ESCALDADURA DAS FOLHAS DA CANA-DE-AÇÚCAR:
CRESCIMENTO *in vitro* DO AGENTE CAUSAL (*Xanthomonas*
albilineans), DIAGNOSE POR PLANTA TESTE E CURA POR
TERMOTERAPIA *in vivo* E CULTURA DE
ÁPICE MERISTEMÁTICO

RENÉ DE ASSIS SORDI

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. HASIME TOKESHI

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Agosto - 1986

"Nada pode amedrontar aquele que
tem a força da reconciliação
dentro de si, o Espírito Santo
de Deus derramado no coração."

A meus pais,

HELENA E PRIMO,

A meus irmãos,

com muito amor e carinho

OFEREÇO

À TEREZINHA, GABRIEL e

MARINA

DEDICO

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos:

- . Ao orientador Prof. Dr. Hasime Tokeshi, pela valiosa orientação e amizade demonstradas no decorrer deste trabalho.
- . Ao IAA/PLANALSUCAR e Departamento de Fitopatologia-ESALQ, pela possibilidade do treinamento.
- . Aos Eng^{os} Agr^{os} Carlos A.B. Zacarias, Tseng S.G. Lee, Hiroshi Kimati, Júlio R. Neto, Antonio de Goês, Silvania H. Furlan e ao Departamento de Genética-ESALQ e Sementes Agroceres pelo fornecimento de material.
- . Aos Téc. Agríc. do IAA/PLANALSUCAR Valter A. Longo, Antonio P.M. Marchetti, Luiz C. Dizerô, Régis F. Pereira e Luiz A. Santana, à bióloga Silvana P. Meneghin e aos funcionários do Departamento de Fitopatologia-ESALQ, pela ajuda na condução dos ensaios.
- . Ao Eng^o Agr^o Norberto A. Lavorenti, pela colaboração nas análises estatísticas.
- . À Fitopatologista Marineide M. Aguilera e Bibliotecária Ana M.Z. Gheller, pela revisão dos originais.
- . Ao desenhista Hêlio O. Júnior, pela confecção das figuras.
- . Às secretárias Roseli A.C. Sampaio e Maria C. Maluli Delgado, pelos trabalhos de datilografia e versão do resumo para o Inglês.
- . Aos colegas de curso e em especial aos Eng^{os} Agr^{os} Hermann P. Hoffmann e Paulo R.R. Chagas, pela amizade e convívio.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	viii
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Importância	4
2.2. Caracterização e condições de crescimento <i>in vitro</i>	5
2.3. Sintomatologia, transmissão e diagnose	7
2.4. Controle	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Curva de crescimento <i>in vitro</i> de <i>X.albilineans</i>	21
3.2. Crescimento <i>in vitro</i> de <i>X. albilineans</i> sob diferentes regimes de temperatura e patogenicidade em milho doce	24
3.3. Reação de diferentes genótipos de milho doce a <i>X. albilineans</i>	27
3.3.1. Inoculação de cultura pura	28
3.3.2. Inoculação de caldo bruto	29
3.4. Sensibilidade do milho doce Cuba a diluições de cultura pura de <i>X. albilineans</i> em água e em W-2 líquido	30
3.5. Fatores que interferem na expressão de sintomas de escaudadura no milho doce Cuba	31
3.5.1. Idade e tamanho das plantas	31

	Página
3.5.2. Luminosidade	32
3.5.2.1. No inverno	32
3.5.2.2. No verão	34
3.5.3. Associação com outros microorganismos .	35
3.6. Uso do milho doce Cuba como planta teste	39
3.6.1. Inoculação de caldo bruto obtido de diferentes sintomas em CB41-76 e RB739331	39
3.6.2. Acompanhamento do viveiro primário de NA56-79 de 1985 da ESU/Araras	41
3.6.3. Presença de <i>X. albilineans</i> nas gotículas de gutação	42
3.7. Termoterapia <i>in vivo</i> e cultura de ápice meristemático	44
3.7.1. Clone RB739331 - Lotes I a IV	51
3.7.1.1. Lote I - tempo de exposição ..	51
3.7.1.2. Lote II - aplicação de ácido giberélico	52
3.7.1.3. Lote III - tempo de exposição e regime de iluminação	54
3.7.1.4. Lote IV - tempo de exposição, aplicação de ácido giberélico e regime de iluminação	54
3.7.2. Variedade NA56-79 - Lotes V a VII	55
3.7.2.1. Lote V - sem aplicação de ácido giberélico	56

3.7.2.2. Lote VI - com aplicação de <u>âci</u> do giberêlico	56
3.7.2.3. Lote VII - sem aplicação de ácido giberêlico	57
3.8. Determinação da cura natural no clone RB739331	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1. Curva de crescimento de <i>X. albilineans</i>	59
4.2. Crescimento <i>in vitro</i> de <i>X. albilineans</i> sob di- ferentes regimes de temperatura e patogenicida <u>a</u> de em milho doce Cuba	63
4.3. Reação de diferentes genótipos de milho doce .	78
4.4. Sensibilidade do milho doce Cuba a diluições de cultura pura em água e em meio W-2 líquido.	81
4.5. Fatores que interferem na expressão de sinto- mas em milho doce Cuba	85
4.5.1. Idade e tamanho das plantas	85
4.5.2. Luminosidade	93
4.5.3. Microorganismos associados	97
4.6. Uso do milho doce Cuba como planta-teste	101
4.6.1. Inoculação de caldo extraído de colmos com diferentes sintomas da CB41-76 e RB739331	101
4.6.2. Acompanhamento do viveiro primário de NA56-79	111
4.6.3. Levantamento dos dados de "roguing" dos	

viveiros de NA56-79 na ESU-Araras de 1978 à 1985	113
4.6.4. Presença de <i>X. albilineans</i> nas gotícu- las de gutação	117
4.7. Cura por termoterapia <i>in vivo</i> e cultura de âpi- ce meristemático	119
4.7.1. No clone RB739331	120
4.7.2. Na variedade NA56-79	136
4.8. Cura natural no clone RB739331	143
5. CONCLUSÕES	145
LITERATURA CITADA	148

RESUMO

ESCALDADURA DAS FOLHAS DA CANA-DE-AÇÚCAR: CRESCIMENTO *IN VITRO* DO AGENTE CAUSAL (*XANTHOMONAS ALBILINEANS*), DIAGNOSE POR PLANTA TESTE E CURA POR TERMOTERAPIA *IN VIVO* E CULTURA DE ÂPICE MERISTEMÁTICO

Autor: RENÉ DE ASSIS SORDI

Orientador: HASIME TOKESHI

Determinou-se a curva de crescimento *in vitro* de *Xanthomonas albilineans* em meio de Wilbrink modificado, a 28°C e no escuro; seu patamar de crescimento foi de 7,5 a $8,5 \times 10^8$ UFC/ml, o que corresponde a uma densidade ótica de 0,15 a 0,20 no comprimento de onda de 625 nm, e 132 a 144 horas de incubação; a adição de 20% de extrato de células mortas de *X. albilineans* ao meio de Wilbrink modificado, propicia diminuição do período de "lag-fase" porém o número de células viáveis passa a ser menor. Estudando-se o seu comportamento quando exposta a diferentes regimes de temperatura, verificou-se que o crescimento *in vitro* a 40°C é praticamente nulo, porém a patogenicidade é mantida por até 96 horas; a taxa de crescimento diminui mas a patogenicidade não é perdida quando se faz alternância de 28°C e 40°C e mantém-se por até 72 horas quando muda-se de 28°C para 40°C, apesar de, neste caso, o

crescimento ser paralizado.

Testando-se o milho doce Cuba como planta indicadora para a escaldadura das folhas da cana-de-açúcar, verificou-se que o mesmo acusa sintomas quando inoculado com caldo de colmos que pelo menos apresentem descoloração vascular, sendo mais fácil quando o inóculo é de variedades suscetíveis, que não apresentem infecção latente; em cultura pura, apenas algumas células bacterianas inoculadas por injeção no palmito foliar do milho doce Cuba já induzem à manifestação de escaldadura, cujos sintomas foliares são influenciados pelas condições de luminosidade e a descoloração vascular pela presença de outros microorganismos como *Fusarium moniliiforme* e *Erwinia herbicola*. O milho doce Cuba, porém, pode ser usado como planta-teste em qualquer fase de seu desenvolvimento, sendo um método prático e relativamente seguro.

O milho doce Cuba propiciou a descoberta de um possível modo natural de disseminação da bactéria, pelas gotículas de gutação, pois acusou sintomas quando inoculado com estas gotículas retiradas de folhas infectadas de cana-de-açúcar, sugerindo que a escaldadura pode se transmitir no campo sem a interferência do homem.

Testando-se a possibilidade de cura desta doença, constatou-se que termoterapia *in vivo* por até 40 dias a 40°C não foi um método eficiente. A associação de termoterapia *in vivo* e a cultura de ápices meristemáticos, propiciou altas porcentagens de cura. Porém, mesmo com aplicação de gi-

berelina para maior alongamento dos colmos, e exposição das plantas à luz contínua para aumentar a resistência, houve aparecimento de escaldadura em alguns "explants" obtidos. Já que para esta doença não existe cura natural em variedades suscetíveis e o tratamento térmico a $50,5^{\circ}\text{C}/2$ horas também não é eficaz, sugere-se que esta técnica desenvolvida no presente estudo seja uma nova opção complementar para a formação de viveiros matrizes de cana-de-açúcar com maior nível de sanidade.

SUMMARY

SUGARCANE LEAF SCALD DISEASE: GROWTH *IN VITRO* OF THE CAUSAL AGENT (*XANTHOMONAS ALBILINEANS*), DIAGNOSIS BY INDICATOR PLANT AND CURE BY THERMOTHERAPY *IN VIVO* AND MERISTEM TIP CULTURE

RENÉ DE ASSIS SORDI

Adviser: HASIME TOKESHI

The growth curve *in vitro* of *Xanthomonas albilineans* in modified Wilbrink medium was determined at 28°C and in the dark; its maximum stationary phase was reached with 7.5 to 8.5×10^8 CFU/ml, corresponding to an optic density from 0.15 to 0.20 in wave length of 625nm, and 132 to 144 hours of incubation; the addition of 20% of dead cell extract of *X. albilineans* in modified Wilbrink medium, led to a reduction of the lag-phase period. However, the number of viable cells became smaller. By studying the behavior of *X. albilineans* in different temperature conditions, it was found that its growth *in vitro* at 40°C is negligible. However, the patogenicity is maintained up to 96 hours; the growth index is reduced, but the patogenicity is not lost when alternation is accomplished from 28°C to 40°C and is maintained up to 72 hours when the temperature is changed from 28°C to 40°C, but in this case the growth is not accomplished.

By testing the Cuba sweet corn as an indicator plant for sugarcane leaf scald disease, it was verified that it shows symptoms when inoculated with stalk juice presenting vascular discolouration, but it is easier when the inoculum is from susceptible varieties, not presenting latent infection. In axenic culture, just a few bacterial cells inoculated by injection in foliar spindle of the Cuba sweet corn can cause leaf scald disease, which foliar symptoms are influenced by the conditions of luminosity and vascular discolouration by the presence of other microorganisms as *Fusarium moniliiforme* and *Erwinia herbicola*. The Cuba sweet corn can, however, be used as an indicator plant in any growth phase, as a reliable and relatively feasible method for detection of leaf scald disease.

The utilization of Cuba sweet corn led to a discovery of a possible natural method of bacterium dissemination through guttation droplets, since it shows symptoms when inoculated with droplets exuded from the infected sugarcane leaves, thus suggesting that leaf scald disease can be propagated in the field without man's interference.

By testing the possibility of curing this disease, it was found that thermotherapy *in vivo* up to 40 days at 40°C was not an efficient method. The association of thermotherapy *in vivo* and meristem tip culture led to a high percentage of cure. However, even with the application of gibberellic acid to obtain longer stalks and exposure of

the plants to a continuous light, to increase their resistance, leaf scald disease was present in some explants tested. Since there is no natural cure for this disease in susceptible varieties and hot water treatment at 50.5°C/2 hours is also not efficient, it is suggested that the method developed in this study can be a new complementary option for the formation of matrix sugarcane nurseries with a higher level of sanity.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar destaca-se atualmente no Brasil devido à grande expansão propiciada pelo advento do PROÁLCOL — Programa Nacional do Alcool. Este programa projeta o País como pioneiro no uso de fontes alternativas de energia, no caso o etanol, que substitui ou complementa o uso do petróleo, até então praticamente a única fonte de energia carburante utilizada.

Esta rápida expansão da cultura fez com que medidas fitossanitárias de importância fossem deixadas em segundo plano. Pela utilização de mudas infectadas, passou-se a presenciar uma maior ocorrência de doenças em áreas tradicionais como também em áreas de expansão, comprometendo muitas vezes a produtividade agrícola e causando preocupações quanto à ocor-

rência de surtos epidêmicos.

Dentre as principais doenças em questão, pela sua dificuldade de controle, assume destaque cada vez maior a escaldadura das folhas causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. Nas principais variedades comerciais cultivadas, a bactéria pode ocorrer endemicamente sob a forma de latência, sem mostrar sintomas, acarretando eventuais falhas na operação de "roguing" em viveiros. Sob condições adequadas a doença pode se manifestar epidemicamente, causando sérios prejuízos em canaviais comerciais. Além disso, o tratamento térmico a 50,5°C/2 horas, recomendado para o controle do raquitismo das soqueiras, mostra-se ineficiente em curar as mudas com escaldadura.

Diante disto, tornou-se necessário desenvolver metodologia que aumentasse cada vez mais a sanidade das mudas. Neste estudo foi testada a validade das técnicas de termoterapia *in vivo* associada a cultura de ápice meristemático para a cura de plantas infectadas. Viveiros matrizes isentos de *X. albilineans* a partir do material inicial curado, poderiam servir como matrizes para intercâmbio com exterior, assim como para início de programas de cruzamento e fornecimento de mudas certificadas para a formação de canaviais sadios.

Para se avaliar melhor as técnicas de cura, procurou-se desenvolver também um método diagnóstico relativamente rápido e seguro, baseado no uso de planta teste indicadora.

A fim de se obter informações básicas para a metodo

dologia de termoterapia, foi estudado o comportamento da bactéria *in vitro*, sob diferentes regimes de temperatura. Estes estudos serviram para testar a sensibilidade da planta indicadora, assim como para padronização do potencial de inóculo em inoculações feitas nos programas de melhoramento visando resistência à *X. albilineans*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância

A escaldadura das folhas da cana-de-açúcar é uma das doenças mais importantes para esta cultura, tanto pelos prejuízos causados, quanto pela sua ocorrência em praticamente todos os centros produtores do mundo (MARTIN e ROBINSON, 1961).

Em nossas condições, desde que foi constatada (ARRUDA, 1944), ganha cada vez mais importância devido principalmente à relativa susceptibilidade das principais variedades comerciais, além da ocorrência de latência, permanecendo endemicamente sem mostrar sintomas e não ser controlada pelo tratamento térmico aplicado para formação de viveiros contra o ra

quitismo das soqueiras (TOKESHI, 1980).

Existem poucos dados sobre a avaliação das perdas causadas (DANTAS, 1958) dada a ocorrência da latência e recuperação de sintomas (KOIKE, 1965; TOKESHI, 1980). Estes fenômenos estão relacionados às condições ambientais e resistência horizontal das variedades que ainda não foram perfeitamente dimensionada.

Devido a todas estas particularidades, esta doença começou a ser mais insistentemente estudada no Brasil a partir de meados da década de 70, em trabalhos de teses desenvolvidos na ESALQ (AKIBA, 1978; VALDEBENITO-SANHUEZA, 1979; MASUDA, 1980; PANIZZU, 1983) os quais trazem revisões mais detalhadas sobre certos tópicos a seguir enfocados.

2.2. Caracterização e condições de crescimento *in vitro*

A proposição do binômio *Xanthomonas albilineans* para a bactéria agente causal da escaudadura das folhas da cana-de-açúcar, foi feita por DOWSON (1943), depois de vários outros pesquisadores falharem na sua caracterização e isolamento (ARRUDA, 1944). Segundo TOKESHI (1980), quando recentemente isolada, a bactéria é de crescimento lento em meio de cultura, produzindo pequenas colônias amareladas, brilhantes, convexas e de bordos lisos. O talo bacteriano é bastonete Gram negativo, de 250-300 nm de largura por 600-1000 nm de comprimento, possuindo um único flagelo polar.

Nos primeiros estudos realizados, as dificuldades de se trabalhar com *X. albilineans* começavam com as metodologias inadequadas de isolamento. DEAN (1974) avançou em muito a metodologia quando propôs o isolamento direto das folhas com sintomas. Este método foi melhorado por AKIBA (1978) e modificado por MASUDA e TOKESHI (1978), que o denominaram de "isolamento por corrida de bactérias", consistindo em se observar, em microscópio estereoscópico, a exsudação da bactéria de pequenas secções de folhas com sintomas, para gotas de água estéril, passando-se o exsudado, com o auxílio de uma micropipeta de Pasteur, para o meio de cultura adequado.

O meio de cultura mais recomendado é o de WILBRINK (WILBRINK, 1920) modificado por vários autores (BELL e CONTREL-DORMER, 1932; PERSLEY, 1972; DEAN, 1974; AKIBA, 1978; PANIZZI, 1983). Entretanto, além de ser um meio de cultura não seletivo, nele *X. albilineans* tem uma "lag-fase" muito demorada, de 4 a 5 dias, quando nas tentativas de isolamento (DEAN, 1974; AKIBA, 1978; TOKESHI, 1980) e parece perder sua patogenicidade depois de poucas repicagens (RICAUD e PAULO, 1970).

A temperatura ótima de crescimento é 28°C (PERSLEY, 1972) podendo crescer mesmo a 37°C (BREED *et alii*, 1957). Em meio de Wilbrink líquido a 28°C, a suspensão de *X. albilineans* com 60% de transmitância no espectrofotômetro de BAUCH-LOMB a 625 nm de comprimento de onda, equivale a aproximadamente 8×10^8 células/mililitro, segundo AKIBA (1978).

