dispendiosos, fáceis e rápidos, do que microscopia eletrônica.

BAILEY (1976a) afirma que exames de bactérias pela microscopia de contraste de fase, em infusão de tecido contaminado, parece ser fácil e vantajoso para a diagnose do RS, principalmente em variedades que não apresentam sintomas nodais conspícuos e também para confirmar diagnose baseada em sintomas nodais. Entretanto, esta técnica tem limitações quando a diagnose é feita em tecidos de canas jovens que apresentam poucas bactérias.

GILLASPIE *et alii* (1976a) estudando clones resistentes e suscetíveis inoculados com RS, comprovaram que o caldo bruto dos clones suscetíveis apresentavam um maior número de bactéria, em relação ao caldo dos clones resistentes. Desta forma, os autores afirmam que a correlação negativa entre nível de resistência ao RS e o número de bactéria no suco do xilema indicam que o método da microscopia de contraste de fase pode ser vantajoso para seleção de variedades resistentes ao RS.

Segundo RICAUD *et alii* (1976b) o organismo associado ao RS é facilmente distinguido das outras bactérias contaminantes, pela técnica da microscopia de campo escuro, devido as suas formas características e sua morfologia comumente filiforme. BAILEY (1977) em estudos com microscopia de contraste de fase, demonstrou existir uma relação direta entre severidade de reações das variedades afetadas pelo RS e o número de bactérias observadas em preparação de tecidos de

todas as partes das plantas. Entretanto, devido ao baixo número de bactérias observadas em tecidos da parte apical do colmo e em tecidos de colmos jovens, torna-se necessário o uso de secções de colmos maduros, para uma maior segurança na diagnose.

Um método para extração da seiva do xilema dos colmos de cana-de-açúcar usando pressão positiva, foi descrito por RICHARDSON (1978) na qual obtém-se um elevado número de bactérias, sem a necessidade de centrifugação, fazendo os exames diretamente em microscópio de contraste de fase. Utilizando-se este método, as estruturas ramificadas e as protuberâncias da bactéria podem ser observadas através da microscopia de contraste de fase.

KAO e DAMANN (1978) utilizando microscopia de contraste de fase, contraste de interferência e eletrônica em pesquisas, tentaram a identificação do agente causal do RS.

TEAKLE *et alii* (1979) recomendam o uso da técnica de coloração negativa com fosfotungstato de sódio para microscopia eletrônica, porém afirmam que provavelmente o tamanho da bactéria associada ao RS é bem maior do que se observa através desta técnica. Entretanto, ao usarem acetato de urânio ou telas umedecidas com a suspensão da bactéria sem corante, o talo bacteriano aproximou-se ao tamanho real.

Recentemente, KAO e DAMANN (1980) observaram a presença da bactéria associada ao RS através de estudos em microscopia eletrônica de varredura.

2.3. ISOLAMENTO DA BACTÉRIA

DAVIS *et alii* (1980) isolaram de cana-de-açúcar com RS e capim bermuda (*Cynodon dactylon*), uma pequena bactéria corineforme, semelhante ao agente do RS. Ambos os isolados foram multiplicados em cana-de-açúcar e em capim bermuda, entretanto, o isolado de capim bermuda não causou sintomas de RS em cana-de-açúcar, porém o desenvolvimento do capim bermuda foi retardado pelos dois isolados.

Conforme GILLASPIE *et alii* (1981), a bactéria do RS de cana-de-açúcar foi isolada e cultivada em meio artificial e sua patogenicidade foi demonstrada em cana-de-açúcar e em um híbrido de sorgo e capim sudão.

Mais recentemente, LIAO e CHEN (1981), afirmam ter cultivado com sucesso, em um meio de cultura artificial, uma pequena bactéria corineforme associada com RS da cana-de-açúcar. O mesmo meio foi também usado para isolar e cultivar uma bactéria semelhante a do RS, presente em capim bermuda. Este meio é diferente do formulado por DAVIS *et alii* (1980). Ambos os isolados infectaram e se multiplicaram em um híbrido de sorgo e capim sudão, porém, só o isolado de cana causou sintomas de murcha em algumas plantas inoculadas.

2.4. TESTES PARA SELEÇÃO DE VARIEDADES RESISTENTES

Em cana-de-açúcar, trabalhos preliminares relatam a possibilidade de ocorrer três tipos de resistências ao RS. STEINDL (1961) afirma que as variedades CP29-116, CP52-68 e Q50 são "tolerantes", podendo ser infectadas, mas geralmente não apresentam danos significativos e que as variedades

Q44 e Badila parecem ter "resistência de campo" ou seja, não mostraram infecção no campo, mas apresentam pouco desenvolvimento quando inoculadas artificialmente e conforme WISMER (1971), a variedade H60-6909 é "imune", pois não conseguiu a sua infecção com o RS.

Posteriormente, STEINDL (1974) relata que o controle do RS com variedades resistentes não é ainda praticado, entretanto, o controle da doença com variedades tolerantes poderia ser desenvolvido desde que se estivesse preparado para conviver com a doença e depender inteiramente destas variedades.

TEAKLE *et alii* (1975) com base nas informações de STEINDL (1961) e WISMER (1971) e acrescentando algumas outras variedades, testaram a resistência, à passagem de água, em pedaços de colmos apresentando apenas um nó, suspeitaram que possivelmente a anatomia vascular estaria envolvida na resistência ao RS. Os autores levantaram a hipótese de que a resistência do movimento da água era paralelo à resistência ao movimento do agente do RS e que isto podia limitar a colonização na planta. Ao estudarem esta hipótese, TEAKLE *et alii* (1975) comprovaram existir correlação entre a taxa da vazão de água em pedaços de colmo sadio e resistência ao RS, aonde a variedade imune H60-6909 apresentou alta resistência à doença e ao movimento da água, enquanto as variedades tolerantes CP26-116, Q50 e 60C644 foram moderadamente resistentes à doença e à vazão de água. As variedades suscetíveis demonstraram ter relativamente uma baixa resistência ao movimento da água. Com a mesma metodologia, foi estudada tam

bem a propriedade da tinta nanquim passar através dos pedaços do colmo colorindo os feixes vasculares funcionais e os resultados mostraram que variedades imunes com alta resistência ao movimento apresentaram poucos feixes vasculares escurecidos, em comparação às variedades suscetíveis de alto fluxo.