2.3. Sintomatologia, transmissão e diagnose

Além da cana-de-açúcar, outras espécies de gramineas podem ser hospedeiros alternativos de *X. albilineans*. MARTIN e ROBINSON (1961) citam o milho (*Zea mays* L), bambu (*Bambusa vulgaris*) sorgo selvagem (*Sorghum verticilliflorem*), capim colonião (*Panicum maximum*) e capim elefante (*Pennisetum purpureum*). Na Austrália, PERSLEY (1973b) constatou a ocorrência natural em outras gramineas como *Brachiaria piligera*, *Imperata cylindrica* var. *major* e *Paspalum conjugatum*. Esta mesma autora preconiza o uso do milho doce como planta teste para se provar a patogenicidade da bactéria (PERSLEY, 1972). A estes vários hospedeiros alternativos, TOKESHI (1980) acrescenta *Sorghum hapelense* e erva cidreira (*Cymbopogon citratus*) como espécies passíveis de serem infectadas artificialmente.

Em cana-de-açúcar, a sintomatologia é bem detalhada por MARTIN e ROBINSON (1961) e TOKESHI (1980). Existe uma fase considerada crônica, caracterizada pelo aparecimento de estrias finas esbranquiçadas ao longo das folhas estendendo-se mesmo até às bainhas; a área esbranquiçada pode evoluir tomando uma parte maior da folha, dando sintomas tipo albinismo, semelhantes àqueles produzidos por injúria de frio e por fitotoxidez de herbicida à base de glifosate (DAL PICCOLO *et alii*, 1980); nesta fase crônica, é comum também o aparecimento de brotações laterais do colmo, da base para o ápice. Existe

uma outra fase chamada aguda, em que ocorre repentina murcha, seca e morte das plantas afetadas, não necessariamente precedida da fase crônica.

Internamente, os colmos apresentam descoloração vascular, de cor avermelhada, concentrada na região dos nós, que pode ser confundida com os sintomas de outras doenças como gomose, estrias cloróticas, podridão vermelha, raquitismo da soqueira e mesmo podridão de *Fusarium moniliforme* (NORSE, 1973; RICAUD, 1974). SUDO (1980) constatou também que *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas rubrilineans* e *P. rubrisubalbicans* induzem descoloração vascular em capim elefante e colocou a possibilidade do mesmo ocorrer em cana-de-açúcar. VALDEBENITO-SAN HUEZA (1979) estudou a relação de *X. albilineans* com *E. herbicola* e *Pseudomonas* sp, na manifestação dos sintomas de escaldadura das folhas, concluindo que estas interações podem contribuir para o caráter errático desta doença nos canaviais. Os sintomas de descoloração vascular são mais frequentes nos nós basais, sugerindo-se que neste local a concentração de bactérias seja maior (RICAUD, 1962; RICAUD e PAULO, 1970). É interessante ressaltar que os sintomas em outros hospedeiros, como milho doce por exemplo, são algo semelhantes àqueles produzidos em cana-de-açúcar.

Outro fato, já devidamente dimensionado (MASUDA *et alii*, 1983) é a falha de brotação das soqueiras devido à escaldadura das folhas. Este prejuízo normalmente não é considerado no cômputo de perdas (TOKESHI, 1980). Além disso, pode

ocorrer latência e recuperação de sintomas, fenômenos estes amplamente discutidas nas revisões de AKIBA (1978) e MASUDA (1980), dificultando a diagnose, os métodos de controle através de roguing, a determinação da resistência varietal e consequentemente a avaliação de perdas por esta doença.

A transmissão se dá preferencialmente pelo plantio de mudas infectadas e pelo instrumento de corte (MARTIN e ROBINSON, 1961). AKIBA (1978) constatou que a bactéria pode ficar viável no facão de corte por até 6 dias, podendo assim ocorrer a transmissão a longa distância.

Porém existem evidências de que existem outros agentes. HUTCHINSON e ROBERTSON (1953) constataram uma transmissão no campo por intermédio de ratos, funcionando estes como eficientes vetores. HUGHES (1968) constatou que a bactéria sobrevive pouco no solo mas conseguiu infecção quando usou solo onde havia sido cultivado anteriormente plantas doentes, sugerindo a possibilidade da transmissão pela água de lixiviação. EGAN (1970) também chamou a atenção para algum outro agente, particularmente relacionado com a parte aérea, pois esta causa desconhecida foi eficiente na disseminação da doença em um experimento de triagem de variedades em condições de campo. Na Austrália, PERSLEY (1971, 1973a, 1973b) admite a sobrevivência da bactéria no solo por poucos dias, relatando a ocorrência natural em outras gramíneas como parte do ciclo vital da bactéria; naquelas condições, a disseminação em vários casos se deu por algum agente desconhecido associado a alta

pluviosidade, ventos fortes e um vetor que depende de alta umidade; concluiu que são necessárias pesquisas sobre o efeito do ambiente na aquisição e expressão da doença, assim como dos mecanismos de disseminação, principalmente aqueles relacionados à água. Além disso, a transmissão pelas sementes ainda não foi devidamente elucidada.

Pela ocorrência de latência e tipo de sintomas apresentados, que se confundem com os de outras doenças, tem-se procurado encontrar um método de diagnóstico mais seguro.

O uso de plantas testes ou método biológico tem sido muito usado em outras culturas, principalmente para doenças causadas por vírus; em cana-de-açúcar, MATSUOKA (1972) tentou introduzir a diagnose do raquitismo da soqueira através do uso do capim elefante, porém esta espécie mostrou reagir inespecificamente também para outros organismos, como comprovado por SUDO (1980). PERSLEY (1972) preconiza o milho doce como planta teste para se provar a patogenicidade de *X. albilineans*, já que neste caso não haveria o risco da planta já estar previamente infectada, pois aparentemente não ocorre a transmissão pela semente.

Outro método usado é o serológico e/ou correlatos. LÉOVILLE e CÔLENO (1976) conseguiram detectar infecção latente através de imunofluorescência indireta, um método porém sofisticado e pouco acessível. OLIVEIRA *et alii* (1977) apresentaram a técnica de produção de antissoro específico para *X. albilineans*, porém na mesma ocasião RICAUD *et alii* (1977) demons-

traram que a reação serológica não conseguiu detectar infecção latente, perdendo em precisão para a inoculação do caldo em variedades suscetíveis, que chegaram a mostrar sintomas. RICAUD *et alii* (1978), melhoraram este teste serológico, porém introduzindo modificações pouco práticas, como alta centrifugação dos exsudados para posteriormente realizar a seroaglutinação. Usando o método de microprecipitina, MASUDA (1980) encontrou bons resultados somente quando usou extrato de vasos de xilema que apresentavam sintomas de descoloração vascular. Percebe-se, portanto, que os métodos serológicos não são tão sensíveis, e o problema de diagnose quando não há manifestação de sintomas continua sendo um ponto crítico para os trabalhos com escaldadura das folhas.

2.4. Controle

O controle de escaldadura das folhas pode ser feito basicamente pelo uso de variedades resistentes ou com resistência satisfatória. EGAN (1971b) relatou o declínio da importância desta doença na Austrália devido ao programa de melhoramento visando resistência nas novas variedades lançadas. Porém, embora se encontrem inúmeros trabalhos de triagem de variedades resistentes em todo o mundo, não existe uma padronização metodológica, principalmente no que se diz respeito à concentração do inóculo e à técnica de inoculação.

O uso de cultura pura da bactéria é recomendado

em vários trabalhos (KOIKE, 1965 e 1971; WISMER e KOIKE, 1965; EGAN, 1968 e 1971a; AKIBA, 1978; SATYANARAYANA e ACHUTARAMA, 1981; PANIZZI, 1983), sem, contudo, apresentarem a curva de crescimento típica da bactéria. MASUDA (1980) demonstrou que 8×10^2 células bacterianas/ml já são suficientes para a manifestação de sintomas na variedade NA56-79.

Existe a variante do uso de inóculo de caldo extraído de colmos com sintomas típicos da doença (RICAUD, 1962; ANTOINE, 1965; STEINDL, 1965; BRIEGER, 1970; NORSE, 1973; RYAN *et alii*, 1980; MASUDA *et alii*, 1983 e 1984; HANDOJO, 1984). Neste caso, a falta de padronização de inóculo é ainda maior, podendo sofrer influência de outros patógenos, principalmente do raquitismo das soqueiras. VALDEBENITO-SANHUEZA (1979) concluiu que o uso de caldo bruto como inóculo não é adequado para testes de resistência de variedades, devido a diversas interações, entre elas a presença ou não de outras bactérias como *E. herbicola*.

Outros trabalhos procuram associar a inoculação do caldo bruto com cultura pura da bactéria (WISMER, 1969; BISSAR, 1970; KOIKE, 1971; THOMPSON, 1982) para melhor garantia de sucesso no aparecimento de sintomas.

Em todos estes casos existem variações também na técnica de inoculação que pode ser por injeção, corte de folhas, corte de folhas com uso de capa de alumínio (KOIKE, 1965), etc. Recentemente, usando caldo bruto, MASUDA *et alii* (1983 e 1984) introduziram a técnica de inoculação precoce em

plântulas, estudando-se assim o comportamento dos diversos cruzamentos e a herança da resistência à escaldadura das folhas.

Uma alternativa de controle através da cura, foi apresentada por STEINDL (1971), com uso de tratamento térmico a 50°C/3 horas antecedido de imersão dos toletes durante 24 horas em água a temperatura natural. Porém neste caso, a porcentagem de germinação é baixa e um tanto errática, e o controle da doença, algo inconsistente. Neste mesmo trabalho, determinou-se o ponto térmico letal da bactéria que foi de 40 minutos a 50°C; AKIBA (1978), contudo, considera que este ponto letal pode variar conforme a "estirpe" ou "isolado" em questão.

Outra tentativa de controle foi apresentada por BAILEY (1976), usando tratamento térmico a 50°C e 52°C durante 2 horas, em dias consecutivos. Neste caso, houve cerca de 24 a 44% de gemas não curadas. Na mesma ocasião constatou que o tratamento com ar seco a 54°C/8 horas teve eficiência baixíssima em curar esta doença.

EGAN e STURGESS (1980) preconizam a metodologia de tratamento térmico usada por STEINDL (1971) e BAILEY, (1976), apresentando um programa de produção de mudas na Austrália, iniciados em 1976, no qual já em 1979 havia cerca de 5.000 ha da variedade Q96, onde a incidência de escaldadura das folhas não havia sido constatada. Este é o único exemplo de sucesso relatado.

Como não existe um método eficiente de cura e a

sua incidência, mesmo em viveiro tratado termicamente a 50,5°C/2 horas contra o raquitismo das soqueiras, é alta, a prática de "roguing" é recomendada como recurso adicional para a produção de mudas sadias (TOKESHI, 1980). Mesmo assim, podem ocorrer falhas no "roguing".

Vários autores obtiveram sucesso em curar plantas através das técnicas de termoterapia *in vivo* e/ou cultivo de ápice meristemático. Alguns exemplos serão apresentados a seguir, em cana-de-açúcar e outras espécies propagadas vegetativamente.

As técnicas de cultura de tecido e cultura de meristema vêm sendo desenvolvidas desde a década de 50. THONSON (1956) conseguiu livrar tubérculos de batatinha do vírus Y, combinando a cultura de meristema com a incubação do material a 38°C durante 28 dias. GOHEEN *et alii* (1956) determinaram a tolerância de plantas de moranguinho a altas temperaturas para inativação de diversas viroses. Outros trabalhos começaram a ser realizados nesta área, principalmente para obtenção de material de hortaliças isento de diversas viroses. HAMID e LOCKE (1961) conseguiram a inativação por termoterapia do vírus do enrolamento das folhas da batatinha. QUAK (1961) adicionou ao binômio termoterapia/cultura de meristema, a permanência das plantas em meios ou substratos inibidores a multiplicação dos vírus.

BAKER (1962) discutiu os detalhes técnicos envolvidos quando se expõe as plantas ou parte delas a altas tem

peraturas. FRIDLUND (1962) dimensionou uma câmara de crescimento para altas temperaturas que consistia basicamente de 4 aquecedores de 600 W e um sistema de circulação de ar que permitia uma uniformidade de temperatura dentro da câmara. STUBBS (1963) apresentou outra câmara mais sofisticada para o mesmo fim.

Este assunto cresceu de tal forma que a Sociedade de Fitopatológica Americana realizou em 1962 um "Simpósio sobre obtenção de matrizes livre de patógenos". Neste simpósio DIMOCK (1962) relatou os sucessos obtidos na cura de *Erwinia chrysanthemi* em crisântemo, de *Pseudomonas caryophylli* em cravo e de *Xanthomonas pelargonii* em gerânios, todos através da técnica de indexação de estacas obtidas livre das bactérias citadas. BAKER e PHILLIPS (1962) relataram a aplicação das técnicas de cultura de meristema em ornamentais para a obtenção de material propagativo livre dos diversos patógenos, inclusive fungos.

Através de uma ampla revisão, HOLLINGS (1965) discorreu sobre o controle de viroses através da obtenção de mudas básicas livre de vírus ou matrizes indexadas. Ele alertou para a necessidade de associação de técnicas como quimioterapia, tratamento térmico e cultura de meristema para um maior sucesso de controle; citou também que basicamente o escape se dá pela germinação e crescimento rápidos da planta, quando então o vírus não consegue acompanhar a taxa de sua multiplicação celular.

GOHEEN *et alii* (1965) conseguiram cura de viroses da videira *in vivo* através do cultivo em altas temperaturas. Outros exemplos foram conseguidos por STACE-SMITH e MELLOR (1968) em batatinha e Ten HOUTEN *et alii* (1969) em outras culturas. HOLLINGS e STONE (1968) constataram que apenas 5% dos ápices de crisântemo ficam livres de vírus pela técnica da cultura de ápice meristemático, mas se combinada com a termoterapia, a taxa de cura pode subir para 98%.

NYLAND e GOHEEN (1969) relataram que geralmente o ponto de inativação térmica *in vivo* de viroses se situa em torno de 38°C, sendo mais baixo do que a inativação térmica *in vitro* do vírus. Citando números aproximados, relataram que cerca de 1000 trabalhos já foram realizados até 1966 onde a termoterapia foi usada para a cura de doenças de plantas. Exemplificaram para a cana-de-açúcar a cura de "sereh", estrias cloróticas e raquitismo das soqueiras, através do tratamento térmico. Nesta ocasião, já existiam cerca de 100 trabalhos onde a cura de viroses fora feita *in vivo*, ou seja, dentro da própria planta, durante o seu crescimento vegetativo. Aprofundando o assunto, afirmaram ser importante o aumento gradual da temperatura e a baixa umidade para a sobrevivência do material.

MURASHIGE (1974), em um dos trabalhos básicos sobre cultura dos tecidos, apresentou os meios de cultura ou substratos mais adequados para esta técnica.

Um exemplo satisfatório de controle de bacterio

se foi obtido por LOZANO e SEQUEIRA (1974), trabalhando com mandioca e *Xanthomonas manihotis*; gemas e ramas superiores onde a bactéria ainda não havia invadido os tecidos, foram usadas num trabalho de indexação de estacas enraizadas individualmente que serviram para a formação de matrizes sadias para o plantio comercial. A efetividade do controle foi menor quando usaram cultivares severamente atacados e de extrema suscetibilidade. Neste mesmo trabalho, os autores citam o insucesso chegado por Keil e Vander Zwet em 1969 e Bauske em 1971 trabalhando com *Erwinia amylovora* em frutíferas, numa metodologia semelhante.

MOREL (1975) afirma que normalmente os ápices meristemáticos de plantas infectadas por viroses ainda permanecem sadios ou livres dos vírus, principalmente se estes não forem de parênquima.

Numa revisão sobre o uso da técnica de cultura de tecidos em fitopatologia, DE FAZIO (1976) cita o sucesso conseguido na eliminação das viroses em banana por Berg e Bustamente em 1974 e em inhame por Hartman em 1974, salientando a ampla gama de espécies vegetais em que já se usa esta técnica, inclusive a cana-de-açúcar.

SCOWCROFT (1977), em capítulo específico sobre engenharia genética visando a resistência de plantas a patógenos, afirmou que o uso de plantas jovens ou tecidos de plantas em crescimento rápido propiciam material livre de bactérias não patogênicas, pois as mesmas tendem a invadir plantas

mais velhas e tecidos dormentes.

Particularmente para plantas ornamentais estas técnicas de cultura de tecido ou meristema, indexação, etc., são muito usadas para a cura de viroses e bacterioses, apesar de serem um investimento vultoso, exigindo um alto retorno financeiro (BAKER e LINDERMAN, 1979). Similarmente ao que se faz para a produção de cravo, em muitos países o controle da podridão preta da batatinha é feito pela produção de batata semente livre de *Erwinia* spp (PÉROMBELON e KELMAN, 1980). KAISER (1980) demonstrou também a cura de 3 viroses em batatinha pela associação das técnicas de termoterapia *in vivo* (3 a 6 semanas a 37°C) com a cultura de meristema. No caso de batatinha, a recontaminação em condições de campo é função direta do emprego ou não de práticas agronômicas adequadas e o sucesso só é conseguido se a multiplicação do material matriz livre de patógenos for feita por instituições especializadas e no agro-ecossistema adequado (THURSTON, 1980).

LEBEN (1981) conseguiu controle de *Pseudomonas lachrymans* em cucurbitáceas pela exposição das sementes por três dias a 50°C e 75% de umidade relativa. Em soja, porém, este método foi altamente prejudicial para a germinação.

Folhas peciolares de begônia, livre de sintomas, têm sido usadas como "explants" para se obter e manter matrizes livres de *Xanthomonas* sp (MIKKELSEN e HASEGAWA, 1981).

As primeiras aplicações práticas destas técnicas em cana-de-açúcar começaram com ROTH (1969), que conseguiu

resultados satisfatórios na eliminação do vírus da doença estrias cloróticas, quando associou a permanência dos tecidos meristemáticos em água a 59°C durante 10 minutos, à cultura de meristema. Sem este tratamento térmico houve uma baixa sobrevivência do material e aparecimento da doença logo nas primeiras multiplicações no campo.

Estudando diferentes níveis de intensidades de luz necessárias para a diferenciação e desenvolvimento de cultura de tecidos de cana-de-açúcar, MORALES (1977) chama a atenção, de que a influência da luz não é muito estudada na fisiologia da cana-de-açúcar.

LEU (1972) mostrou ser possível a limpeza do vírus do mosaico da cana-de-açúcar através das técnicas de cultura de meristema e cultura de tecido. Nesse caso, porém, dada a característica de disseminação do mosaico via pulgões vetores, não há um sentido prático da limpeza e obtenção de plantas sadias, que poderão se infectar novamente quando colocadas no campo.

CHEN *et alii* (1979) não conseguiram sucesso para a obtenção de resistência a *Sclerospora sacchari* em "explants" submetidos ao contato direto com o fungo, diferente de outros trabalhos como *Helminthosporium sacchari* onde se faz a exposição dos "explants" somente à toxina helminthosporosideo. Neste ensaio, porém, o crescimento das hifas ficou mais concentrado na camada periférica das células parenquimáticas, do que na região meristemática, aventando a possibilidade dos genes de re-

sistência não serem expressos na técnica de cultura de tecidos.

O trabalho de LIU *et alii* (1980) traz detalhes microscópicos dos sítios de formação de "callus" no caule e folha de cana-de-açúcar, assim como delimita a região do meristema apical em cerca de 1 a 2 mm de comprimento. LIU (1981) conseguiu uma variabilidade genética grande em cultura de tecidos de várias variedades de cana-de-açúcar; porém, na parte de resistência a doenças, conseguiu uma porcentagem não convincente de "explants" resistentes a carvão (*Ustilago scitaminea*) e um aparecimento inesperado de "Sclerotic disease" em vários subclones.

VIEIRA (1983) revisando os trabalhos sobre o uso de cultura de tecidos em cana-de-açúcar, destaca o sucesso obtido nas doenças de fiji, míldio, carvão e mancha ocular, porém os vários laboratórios do mundo todo, mesmo grandes firmas comerciais, atualmente se desviam para a aplicação da multiplicação rápida da cana-de-açúcar através da cultura de meristema apical.

HENDRE *et alii* (1983) e LEE (1985) destacaram o uso desta técnica como método de propagação vegetativa, conseguindo uma taxa de multiplicação muito maior e em menos tempo do que qualquer outra metodologia. Esta multiplicação poderia ser válida para clones oriundos do melhoramento tradicional ou também para variedades comerciais livres das doenças que normalmente a atacassem.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios e casas de vegetação do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP em Piracicaba-SP e da Estação Central Sul (ESU) do IAA/PLANALSUCAR, em Araras-SP.

3.1. Curva de crescimento *in vitro* de *X. albilineans*

Isolou-se *X. albilineans* do clone de cana-de-açúcar RB739331, fornecido pela Estação Central Leste de Campos-RJ do IAA/PLANALSUCAR. Este clone já veio infectado e posteriormente foi feita inoculação de reforço por corte de folhas com tesoura embebida em caldo com uma mistura de isolados de Araras-SP, segundo metodologia descrita por AKIBA (1978).

No isolamento foi usado o método de "pipeta de Pasteur" ou "corrida de bactérias" (MASUDA e TOKESHI, 1978). A identidade da bactéria foi comprovada por serologia, conforme MASUDA (1980), usando-se antissoro fornecido pelo Prof. Hiroshi Kimati da ESALQ-USP. A conservação da bactéria, quando necessária, foi feita em tubos de cultura com meio sólido inclinado, deixados em câmara fria a 10°C.

O meio de cultura utilizado foi o de Wilbrink modificado — W-2 (AKIBA, 1978), o qual tem a seguinte composição:

<u>Componentes</u>	<u>Quantidade</u>
Neopeptona - DIFCO	5,0 g
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
Sacarose	10,0 g
Agar	18,0 g
H ₂ O destilada	1,0 l

O pH do meio foi ajustado para 6,8 com NaOH, depois de fundir-se os componentes em fogo brando. A esterelização se deu em autoclave a 1,0 ATM - 120°C/20 minutos.

Testou-se a adição ao meio W-2, de 20% de extrato de células mortas de *X. albilineans* (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1979), centrifugadas por 10 minutos a 5.000 RPM, a que chamou-se meio W-3.

Nos estudos com meio líquido foram usados tubos de cultura referência 17 (17 mm de diâmetro externo), com

9,0 ml de meio em cada tubo. Fez-se inicialmente, em cada um dos ensaios instalados, uma suspensão estoque, ou original, da bactéria, em tubos maiores, contendo de 15 a 20 ml de meio, e depois de 3 a 4 dias sob crescimento a 28°C, e no escuro, repicou-se com pipetas estéreis de 1 ml, alíquotas de 0,1 ml da suspensão bacteriana original para cada tubo. Logo após a repicagem, determinou-se a concentração da suspensão estoque através de densidade ótica em espectrofotômetro ou através da contagem direta de colônias formadas em meio sólido.

Os tubos foram mantidos em estufas a 28°C $\pm$ 1°C no escuro. O crescimento em meio líquido foi medido em densidade ótica (ou transmitância) no espectrofotômetro BAUSCH & LOMB SPECTRONIC 20 a 625 nm de comprimento de onda, segundo AKIBA (1978). Inicialmente, na "lag-fase" de crescimento fez-se as leituras da turbidez a cada 6 horas e depois de 24 em 24 horas.

O plaqueamento em meio sólido foi feito com pipetagens de 0,1 ml da suspensão bacteriana a ser determinada, na diluição 10⁻⁵, espalhando-se por toda a placa de Petri com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 28°C no escuro. As contagens do número de células viáveis ou unidades formadoras de colônias (UFC), foram feitas de 5 a 6 dias após o plaqueamento em meio sólido, quando então se tornavam visíveis a olho nu todas as colônias pequenas, de coloração amarelada brilhante.

Foram feitas 3 repetições em cada ponto de de-

terminação, ou seja, foram usados 3 tubos para cada ponto de crescimento, feitas 3 leituras na determinação da turbidez e usadas 3 placas de meio sólido para as contagens das colônias formadas em cada ponto de crescimento.

As médias das repetições foram então submetidas à regressão quadrática para a determinação das curvas de crescimento nos meios W-2 e W-3.

3.2. Crescimento *in vitro* de *X. albilineans* sob diferentes regimes de temperatura e patogenicidade em milho doce

Para os estudos de temperatura foi usado o meio W-2 líquido, em tubos de cultura 17 ou 22 (22 mm de diâmetro externo), 9 ml de meio em cada tubo, os quais foram mantidos em estufas com precisão de aproximadamente $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, no escuro. Usou-se a mesma metodologia descrita em 3.1 no preparo da suspensão original, repicagens e determinação do crescimento.

Os regimes de temperatura e características de cada ensaio estão na Tabela 1.

A patogenicidade foi testada inoculando-se por injeção 0,5 ml da suspensão bacteriana das diferentes concentrações, conforme transcorriam os ensaios, em milho doce variedade Cuba mantido em casa de vegetação, usando-se seringa hipodérmica de 1 ml (AKIBA, 1978) porém sem obliterar-se a ponta da agulha. Procurou-se fazer a inoculação, logo após determi-

Tabela 1. Caracterização dos ensaios de crescimento *in vitro* de *X. albilineans* sob diferentes regimes de temperaturas.

Ensaio nº	Diâmetro dos tubos de cultura (mm)	Concentração da suspensão original (densidade ótica)		Regimes de temperatura
1	17	0,095		20°, 28°, 35° e 40°C
2	17	0,095		28°, 40° e 42°C constantes e 28°C durante 48 hs passando-se os tubos depois para 40°C ou 42°C
3	22	0,130		28° e 40°C constantes e 28°C durante 48 ou 72 hs, passando-se os tubos depois para 40°C; usou-se também 28° e 40°C alternados 24/24 hs, iniciando-se com 28°C
4	17	0,045		28° e 40°C constantes e 28°C durante 24,72 ou 168 hs, passando-se os tubos depois para 40°C usou-se também 28°C e 40°C alternados 24/24 hs, iniciando-se com 28°C

nada a concentração da suspensão bacteriana, aproximadamente a 5 cm acima do meristema apical.

As sementes de milho doce foram previamente tratadas por imersão em benomyl na concentração de 2,5 g do i.a./100 l de água por 4-5 horas, para posterior plantio, sendo feitas ainda duas regas do mesmo fungicida durante o crescimento inicial do milho.

As plantas de milho doce foram, em número de 5 cultivadas em solo esterilizado em vasos de alumínio de 1.500 cc, e inoculadas quando tinham de 15 a 20 dias de idade. Foram inoculadas 4 plantas por vaso como repetições para cada concentração determinada da suspensão bacteriana, sendo que a testemunha consistiu de 1 planta em cada 5 plantas do vaso, na qual inoculou-se somente o W-2 líquido e também 1 vaso com 5 plantas que, igualmente, só receberam o meio de cultura.

A constatação dos sintomas externos (listras e bandas brancas nas folhas) e internos (descoloração vascular na região dos nós) de escaldadura das folhas puderam ser feitas de 15 a 20 dias após a inoculação. Preferencialmente se fez a graduação dos sintomas internos nos nós basais, cortando-se transversalmente os colmos com canivete bem afiado, seguindo-se o seguinte critério, através da estimativa visual dos vasos afetados:

- nota 1 = 0% de vasos descoloridos
- nota 2 = de 1 a 25% de vasos descoloridos
- nota 3 = de 26 a 50% de vasos descoloridos

- nota 4 = de 51 a 75% de vasos descoloridos
- nota 5 = de 76 a 100% de vasos descoloridos

Os sintomas externos foram anotados como ausentes (-) ou presentes (+).

Os sintomas internos duvidosos, principalmente quando ocorreu ataque de *Fusarium moniliforme*, foram confirmados pela tentativa de isolamento do fungo em meio de Martin (TUIE, 1969).

Fez-se sempre, no final dos ensaios, por amostragem, um reisolamento da bactéria a partir de folhas do milho com sintomas típicos, e a posterior identificação por serologia e reinoculação em milho doce, para se seguir os postulados de Koch.

As médias das 3 repetições dos dados de crescimento a diferentes temperaturas foram submetidas à regressão linear e as notas de descoloração vascular foram analisadas estatisticamente pelos testes F e Tukey, segundo a possibilidade de cada ensaio.

3.3. Reação de diferentes genótipos de milho doce à *X. albilineans*

Foram testados 4 genótipos de milho doce (Super Doce 6 e Super Doce 9 da Agrocere, cedidos pela mesma empresa e BR-400 da EMBRAPA e Doce de Cuba, cedidos pelo Departamento de Genética da ESALQ), quanto às suas reações à *X. albilineans*,

quando inoculados com cultura pura ou com caldo de plantas doentes.

Usou-se vasos de alumínio de 1.500 cc e solo esterilizado, deixando-se 5 plantas de milho doce/vaso, sendo que o cultivar Super Doce 6, por apresentar problemas de germinação, ficou com menos repetições. Fez-se o tratamento prévio das sementes em benomyl conforme já descrito anteriormente. Este ensaio foi conduzido no inverno, em casa de vegetação sem temperatura controlada.

A inoculação foi por injeção conforme descrito em 3.2, feita 35 dias após o plantio. A avaliação dos sintomas, também já descrita em 3.2, deu-se 20 dias após a inoculação.

O delineamento utilizado foi o de parcelas inteiramente casualizados com 5 repetições (5 vasos com 4 plantas inoculadas em cada um) por genótipo, sendo a testemunha uma planta em cada vaso que não foi inoculada. Os dados foram analisados estatisticamente pelos testes F e Tukey.

3.3.1. Inoculação de cultura pura

Utilizou-se o mesmo isolado de *X. albilineans* usado em 3.2 e 3.3, cultivado em W-2 líquido e inoculou-se a cultura pura quando esta apresentava aproximadamente 80% de transmitância no espectrofotômetro BAUSCH & LOMB SPECTRONIC 20 a 625 nm de comprimento de onda.

3.3.2. Inoculação de caldo bruto

O caldo bruto foi obtido do clone infectado RB739331 da seguinte forma:

- colmos de plantas com sintomas foliares e com descoloração vascular típica foram descascados superficialmente, e cortados, com canivete afiado, em secções finas transversais, na região dos nós;
- estas secções finas transversais foram depositadas em vidros de siracusa até pesarem aproximadamente 1 g;
- adicionou-se 5 ml de tampão fosfato pH 7.0 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2,8 g/l em 7 partes + KH_2PO_4 - 2,4 g/l em 3 partes) para evitar excessiva oxidação dos tecidos;
- com auxílio de um bastão de vidro ou almofariz, procedeu-se a maceração dos tecidos até perceber-se uma boa desintegração;
- adicionou-se mais 5 ml de tampão fosfato e o caldo ficou de 10 a 15 minutos em repouso;
- o inóculo foi então coado para pequenos tubos de vidro com auxílio de papel de filtro ou mesmo de papel higiênico dobrado, para se tirar as pequenas porções de tecido celular que entupiriam a ponta da agulha;
- o filtrado foi então inoculado por injeção na quantia de 0,5 ml/planta de milho doce, 5 cm acima do meristema apical (AKIBA, 1978).

É importante ressaltar que todo o material uti-

lizado foi previamente esterilizado para se proceder à obtenção deste inóculo.

3.4. Sensibilidade do milho doce Cuba a diluições de cultura pura de *X. albilineans* em água e em W-2 líquido

Verificou-se a sensibilidade do milho doce Cuba em acusar sintomas de Escaldadura quando inoculado com cultura pura diluída. As diluições foram efetuadas em água estéril ou em meio W-2 líquido, usando-se tubos de cultura 17 e pipetas estéreis de 1 ml.

As culturas puras foram cultivadas em meio W-2 líquido a 28°C no escuro e as concentrações das suspensões foram determinadas em espectrofotômetro BAUSCH & LOMB SPECTRONIC 20 a 625 nm de comprimento de onda.

Nas diluições em água estéril, foram usadas duas concentrações: 80% e 60% de transmitância que foram diluídas até 10^{-9} .

Nas diluições em W-2 líquido, usou-se três concentrações: 86%, 78% e 60% de transmitância, diluídas até 10^{-9} .

Cada uma das diluições foi imediatamente inoculada em plantas de milho doce Cuba, com aproximadamente 20 dias de idade, conforme metodologia descrita em 3.2. Foram usadas 4 plantas de milho doce como repetições para cada diluição. A testemunha constou de 1 planta das 5 plantas do vaso

na qual inoculou-se somente água estéril.

A avaliação foi feita 15 a 20 dias após as inoculações, anotando-se os sintomas foliares (+ ou -) e de descoloração vascular, conforme 3.2. As médias das avaliações foram apresentadas em histogramas para melhor visualização do ocorrido.

3.5. Fatores que interferem na expressão de sintomas de Escaldadura no milho doce Cuba

Dentre os vários fatores que podem influir na manifestação de sintomas de escaldadura, estudou-se, em milho doce Cuba, a idade e tamanho das plantas, as condições de luminosidade nas quais elas se desenvolveram e a interferência de microorganismos residentes ou inoculados, na presença e ausência de *X. albilineans*.

3.5.1. Idade e tamanho das plantas

Semeou-se o milho doce Cuba em vasos de alumínio contendo solo esterilizado em 5 diferentes datas, espaçadas de 7 a 15 dias; fez-se, antes de semeadura, um tratamento das sementes com benomyl (2,5g do i.a./100 l de H₂O) por 4-5hs; devido a não uniformidade de germinação, as 5 datas de semeadura resultaram em 7 lotes de idades diferentes.

Formados os 7 lotes, cada um deles foi subdividido em duas partes iguais, uma parte recebendo inoculação de caldo bruto extraído de RB739331, e a outra sendo inoculada com cultura pura cultivada em W-2 líquido apresentando 78% de transmitância. A inoculação de todos os lotes procedeu-se numa única data. A metodologia de extração do caldo, inoculação e determinação da concentração bacteriana foi de acordo com o descrito em 3.2.

Marcado o ponto de inoculação, mediu-se com fita métrica a altura deste até o solo em cada planta inoculada. Isto permitiu uma extratificação das plantas também pelo tamanho.

A idade das plantas variou de 20 a 80 dias, quando as mesmas já apresentavam emissão do pendão floral; o tamanho (altura medida a partir do colo até o ponto de inoculação) foi de 3 a 98 cm. Estes dois parâmetros, assim como o número de repetições usadas serão detalhados por ocasião da apresentação dos resultados.

O ensaio foi avaliado pelos sintomas internos e externos produzidos nos diferentes lotes, de acordo com os critérios apresentados em 3.2.

3.5.2. Luminosidade

3.5.2.1. No inverno

Este ensaio foi conduzido no inverno e nele procurou-se variar as condições de luminosidade nas quais foram mantidas as plantas de milho doce Cuba, depois de inoculadas com cultura pura de *X. albilineans*. A cultura pura foi obtida em meio W-2 e usada na concentração de 75% de transmitância.

As sementes foram previamente tratadas com benomyl (2,5 g do i.a./100 l. de H₂O por 4-5 horas) e depois semeadas em vasos de alumínio de 1.500 cc com solo esterilizado. Quando atingiram aproximadamente 35 dias de idade, foram inoculadas e colocadas nas seguintes condições de luminosidade:

- Tratamento A - em condições naturais no pátio da área experimental do Departamento de Fitopatologia.
- Tratamento B - em casa de vegetação.
- Tratamento C - em casa de vegetação com luz contínua (3 lâmpadas fluorescentes luz do dia de 30W e uma incandescente de 100 W).
- Tratamento D - em casa de vegetação, dentro de um compartimento de sombrite (aproximadamente retendo 50% da luminosidade).
- Tratamento E - em câmara de crescimento (fitotron) com fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro, a 22-24°C constantes.
- Tratamento F - em câmara de crescimento (Germinadora Superohm CC-300) sob luz contínua (6 lâmpadas fluorescentes de 40W e 8 incandescentes de 25W) a 22-24°C constantes.

A inoculação e avaliação foram conforme descrito em 3.2. Usou-se 5 vasos como repetições para cada tratamento, com 5 plantas por vaso no qual 1 planta não foi inoculada, servindo como testemunha. O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, sendo os dados analisados pelos testes F e Tukey.

3.5.2.2. No verão

Com os mesmos objetivos anteriores, repetiu-se o ensaio, porém desta vez no verão. As variações em relação ao ensaio anterior foram as seguintes: a cultura pura tinha 60% de transmitância; fez-se irrigação suplementar com benomyl (2,5 g do i.a./100 l de H_2O) em duas ocasiões após a germinação; a inoculação se deu com 26 dias de idade das plantas; usou-se 4 vasos/tratamento como repetições.

As plantas depois de inoculadas foram colocadas nas seguintes condições de luminosidade:

- Tratamento A - com condições naturais, no pátio.
- Tratamento B - em casa de vegetação.
- Tratamento C - em casa de vegetação dentro de um compartimento de sombrite (retendo 50% de luminosidade).
- Tratamento D - em fitotron com fotoperíodo de 12/12 hs luz/escuro a 22°C constantes.
- Tratamento E - em câmara climática, sob luz contínua e temperatura ambiente, não controlada.