VALARINI (1978) utilizando a metodologia de TEAKLE *et alii* (1975) modificada, desenvolveu um aparelho denominado fluxômetro e trabalhando tanto com plantas inoculadas com RS e sadias, concluiu que existe uma correlação entre a diferença da vazão de água em colmos sadios e doentes de cana-de-açúcar e o grau de suscetibilidade. Desta forma, o autor sugere a possibilidade de se avaliar a suscetibilidade de variedades ao RS pela determinação da vazão de água, sendo esta técnica um método rápido, econômico e eficiente na seleção de plantas resistentes ao RS.

Conforme VALARINI e TOKESHI (1980) a avaliação do fluxo de água em colmos sadios e doentes, sofre interferência da pressão de vácuo, localização do nó no colmo e período de armazenamento, na avaliação da resistência ao RS e que cada variedade deve ser comparada em condições idênticas.

TEAKLE *et alii* (1978) em estudos microscópicos, observaram que variedades resistentes, com taxa baixa de fluxo de água, apresentam maior número de ramificações nos vasos metaxilema em comparação com nós de variedades suscetíveis. Ao medir os menores poros das células do metaxilema observaram que estes tinham $8\text{ }\mu\text{m}$, e eram portanto muito maior do que a bactéria associada ao RS ($0,15\text{ a }0,32\text{ }\mu\text{m} \times 1,0\text{ a }$

2,5 μm). Os autores relataram que diferenças anatômicas não são suficientes para explicar a imunidade frequentemente observada na variedade H60-6909. Como tiloses e gomas são comumente produzidas pela planta em reação ao agente do RS (STEINDL, 1961), esses mecanismos de defesa podem explicar o bloqueio mais rápido dos pequenos poros das variedades resistentes do que os grandes poros das variedades suscetíveis.

MATSUOKA (1980) sugere um método de seleção de tolerância ao RS através de microparcelas, comparando o peso de plantas tratadas termicamente, consideradas como sadias e plantas inoculadas com RS estabelecidas como doentes.

DOUGLAS (1981) afirma que a anatomia vascular não é suficiente por si só para explicar o grau de suscetibilidade entre as variedades e que aparentemente a quantidade de bactérias nas variedades tolerantes é menor do que nas variedades suscetíveis. Assegura também que o método de medida da vazão de água pode se constituir num método simples, seguro, econômico e rápido para se selecionar variedades resistentes ao RS. O autor afirma que este método pode ser usado com um grande número de variedades, com um mínimo trabalho e pouco espaço e custos operacionais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP e na Estação Experimental Central da Coordenadoria Regional Sul (COSUL) IAA-PLANALSUCAR.

Foram utilizadas cinco variedades de cana-de-açúcar: CB41-76, CB47-355, IAC48/65, IAC51/205 e NA56-79, tratadas termicamente (50,5°C/2h), pertencentes ao viveiro primário de mudas sadias da Estação Central do IAA-PLANALSUCAR, em Araras, SP.

3.1. OBTENÇÃO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO

O inóculo utilizado para o teste com o RS foi caldo bruto da variedade IAC52/326, que apresentava sintomas típicos da doença, obtidos através de inoculação artificial.

Nas inoculações para testar a escaldadura das folhas foi usada cultura pura de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson (Xa), agente causal desta doença, cultura esta conservada em meio de Wilbrink mais óleo mineral. O isolam

do foi o mesmo utilizado por MASUDA (1980). Esta bactéria foi multiplicada em meio de cultura líquido de Wilbrink modificado 2 (W-2) (AKIBA, 1978), em Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml do caldo que foi incubado por oito dias à temperatura ambiente, sob regime constante de agitação. Esta cultura foi centrifugada a 17.300g durante 10 minutos (Centrífuga Sorval SS-4).

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em água destilada esterilizada, com auxílio de um agitador de tubo de ensaio. A concentração da bactéria foi estabelecida em colorímetro (Baush and Lomb, Spectronic 20) a 580 nm, com uma concentração final de 65% de transmitância equivalente à escala nº 3 de McFarland correspondente a aproximadamente 8.10^8 talos bacterianos por ml.

Novecentos colmos de cada variedade, sendo trezentos para cada um dos tratamentos, RS e EF, foram inoculados através de injeção sob pressão, com seringa hipodérmica, com agulha obliterada na extremidade e com abertura lateral. Em cada colmo, foi injetado cerca de 1,0 ml de inóculo a 5cm acima do meristema apical (AKIBA, 1978). As plantas consideradas como testemunhas foram injetadas com água destilada esterilizada. Os colmos inoculados foram etiquetados com fitas plásticas coloridas para diferenciar os tratamentos que ficaram em sulcos distintos.

A idade das plantas variou em torno de 6 a 7 meses.

Algumas plantas das cinco variedades apresentaram sintomas crônicos de EF e a motilidade da bactéria foi

observada em parte das folhas, baseando-se na técnica de isolamento descrita por AKIBA (1978).

3.2. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO RAQUITISMO DA SOQUEIRA (RS) E A ESCALDADURA DAS FOLHAS (EF) PELO MÉTODO DE VAZÃO DE ÁGUA.

A metodologia empregada neste trabalho foi baseada no método descrito por TEAKLE *et alii* (1975), modificado por VALARINI (1978). O aparelho denominado fluxômetro, utilizado para medir a vazão de água através de colmos de cana-de-açúcar, foi o mesmo usado por VALARINI (1978) e DOUGLAS (1981).

A vazão de água foi avaliada em secções dos colmos inoculados, próximo à base, medindo 8cm de comprimento, composto de apenas um nó e das partes adjacentes dos internódios, sob uma pressão de vácuo constante de 30mm de Hg, por um período de 15 minutos.