A inoculação, avaliação, delineamento e testes estatísticos foram os mesmos descritos em 3.5.2.1.

3.5.3. Associação com outros microorganismos

Os sintomas de descoloração vascular produzidos em cana-de-açúcar, e mesmo em milho doce, não são devido exclusivamente à presença de *X. albilineans*, como demonstrado por SUDO (1980). Dentre outros microorganismos que invariavelmente estão presentes como habitantes naturais da cana-de-açúcar, destacam-se *Fusarium moniliforme* e *Erwinia herbicola*. *F. moniliforme* também é de ocorrência frequente em milho, dando sintomas de descoloração vascular algo semelhante àqueles produzidos por *X. albilineans*. *E. herbicola* tem sua interferência já demonstrada na Escaldadura em cana-de-açúcar (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1979) e sua associação em milho doce pode ser a mesma.

Estes ensaios foram instalados para se verificar a influência destes dois microorganismos na expressão de sintomas de Escaldadura em milho doce Cuba.

a) levantamento de fungos em sementes de milho doce

Procedeu-se o levantamento de fungos infectando sementes de milho doce Cuba de três diferentes condições de produção e armazenamento, a saber: 1) sementes produzidas na ESU-Araras, tratadas para armazenamento com thiram; 2) semen-

tes produzidas na ESU-Araras, sem tratamento químico para armazenagem; 3) sementes produzidas pela Agroceres. Este ensaio contou com a colaboração da Eng^a Agr^a Silvânia H. Furlan.

O método usado foi o do papel de filtro com congelamento ("deep-freezing method"). Utilizou-se 200 sementes de cada lote para o teste. Inicialmente elas receberam uma assepsia superficial com hipoclorito de sódio a 1% durante 3 minutos; distribuiu-se de maneira equidistante, 10 sementes em cada placa de Petri de plástico (100 mm de diâmetro e 15 mm de altura), contendo três discos de papel de filtro previamente embebidos em água destilada; as placas com sementes foram mantidas a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas sob luz próxima a ultra-violeta (NUV), em um ciclo alternado de 12 hs de luz e escuro; seguiu-se por 24 horas em temperatura de 18°C e foram novamente incubadas em NUV por mais 10 dias; fez-se a determinação e identificação dos patógenos em microscópio estereoscópico e/ou microscópio composto.

b) inoculação de vários isolados de *F. moniliforme*

Inoculou-se em milho doce Cuba, 10 isolados de *F. moniliforme* associados ou não a *X. albilineans*. A caracterização dos isolados fornecidos pelo Eng^o Agr^o Antonio de Góes da PESAGRO - Macaê-RJ, encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização de 10 isolados de *F. moniliiforme* inoculados em milho doce Cuba

Nº de catálogo	Isolado de	Data	Local
28	milho doce	25.10.82	Piracicaba
42	milho	21.09.83	Piracicaba
43	CB41-76	15.09.83	Piracicaba
46*	CB41-76	06.09.83	Sertãozinho
49*	NA56-79	21.09.83	Guariba
51	RB72454	21.09.83	Araras
55	CP51-22	15.09.83	Piracicaba
56	Co775	15.09.83	Sertãozinho
57	NA56-79	15.09.83	Piracicaba
59	NA56-79	21.09.83	Araras

* *F. moniliiforme* f.sp. *subglutinans*

Os isolados foram recuperados em tubos de cultura com 10 ml do meio glucose 1% BDA; depois de 12 dias de crescimento a 25°C no escuro, padronizou-se a concentração de inóculo em 10^6 conídios/ml (EIRA, 1972), contando-se em câmara de Neubauer os macro e microconídios, diluindo-se depois em água estéril; a suspensão foi filtrada com papel higiênico dobrado, sendo a seguir inoculada por injeção a 5 cm acima do meristema apical, conforme técnica descrita em 3.2.

A cultura pura de *X. albilineans* foi obtida em meio W-2 líquido e usada na concentração de 80% de transmitância.

A inoculação associada de *F. moniliforme* e *X. albilineans*, nas concentrações descritas, foi na proporção de 1:1, ou seja, misturou-se uma parte do inóculo do fungo mais uma parte do inóculo da bactéria, e se deu injeção, conforme item 3.2.

Foram inoculadas 4 plantas de milho doce Cuba por isolado e mais 4 plantas com cada isolado associado à bactéria. A avaliação dos sintomas de descoloração vascular foi a mesma descrita em 3.2. Fez-se também uma notação dos sintomas foliares, tanto de *F. moniliforme* (tipo "Pokkah boeng"), quanto de *X. albilineans*.

c) inoculação de *E. herbicola*

Foi fornecido pelo Instituto Biológico, através do Engº Agrº Júlio Rodrigues Neto, o isolado de *E. herbicola* IBSBF 391, recebido da PDDCC nº 1.377.

O material veio em forma liofilizada, recuperando-se o crescimento ativo em BDA, passando-se a seguir para W-2 líquido. A suspensão foi inoculada por injeção em 16 plantas de milho doce Cuba quando apresentava 50% de transmitância; fez-se também a inoculação associada com *X. albilineans* na proporção de 1:1, na mesma concentração anterior.

Acompanhou-se o desenvolvimento dos sintomas internos e externos causados nas plantas de milho doce.

3.6. Uso do milho doce Cuba com planta teste

Devido aos resultados obtidos nos itens 3.2, 3.3 e 3.4, resolveu-se testar a possibilidade do emprego do milho doce Cuba como planta teste ou indicadora para acusar a presença de *X. albilineans*, nas suas mais diferentes formas de infecção, inclusive latência.

3.6.1. Inoculação de caldo bruto obtido de diferentes sintomas em CB41-76 e RB739331

Instalou-se 2 ensaios usando-se colmos da variedade CB41-76 com as seguintes características em relação à escaldadura:

- Condição A - colmos com sintomas internos e externos fortes, bem definidos.
- Condição B - colmos somente com sintomas internos de descoloração vascular.
- Condição C - colmos sem sintomas aparentes de escaldadura, porém oriundos de parcelas inoculadas.

No ensaio 1 foram usados colmos de touceiras inoculadas obtidas no Departamento de Fitopatologia da ESALQ, sendo que para o ensaio 2, o material foi obtido junto a um

teste de reação à escaldadura da ESU-Araras. Para os dois ensaios, o inóculo foi extraído segundo metodologia descrita em 3.3.2., usando-se tampão fosfato. No ensaio 1 usou-se uma touceira para cada condição de sintomas, testando-se a diluição do caldo em tampão fosfato em 1:0, 1:10 e 1:20; no ensaio 2 usou-se três touceiras para cada condição, não diluindo-se o caldo.

Outros 3 ensaios foram instalados na ESALQ, com os mesmos objetivos anteriores, porém agora com touceiras do clone RB739331. As condições de sintomas dos colmos (A, B e C) foram idênticas às descritas para a CB41-76. A extração do caldo deu-se segundo o descrito em 3.3.2.

No ensaio 3, usou-se tampão fosfato como diluente, fazendo-se as diluições do caldo em 1:0, 1:10, 1:20 e 1:30; no ensaio 4, foram usadas outras touceiras, extraíndo-se o caldo em água destilada e diluindo-se em 1:0, 1:10, 1:20 e 1:30; já no ensaio 5, em outra ocasião, foram usados colmos das mesmas touceiras do ensaio 4, porém agora comparando-se a extração feita em água com a extração feita em tampão fosfato, nas diluições 1:0, 1:10 e 1:20; finalmente um ensaio 6 foi instalado na ESU-Araras, usando-se material de RB739331 dos estudos da Seção de Fisiologia, o qual separou-se nas condições A e B, idênticas às anteriores e também numa condição D, um material sadio que não havia recebido inoculação de escaldadura.

Em todos os seis ensaios, a metodologia da inoculação em milho doce Cuba e os critérios de avaliação dos sin

tomas produzidos, foram iguais aos descritos em 3.2. Para a análise dos resultados foi usada estatística não paramétrica, comparando-se as médias pelo teste χ^2 de Friedman, exceto para o ensaio 5, que não pode ser analisado estatisticamente.

3.6.2. Acompanhamento do viveiro primário de NA56-79 de 1985 na ESU-Araras.

A variedade NA56-79, apesar de sua reação intermediária à escaldadura, às vezes apresenta surtos epidêmicos que da mesma maneira que surgem inesperadamente nos talhões, às vezes desaparecem de um ano para o outro.

Foi realizado o levantamento dos dados de "roguing" da ESU-Araras desde 1978 até 1985, nos viveiros primários e secundários de NA56-79, do qual se discutirá posteriormente as condições das mudas desta variedade frente à escaldadura.

O viveiro primário de 1985 da ESU foi acompanhado, pedindo-se inicialmente aos roguistas que somente marcassem as touceiras encontradas com escaldadura, ao invés de arrancá-las. Foram marcadas com fita vermelha 19 touceiras com sintomas crônicos bem definidos, chamados pelos roguistas de "forte" e 15 touceiras com fitas brancas, que apresentavam somente 1 ou 2 perfilhos com risca branca longitudinal no limbo foliar, sintoma "fraco", que sempre causa dúvidas na diagnose da doença.

Foi extraído, em duas ocasiões, o caldo destas 34 touceiras, individualmente, segundo metodologia descrita em 3.3.2. O inóculo de cada touceira foi injetado em 4 plantas de milho doce Cuba com aproximadamente 30 dias de idade. A avaliação se deu 20 dias após, segundo critérios descritos em 3.2, sendo que os nós que apresentaram somente descoloração vascular, foram usados para tentativa de isolamento do agente causal em BDA e W-2.

3.6.3. Presença de *X. albilineans* nas gotículas de gutação

A transmissão de escaldadura se dá preferencialmente pelas mudas e instrumento de corte, por ocasião da multiplicação dos viveiros e safra dos talhões comerciais. Porém existem evidências de que esta não seja a única maneira, conforme já foi visto na revisão bibliográfica. Aventou-se a possibilidade das gotículas de gutação servirem como veículo transmissor de *X. albilineans*. Para tanto, instalou-se este ensaio para se verificar a presença da bactéria nas gotículas de gutação.

Plantas do clone RB739331 e da variedade NA56-79, respectivamente suscetível e intermediária à escaldadura, com sintomas típicos desta doença, foram cultivadas individualmente em sacos de polietileno pretos de 15 cm de diâmetro e 25 cm de altura, em solo esterilizado. As plantas foram

mantidas em pátio de cimento, em condições naturais, irrigando-se 1 a 2 vezes por dia.

O milho doce Cuba foi cultivado em vasos de alumínio de 1.500 cc, 4 plantas por vaso, e mantido em casa de vegetação. Tratou-se previamente as sementes em solução de benomyl (2,5 g do i.a./100 l de água por 4-5 horas) para se evitar a contaminação por *F. moniliforme*.

A partir da 3ª semana do plantio do milho doce, inoculou-se em várias ocasiões as gotículas de gutação, injetando-se 0,5 ml/planta, conforme metodologia descrita em 3.2. A coleta da gutação foi feita sempre entre 6:30 e 7:00 horas da manhã, quando o fenômeno é máximo e as gotículas ainda não caíram ou secaram sob a ação do vento e do sol; usou-se para tal coleta, seringa hipodérmicas de 1 ml esterilizadas, transferindo-se o sub-volume coletado das folhas para tubos esterilizados de 5 ml, até atingir-se o volume total desejado, inoculando-se logo a seguir. Fez-se várias coletas de várias plantas, nos dias mais propícios à ocorrência da gutação.

Além das touceiras doentes de cana-de-açúcar, usou-se também plantas de milho doce Cuba com sintomas típicos de escaldadura nas folhas, que faziam parte de outro ensaio inoculado com cultura pura de *X. albilineans*.

As testemunhas foram plantas saudas do milho doce Cuba e do clone RB739331.

A partir do 10º dia da inoculação, quando apareceram os primeiros sintomas nas plantas de milho doce inocula-

das, fez-se amostragens para isolamento do agente causal por "corrida de bactérias" (MASUDA e TOKESHI, 1978) em W-2. Usou-se a serologia de precipitação (MASUDA, 1980) para diagnose do isolado obtido, e reinoculou-se em milho doce, para cumprir os postulados de Koch.

Foram feitas também tentativas de isolamento transferindo-se diretamente as gotículas de gutação para o meio de cultura W-2 sólido, espalhando-se por toda a placa com alça de platina.

3.7. Termoterapia *in vivo* e cultura de ápice meristemático

Como parte final da metodologia, foram conduzidos estudos de tentativa de cura de escaldadura através das técnicas de termoterapia *in vivo* associadas a cultura de ápice meristemático.

Deve-se diferenciar aqui esta termoterapia *in vivo*, feita na planta toda em fase de crescimento vegetativo, daquela termoterapia, ou tratamento térmico feito nos colmos ou gemas antes do plantio, visando o controle de raquitismo da soqueira. Também se chamará de ápice meristemático a região apical de crescimento do colmo, medindo de 1 mm a 2,5 mm de comprimento, já que o termo meristema apical, apesar de muito usado, deve tecnicamente ser destinado apenas ao material que tiver de 0,2 a 0,5 mm, segundo o Engº Agrº T.S.G. LEE (informação pessoal), do laboratório de Cultura de Tecidos da Se-

ção de Fisiologia da ESU-Araras.

Foram usados o clone RB739331, cedido pela Estação Experimental Frederico de M. Veiga do IAA/PLANALSUCAR de Campos-RJ, e a variedade NA56-79 oriunda da ESU-Araras, respectivamente suscetível e intermediária a escaldadura. As plantas foram obtidas e conduzidas em várias ocasiões da seguinte forma:

- mini-toletes de 1 gema foram tratados termicamente por 2 horas a 50,5°C contra o raquitismo da soqueira e depois por imersão em benomyl (3,5 g de i.a./10 l de água por 10 minutos) sendo plantados em caixas de plástico em areia lavada e esterilizada, em casa de vegetação; 15 a 20 dias após a germinação, os brotos foram transplantados para copos plásticos ou diretamente em sacos de polietileno pretos de 25 cm de altura e 15 cm de diâmetro, em solo misto com alto teor de matéria orgânica; estabelecidas as plantas, estas foram mantidas em condições naturais em pátio cimentado, recebendo adubações periódicas e sendo irrigadas 1 a 2 vezes por dia; foram feitas 2 a 3 inoculações de escaldadura por corte de folhas com tesoura mergulhada constantemente no inóculo, segundo MASUDA *et alii* (1984); o inóculo constituiu-se de caldo bruto extraído de vários clones em fase de melhoramento na ESU-Araras; durante o período vegetativo, as plantas receberam podas sucessivas, a fim de se uniformizar o tamanho dos perfilhos, assim como a própria doença em si; permaneceram nestas condições por 5 a 6 meses sendo que antes de serem

submetidas à termoterapia, foram podadas, despalhadas e irrigadas com solução de benomyl (3,5 g de i.a./10 l de água); só foram submetidas à termoterapia as plantas que mostraram sintomas típicos de escaldadura.

Para a realização da termoterapia utilizou-se câmara climática GERMINADORA SUPEROHM CC-300 com controles automáticos de temperatura (precisão de $0,1^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo; as dimensões internas da câmara são de 0,6 m de largura x 0,6 m de comprimento x 1,25 m de altura e a intensidade luminosa de 6 lâmpadas fluorescentes de 40W e 8 lâmpadas incandescentes de 25W.

Baseados nos dimensionamentos de câmaras de crescimento e termoterapia formulados por FRIDLUND (1962) e STUBBS (1963), projetou-se e usou-se uma sala de termoterapia nos porões do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, constituindo-se basicamente de um compartimento de alvenaria, azulejado até à meia altura, de 1,6 m de largura x 2,3 m de comprimento x 2,5 m de altura no qual foram instalados, a 0,5 m do teto, 4 conjuntos com 3 lâmpadas fluorescentes luz do dia de 40W cada um, mais 2 lâmpadas incandescentes de 200W; o aquecimento se deu pela própria geração de calor dos reatores dos conjuntos fluorescentes e das lâmpadas incandescentes; a uniformidade da temperatura foi conseguida pela circulação forçada de ar por intermédio de um circulador-exaustor ARNO de 180W, 5 velocidades, posicionado rente ao piso; a porta de acesso foi crivada de furos nas partes inferior e superior pa-

ra permitir a renovação de ar; a combinação de todos estes fatores dentro da sala e a relativamente baixa variação de temperatura no ambiente do porão, permitiu que a mesma se mantivesse constante em $40^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ quando todas as lâmpadas ficavam acesas; foram ainda instalados dois "timers" para se programar os fotoperíodos, e neste caso foi acoplado um aquecedor elétrico de 1.000W da General Electric Co com termostato, que entrava em funcionamento quando as lâmpadas eram apagadas, mantendo assim a temperatura desejada.

Os saquinhos com as plantas foram colocados dentro da câmara ou sala em suportes de bandeja plástica. A umidade relativa do ar ficou em torno de 30-40%, a fim de se promover uma maior sobrevivência do material, segundo NYLAND e GOHEEN (1969). Desta maneira, foram necessárias duas irrigações diariamente.

Foram estudados os períodos de permanência das plantas em termoterapia nos diferentes lotes que se formaram, trabalhando-se preliminarmente com o clone RB739331, e depois com a variedade NA56-79. Outra linha definida de estudo foi a aplicação ou não de ácido giberélico (GA3) a fim de se promover ou não o alongamento dos internódios, inclusive na região próxima ao meristema apical, baseado nos trabalhos conduzidos por BULL (1964), GONÇALVES (1984) e LIU e LOY (1976). Para se tentar aumentar o nível de resistência das plantas frente à escaladadura, estas permaneceram em alguns lotes, sob luz contínua, segundo as evidências apontadas por BUCHANAN *et alii* (1981) e DALY

(1976).

Para a realização da cultura de ápice meristemático, seguiu-se a seguinte metodologia:

- foram retirados 4 perfilhos de cada planta, cortados no mínimo 10 cm abaixo da região meristemática;
- destes perfilhos, retirou-se as bainhas e lâminas foliares até limitar-se o material em apenas poucas folhas que ainda não haviam sido emitidas do "cartucho" foliar (palmito);
- a partir de então, trabalhando-se com mais cuidado e com auxílio de canivete bem afiado, foram feitos cortes longitudinais até se expor a região meristemática;
- fez-se novas retiradas de primórdios de bainha e lâminas foliares, a fim de se limitar a região em torno de 2 cm de comprimento e 0,6-0,7 cm de diâmetro; aparou-se os bordos dos perfilhos de maneira a torná-los com faces retas para melhor manuseio feito a seguir;
- os 4 perfilhos foram tratados em conjunto em álcool etílico 70% por um minuto;
- fez-se a submersão em hipoclorito de sódio (QBOA, 20% v/v) por 2 vezes;
- levou-se a seguir os perfilhos para condições assépticas, mergulhando-os em solução de hipoclorito de sódio (20% de QBOA em água esterilizada) por 15 minutos, dentro de uma câmara asséptica; a câmara e todo o material de seu interior já haviam sido esterilizados pela exposição à luz ultra-violeta;

- depois destes 15 minutos, os perfilhos foram lavados por 3 vezes em água destilada estéril, sô então foram manuseados para a retirada dos ápices meristemáticos, sob microscópio estereoscópico no aumento de 6 x;
- com auxílio de um estilete com agulha firme, foi-se destacando os primórdios foliares até chegar-se ao tamanho de 1,5 a 2,5 mm de ápice;
- usando-se um estilete com lâmina afiada, cortou-se o ápice e transferiu-se para os tubos de cultura de 25 mm de diâmetro com 20 ml do meio, tampando-se os tubos com plástico Magi-pack, que permite trocas gasosas.

O meio de cultura utilizado, preparado e cedido pelo laboratório de cultura de tecido da Seção de Fisiologia da ESU-Araras, do IAA/PLANALSUCAR, foi o MP-I líquido, cuja constituição encontra-se na Tabela 3.

Deve-se ressaltar que todos os instrumentos, pinças, estiletos e lâminas utilizadas foram constantemente flambados, principalmente ao se passar do manuseio de um perfilho para o outro.

Findo a extração dos ápices meristemáticos, todos os tubos foram levados para uma câmara de crescimento B10-TRONETTE MARK III da LAB-LINE INSTRUMENTS INC CAT nº 846, com temperatura de 24 a 28°C e fotoperíodo de 12 horas, equipada com 3 lâmpadas fluorescentes de 30W e 2 incandescentes de 25W.

Tabela 3. Composição do meio de cultura para ápice meristemático de cana-de-açúcar (MP-I) adaptado de Murashige, 1962 e extraído de LIU (1981)

Ingredientes	Para germinação	Para enraizamento
	MP.I (mg/l)	MP.II (mg/l)
a) Nutrientes Inorgânicos		
NH_4NO_3	1.650,0	-
KNO_3	1.900,0	2.500,0
KH_2PO_4	170,0	-
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	-	300,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440,0	200,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,0	400,0
H_3BO_3	6,2	5,0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	-
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	10,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	1,0
KI	0,83	1,0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,2
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,1
Na_2EDTA	37,3	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8
b) Vitaminas e Suplementos orgânicos		
. Myo-Inositol	100,0	1.000,0
. Tiamina HCl	1,0	5,0
. Piridoxina HCl	-	0,5
. Ácido nicotínico	-	5,0
. Caseína hidrolisada	400,0	-
. H_2O de côco	10% (v/v)	10% (v/v)
c) Regulador de crescimento		
. Kinetina	1,0	-
d) Fonte de carbono		
. Sacarose	2.000,0	2.000,0
e) Agar		
	8.000,0	8.000,0
Ajustar o pH com NaOH em	5,7	5,7

Após estarem bem enraizados, os "explants" foram novamente transplantados para sacos de polietileno pretos de 15 cm de diâmetro e 25 cm de altura, em solo misto esterilizado, e mantidos em casa de vegetação

Foi formado um total de 7 lotes a seguir descritos.

3.7.1. Clone RB739331 - Lotes I a IV

3.7.1.1. Lote I - Tempo de exposição

Avaliou-se neste lote principalmente o tempo de exposição das plantas à termoterapia. Desta maneira, constituiu-se os tratamentos:

- Tratamento A: 1 semana na câmara a 40°C - 5 plantas
- Tratamento B: 2 semanas na câmara a 40°C - 5 plantas
- Tratamento C: 3 semanas na câmara a 40°C - 5 plantas
- Tratamento D: sem termoterapia - 5 plantas
- Tratamento E: 4 semanas na câmara a 40°C - 4 plantas
- Tratamento F: 4 semanas na sala a temperaturas de 34-36°C, quando apagadas as lâmpadas e 40-42°C quando todas as lâmpadas acesas - 8 plantas (neste caso foi usado o aquecedor durante o período "noturno").

Foram extraídos 4 ápices meristemáticos de cada planta, marcando-se qual era o do perfilho primário. Além da

avaliação visual do estado das plantas no momento da extração dos ápices, estas mesmas "plantas-mãe" foram levadas novamente para o pátio em condições naturais a fim de se observar o recrudescimento ou não da escaldadura.

Fez-se as anotações das contaminações ocorridas dentro dos tubos por bactérias, fungos e leveduras, assim como da excessiva oxidação do meio e não crescimento dos ápices. Todas estas observações constarão do protocolo na parte de resultados e discussão.

Os "explants" formados e perfeitamente desenvolvidos nos sacos de polietileno, quando apresentavam no mínimo 4 a 5 internódios visíveis em pelo menos 2 perfilhos, foram depois de 6-7 meses, avaliados quanto à ocorrência de *X. albilineans*. Procedeu-se à extração do caldo de cada "explant" conforme descrito em 3.3.2 e a diagnose constou de avaliação visual de sintomas externos e internos, de tentativa de isolamento em W-2 em amostras tomadas ao acaso, assim como de inoculação em 8 plantas do milho doce Cuba, conforme o preconizado em 3.6.

3.7.1.2. - Lote II - Aplicação de Ácido Giberélico

Neste lote avaliou-se o efeito da aplicação do hormônio vegetal Ácido Giberélico (GA3), para promover maior alongamento de internódios, na tentativa de se fazer a planta

crescer mais rapidamente do que a própria colonização por *X. albilineans*.

Foi usado o produto comercial GIBERELLIN 10% da TAKENAKA S/A IND. e COM., na concentração de 100ppm (GONÇALVES, 1984). Para melhor solubilidade do princípio ativo, o produto foi dissolvido em álcool etílico, adicionando-se algumas gotas de Tween 80. A aplicação foi feita com atomizador BADGER AIR - BRUSH acoplado a uma bomba de ar PRIMAR MOD. 141, até o ponto de escorrimento do produto nas lâminas foliares e consequente deposição nas bainhas junto aos colmos; fez-se a aplicação do GA3 à noite para evitar a relativa fotodecomposição do hormônio, colocando-se as plantas a seguir na câmara de termoterapia, ou deixando-as em condições naturais, conforme o tratamento.

Foram constituídos os seguintes tratamentos, todos a 40°C na câmara:

- Tratamento GA: aplicação de GA3, com termoterapia de 15 dias a 40°C na câmara - 4 plantas
- Tratamento GB: GA3 sem termoterapia, 15 dias após fez-se a cultura de ápice meristemático - 2 plantas
- Tratamento GC: GA3 sem termoterapia, 30 dias após fez-se a cultura de ápice - 2 plantas
- Tratamento GD: sem GA3, termoterapia de 15 dias - 2 plantas
- Tratamento GE: sem GA3, termoterapia de 30 dias - 2 plantas
- Tratamento GF: sem GA3 e sem termoterapia - 4 plantas

A extração dos ápices, condução dos "explants",

anotações de contaminações, avaliações e diagnose foram conforme o descrito em 3.7.1.1., exceto em não proceder-se a tentativa de isolamento em W-2.

3.7.1.3. Lote III - Tempo de exposição e regime de iluminação

Além do tempo de permanência em termoterapia (40°C), testou-se neste lote a exposição das plantas em luz contínua, tentando-se aumentar a resistência das mesmas à doença.

Foram feitos os tratamentos:

- Tratamento A: 17 dias na câmara, fotoperíodo de 14/10 hs
luz/escuro - 6 plantas
- Tratamento B: 30 dias na câmara, fotoperíodo de 14/10 hs
luz/escuro - 6 plantas
- Tratamento C: 20 dias na sala sob luz contínua - 10 plantas
- Tratamento E: 40 dias na sala sob luz contínua - 9 plantas

As plantas que ficaram sob luz contínua receberam 2 aplicações de solução Cu + Zn ($\text{CuSO}_4 + \text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 20 ppm, devido a sintomas de deficiência a estes microelementos, que apareceram a partir de 109 dia.

A extração dos ápices, condução dos "explants", observações e diagnose foram conforme o descrito em 3.7.1.2.

3.7.1.4. Lote IV - Tempo de exposição, aplica-

ção de Ácido Giberélico e re
gime de iluminação

Repetiu-se o teste de aplicação de GA₃, porém agora fazendo-se a atomização de 100 ppm de GA₃ e somente depois de 3 dias é que as plantas foram colocadas em termoterapia a 40°C.

Constituiu-se os tratamentos:

- Tratamento CCG: aplicação de GA₃, 5 plantas na câmara por 15 dias
- Tratamento CSG: sem aplicação de GA₃, 4 plantas na câmara por 15 dias
- Tratamento SCG: aplicação de GA₃, sala sob luz contínua; 8 plantas, durante 20 dias + 8 plantas durante 30 dias
- Tratamento SSG: sem aplicação de GA₃, sala sob luz contínua; 2 plantas durante 20 dias mais 2 plantas durante 30 dias.

Fez-se a aplicação da solução 20 ppm de Cu + Zn em duas ocasiões devido aos sintomas de deficiência observados, conforme 3.7.1.3.

A extração dos ápices, condução dos "explants", observações e diagnose foram conforme o descrito em 3.7.1.2.

4.7.2. Variedade NA56-79 - Lotes V a VII

Dos resultados preliminares obtidos com o clone RB739331 escolheu-se aqueles que de uma maneira geral foram os melhores tratamentos e se passou a trabalhar com a NA56-79, portanto num nível de suscetibilidade diferente à escaldadura. Desta forma, foi usada somente a sala para a termoterapia, sob luz contínua, totalizando-se 3 lotes nestas condições. As plantas ficaram no pátio durante 3 meses até o começo da termoterapia.

3.7.2.1. Lote V - Sem aplicação de Ácido Giberélico

Plantas de NA56-79 numeradas de 1 a 20 ficaram 20 dias na sala a 40°C sob luz contínua, realizando-se a seguir a extração dos ápices meristemáticos, levando-se os tubos para o laboratório de cultura de tecidos da Seção de Fisiologia na ESU-Araras.

O restante dos materiais e métodos foram idênticos ao item 3.7.1.2.

3.7.2.2. Lote VI - Com aplicação de Ácido Giberélico

Foram usadas mais 20 plantas, numeradas de 21 a 40, nas quais fez-se uma 1ª aplicação de GA3 100 ppm deixando-as ainda no pátio sob condição natural; depois de 2 dias fez-se uma 2ª aplicação de GA3 100 ppm, permanecendo as plan-

tas por mais 12 horas em escuro total e temperatura ambiente para somente depois serem colocadas em termoterapia a 40°C durante 14 dias sob luz contínua.

Os outros parâmetros foram iguais ao descrito em 3.7.1.2, conduzidos também na ESU-Araras.

3.7.2.3. - Lote VII - Sem aplicação de Ácido Giberélico

Repetiu-se a metodologia em mais um lote de 20 plantas de NA56-79, numeradas de 41 a 60, sem a aplicação de giberelina; o tempo de permanência em termoterapia foi de 14 dias, sendo a seguir o ensaio conduzido na ESU-Araras, conforme o descrito em 3.7.1.2.

3.8. Determinação da cura natural no clone RB739331

As plantas de RB739331 infectadas por *X. albilineans* e que passaram pela termoterapia, depois que retiraram-se os ápices meristemáticos de 4 de seus perfilhos, foram reconduzidas para o pítio, a fim de se avaliar o ressurgimento ou não de sintomas da doença. Aquelas nas quais constatou-se sintomas típicos de escaldadura continuaram a se desenvolver e serviram depois para se extrair 330 mini-toletes de uma gema, de todas as partes dos colmos; os mini-toletes foram tratados com benomyl 2,5 g do i.a./10 l de água por 10 minutos e foram

plantados em caixas com areia, a fim de se avaliar qual seria a autocura (recuperação ou cura natural), da doença neste clone.

Repicou-se as plantas obtidas para saquinhos maiores com solo, e acompanhou-se a manifestação ou não de sin tomas de Escaldadura, fazendo-se descartes periódicos daqueles que manifestaram sintomas externos da doença.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Curva de crescimento de *X. albilineans*

A Figura 1 representa a curva de crescimento de *X. albilineans* em meio W-2 na temperatura de 28°C no escuro. A regressão quadrática, com um coeficiente de determinação (R^2) altamente significativo, foi feita pela média das 3 repetições em cada ponto determinado de crescimento.

O turvamento do meio líquido começou entre 12 e 18 horas após a repicagem da suspensão original com 0,095 , de densidade ótica. As colônias em meio sólido começaram a ficar visíveis a olho nú depois de 96 horas de incubação e foram contadas depois de 120 hs.

O número máximo de Unidades Formadoras de Colô-

FIGURA 1. Curva de crescimento de *X. albilineans* em W-2 a 28°C no escuro - suspensão original com 80% de Transmittância.

nia (UFC), que segundo ROTT (1984) tem igual relação com o número de células bacterianas, chegou a aproximadamente $8,5 \times 10^8$ UFC/ml e foi alcançado depois de 144 horas, na densidade ótica de 0,17. Estes números concordam com os apresentados por AKIBA (1978), numa das poucas referências sobre o assunto. Mas a UFC, pelo transcorrido durante o ensaio, não deve corresponder exatamente ao número de células bacterianas, já que plaqueando-se outras diluições (10^{-4} e 10^{-6}) encontrou-se que o número de colônias formadas decresce mais do que esperado conforme aumenta-se a diluição, demonstrando que deve existir um certo número de células agregadas necessários para se desencadear o desenvolvimento da colônia.

A Figura 2 traz novamente a curva de crescimento de *X. albilineans* a 28°C no escuro, agora comparando-se o meio W-2 com o W-3 para se verificar o possível efeito de micronutrientes, vitaminas ou hormônios necessários à rápida adaptação ao meio de cultura e consequente crescimento.

Como se esperava, o crescimento inicial em W-3 foi mais rápido e maior, pois a bactéria beneficiou-se da adição de extrato de células mortas em suspensão de W-2, que provavelmente propiciaram prontamente o suprimento de substâncias pré-formadas, para se desencadear a multiplicação de células. Neste meio W-3, o turvamento do meio líquido começou depois de 9 horas de repicada a suspensão original, a qual tinha 0,045 de densidade ótica; no meio sólido, o tempo de visualização das colônias reduziu-se para 72 horas, caracterizando, portan-

FIGURA 2. Curvas de crescimento de *X. albilineans* em W-2 e W3 a 28°C no escuro - suspensão original com 90% de Transmittância.

to, uma diminuição da fase de adaptação, ou "lag-fase", de *X. albilineans*.

Porém, o pico de UFC em W-3 ($4,3 \times 10^8$ UFC/ml) foi bem menor em relação ao alcançado em W-2 ($7,9 \times 10^8$ UFC/ml), entrando em fase de declínio, ou de morte, mais rapidamente (após 96 horas de crescimento), provavelmente pelo acúmulo de metabólitos tóxicos (PANIZZI, 1983), enquanto que em W-2 conseguiu-se um período de crescimento exponencial maior, em torno de 132 horas. Por esta razão, o uso do meio W-3 fica inviabilizado.

Na metodologia empregada, pela comparação do crescimento em W-2 nos dois ensaios (Fig. 1 e 2), verifica-se que o comportamento de *X. albilineans* foi semelhante, havendo uma pequena interferência da suspensão original empregada. Isto faz-nos supor como perfeitamente possível, uma padronização de inóculo em W-2 para inoculação em testes de reação de variedades e clones dos programas de Melhoramento, sugerindo-se que se faça esta padronização a partir de 80% de transmitância (0,095 de d.o.) até no máximo 65% de transmitância (0,185 de d.o.), pois a partir de então *X. albilineans* entra rapidamente em fase de declínio ou morte de células.

4.2. Crescimento *in vitro* de *X. albilineas* sob diferentes regimes de temperatura e patogenicidade em milho doce Cuba

A Figura 3 mostra a regressão linear dos dados de densidade ótica em relação ao tempo de crescimento, conforme os quatro regimes de temperatura. A 28°C tem-se a maior taxa de crescimento, dada pelo ângulo de inclinação da reta, a qual foi bem menor quando a bactéria cresceu a 20°C e 35°C. A 40°C a taxa foi reduzida drasticamente, ocorrendo leve turvação do meio somente a partir de 96 horas de incubação, fato este que pode ter sido provocado por alguma alteração não detectada na temperatura da estufa na qual os tubos estavam.

Vale ressaltar que a partir deste ensaio não foi feita a correlação da densidade ótica com o número de células viáveis ou UFC. Porém, certamente, nas temperaturas não adequadas a viabilidade seria menor do que o foi a 28°C, conforme BREED *et alii* (1957) e PERSLEY (1972).

b) Ensaio 2

Como o ensaio anterior evidenciou um efeito drástico de redução do crescimento *in vitro* de *X. albilineans* a 40°C, neste ensaio 2 procurou-se maior acuidade, trabalhando-se também com 42°C e verificando-se a patogenicidade da bactéria, segundo a associação de sintomas externos e internos causados em milho doce Cuba. Os sintomas externos (foliares), apesar de inconstantes (AKIBA, 1978), são de grande valia na diagnose da doença, dada às suas singularidades, ao contrário

FIGURA 3. Crescimento *in vitro* de *X. albilineans* em 4 diferentes temperaturas - regressão linear.

dos internos (descoloração vascular), os quais podem ser confundidos com aqueles causados por *F. moniliforme*, *E. herbicola* e outros patógenos.

Nota-se pela Figura 4, que não houve turvamento do meio quando os tubos foram colocados a 40°C ou 42°C (tratamentos B e C, respectivamente) e uma paralização da taxa de multiplicação da bactéria quando a mesma foi colocada a estas temperaturas, depois de estar por 48 horas a 28°C (tratamentos D e E).