A extremidade superior do rebolo foi inserida em uma luva de borracha e encaixada no frasco de vácuo através de um funil metálico intermediário. A outra extremidade (inferior) foi adaptada em uma outra luva de borracha que permanecia constantemente cheia de água destilada, ficando assim o pedaço do colmo invertido em relação ao colmo na planta, permitindo a passagem de água no mesmo sentido da seiva bruta no colmo.

Após as determinações, os pedaços do colmo foram cortados longitudinalmente para exames internos, com a

finalidade de verificar se as variações da vazão de água nos pedaços de colmo estavam correlacionados com sintomas típicos do RS ou de outras doenças vasculares.

Na época da colheita e avaliação de vazão, as plantas estavam com 18 a 20 meses de idade e tinham recebido os tratos culturais normais.

As avaliações dos tratamentos foram feitas me dindo-se a vazão da água (ml/15min) em 7 repetições compos tas de 20 amostras cada. O delineamento foi o inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos à análise de va riância e teste de Tukey para comparação de médias.

3.3. CONTAGEM DOS VASOS FUNCIONAIS DO XILEMA

A técnica utilizada para coloração dos vasos funcionais foi a mesma para a avaliação da vazão da água des crita anteriormente, sendo que a água destilada foi substi - tuída pelo corante safranina O ou tinta nanquim. O tempo sob ação do vácuo foi controlado pelo início da passagem do co - rante.

Posteriormente, os pedaços dos colmos foram cortados transversalmente no anel de crescimento, próximo a região do n^o, e estas secções foram avivadas com o auxílio de instrumento de corte e etiquetados.

As secções dos n^{os} foram fotografadas usando uma câmara fotográfica Nikon AS, com lente Micro-Nikkor 33mm 1:35, em filme diapositivo Fujichrome 100 asa, baseando-se no trabalho de TANIMOTO (1964).

Os vasos funcionais foram contados através da projeção dos diapositivos em quadro magnético, tipo kartro e com escurecimento dos vasos funcionais projetados no quadro, com pincel marcador para evitar dupla contagem, registrando-se seu número com contadores manuais.

Cada tratamento constou de 8 repetições de uma amostra, em um delineamento estatístico inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para comparação de médias.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO RAQUITISMO DA SOQUEIRA (RS) E A ESCALDADURA DAS FOLHAS (EF) PELO MÉTODO DE VAZÃO DE ÁGUA.

A tabela 1 mostra a vazão média de água, em 7 repetições cada uma, representada por 20 colmos, para cada tratamento em 5 variedades de cana-de-açúcar tratadas termicamente e inoculadas com caldo bruto (RS), cultura pura de Xa e plantas testemunhas.

A análise da variância dos dados apresentados na tabela 2 constatou diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade entre os tratamentos para as variedades CB41-76, IAC48/65 e NA56-79, e ao nível de 5% para a variedade IAC51/205.

TABELA 1. Vazão média de água em colmos de cana-de-açúcar inoculados com Raquitismo da Soqueira (RS) e Escaldadura das Folhas (EF) e Testemunha (T)

MÉDIAS DE 20 COLMOS/TRATAMENTO EM ml/15 min À PRESSÃO DE VÁCUO DE 30 mm Hg													
V A R I E D A D E S													
REPETIÇÕES	CB41-76			CB47-355			IAC48/65			IAC51/205			NA56-79
	RS	T	EF	RS	T	EF	RS	T	EF	RS	T	EF	T
1	11,52	16,70	21,15	13,52	12,07	18,62	10,00	13,82	15,75	8,95	10,92	13,55	13,25
2	11,30	15,07	16,10	13,10	13,17	18,65	10,40	15,05	15,05	6,57	9,97	7,57	20,63
3	8,37	14,72	16,12	10,17	14,15	11,82	12,12	16,27	18,95	6,77	8,85	12,90	25,66
4	12,35	13,02	15,47	13,70	14,75	15,92	10,52	12,80	16,75	5,70	7,40	12,12	18,94
5	14,40	14,67	14,42	12,97	15,77	12,57	9,37	10,82	13,97	7,97	7,25	10,07	25,11
6	10,37	15,32	16,67	12,92	15,30	17,67	11,92	10,12	16,82	8,65	9,57	8,85	23,19
7	12,57	18,80	16,95	13,22	16,62	13,85	10,50	12,65	11,25	6,87	10,40	8,60	21,05
MÉDIA	11,55a	15,47b	16,70b	12,80a	14,55ab	15,59b	10,69a	13,08ab	15,51b	7,35a	9,19ab	10,52b	21,12b
D.M.S.	2,66				2,74			2,70			2,35		4,45
CV(%)	13,40				14,02			15,12			19,12		18,34

Médias de tratamentos com letras iguais para cada variedade não diferem estatisticamente entre si.

TABELA 2. Análise da variância dos resultados apresentados na Tabela 1. Delineamento inteiramente casualizado.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	QUADRADOS MÉDIOS				
		CB41-76	CB47-355	IAC48/65	IAC51/205	NA56-79
Tratamentos	2	50,5113**	13,8733 ^{ns}	49,5865**	17,7223*	107,8542**
Resíduo	18	3,8130	4,0270	3,9188	2,9784	10,6245

Aplicado o método de Tukey de comparação de médias de tratamentos ao nível de 5% de probabilidade, verificou-se que em nenhuma variedade os tratamentos EF e testemunha diferiram significativamente entre si.

A testemunha também não diferiu estatisticamente do tratamento com RS nas variedades CB47-355, IAC48/65 e IAC51/205. Nas demais variedades, esses tratamentos apresentaram diferenças significativas.

Em todas as variedades, a vazão de água em colmos com RS foi menor que os demais tratamentos, diferindo significativamente da vazão média do tratamento com EF.

4.2. CORRELAÇÃO ENTRE A VAZÃO DE ÁGUA E NÚMERO DE VASOS FUNCIONAIS DO XILEMA.

Verifica-se na Tabela 3, os dados referentes ao número de vasos funcionais do xilema de 5 variedades de cana-de-açúcar, após terem sido inoculadas com RS, cultura pura de Xa e plantas testemunhas.

TABELA 3. Número médio de vasos funcionais do xilema de colmos de cana-de-açúcar inoculados com Raquitismo da Soqueira (RS), Escaldadura das Folhas (EF) e Testemunha (T).

NÔMERO DE VASOS FUNCIONAIS DO XILEMA																		
V A R I E D A D E S																		
REPETIÇÕES	CB41-76				CB47-355				IAC48/65				IAC51/205				NA56-79	
	RS	T	EF	RS	T	EF	RS	T	EF	RS	T	EF	RS	T	EF	EF		
1	641	514	652	620	669	673	397	612	512	350	589	421	189	723	560			
2	569	618	747	544	723	574	306	646	591	442	547	513	423	704	603			
3	427	560	796	511	593	597	261	539	642	390	498	456	410	706	741			
4	501	733	861	557	682	748	433	547	445	318	632	554	152	637	*			
5	355	694	827	654	592	672	358	544	553	341	869	233	241	763	*			
6	638	654	798	508	660	823	146	613	568	452	695	667	475	884	*			
7	579	628	583	689	562	592	319	523	320	351	474	255	545	787	*			
8	404	791	638	505	696	696	408	723	578	231	715	509	*	747	*			
MÉDIA	514a	649b	738b	574a	647ab	672b	329a	593b	526b	359a	627b	451a	348a	744b	635b			
D.M.S.	127			91			112				152			*				
CV (%)	15,86			11,47			18,43				25,16			19,90				

* Parcelas perdidas.

*1 Quando se compara o tratamento RS com T, D.M.S. = 152.

Quando se compara o tratamento EF com T, D.M.S. = 199.

Quando se compara o tratamento RS com EF, D.M.S. = 203.

Médias de tratamentos com letras iguais para cada variedade não diferem estatisticamente entre si.

Nas Tabelas 4 e 5, a análise da variância dos dados apresentados acusou diferença significativa ao nível de 1% entre os tratamentos, nas variedades CB41-76, IAC48/65, NA56-79 e ao nível de 5% para a variedade CB47-355,

TABELA 4. Análise da variância dos resultados apresentados na Tabela 3 para as variedades CB41-76, CB47-355, IAC48/65 e IAC51/205. Delineamento inteiramente casualizado.

CAUSAS DA VARIACÃO	GL	QUADRADOS MÉDIOS			
		CB41-76	CB47-355	IAC48/65	IAC51/205
Tratamentos	2	101315,17**	20947,7917*	151649,29**	148436,38**
Resíduo(s)	21	10105,10	5238,9405	7911,18	14534,27

TABELA 5. Análise da variância dos resultados apresentados na Tabela 3 para variedade NA56-79. Delineamento inteiramente casualizado.

CAUSAS DA VARIACÃO	GL	QUADRADO MÉDIO
Tratamentos	2	299893,8**
Resíduo(s)	15	17712946,0

5. DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO RAQUITISMO DA SOQUEIRA (RS) E A ESCALDADURA DAS FOLHAS (EF) PELO MÉTODO DE VAZÃO DE ÁGUA.

O estudo realizado, nas 5 variedades de cana-de-açúcar para avaliar a viabilidade do método da vazão de água, mostrou-se bastante efetivo para selecionar variedades tolerantes ao RS, confirmando os trabalhos de VALARINI (1978) e DOUGLAS (1981).

Na Tabela 1, verifica-se que nas condições do experimento, as variedades CB47-355, IAC48/65 e IAC51/205 são tolerantes ao RS e as variedades CB41-76 e NA56-79 apresentaram-se como suscetíveis.

As reações apresentadas pelas variedades CB41-76, CB47-355, NA56-79 estão de acordo com os resultados obtidos por DOUGLAS (1981). VALARINI (1978) encontrou respostas semelhantes ao testar as variedades CB47-355 e NA56-79, entretanto, este autor não conseguiu detectar diferenças significativas entre a vazão de água nos colmos da CB41-76, apesar de

certa tendência, possivelmente por ter feito a avaliação 24 horas após a colheita. Conforme o próprio VALARINI (1978) e VALARINI e TOKESHI (1980) o armazenamento do material induz uma queda na vazão de água e interfere na avaliação de resistência ao RS, neste método.

Alguns resultados da Tabela 1 estão de acordo com MATSUOKA (1976) que ao estudar a recuperação da produtividade de variedades de cana-de-açúcar, afirma ser a CB41-76 muito sensível ao RS e com TOKESHI (1980) que considera a variedade CB47-355 tolerante e CB41-76 e NA56-79 como suscetíveis.

Em trabalhos de seleção de tolerância ao RS através da produção de colmos (kg/parcela), MATSUOKA (1980) afirma que a variedade CB41-76 é altamente suscetível ao RS, a IAC51/205 é considerada como tolerante e a CB47-355 como altamente tolerante, confirmando os resultados obtidos pelo método de vazão de água. Ao estudar a variedade NA56-79, MATSUOKA (1980) não detectou diferenças significativas em dois experimentos, entretanto o autor afirma que em uma outra região esta variedade apresentou grandes diferenças de produção entre as parcelas sadia e doente.

Como a resistência varietal pode mudar em função das condições de fertilidade do solo e regime hídrico, e tendo em vista este trabalho ter sido conduzido no mesmo local, no qual MATSUOKA (1980) não conseguiu captar diferenças significativas entre as parcelas sadia e doente na variedade NA56-79, o método de vazão de água provavelmente é mais preciso do que o método de avaliação através de microparcelas,

para diagnósticos de resistência ao RS.

Observa-se na tabela 1 que a variedade CB47-355 considerada tolerante apresentou uma vazão de água superior a CB41-76 que é suscetível ao RS. DOUGLAS (1981) obteve dados semelhantes, comparando a CB47-355 com as variedades IAC50/134 e NA56-79, também suscetíveis. Estes resultados não estão de acordo com TEAKLE *et alii* (1975) e TEAKLE *et alii* (1978), que relacionam baixa vazão de água, a alto grau de resistência. Isto possivelmente, porque nestes trabalhos, os autores fizeram as comparações entre variedades enquanto no presente trabalho, assim como DOUGLAS (1981) as comparações foram feitas entre tratamentos dentro de cada variedade.