Observa-se porém, que a patogenicidade da bactéria em milho doce Cuba, expressa na tabela 4, foi mantida por 96 horas quando cultivada a 40°C constantes e por 48 horas quando a 42°C, apesar de não ocorrer o turvamento do meio. Ou seja, as bactérias contidas nas alíquotas de 0,1 ml da suspensão original, colocadas para se multiplicarem nos 9,0 ml de cada tubo 17, não se multiplicaram a 40°C e 42°C a ponto de turvarem o meio líquido, mas ficaram patogênicas durante 96 e 48 horas, respectivamente. Chama-nos a atenção, portanto, a alta sensibilidade do milho doce Cuba em acusar sintomas, mesmo quando inoculado com baixas concentrações de *X. albilineans*.

A média das notas de descoloração vascular atribuídas no regime de 28°C (tratamento A), diferiu estatisticamente daquelas dos regimes de 40°C e 42°C (tratamentos B e C), apesar de ocorrer um decréscimo lento, não significativo, da patogenicidade com o passar do tempo.

Verifica-se também pela tabela 4 que, quando co

FIGURA 4. Crescimento *in vitro* de *X. albilineans* sob diferentes regimes de temperaturas em tubos de 17 mm de diâmetro.

Tabela 4. Patogenicidade de *X. albilineans* em milho doce Cuba, conforme diferentes regimes de temperatura no crescimento *in vitro* da bactéria - ensaio 2 (tubo 17).

Horas de crescimento	Regimes de temperatura						Teste-munha	Regimes de temperatura					
	28°C (A)		40°C (B)		42°C (C)			28/40°C (D)		28/42°C (E)			
	T ₂ (1)	Patogeni- cidade (2)	T ₂ (1)	Patogeni- cidade (2)	T ₂ (1)	Patogeni- cidade (2)		T ₂ (1)	Patogeni- cidade (2)	T ₂ (1)	Patogeni- cidade (2)		
6	99	4,5(+)	99	3,5(+)	100	3,8(+)	1(-)	24	0	90	4,5(+)	90	4,5(+)
12	98	3,5(+)	99	3,8(+)	100	3,8(+)	1(-)	48	0	86	3,5(+)	86	3,5(+)
24	90	4,0(+)	100	3,8(+)	99	2,8(+)	1(-)	54	6	85	4,0(+)	85	4,3(+)
48	86	4,5(+)	100	2,8(+)	99	2,8(+)	1(-)	60	12	85	3,8(+)	86	4,0(+)
72	82	3,8(+)	97	1,8(+)	98	1,0(-)	1(-)	72	24	85	3,5(+)	86	3,8(+)
96	75	3,5(+)	98	1,8(+)	97	1,0(-)	1(-)	96	48	87	4,0(+)	87	1,3(+)
120	66	3,5(+)	99	1,3(-)	100	1,0(-)	1(-)	120	72	85	3,8(+)	88	1,3(-)
144	59	3,8(+)	99	1,3(-)	100	1,0(-)	1(-)	144	96	86	2,3(+)	88	1,0(-)
168	52	3,0(+)	99	1,9(-)	99	1,0(-)	1(-)	168	120	87	2,3(-)	88	1,0(-)
192	40	3,3(+)	99	2,5(-)	99	1,0(-)	1(-)	192	144	86	1,0(-)	87	1,0(-)
Média (3)		3,7 ^{4a}		2,3 ^{6b}		1,8 ^{7b}							

(1) Transmissão (%) - média de 3 tubos de ensaio/3 leituras cada à 625 nm de comprimento de onda.

(2) Média de 4 plantas de milho doce Cuba - critério de notas de descoloração vascular: 1 = 0% descoloridos; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%. Os sinais entre parênteses correspondem a presença (+) ou ausência (-) de sintomas foliares no milho.

(3) Médias seguidas de pelo menos 1 letra igual não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade; erro padrão = 0,19;

Δ 5% = 0,69; C.V. = 22,68%

Obs: (A) (B) (C) (D) (E) são os tratamentos detalhados no texto.

locada a altas temperaturas, depois de iniciar seu crescimento a 28°C, a bactéria ainda ficou patogênica por 96 e 48 horas, respectivamente, a 40°C e 42°C (tratamentos D e E) apesar de ter paralizado seu crescimento (ver Figura 4).

Os dados dos tratamentos D e E não puderam ser analisados estatisticamente juntamente com os outros tratamentos, devido a não concordância dos períodos de crescimento.

c) Ensaio 3

Usou-se neste ensaio, tubos com 22 mm de diâmetro, que propiciam maior superfície de aeração e, conseqüentemente, maior taxa de crescimento da bactéria, em relação aos tubos com 17 mm. Procurou-se introduzir um regime de temperaturas alternadas, uma que fosse favorável e outra desfavorável ao crescimento de *X. albilineans*.

A Figura 5 representa os dados de densidade ótica em relação ao tempo de crescimento. Não se fez a regressão linear, para melhor visualização do ocorrido.

A taxa de crescimento a 28°C constantes (tratamento A) foi bem maior do que nos ensaios anteriores, devido as melhores condições de aeração deste ensaio; a 40°C (tratamento B), novamente não houve turvamento do meio.

A introdução do regime alternado de temperatura demonstrou que, apesar de haver um decréscimo da taxa de crescimento, acentuadamente durante as 24 horas em que a bactéria

FIGURA 5. Crescimento *in vitro* de *X. albilineans* sob diferentes regimes de temperatura em tubos de 22 mm de diâmetro.

ficava a 40°C, quando se voltava para 28°C havia um retorno ao crescimento normal (tratamento E). Chama a atenção o fato da bactéria continuar a crescer por algum período a 40°C, depois de ser mantida por 48 horas a 28°C (tratamento C), o mesmo não aconteceu com o tratamento D, que depois de ficar 72 horas a 28°C, paralizou o crescimento quando colocada em seguida a 40°C.

A Tabela 5 traz a patogenicidade em milho doce Cuba, conforme as diferentes etapas de observação em cada regime de temperatura. Os tratamentos C e D não puderam ser analisados estatisticamente devido a não paridade das horas de crescimento entre si e com os outros tratamentos.

Nota-se que no tratamento B, a 40°C constantes, a bactéria ficou patogênica ainda durante 72 horas, apesar de na análise estatística a média da patogenicidade deste tratamento diferir significativamente daquela obtida a 28°C (tratamento A). Corroborando os dados da Figura 5, a Tabela 5 indica que o regime de temperatura alternada (tratamento E) não influenciou na patogenicidade de *X. albilineans*. Outra evidência observada foi que a mudança de temperatura de 28°C para 40°C (tratamento C e D), não chegou a afetar muito a patogenicidade, pelo menos no período considerado, ou seja, até o término do ensaio pela exaustão do meio de cultura.

d) Ensaio 4

Repetiram-se praticamente as mesmas condições

Tabela 5. Patogenicidade de *X. albilineans* em milho doce Cuba, conforme diferentes regimes de temperatura no crescimento *in vitro* da bactéria - ensaio 3 (tubo 22).

Horas de crescimento	Regimes de temperatura						Teste-munha	Regime de Temperatura					
	28°C (A)		40°C (B)		28 a 40°C alternados (E)			48hs a 28°C/ depois 40°C (C)		72hs a 28°C/ depois 40°C (D)			
	T _g (1)	Patogeni- cidade (2)	T _g (1)	Patogeni- cidade (2)	T _g (1)	Patogeni- cidade (2)		Horas a 40°C	T _g (1)	Patogeni- cidade (2)	Horas a 40°C	T _g (1)	Patogeni- cidade (2)
6	99	2,8(+)	99	3,3(+)	99	2,8(+)	1(-)	24	0	87,0	-	0	-
12	97	3,0(+)	99	3,0(+)	97	3,0(+)	1(-)	48	0	53,0	-	0	-
24	87	3,0(+)	99	2,5(+)	87	3,0(+)	1(-)	54	6	57,0	3,0(+)	0	-
48	53	4,0(+)	96	3,0(+)	81	2,3(+)	1(-)	60	12	41,0	3,8(+)	0	-
72	22	3,3(+)	99	2,3(+)	63	2,8(+)	1(-)	72	24	34,0	2,8(+)	0	-
96	11	3,5(+)	99	1,5(-)	57	2,8(+)	1(-)	96	48	21,3	3,8(+)	24	26,0
120	7	2,3(+)	98	1,5(-)	26	3,0(+)	1(-)	120	72	21,0	2,8(+)	48	26,0
144	6	3,5(+)	99	1,0(-)	15	2,0(+)	1(-)	144	96	21,0	1,3(+)	72	24,0
168	4	3,0(+)	98	1,0(-)	10	2,5(+)	1(-)	168	120	21,0	1,3(+)	96	24,0
Média (3)	3,16a		2,12b		2,69ab								

(1) Transmissão (%) - média de 3 tubos/3 leituras cada, a 625 nm de comprimento de onda.

(2) Média de 4 plantas de milho doce - critério de notas de descoloração vascular: 1 = 0% descoloridos; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%;

5 = 76 a 100%. Os sinais entre parênteses correspondem a presença (+) ou ausência (-) de sintomas foliares no milho.

(3) Médias seguidas de pelo menos 1 letra igual não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; parâmetros do teste:

erro padrão = 0,20; Δ 5% = 0,74; C.V. % = 23,05%.

* Mudança de temperatura de 28°C para 40°C.

OBS: (A) (B) (C) (D) (E) são os tratamentos detalhados no texto.

do ensaio 3, agora usando-se novamente tubos com 17 mm de diâmetro. A Figura 6 e a Tabela 6 esboçam os resultados obtidos.

Verifica-se que o comportamento dos tratamentos A, B e F foram semelhantes aos ensaios anteriores, ou seja: a 28°C obteve-se a maior taxa de crescimento e consequentemente a patogenicidade foi maior; a 40°C não houve turvamento do meio, porém a patogenicidade se manteve por 72 horas; em regime de temperaturas alternadas, a taxa de crescimento decresceu, porém a patogenicidade foi mantida até quase o final do ensaio, não diferindo estatisticamente daquela do tratamento A.

A mudança da temperatura de 28°C para 40°C (tratamentos C, D e E), em tubos de 17 mm, apesar de não analisada estatisticamente, resulta numa paralização da multiplicação de *X. albilineans*, porém a bactéria fica patogênica ainda por um certo período, que variou conforme a fase do crescimento em que se fez a mudança de temperatura.

Compilando os dados de crescimento obtidos nestes 4 ensaios, em ocasiões distintas, e fazendo-se a regressão linear da densidade ótica em relação ao tempo de crescimento, conforme as diferentes concentrações da suspensão estoque original, obtiveram-se os dados constantes da Figura 7.

Nela percebe-se que, pela metodologia empregada, a taxa de crescimento de *X. albilineans* em meio W-2, dada pelo ângulo de inclinação da reta, é bastante influenciada pela quantidade inicial de células colocadas no meio. Isto re-

FIGURA 6. Crescimento *in vitro* de *X. albilineans* sob diferentes regimes de temperatura - repetição em tubos de 17 mm de diâmetro, com alternância de temperatura.

Tabela 6. Patogenicidade de *X. albilineans* em milho doce Cuba, conforme diferentes regimes de temperatura no crescimento *in vitro* da bactéria - ensaio 4 (tubo 17).

Horas de crescimento	Regimes de temperatura									
	28°C (A)					40°C (B)				
	28 a 40°C alternados (F)					Teste-munha				
	T ₂ (1)	Patogeni- cidade (2)	T ₂ (1)	Patogeni- cidade (2)	T ₂ (1)	Patogeni- cidade (2)	T ₂ (1)	Patogeni- cidade (2)	T ₂ (1)	Patogeni- cidade (2)
12	93	2,8(+)	98	3,3(+)	93	2,8(+)	1(-)	24	0	-
24	36	2,8(+)	99	2,8(+)	86	2,8(+)	1(-)	36	12	87
48	82	3,0(+)	98	2,3(+)	91	3,0(+)	1(-)	48	24	88
72	78	3,8(+)	98	2,3(+)	83	3,8(+)	1(-)	72	48	88
96	74	2,8(+)	99	2,3(+)	83	3,5(+)	1(-)	84	60	-
120	73	4,5(+)	98	1,0(-)	78	4,5(+)	1(-)	96	72	90
144	67	3,3(+)	99	1,0(-)	78	3,8(+)	1(-)	120	96	90
168	60	3,5(+)	98	1,0(-)	72	2,3(+)	1(-)	144	120	90
192	58	3,8(+)	99	1,0(-)	72	1,8(+)	1(-)	168	144	90
216	46	2,8(+)	99	1,0(-)	69	2,3(+)	1(-)	192	168	90
240	37	2,8(+)	98	1,0(-)	70	1,0(-)	1(-)	246	192	90
Média (3)	3,28a		1,61b		2,87a			240	216	90

(1) Transmissão (3) - média de 3 tubos de ensaio/3 leituras cada à 625 nm de comprimento de onda.

(2) Média de 4 plantas de milho doce Cuba - critério de notas de descoloração vascular: 1 = 0% descoloridos; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50; 4 = 51 a 75%;

5 = 76 a 100. Os sinais entre parênteses correspondem a presença (+) ou ausência (-) de sintomas foliares no milho.

(3) Médias seguidas de pelo menos 1 letra igual não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade; erro padrão = 0,24;

Δ 5% = 0,86; C.V. = 30,82%.

Δ mudança de temperatura de 28°C para 40°C

95%: (A) (B) (C) (D) (E) (F) são os tratamentos detalhados no texto.

FIGURA 7. Regressão linear do crescimento de *X. albilineans* em W-2 a 28°C no escuro, conforme diferentes concentrações da suspensão este que original e diâmetro dos tubos de cultura.

força a hipótese de que a UFC em meio sólido não corresponde exatamente ao número de células bacterianas, havendo que se descobrir qual seria esta constante a partir da qual desencadeia o crescimento colonial.

Na Figura 7, fica visível o efeito da maior aeração em propiciar maior taxa de crescimento, porém o mesmo não acontece em relação a patogenicidade, pelas médias obtidas a 28°C nas Tabelas 4, 5 e 6.

Outro aspecto global dos 4 ensaios foi que, as dúvidas que surgiram em relação aos sintomas de descoloração vascular, alguns constatados mesmo nas testemunhas, foram tiradas pelo isolamento de *F. moniliiforme* em meio de Martin. O reisolamento, identificação e reinoculação de *X. albilineans* em todos os ensaios serviu para se confirmar os postulados de Koch.

Todos estes resultados do comportamento de *X. albilineans* a diferentes regimes de temperatura, são particularmente interessantes e serviram de suporte para o uso de termoterapia *in vivo* como método de cura, pois demonstram que, mesmo *in vitro*, no meio de cultura que lhe é bem menos favorável do que a planta hospedeira, esta bactéria tem uma alta tolerância a temperaturas elevadas.

Ficou demonstrado que deve-se tentar fazer termoterapia *in vivo* a partir de 40°C e no mínimo por uma semana, já que a patogenicidade em meio de cultura se manteve até por 96-120 horas quando exposta a esta temperatura.

Esta alta tolerância a temperaturas elevadas explica porque o método de cura preconizado por STEINDL (1971), que consiste no tratamento térmico dos toletes a 50°C/3 horas, antecedido de uma submersão de todo o material em água a temperatura ambiente por 24 horas, propicia um controle errático e inconsistente desta doença.

Estes resultados poderiam até serem associados ao fato de que no Nordeste brasileiro a escaldadura das folhas é uma doença de importância relativa maior de que no Centro-Sul.

4.3. Reação de diferentes genótipos de milho doce

Apesar das sementes serem tratadas com benomyl, houve incidência de *F. moniliforme* devido ao período prolongado de germinação, no ensaio conduzido no Inverno e em casa de vegetação sem temperatura controlada. Esta interferência pode atrapalhar um pouco a diagnose, como foi demonstrado pelos sintomas externos e isolamento do fungo.

A reação dos 4 genótipos à inoculação de caldo bruto infectado e de cultura pura de *X. albilineans* encontra-se nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

O genótipo mais suscetível foi o Cuba, tanto na inoculação de caldo bruto, quanto de cultura pura. O Super Doce 9 também foi bem suscetível, principalmente em se tratando de sintomas foliares, mas com inoculação de cul

Tabela 7. Reação de 4 genótipos de milho doce inoculados com caldo bruto de colmos infectados por *X. albilineans*.

Genótipos	Descoloração vascular nas rep. (1)					Média (2)	% de presença de sintomas foliares
	1	2	3	4	5		
Cuba	3,75	3,75	2,75	3,75	3,00	3,40 a	75,0
Super Doce 9	2,75	2,50	3,25	3,25	3,00	2,95 a	95,0
Super Doce 6	2,75	1,50	2,25	2,00	-(3)	2,12 b	31,2
BR400	1,75	1,25	1,75	2,25	1,75	1,75 b	30,0

erro padrão = 0,18; Δ_1 5% = 0,82; Δ_2 5% = 0,77; C.V. = 16,41%

(1) cada repetição = 1 vaso com 4 plantas; critério de notas (% de vasos descoloridos): 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%.

(2) Médias seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(3) parcela perdida.

Tabela 8. Reação de 4 genótipos de milho doce inoculados com cultura pura de *X. albilineans*.

Genótipos	Descoloração vascular nas rept. (1)					Média (2)	% de presença de sintomas foliares
	1	2	3	4	5		
Cuba	3,25	4,00	3,75	4,50	4,25	3,95 a	90,0
Super Doce 9	2,00	2,25	3,00	4,75	2,75	2,95 ab	95,0
Super Doce 6	2,00	2,50	2,00	2,00	2,50	2,20 b	68,7
BR400	1,75	2,00	2,25	2,00	1,50	1,90 b	50,0

erro padrão = 0,28; Δ 5% = 1,13; C.V. = 22,68%

(1) cada repetição = 1 vaso com 4 plantas; critério de notas (% de vasos descoloridos): 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 25 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%.

(2) Médias seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

tura pura ele não chegou a diferir estatisticamente, nos dados de descoloração vascular, em relação aos genótipos Super Doce 6 e BR400.

Além disso, o Super Doce 9 já estava em estágio de florescimento o que fez os sintomas internos serem mais facilmente detectáveis nos nós superiores do colmo, já que nesta fase a translocação dos nutrientes dentro da planta é predominantemente no sentido de suprir os órgãos florais. Isto evidencia que *X. albilineans* pode ser habitante também de floema, em milho doce.

O genótipo mais resistente foi o BR400, tanto na descoloração vascular, quanto em não mostrar sintomas foliares típicos de escaldadura. Notou-se uma tendência, em todos os genótipos, do inóculo de cultura pura produzir maior descoloração vascular e mais sintomas foliares do que o inóculo de caldo bruto.

Diante destes resultados, pode-se usar somente o milho doce Cuba, como um genótipo bem suscetível e adequado para acusar a presença de *X. albilineans*.

4.4. Sensibilidade do milho doce Cuba a diluições de cultura pura em água e em meio W-2 líquido

A Figura 8 representa a patogenicidade de *X. albilineans* no milho doce Cuba inoculado com cultura pura diluída em água esterilizada. Nota-se que a expressão da doença é

FIGURA 8. Patogenicidade de *X. albilineans* em milho doce Cuba inoculado com cultura pura diluída em água, expressa em intensidade de descoloração vascular e presença (+) ou ausência (-) de sintomas foliares.

função direta do número de talos bacterianos inoculados, ou seja, a descoloração vascular decresce à medida que se dilue o inóculo. Com a concentração inicial de 82% de transmitância, conseguiu-se tanto sintomas externos como internos no milho doce somente até a diluição 10^{-6} , enquanto que com 60% de transmitância, chegou-se a resultados positivos até 10^{-7} ; baseados na curva de crescimento determinada no ítem 4.1, tem-se que estas diluições correspondem, respectivamente, a centenas (10^2) e dezenas (10^1) de UFC/ml

Na Figura 9 encontramos o resultado das diluições feitas no próprio meio W-2 líquido. Percebe-se que, também neste caso, conforme se dilui o inóculo, este fica menos patogênico. À medida que se faz diluições em suspensões bacterianas concentradas, decresce a descoloração vascular, diminuindo a intensidade de doença; assim, com 86% de transmitância, o inóculo causou doença até a diluição 10^{-5} ; já com 78% de transmitância, foi-se até a diluição 10^{-7} , na casa das dezenas, portanto; e com 60% de transmitância bastou apenas algumas unidades de células bacterianas para se conseguir sucesso no aparecimento tanto de sintomas internos como externos, pois percebe-se que mesmo na diluição 10^{-9} houve aparecimento de sintomas de descoloração vascular.

Comparando-se os histogramas da Figura 8 com os da Figura 9, percebe-se que a diluição feita em W-2 favoreceu a sensibilidade do milho doce Cuba, pois a bactéria foi inoculada com um meio ao qual já estava adaptada.

FIGURA 9. Patogenicidade de *X. albilineans* no milho doce Cuba inoculado com cultura pura diluída em W-2 líquido, expressa em intensidade de descoloração vascular e presença (+) ou ausência (-) de sintomas foliares.

Estes resultados refletem uma alta sensibilidade do milho doce Cuba e uma susceptibilidade ímpar à *X. albilineans*, já que apenas algumas células inoculadas conseguiram se multiplicar neste tecido extremamente favorável e infectaram toda a planta, a ponto de mostrar os sintomas da doença. Esta sensibilidade foi maior do que a detectada por MASUDA (1980), trabalhando com a variedade NA56-79 como planta teste.

Esta é a grande vantagem do teste biológico em relação a outros testes, como o serológico por exemplo: a planta susceptível multiplica o inóculo e tem, portanto, um sucesso maior na diagnose da doença.

Deve-se ressaltar que inoculou-se apenas 0,5 ml por planta, logo após o preparo das diluições, ou seja, antes da bactéria multiplicar-se em outras gerações, o que reforça ou duplica, a alta sensibilidade. Estima-se, pelos dados obtidos, que o milho doce Cuba foi capaz de detectar até 2 UFC/ml.

Finalmente, deve-se considerar que estes resultados foram obtidos com cultura pura, sem a interferência de outros microorganismos, que podem e devem alterar a sensibilidade do milho doce Cuba à *X. albilineans*.

4.5. Fatores que interferem na expressão de sintomas em milho doce Cuba

4.5.1. Idade e tamanho das plantas

Como este ensaio foi desenvolvido durante o In-

verno, a temperatura amena propiciou uma germinação e crescimento desuniformes das plantas. Isto fez com que fossem adotados dois critérios para se analisar a reação do milho doce Cuba, tanto inoculado com caldo bruto quanto com cultura pura: agrupou-se as plantas de acordo com a idade considerando a época da germinação, formando-se 7 lotes; o outro critério foi a altura, medida a partir do colo até o ponto de inoculação, determinada no momento em que se fez tal inoculação, separando-se inicialmente em lotes de 10 em 10 cm e depois agrupando-se em 3 lotes.

As Tabelas 9 e 10 demonstram os resultados obtidos com caldo bruto e as Tabelas 11 e 12, aqueles obtidos com cultura pura.

Nota-se pela Tabela 9, que os lotes mais novos e os mais velhos foram os que tiveram reação mais suscetível, tanto na média das notas de descoloração vascular, quanto na expressão de sintomas externos. Os grupos com idades intermediárias tiveram um comportamento mais resistente. Verifica-se que a maioria das notas concentrou-se nos valores 2 e 3, não ocorrendo nota 5.

Esta tendência de comportamento se manteve quando se analisou as plantas agrupadas de acordo com o tamanho, já que este está relacionado diretamente com a idade das plantas. Assim, pela Tabela 10, observa-se que as plantas inoculadas a uma altura menor que 10 cm e aquelas com mais de 50 cm foram mais suscetíveis, tanto na média das notas de descolora-

Tabela 9. Reação do milho doce Cuba inoculado com caldo bruto de colmos infectados por *X. albilineans*, segundo as diferentes idades das plantas no momento da inoculação.

Idade das plantas (dias)	Nº de plantas inoculadas	Descoloração vascular (1)							% de presença de sintomas externos
		Média das notas	% de notas						
			1	2	3	4	5		
80	20	3,0	5,0	15,0	55,0	25,0	0,0	85,0	
70	20	2,2	20,0	50,0	20,0	10,0	0,0	65,0	
60	12	1,9	25,0	58,3	16,7	0,0	0,0	58,3	
50	12	1,6	41,7	58,3	0,0	0,0	0,0	50,0	
40	16	2,4	0,0	56,3	47,7	0,0	0,0	75,0	
30	12	2,4	25,0	25,0	33,3	16,7	0,0	50,0	
20	16	2,3	12,5	56,3	25,0	6,3	0,0	81,2	
Total/Média	108	2,3	18,5	45,6	28,3	8,3	0,0	66,3	

(1) Critério de notas (% de descoloração vascular): 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%.

Tabela 10. Reação do milho doce Cuba inoculado com caldo bruto de colmos infectados por *X. albilineans*, segundo o tamanho das plantas no momento da inoculação.

Altura do colo até o ponto inoculação (cm)	Nº de plantas inoculadas	Descoloração vascular (1)							% de presença de sintomas externos
		Média das notas	% de notas						
			notas						
				1	2	3	4	5	
< 10	36	2,3	13,7	41,8	35,8	8,6	0,0	70,2	
10-50	35	1,9	25,8	56,0	18,2	0,0	0,0	57,4	
> 50	37	2,6	7,9	35,2	37,9	19,0	0,0	78,6	

(1) Critério de notas (% de descoloração vascular): 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%.

Tabela 11. Reação do milho doce Cuba inoculado com cultura pura de *X. albilineans*, segundo as diferentes idades das plantas no momento da inoculação

Idade das plantas (dias)	Nº de plantas inoculadas	Descoloração vascular (1)							% de presença de sintomas externos
		Média das notas	% de notas						
			1	2	3	4	5		
80	20	3,2	15,0	5,0	30,0	45,0	5,0	85,0	
70	20	2,5	15,0	40,0	30,0	15,0	0,0	80,0	
60	12	2,9	0,0	41,7	25,0	33,3	0,0	75,0	
50	11	2,6	9,1	36,4	45,5	0,0	9,1	81,8	
40	16	2,8	12,5	25,0	31,3	31,3	0,0	75,0	
30	12	3,0	25,0	16,7	16,7	16,7	25,0	58,3	
20	16	4,0	0,0	6,3	18,8	43,8	31,3	81,2	
Total/Média	107	3,0	11,0	24,5	28,2	26,5	10,1	76,6	

(1) Critério de notas (% de descoloração vascular): 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a

75%; 5 = 76 a 100%.

Tabela 12. Reação do milho doce Cuba inoculado com cultura pura de *X. albilineans*, segundo o tamanho das plantas no momento da inoculação.

Altura do colo até o ponto inoculação (cm)	Nº de plantas inoculadas	Descoloração vascular (1)					% de presença de sintomas externos	
		Média das notas	% de notas					
			1	2	3	4		5
< 10	35	3,5	10,0	15,6	16,7	35,6	22,2	70,0
10-40	34	2,6	12,3	33,1	35,8	16,5	2,3	70,8
> 40	38	2,9	12,4	19,6	35,6	30,7	1,8	84,0
Total/Média	107	3,0	11,6	22,8	29,4	27,6	8,8	74,9

(1) Critério de notas (% de descoloração vascular): 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%, 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%.

ção vascular quanto de sintomas internos.

As plantas menores, porém, foram severamente danificadas pela inoculação, aparecendo muitos sintomas tipo "Pokkah boeng", já que o caldo bruto pode conter também *F. moniliforme*.

Quando se analisa os resultados obtidos com cultura pura, verifica-se que as tendências são as mesmas do anteriormente discutido e de uma maneira geral os sintomas são mais severos do que quando inoculados com caldo bruto, para todas as idades e tamanhos.

Pelas tabelas 11 e 12 nota-se que os sintomas de descoloração vascular são mais severos em plantas mais novas e com altura de inoculação menor do que 10cm. Plantas mais velhas, com 70 e 80 dias, que já estavam na fase de florescimento quando foram inoculadas, também deram reação forte de suscetibilidade. É interessante ressaltar que para este grupo, devido ao florescimento, a bactéria não se translocou para os nós basais, infectando mais os nós superiores, nos quais a avaliação teve que ser efetuada.

Com a inoculação de cultura pura, a frequência de notas máximas de descoloração vascular (nota 5) foi maior do que com caldo bruto, principalmente nos lotes de plantas mais novas e menores. Porém, a maior frequência das notas residu nos valores 2, 3 e 4.

Na Figura 10 estão resumidos os resultados obtidos com caldo bruto e cultura pura pelo critério da altura de

FIGURA 10. Influência do tamanho das plantas de milho doce Cuba na intensidade de descoloração vascular causada por *X. albilineans*.

inoculação. Nota-se claramente, que o milho doce Cuba é mais suscetível nos estádios mais juvenis e no florescimento.

Porém, o ponto principal a ser discutido é que *X. albilineans* consegue infectar o milho doce Cuba, tanto na forma de cultura pura como de caldo de cana, em qualquer fase das plantas, sendo que os melhores resultados são obtidos quando as plantas tem de 20 a 30 dias de idade.

Pelo menos no milho doce Cuba, percebe-se claramente que a cultura pura dá reações mais severas do que o caldo bruto extraído de colmos com sintomas fortes de escaldadura. Este fato, associado à facilidade de padronização do inóculo, como visto no ítem 4.1, faz com que o uso de cultura pura em W-2 possa ser recomendado em testes de reação de variedades e clones de cana-de-açúcar frente à escaldadura.

4.5.2. Luminosidade

Os resultados da influência da luminosidade e outros fatores ambientais na expressão dos sintomas de escaldadura das folhas em milho doce Cuba, no Inverno e no Verão, encontram-se nas Tabelas 13 e 14, respectivamente.

Verifica-se que no Inverno a descoloração vascular causada por *X. albilineans* foi estatisticamente inferior quando as plantas ficaram no pátio em condições naturais em relação a todas as demais condições. No pátio, inclusive, dada a baixas temperaturas reinantes, chegou-se a presenciar um cer

Tabela 13. Influência da luminosidade na expressão de sintomas de escaudadura das folhas em milho doce Cuba. I. Inverno.

Tratamentos (1)	Descoloração vascular nas repetições (2)						% de presença de sintomas foliares
	1	2	3	4	5	Média (3)	
A	1,50	2,25	2,75	1,75	3,00	2,25 a	45,0
B	3,50	3,50	3,00	4,00	3,50	3,50 b	85,0
C	4,00	3,25	3,25	4,25	3,50	3,65 b	95,0
D	3,50	3,50	3,25	3,50	3,50	3,45 b	90,0
E	4,00	4,00	3,75	3,50	3,75	3,80 b	90,0
F	4,25	4,00	4,50	3,75	3,50	4,00 b	60,0

Erro padrão = 0,18; Δ 5% = 0,78; C.V. = 11,56%

(1) A = pátio em condições naturais; B = casa de vegetação; C = casa de vegetação com luz contínua; D = casa de vegetação com sombrite; E = fitotron 12/12 hs luz/escuro; F = câmara de crescimento com luz contínua.

(2) Cada repetição = 1 vaso com 4 plantas; critério de notas (% de vasos descoloridos): 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%.

(3) Médias seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 14. Influência da luminosidade na expressão de sintomas de escaaldadura das folhas em milho doce Cuba. II. Verão

Tratamentos ⁽¹⁾	Descoloração vascular nas repetições ⁽²⁾					% de presença de sintomas foliares
	1	2	3	4	Média ⁽³⁾	
A	2,75	2,75	1,75	1,75	2,25 abc	93,7
B	2,75	3,25	3,00	2,50	2,88 a	93,7
C	2,75	2,50	3,00	2,50	2,69 ab	100,0
D	1,75	2,00	1,75	2,00	1,88 c	93,7
E	2,25	1,50	2,00	2,00	1,94 bc	75,0

Erro padrão = 0,18; Δ 5% = 0,77; C.V. = 15,08%.

(1) A = pátio, em condições naturais; B = casa de vegetação; C = casa de vegetação com sombrite; D = fitotron 12/12 hs luz/escuro; E = câmara de crescimento com luz contínua.

(2) Cada repetição = 1 vaso com 4 plantas; critério de notas (% de vasos descoloridos): 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 25 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%.

(3) Médias seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

to avermelhamento das folhas, sintomas típicos de frio; foi nestas condições que se obteve a menor porcentagem de sintomas foliares típicos de escaldadura, sendo que quando estes ocorreram, foram bem menos intensos que nas outras condições.

As outras condições de luminosidade não chegaram a diferir estatisticamente entre si em relação à descoloração vascular, mas na câmara de crescimento sob luz contínua houve uma alta porcentagem de ausência de sintomas foliares.

Esta constatação se repetiu no ensaio instalado no Verão (Tabela 14). Nesta estação, os sintomas de descoloração das plantas mantidas no pátio em condições naturais, não diferiu estatisticamente das demais condições, apesar de manter média igual à observada no Inverno.

Como as outras condições ambientais também variaram, principalmente a temperatura, não foi possível avaliar a influência da luminosidade nos sintomas internos. Parece que a luminosidade exerce maior influência na manifestação dos sintomas externos, pois, em condições de luz contínua foi onde se obteve as menores frequências destes sintomas e em condições de luminosidade mínima (uso de sombrite) foi onde os sintomas externos melhor se expressaram, principalmente no Verão.

Estes fatos foram constatados durante a condução de outros ensaios, quando se notou que nas semanas com menor índice de luminosidade (por nebulosidade ou chuvas prolongadas), houve um aparecimento maior de sintomas foliares no clone de cana-de-açúcar RB739331 e na variedade NA56-79, inocu

lados artificialmente e mantidos no pátio em condições naturais.

Deve-se porém separar melhor os efeitos de outros fatores ambientais, principalmente a temperatura, que podem atuar interrelacionados para a expressão dos sintomas de escaldadura das folhas. Todos estes fatores podem atuar não só na própria *X. albilineans* como também em outros componentes da doença, como por exemplo, a presença de bacteriófagos, os quais já foram detectados por ROTT (1984).

4.5.3. Microorganismos associados

O levantamento de fungos infectando sementes de milho doce Cuba (Tabela 15) mostrou que as condições apropriadas de produção e armazenamento são essenciais para a produção de um lote sadio, ou com frequência baixa dos patógenos considerados, no caso *F. moniliiforme* e *Cephalosporium* sp.

Este levantamento serviu para mostrar que *F. moniliiforme* frequentemente está associado a sementes de milho doce, sendo que sua manifestação como patógeno, causando sintomas de descoloração vascular, depende do tratamento que se dá às sementes na sua produção, armazenamento e no momento do plantio. Logicamente, outros fatores também concorrem para a infecção por *F. moniliiforme*, como por exemplo a temperatura; em condições de temperaturas mais baixas, como no Inverno, onde se prolonga o período de germinação, é essencial que se faça

Tabela 15. Levantamento de fungos em sementes de milho doce Cuba, produzidas em dois locais e com diferentes condições de armazenamento.

Local/armazenamento	% de sementes infectadas		
	<i>F. moniliforme</i>	<i>Cephalosporium</i> sp	F + C
1. Produzidas na ESU armazenadas com thiram	3,0	3,5	6,5
2. Produzidas na ESU armazenadas sem tratamento	15,0	18,5	33,5
3. Produzidas na Agrocere	26,0	22,5	48,5

um tratamento fungicida pré-semeadura, para evitar-se a interferência deste fungo.

As inoculações feitas com 10 isolados de *F. moniliiforme* associados ou não a *X. albilineans* (Tabela 16), demonstraram que todos eles causam sintomas de descoloração vascular no milho doce Cuba, sintomas estes que na maioria dos casos não ficam restritos à região dos nós e se prolongam pelo colmo. Esta descoloração se acentuou pela presença de *X. albilineans*. Os sintomas foliares causados pelo fungo, tipo "Pokkah boeng", variaram conforme os isolados, mas em nenhum caso puderam ser confundidos com os sintomas foliares causados por *X. albilineans*. Isto vem amenizar a interferência que o *F. moniliiforme* possa ter quando se usa o milho doce Cuba como planta-teste para diagnose de escaldadura das folhas.

A inoculação de *E. herbicola* em milho doce Cuba resultou em não aparecimento de sintomas externos semelhantes aos de *X. albilineans*, havendo apenas uma pequena anasarca nas folhas de algumas plantas, logo após a inoculação, mas não evoluindo a seguir. Porém, *E. herbicola* causou uma descoloração vascular no milho doce Cuba, que se acentuou quando associada com *X. albilineans*.

No caso de dúvidas do sintoma interno, a solução é o isolamento do agente causal em meio W-2 sólido, pois *E. herbicola* tem um crescimento muito mais rápido e abundante, bem diferente do crescimento colonial de *X. albilineans*. Existindo as duas bactérias infectando os colmos, certamente *X. al*

Tabela 16. Reação do milho doce Cuba a vários isolados de *F. moniliiforme* inoculados conjuntamente ou não com *X. albilineans*.