Ainda com referência a tabela 1, pode ser observado que todas variedades mostraram diferenças marcantes entre as médias de vazão de água entre os tratamentos EF e RS e resultados sem diferenças significativas ao se comparar o tratamento EF com a testemunha.

Ao tentar avaliar a resistência de variedades a EF pelo método da vazão de água, VALARINI (1978) não publicou os resultados obtidos, sugerindo a necessidade de estudos mais apurados para comprovação da eficiência do método.

Os resultados desta pesquisa que mostrou uma tendência de maior vazão nas variedades inoculadas com o agente causal da EF, sugerem que isto possivelmente ocorreu devido à desintegração das paredes celulares do xilema, obstruídos por substâncias gomosas produzidas pela bactéria, com a destruição dos tecidos adjacentes ao parênquima do xilema, formando espaços de ar ou lacunas, denominados cavidades liso

gênicas, conforme explicam MARTIN e ROBINSON (1961). Por esta razão e não sendo esta bactéria totalmente controlada pelo tratamento térmico (BAILEY, 1976b) é possível haver interferência na avaliação à resistência ao RS, caso o material esteja contaminado com Xa. Por esta razão é recomendado o uso de material livre de EF, possível de ser diagnosticado através de testes serológicos (MASUDA, 1980) ou aumentar o número de amostras estudadas com a finalidade de minimizar o possível erro.

Pelo método de vazão de água, foi possível observar que os mecanismos de patogenicidade das bactérias causais da EF e do RS no interior da planta são diferentes, eliminando a hipótese sugerida por TOKESHI *et alii* (1974) como sendo Xa um dos prováveis agentes de ambas as doenças.

O exame interno dos pedaços de colmo não mostraram vasos descoloridos pelo RS nem por outras doenças vasculares, entretanto, TOKESHI (1980), afirma que a ausência de sintomas internos do RS, não assegura sanidade do material.

5.2. CORRELAÇÃO ENTRE A VAZÃO DE ÁGUA E NÚMERO DE VASOS FUNCIONAIS DO XILEMA.

A tabela 3 apresenta o número médio de vasos funcionais do xilema de 5 variedades de cana-de-açúcar, onde mostra ter ocorrido uma correlação positiva entre estes números e a quantidade de água passada através dos colmos das variedades CB41-76, NA56-79 e CB47-355, com RS. As duas

primeiras variedades consideradas como suscetíveis ao RS, pelo método da vazão de água, apresentaram baixo número de vasos funcionais para este tratamento, em relação à testemunha. Nas figuras 1 e 2 são apresentados os vasos funcionais coloridos na NA56-79. A variedade CB47-355 que é tolerante ao RS não mostrou diferença significativa em comparação a testemunha (figuras 4 e 5). Estes resultados estão de acordo com VALARINI (1978).

O estudo do número de vasos funcionais do xilema confirma também que o mecanismo da patogenicidade de *Xanthomonas albilineans* é diferente do agente causal do RS, que além de não reduzir a vazão de água, não mostra diferenças significativas quando comparados com a testemunha. Estes resultados são mostrados nas variedades NA56-79 e CB47-355, nas figuras 3 e 6 respectivamente.

Entretanto, as variedades IAC48/65 e IAC51/205 não mostraram haver correlação entre os números de vasos funcionais e a vazão de água em colmos de cana-de-açúcar, possivelmente devido a outros mecanismos de resistência morfológica ou fisiológica destas variedades, confirmando as afirmações de TEAKLE *et alii* (1978) e DOUGLAS (1981) que asseguram que a anatomia vascular não é suficiente por si só para explicar o grau de resistência entre as variedades. Como foi recomendado que o método de vazão de água fosse sempre realizado com um grande número de amostras para evitar possíveis erros, interessante se torna efetuar maiores estudos em relação aos números dos vasos funcionais do xilema e vazão de água, com novos testes e maior número de amostras para uma

Figura 1 - Com Raquitismo da Soqueira apresentando 189 vasos funcionais.

Figura 2 - Testemunha apresentando 884 vasos funcionais.

Figura 3 - Com Escaldadura das Folhas apresentando 741 vasos funcionais.

Figura 4 - Com Raquitismo da Soqueira apresentando 689 vasos funcionais.

Figura 5 - Testemunha apresentando 660 vasos funcionais.

Figura 6 - Com Escaldadura das Folhas apresentando 823 vasos funcionais.

conclusão mais segura do comportamento destas duas variedades e da distribuição da bactéria do RS dentro da touceira e dos colmos, pois as variações observadas levam a suspeita de haver colonização de forma irregular dentro de um único colmo e entre colmos da touceira infectada.

A correlação entre a vazão de água em colmos de cana-de-açúcar com EF e número de vasos funcionais mostrou-se positiva para as variedades CB41-76, CB47-355, IAC48/65 e NA56-79. Porém a variedade IAC51/205 apresentou menor número de vasos funcionais e maior vazão quando comparados com a testemunha, provavelmente justificando as afirmações de MARTIN e ROBINSON (1961) que o agente causal da EF, quando ocorre obstruções dos vasos do xilema por substâncias gomosas, pode causar a desintegração das paredes celulares do xilema, causando desvios para o fluxo de água.

Através da coloração dos vasos funcionais do xilema, foi possível comprovar de forma direta que o tratamento térmico ($50,5^{\circ}\text{C}/2\text{h}$) não controla totalmente o RS, conforme se observa na figura 7, aonde a parte central do colmo obtido de viveiro primário após tratamento térmico, apresenta-se com os vasos do xilema obstruídos, devido à presença de ataque de RS, não permitindo a passagem do corante safranina. Esta foto evidencia outra possibilidade do uso do fluxômetro para o controle de qualidade de mudas de viveiros e avaliação da sua taxa de contaminação. Não foi encontrada na literatura nenhuma descrição de metodologia capaz de efetuar este controle usando-se equipamento simples e de custo bastante reduzido.

VARIEDADE CB41-76

Figura 7 - Testemunha tratada ter
micamente a $50,5^{\circ}\text{C}$ por 2 horas
mostrando a presença do Raquitis-
mo da Soqueira na área central da
secção não colorida.

6. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho, podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1. Existe diferença entre a vazão de água em colmos de cana-de-açúcar sadias e doentes com RS e por este método é possível avaliar o nível de resistência das variedades quanto à esta doença.
2. As variedades CB47-355, IAC48/65 e IAC51/205 podem ser consideradas tolerantes e as CB41-76 e NA56-79 são consideradas suscetíveis ao RS pelo método da vazão de água em colmos de cana-de-açúcar.
3. O método de vazão de água em colmos de cana-de-açúcar possivelmente é mais preciso do que o método da produção de colmos (kg/parcela) em microparcelas, na avaliação de níveis de resistência ao RS.

4. O método de vazão de água em colmos de cana-de-açúcar não funciona para avaliação de resistência a EF.
5. O mecanismo de patogenicidade do agente causal do RS é diferente ao da Xa.
6. A EF provavelmente pode interferir no método de avaliação de resistência ao RS, pela vazão de água.
7. Através da coloração dos vasos funcionais do xilema é possível visualizar as falhas do tratamento térmico no controle do RS em viveiros.

7. LITERATURA CITADA

- ADSUAR, J. e J.H. LOPEZ-ROSA, 1962. Failure to transmit the causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane through the soil. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico, Rio Piedras, 46:87-90.
- AKIBA, F., 1978. Isolamento, inoculação e sobrevivência de *Xanthomonas albilineans* e avaliação de resistência a escaladadura das folhas em cana-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP, 97p. (Dissertação de Mestrado).
- ANTOINE, R., 1957. A histo-chemical test for diagnosing ratoon stunting disease of sugarcane. 3^{eme} Congrès de la P.I.O.S.A., Tananarive, p. 155-160.
- BAILEY, R.A., 1976a. Some observations on the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. In: Proceedings of the 50th South African Sugar Technologists' Association, Durban, p. 60-64.
- BAILEY, R.A., 1976b. Heat treatment and leaf scald. Sugarcane Pathologists' Newsletter, Aiea (17):14-16.

- BAILEY, R.A., 1977. The systemic distribution and relative occurrence of bacteria in sugarcane varieties affected by ratoon stunting disease. In: Proceedings of the 51st South African Sugar Technologists' Association, Durban, p.55-56.
- BECHET, G.R., 1976. Ratoon stunting disease and rapid diagnostic techniques. Proceedings of the 50th South African Sugar Technologists' Association, Durban, p.4. (Separata).
- CHEN, C.T.; M.J. CHEN e S.M. LEE, 1978. Studies on sugarcane ratoon stunting disease in Taiwan. I. Phase-contrast and electron microscopy of the small coryneform bacteria in the diseased sugarcane. Report of the Taiwan Sugar Research Institute, Tainan, (80):13-20.
- CHEN, C.T.; S.M. LEE e M.J. CHEN, 1975. Small coryneform bacteria in ratoon-stunted sugarcane. Sugarcane Pathologists' Newsletter, Honolulu (13/14):6-8.
- DAMANN, K.E. Jr., 1976. A possible causal organism of ratoon stunting disease. In: Proceedings of the 5th American Society of Sugar Cane Technologists', Baton Rouge, p. 53-55.
- DAMANN, K.E. Jr. e K.S. DERRICH, 1976. Bacterium associated with ratoon stunting disease in Louisiana. Sugarcane Pathologists' Newsletter, Aiea, (15/16):20-22.
- DAMANN, K.E. Jr.; K.S. DERRICH; A.G. GILLASPIE Jr.; B.F. FONTENOT e J. KAO, 1977. Detection of the RSD-associated bacterium by serologically specific electron microscopy. In: Proceedings of the 18th Congress International Society of Sugar Cane Technologists, São Paulo. p.433-437.

- DAVIS, M.J.; A.G. GILLASPIE Jr.; R.W. HARRIS e R.H. LAWSON, 1980. Ratoon stunting disease of sugarcane: isolation of the causal bacterium. Science, Washington, 210:1365-1367.
- DOUGLAS, R.A., 1981. Correlação entre vazão de água e resistência ao raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP, 57p. (Dissertação de Mestrado).
- FARRAR, L.L., 1957. A chemical test for ratoon stunting disease of sugarcane. Phytopathology, Lancaster, 47:10.
- FIFE, J.M. e I.E. STOKES, 1959. Amino acid changes identify ratoon stunting disease. Sugar y Azucar, New York, 54:27-28.
- FORBES, I.L. e K.C. LING, 1960. Particles associated with the ratoon stunting disease of sugarcane. Sugar Journal, New Orleans, 23(2):15.
- GILLASPIE Jr., A.G., 1970. Evidence that ratoon stunting disease of sugar cane is caused by virus and not micoplasma. Phytopathology, Lancaster, 60:1448-1450.
- GILLASPIE Jr., A.G., 1971. Ratoon stunting disease virus: problems in purification. In: Proceedings of the 1st American Society of Sugar Cane Technologists, Baton Rouge, p. 52-55.
- GILLASPIE Jr., A.G. 1978a. Ratoon stunting disease of sugarcane: serology. Phytopathology, Lancaster, 68:529-532.
- GILLASPIE Jr., A.G., 1978b. An antiserum to the ratoon stunting disease associated bacterium. Sugarcane Pathologists' Newsletter, Mauritius, (20):5-6.

- GILLASPIE Jr., A.G.; G. FLAX e H. KOIKE, 1976a. Relationship between numbers of diagnostic bacteria and injury by ratoon stunting disease in sugarcane. Plant Disease Reporter, Washington, 60(7):573-575.
- GILLASPIE Jr., A.G.; J.E. IRVINE e R.L. STEERE, 1966. Ratoon stunting disease virus; assay technique and partial purification. Phytopathology, Lancaster, 56:1426-1427.
- GILLASPIE Jr., A.G. e J.W. BLIZZARD, 1976. Some properties of the ratoon stunting disease agent of sugarcane. Sugarcane Pathologists' Newsletter, Aiea, (15/16):34-36.
- GILLASPIE Jr., A.G.; M.J. DAVIS; R.W. HARRIS e R.H. LAWSON, 1981. Isolation and pathogenicity of the ratoon stunting disease bacterium. International Sugar Journal, Bucks, 83(995):324-326.
- GILLASPIE, Jr., A.G.; R.E. DAVIS e J.F. WORLEY, 1973. Diagnosis of ratoon stunting disease based on the presence of a specific microorganism. Plant Disease Reporter, Washington, 57(12):987-990.
- GILLASPIE Jr., A.G.; R.E. DAVIS e J.F. WORLEY, 1975. Nature of the ratoon stunting disease agent. Sugar Journal, New Orleans, 38:7-10.
- GILLASPIE Jr., A.G.; R.E. DAVIS e J.F. WORLEY, 1976b. Nature of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. Sugarcane Pathologists' Newsletter, Aiea, (15/16): 11-15.
- GILLASPIE Jr., A.G. e R.W. HARRIS, 1978. Screening for resistance to ratoon stunting disease-injury; the enzyme-linked immunosorbent assay. Sugar y Azucar, New York, 73(6):42-43.

- GILLASPIE, Jr., A.G. e R.W. HARRIS, 1979. Limitations of ELISA for detection of the RSD-associated bacterium in sugarcane and sudangrass. Sugarcane Pathologists' Newsletter, Reduit (22):25-28.
- HARRIS, R.W. e A.G. GILLASPIE Jr., 1978. Immunofluorescent diagnosis of ratoon stunting disease. Plant Disease Reporter, Washington, 62(3):193-196.
- HUGHES, C.G., 1958. Disease investigations: ratoon stunting disease. Annual Report Queensland Bureau of Sugar Experiment Stations, Brisbane, 58:68-95.
- HUGHES, C.G., 1978. Diseases of sugarcane - a review. PANS, London, 24(2):143-159.
- HUGHES, C.G. e D.R.L. STEINDL, 1955. Ratoon stunting disease of sugarcane. Technical Communications. Queensland Bureau of Sugar Experiment Stations, Brisbane, 2:54.
- HUGHES, C.G. e D.R.L. STEINDL, 1966. Some further developments in the study of ratoon stunting disease in Queensland. In: Proceedings of the 9th Congress International Society of Sugar Cane Technologists. New Delhi, p. 1012-1022.
- IRVINE, J.E., 1975. Factors affecting the expression of juvenile symptoms of the ratoon stunting disease. In: Proceedings of the 4th American Society of Sugarcane Technologists, Baton Rouge, p. 109-113.
- KAO, J. e K.E. DAMANN Jr., 1978. Microcolonies of the bacterium associated with ratoon stunting disease found in sugarcane xylem matrix. Phytopathology, Lancaster, 68:545-551.
- KAO, J. e K.E. DAMANN Jr., 1980. In situ localization and morphology of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 58(3):310-315.

- KHURANA, S.M.P., 1972. Causal organisms of RSD. Sugarcane Pathologists' Newsletter, Durban (8):15.
- LIAO, C.H. e T.A. CHEN, 1981. Isolation, culture and pathogenicity to sudan grass of a *Corynebacterium* associated with ratoon stunting of sugarcane and with bermuda grass. Phytopathology, Saint Paul, 71:1303-1306.
- LIU, H.P., 1963. Studies on the ratoon stunting disease of sugarcane: purification of a nucleoprotein associated with diseased cane. Taiwan Sugar, Taipei, 10:9-11.
- LIU, L.J.; A. CORTES-MONLLOR; K. MARAMOROSCH; H. HIRUMI; J.E. PÉREZ e J. BIRD, 1974. Isolation of an organism resembling *Xanthomonas vasculorum* from sugarcane affected by ratoon stunting disease. In: Proceedings of the 15th Congress International Society of Sugar Cane Technologists, Durban, p. 234-240.
- LIU, L.J.; G. RAMÍREZ-OLIVEIRAS; J.L. SERAPIÓN e C.L. GONZÁLEZ-MOLINA, 1979. Further developments in the study of the ratoon stunting disease of sugarcane in Puerto Rico. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico, Rio Piedras, 63(2):146-151.
- MARAMOROSCH, K.; B. PLAVSIC-BANJAC; J. BIRD e L.J. LIU, 1973. Electron microscopy of ratoon stunted sugar cane: Microorganisms in xylem. Phytopathologische Zeitschrift, Berlin, 77:270-273.
- MARTIN, J.P. e P.E. ROBINSON, 1961. Leaf scald. In: MARTIN, J.P., E.V. ABBOTT e C.G. HUGHES, eds. Sugarcane Diseases of the World. Amsterdam, Elsevier, v.1, p. 79-107.

- MASUDA, Y., 1980. Aplicação da serologia na detecção de *Xanthomonas albilineans* em colmos de cana-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP, 111p. (Tese de Doutorado).
- MATSUOKA, S., 1971. Elephant-grass, an indicator plant for ratoon stunting virus of sugarcane. Plant Protection Bulletin-FAO, Rome, 9(5):110-115.
- MATSUOKA, S., 1972. Raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar: diagnose da moléstia e estudos sobre o seu agente causal. Piracicaba, ESALQ/USP, 77p. (Tese de Doutorado).
- MATSUOKA, S., 1976. Recuperação da produtividade de variedades de cana-de-açúcar pelo tratamento térmico de toletes. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 87(5):20-24.
- MATSUOKA, S., 1980. Microplots for screening sugarcane varieties for tolerance to ratoon stunting disease. In: Proceedings of the 17th Congress International Society of Sugar Cane Technologists, Manila, p. 1628-1638.
- PLAVSIC-BANJAC e K. MARAMOROSCH, 1972. Electron microscopy of the xylem of ratoon stunted sugarcane. Phytopathology, Lancaster, 62:498-499.
- RICAUD, C.; S. SULLIVAN e J.C. AUTREY, 1976a. Presence of the RSD-associated bacterium in Mauritius. Sugarcane Pathologists' Newsletter, Aiea, 17:37-39.
- RICAUD, C.; S. SULLIVAN e J.C. AUTREY, 1976b. Systemic infection of sugar cane by the bacterium associated with symptoms of ratoon stunting disease. Revue Agricole et Sucriere de l'Ille Mauricie, Réduit 55(1/2):159-162.

- RICHARDSON, S.R., 1978. An improved method of xylem-sap extraction using positive pressure for the rapid diagnosis of ratoon stunting disease. Sugarcane Pathologists' Newsletter, Réduit, (21):17-18.
- RISHI, H. e P. NATH, 1978. Association of the coryneform bacterium with ratoon stunting disease of sugarcane. Sugarcane Pathologists' Newsletter, Réduit, (20):9-10.
- ROTH, G. e C. WHITEHEAD, 1965. Virus disease sugarcane. The South African Sugar Journal, Durban, 49:675-683.
- SCHEXNAYDER, C.A., 1956. The effect of stunting disease of sugarcane on yields of cane and sugar in Louisiana, and the use of heat treatment for control. The Sugar Bulletin, New Orleans, 34(22):349-355.
- SCHEXNAYDER, C.A., 1959. The use of a sugarcane "test plant" as a means of detecting the presence of ratoon stunting disease in sugarcane. In: Proceedings of the 10th Congress International Society of Sugar Cane Technologists ., Honolulu, p. 1068-1072.
- SINGH, G.R., 1969. An indicator sugarcane variety for ratoon stunting disease. Current Science, Bangalore, 38(9):221-222.
- STEIB, R.J. e D.M. TANTERA, 1970. Studies to determine the effect of tetracycline antibiotic on the ratoon stunting disease (RSD) of sugarcane. The Sugar Bulletin, New Orleans, 48:217-219.
- STEIB, R.J. e I.L. FORBES, 1957. Johnson grass and corn as carriers of the virus of ratoon stunting disease of sugarcane. The Sugar Bulletin, New Orleans, 35:375.

- STEINDL, D.R.L., 1950. Ratoon stunting disease. In: Proceedings of the 7th Congress Internacional Society of Sugar Cane Technologists, Brisbane, p. 457-465.
- STEINDL, D.R.L., 1961. Ratoon stunting disease. In: MARTIN, J.P.; E.V. ABBOTT e C.G. HUGHES, eds. Sugarcane Diseases of the World. Amsterdam, Elsevier, v.1, p. 433-459.
- STEINDL, D.R.L., 1974. Ratoon stunting disease history, distribution and control. In: Proceedings of the 15th Congress International Society of Sugar Cane Technologists, Durban, p. 210-212.
- STEINDL, D.R.L., 1976. Pathology research development. New method of identifying ratoon stunting disease. The Cane Growers' Quartely Bulletin, Brisbane, 39(4):130-131.
- STEINDL, D.R.L. e C.G. HUGHES, 1953. Ratoon stunting disease. The Cane Growers' Quartely Bulletin, Brisbane, 16:79-95.
- STEINDL, D.R.L. e D.S. TEAKLE, 1974. Recent developments in the identification of ratoon stunting disease. In: Proceedings of the Queensland Society of Sugar Cane Technologists 41st Conference. Brisbane, p. 101-104.
- SUDO, S., 1980. Bactérias associadas ao raquitismo das soqueiras da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) e avaliação do capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) como indicadora. Piracicaba, ESALQ/USP, 86p. (Dissertação de Mestrado).
- TANIMOTO, T., 1964. Microtome-slide projections for histological examination of sugarcane. Hawaiian Planters' Records, Honolulu, 57:119-132.

TEAKLE, D.S., 1974. The causal agent of sugarcane ratoon stunting disease (RSD). In: Proceedings of the 15th Congress International Society of Sugar Cane Technologists, Durban, p. 225-233.

TEAKLE, D.S.; D. KONTZE e J.M. APPLETON, 1979. A note on the diagnosis of ratoon stunting disease of sugarcane by negative-stain electron microscopy of the associated bacterium. Journal of Applied Bacteriology, 46(2):279-284.

TEAKLE, D.S.; J.M. APPLETON e D.R.L. STEINDL, 1978. An anatomical basis for resistance of sugar cane to ratoon stunting disease. Physiological Plant Pathology, New York, 12:83-91.

TEAKLE, D.S.; P.M. SMITH e D.R.L. STEINDL, 1973. Association of a small coryneform bacterium with the ratoon stunting disease of sugar-cane. Australian Journal of Agricultural Research, East Melbourne, 24:869-874.

TEAKLE, D.S.; P.M. SMITH e D.R.L. STEINDL, 1975. Ratoon stunting disease of sugarcane: possible correlation of resistance with vascular anatomy. Phytopathology, Lancaster, 65:138-141.

TOKESHI, H., 1980. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F.; P.C.T. CARVALHO; E. BALMER; H. KIMATI; C.O.N. CARDOSO; C.L. SALGADO; T.L. KRUGNER; E.J.B.N. CARDOSO e A.B. FILHO, Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas, 2. ed., São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, v.2, p. 141-206.

TOKESHI, H.; A. SANGUINO e F. AKIBA, 1974. *Xanthomonas albilineans*, provável agente causal do raquitismo da soqueira e escaldadura de cana-de-açúcar. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 84(6):28-40.

- VALARINI, P.J., 1978. Avaliação da resistência ao raquitismo da soqueira pelo método da vazão de água em colmos de cana-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP, 78p. (Dissertação de Mestrado).
- VALARINI, P.J. e H. TOKESHI, 1980. Factors that interfere in evaluation of ratoon stunting disease resistance by water flow in sugarcane stalks I. In: Proceedings of the 17th Congress International Society of Sugar Cane Technologists, Manila, p. 1621-1627.
- WEAVER, L.; D.S. TEAKLE e A.C. HAYWARD, 1977. Ultrastructural studies on the bacterium associated with the ratoon stunting disease of sugarcane. Australian Journal of Agricultural Research, East Melbourne, 28:843-852.
- WISMER, C.A., 1971. A sugarcane clone apparently immune to RSD. Sugarcane Pathologists' Newsletter, Sydney, (6):46.
- WORLEY, J.F. e A.G. GILLASPIE Jr., 1975. Electron microscopy in situ of the bacterium associated with ratoon stunting disease in sudangrass. Phytopathology, Lancaster, 65:287-295.