Isolado nº (1)	Sintomas foliares ("Pokkah boeng") Sem <i>X.albilineans</i> (2)	Descoloração vascular (3)	
		Sem <i>X.albilineans</i>	Com <i>X.albilineans</i>
28	++	2,75	3,00
42	+++	2,75	3,25
43	+	2,00	3,50
46	+++	3,00	3,50
49	+	2,75	4,50
51	-	2,50	3,00
55	++	3,00	3,75
56	+	3,00	2,75
57	+++	3,25	4,50
59	+++	2,75	3,50
Média		2,78	3,53

(1) vide tabela 2 para caracterização dos isolados.

(2) graduação de ausentes (-) a positivo forte (+++)

(3) Média de 4 plantas; critério de notas (descoloração vascular): 1 = 0%;

2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%.

bilineans se manifestará na forma de sintomas foliares típicos.

4.6. Uso do milho doce Cuba como planta-teste

4.6.1. Inoculação de caldo extraído de colmos com diferentes sintomas da CB41-76 e RB739331

Como o milho doce Cuba acusou uma alta sensibilidade a *X. albilineans*, conforme visto nos ítems 4.3. e 4.4., testou-se a possibilidade de seu emprego como planta-teste para escaldadura das folhas, uma vez que PERSLEY (1972) já havia recomendado o seu uso para provar a patogenicidade da bactéria. Mas nesta doença existe a particularidade da ocorrência de infecção latente, onde não há manifestação de sintomas. Isto fez com que fossem usados colmos oriundos de plantas com vários tipos de sintomas, da variedade CB41-76, de comportamento intermediário à escaldadura e consequentemente que tem uma ocorrência da latência em níveis elevados, e do clone RB739331 altamente suscetível, cuja concentração de bactérias em seu interior invariavelmente chega a níveis elevados, propiciando menor ocorrência de latência.

Os resultados obtidos com a CB41-76 nos ensaios 1 e 2 encontram-se nas Tabelas 17 e 18, respectivamente. Nota-se no ensaio 1, que o inóculo dos colmos que tinham sintomas externos e internos bem definidos, propiciaram uma reação tam-

Tabela 17. Reação do milho doce Cuba inoculado com caldo extraído de colmos de CB41-76 com diferentes sintonias de escaldadura das folhas. Ensaio 1 - diluição do caldo.

Tipos de sintomas	Infecção no milho doce inoculado com as diluições (1)						Significância (2)
	1:0		1:10		1:20		
	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo	
- Externos e internos fortes	3,0	(+)	3,8	(+)	3,0	(+)	a
- Somente internos	2,0	(+)	1,3	(-)	1,3	(-)	ab
- Sem sintomas	1,0	(-)	1,0	(-)	1,0	(-)	b

Estatística do teste (χ^2) = 6,00; significância (α) = 2,8%

(1) média de 4 plantas; critério de notas (% de vasos descoloridos): 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%;

4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%.

(2) letras iguais indicam ausência de significância estatística entre os tipos de sintomas, pelo teste

χ^2 de Friedman, ao nível de significância especificado.

Tabela 18. Reação do milho doce inoculado com caldo extraído de colmos de CB41-76 com diferentes sintomas de escaldadura das folhas. Ensaio 2 - caldo bruto.

Infecção no milho doce inoculado com caldo das touceiras (1)								Média (2)
Tipos de sintomas	Touceira I		Touceira II		Touceira III		Nota	Sintoma externo
	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo		
- Externos e internos fortes	1,2	(+)	3,2	(+)	2,4	(+)	2,3a	(+)
- Somente internos	1,0	(-)	1,4	(-)	1,6	(-)	1,3ab	(-)
- Sem sintomas	1,0	(-)	1,0	(-)	1,0	(-)	1,0b	(-)
Estatística do teste (χ^2) = 5,17; significância (α) = 5,5%								

(1) Média de 5 plantas; critério de notas (% de vasos descoloridos): 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%.

(2) Letras iguais indicam ausência de significância estatística entre os tipos de sintomas, pelo teste χ^2 de Friedman, ao nível de significância especificado.

bem forte de escaldadura no milho doce Cuba, inclusive na diluição 1:20; quando o inóculo foi oriundo de colmos com sintomas internos, a reação foi mais fraca, principalmente quando diluiu-se o caldo, porém não diferindo estatisticamente da condição anterior, ocorrendo sintomas externos no milho doce Cuba somente quando este foi inoculado com caldo bruto; o inóculo de colmos sem sintomas aparentemente estavam realmente sadios, ou com uma concentração baixíssima de bactérias, não suficiente para causar sintomas no milho doce.

Estas observações se confirmaram no ensaio 2, onde usou-se 3 touceiras diferentes para cada tipo de sintoma; somente o inóculo de colmos com sintomas foliares e internos fortes, propiciou o aparecimento de sintomas externos também no milho, sendo que o inóculo de colmos só com descoloração vascular igualmente só propiciou descoloração vascular no milho.

Isto significa que a CB41-76 tem um nível de resistência tal que só mantém um potencial de inóculo moderado de *X. albilineans* no seu interior, principalmente quando não está acusando sintomas foliares.

Os resultados como clone RB739331 dos ensaios 3, 4, 5 e 6 encontram-se respectivamente nas Tabelas 19, 20, 21 e 22.

Pela Tabela 19 percebe-se que o milho doce Cuba acusou sintomas até quando inoculado com diluição de 1:30 do caldo dos 3 diferentes tipos de sintomas dos colmos, mesmo

Tabela 19. Reação do milho doce Cuba inoculado com caldo extraído de colmos de RB739331 com diferentes sintomas de escaaldadura das folhas. Ensaio 3 - diluição em tampão fosfato.

Tipos de sintomas	Infecção no milho doce inoculado com as diluições ⁽¹⁾								Significância ⁽²⁾
	1:0		1:10		1:20		1:30		
	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo	
- Externos e internos fortes	3,7	(+)	3,3	(+)	4,7	(+)	4,7	(+)	a
- Somente internos	4,0	(+)	4,0	(+)	3,0	(+)	2,7	(-)	a
- Sem sintomas	4,0	(+)	3,7	(+)	4,3	(+)	3,3	(+)	a

Estatística do teste (χ^2) = 0,12^{NS}

(1) Média de 3 plantas; critério de notas (% de vasos descoloridos): 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%.

(2) Letras iguais indicam ausência de significância estatística entre os tipos de sintomas, pelo teste χ^2 de Friedman.

Tabela 20. Reação do milho doce Cuba inoculado com caldo extraído de colmos de RB739331 com diferentes sintomas de escaldadura das folhas. Ensaio 4 - diluição em água.

Infecção no milho doce inoculado com as diluições ⁽¹⁾										Significan- cia ⁽²⁾
Tipos de sintomas	1:0		1:10		1:20		1:30		Sintoma externo	
	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo		
- Externos e internos fortes	3,7	(+)	3,0	(+)	3,0	(+)	4,0	(+)	a	
- Somente internos	3,7	(+)	3,0	(+)	2,7	(+)	1,7	(-)	ab	
- Sem sintomas	1,0	(-)	1,0	(-)	1,0	(-)	1,0	(-)	b	
Estatística do teste (χ^2) = 8,00; significância (α) = 4,2%										

(1) Média de 3 plantas; critério de notas (% de vasos descoloridos): 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%.

(2) Letras iguais indicam ausência de significância estatística entre os tipos de sintomas, pelo teste χ^2 de Friedman, ao nível de significância especificado.

Tabela 21. Reação do milho doce Cuba inoculado com caldo extraído de colmos de RB739331 com diferentes sintomas de escladadura das folhas. Ensaio 5 - comparação da diluição em tampão fosfato com a diluição em água.

Tipos de sintomas	Infecção no milho doce inoculado com as diluições em (1)											
	Água						Tampão fosfato					
	1:0		1:10		1:20		1:0		1:10		1:20	
	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo
- Externos e internos fortes	3,8	(+)	4,5	(+)	3,8	(+)	5,0	(+)	4,5	(+)	4,0	(+)
- Somente internos	1,0	(-)	1,0	(-)	1,0	(-)	1,0	(-)	1,0	(-)	1,0	(-)
- Sem sintomas	1,0	(-)	1,0	(-)	1,0	(-)	1,0	(-)	1,0	(-)	1,0	(-)

(1) Média de 4 plantas; critério de notas (% de vasos descoloridos): 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%.

Tabela 22. Reação do milho doce Cuba inoculado com caldo extraído de colmos de RB739331. Ensaio 6 - Material da Seção de Fisiologia da ESU-Araras.

Tipos de sintomas	Infecção no milho doce nas repetições (1)										Significância (2)		
	1		2		3		4		5				
	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo	Nota	Sintoma externo			
- externos e internos fortes	2	(+)	2	(+)	2	(-)	2	(+)	4	(+)	2,4	(+)	a
- somente internos	2	(+)	3	(+)	3	(+)	4	(+)	2	(-)	2,8	(+)	a
- sem sintomas (planta não inoculada)	1	(-)	1	(-)	1	(-)	1	(-)	1	(-)	1,0	(-)	b

Estatística do teste (χ^2) = 6,59; significância (α) = 3,9%

(1) cada repetição = 1 planta; critério de notas (% de vasos descoloridos): 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%.

(2) letras iguais indicam ausência de significância estatística entre os tipos de sintomas, pelo teste χ^2 de Friedman, ao nível de significância especificado.

aquele que não tinha aparentemente infecção por *X.albilineans*; não houve diferença estatística pelo teste X^2 entre as diversas fontes de inóculo, mostrando que o milho doce Cuba serviu para detectar a infecção latente na touceira sem sintoma, inclusive no caldo mais diluído.

Na Tabela 20, quando usou-se água para extrair o inóculo, notou-se a mesma tendência observada anteriormente para a CB41-76 (tabela 17) ou seja, o inóculo de colmos somente com descoloração vascular tiveram tendência de propiciar igualmente sintomas internos no milho doce Cuba, produzindo sintomas externos somente quando não se diluiu o caldo.

Quando fez-se o ensaio 5 (Tabela 21), repetindo-se as touceiras do ensaio 4 e tentando-se comparar a extração do caldo feita em tampão fosfato com a feita em água, verificou-se que o inóculo de colmos somente com descoloração vascular não deu sintomas de escaldadura no milho doce Cuba, ficando a dúvida se aquele sintoma interno constatado visualmente seria ou não causado pela bactéria; aliás, isto reflete a dificuldade de diagnose da doença somente apoiada em sintomas de descoloração vascular. O inóculo, extraído com tampão fosfato, de colmos com sintomas fortes, deu sintomas muito fortes no milho doce Cuba, com tendência das notas serem maiores do que aquelas da extração feita em água; além disso, o inóculo extraído com tampão fosfato ficou muito menos oxidado e mais límpido do que, o extraído em água, reforçando assim a preferência do uso do tampão fosfato nesta metodologia.

Finalmente, o ensaio realizado com material de estudos da Seção de Fisiologia da ESU-Araras (Tabela 22), ratificou que o milho doce Cuba é capaz de exteriorizar os sintomas de escaldadura, mesmo quando inoculado com caldo extraído de colmos somente com descoloração vascular do RB739331. Planta sadia, que não foi inoculada serviu neste ensaio como testemunha, provando-se que realmente a touceira estava sadia.

Da análise global dos 6 ensaios, depreende-se que o milho doce Cuba permitiu detectar latência somente em um caso (ensaio 3 - Tabela 19) e ainda assim no clone bem suscetível. O fato de não ter acusado sintomas nos outros ensaios, quando inoculado com inóculo de plantas sem sintomas (que tinham sido inoculadas anteriormente com *X. albilineans*) não deve contudo invalidar o seu emprego como planta-teste, sugerindo novas investigações a respeito.

O mecanismo de resistência da planta pode ter reduzido o número de talos bacterianos a um nível muito baixo ou a colonização estar restrita a alguns locais não amostrados durante a extração do caldo. Na infecção pela bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (raquitismo da soqueira), os trabalhos de coloração de xilema para detectar sinais de contaminação (VALARINI, 1978; CHAGAS, 1986) tem mostrado que a colonização não é uniforme no colmo e na touceira.

Estes fatos, associados com o mosaico genético (mixaploide) apresentado pela cana-de-açúcar, indicam a possibilidade de ocorrência de regiões de "confinamento" ou "restr

ção" de *X. albilineans*, dificultando o seu diagnóstico por planta teste.

4.6.2. Acompanhamento do viveiro primário de NA56-79

Muitas das touceiras marcadas durante os primeiros "roguings", no viveiro primário de 1985, da variedade NA56-79, na ESU-Araras, não apresentavam sintomas de esca^ldaura no momento de se retirar os colmos para extração do inóculo e posterior inoculação no milho doce Cuba. Principalmente naquelas onde havia somente uma risca longitudinal no limbo foliar, não notou-se a presença de descoloração vascular.

Na Tabela 23 encontramos os resultados obtidos nos testes de sanidade das mudas efetuados pelas inoculações feitas em milho doce em duas ocasiões distintas. Percebe-se que no 1º teste, apenas uma touceira acusou sintomas foliares de esca^ldaura no milho doce Cuba e apenas 4 delas propiciaram descoloração de vasos no milho doce, diferindo das testemunhas não inoculadas (nota 1). No 2º teste, quando as touceiras estavam um pouco maiores e cujos colmos tinham alguns internódios já formados, este quadro modificou-se um pouco, com 29,5% das touceiras dando sintomas externos positivos no milho doce, sendo que 22 das 34 chegaram a acusar sintomas internos diferentes da nota 1,0, com a média ficando em 1,4.

Estes dados refletem a dificuldade de se detectar infecção latente em variedades intermediárias, como já dis

Tabela 23. Teste de sanidade de mudas de NA56-79 em milho doce Cuba, inoculado com caldo extraído de plantas marcadas como com Escaldadura das folhas nos "roguings" do viveiro primário-85 da ESU-Araras.

Número da touceira	Tipo de sintomas (1)	Índice de doença obtido no milho doce (2)					
		1º teste			2º teste		
		Nota	Sintoma externo	Test.	Nota	Sintoma externo	Test.
1	D	1,0	(-)	1,0 (-)	1,2	(-)	1,0 (-)
2	D	1,0	(-)	1,0 (-)	1,0	(-)	1,0 (-)
3	D	1,0	(-)	1,0 (-)	1,0	(-)	1,0 (-)
4	D	1,6	(+)	1,0 (-)	1,2	(+)	1,0 (-)
5	ND	1,0	(-)	1,0 (-)	1,8	(-)	1,0 (-)
6	D	1,0	(-)	1,0 (-)	1,0	(-)	1,0 (-)
7	ND	1,0	(-)	1,0 (-)	1,0	(-)	1,0 (-)
8	D	1,0	(-)	1,0 (-)	1,0	(-)	1,0 (-)
9	ND	1,0	(-)	1,0 (-)	1,0	(-)	1,0 (-)
10	D	1,0	(-)	1,0 (-)	1,6	(-)	1,0 (-)
11	ND	1,2	(-)	1,0 (-)	1,2	(-)	1,0 (-)
12	ND	1,0	(-)	1,0 (-)	1,0	(-)	1,0 (-)
13	D	1,0	(-)	1,0 (-)	1,2	(+)	1,0 (-)
14	ND	1,0	(-)	1,0 (-)	1,2	(-)	1,0 (-)
15	ND	1,4	(-)	1,0 (-)	1,4	(-)	1,0 (-)
16	ND	1,0	(-)	1,0 (-)	1,2	(-)	1,0 (-)
17	D	1,0	(-)	1,0 (-)	2,0	(-)	1,0 (-)
18	D	1,0	(-)	1,0 (-)	1,0	(-)	1,0 (-)
19	ND	1,0	(-)	1,0 (-)	1,6	(-)	1,0 (-)
20	D	1,4	(-)	1,0 (-)	1,3	(+)	1,0 (-)
21	D	-	-	-	2,0	(+)	1,0 (-)
22	ND	-	-	-	1,0	(-)	1,0 (-)
23	ND	-	-	-	1,2	(+)	1,0 (-)
24	ND	-	-	-	1,0	(-)	1,0 (-)
25	D	-	-	-	1,2	(+)	1,0 (-)
26	ND	-	-	-	1,2	(-)	1,0 (-)
27	D	-	-	-	1,4	(-)	1,0 (-)
28	D	-	-	-	1,0	(-)	1,0 (-)
29	ND	-	-	-	1,2	(+)	1,0 (-)
30	D	-	-	-	2,0	(+)	1,0 (-)
31	ND	-	-	-	2,0	(+)	1,0 (-)
32	D	-	-	-	1,0	(-)	1,0 (-)
33	D	-	-	-	2,6	(+)	1,0 (-)
34	D	-	-	-	1,2	(-)	1,0 (-)

(1) D = Sintoma crônico bem definido; ND = sintoma não definido, apenas rigidez branca longitudinal

(2) Média de 5 plantas; critério de notas (% de vasos descoloridos): 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%; sinal positivo indica que pelo menos uma das cinco plantas tinha sintoma foliar.

cutido no ítem 4.6.1, pois o mecanismo de resistência das plantas pode restringir a colonização.

O inóculo de escaldadura obtido de caldo da NA56-79, realmente não tem dado resultados positivos e consistentes, mesmo em testes de reação de variedades de cana-de-açúcar, conforme constatado em outros trabalhos sobre este assunto (A. SANGUINO, comunicação pessoal). Parece haver uma certa seleção por cepas menos agressivas, indicando a relativa resistência apresentada por esta variedade em condições de campo.

Além disso, não estão postas em discussão a validade da marcação inicial feita pelos roguistas, baseada apenas em sintomas externos, o que pode apresentar uma taxa de erro elevada.

4.6.3. Levantamento dos dados de "roguing" dos viveiros de NA56-79 na ESU-Araras de 1978 a 1985

O tratamento térmico das mudas a 50,5°C/2 horas feito usualmente para o controle do raquitismo da soqueira, não tem controle eficaz contra a escaldadura das folhas, como foi enfatizado anteriormente na revisão bibliográfica. Este fato é inequivocamente corroborado pela análise dos dados das Tabelas 24 e 25.

A incidência de escaldadura aumentou, ano a ano, principalmente depois de 1980 quando foi mudada a origem

Tabela 24. Ocorrência de escaldadura das folhas nos "roguings" do viveiro primário de NA56-79 na ESU-Araras nos anos de 1978 a 1985 (dados em nº de touceiras/ha).

Mês	Ano						Média
	1980*	1981	1982	1983	1984	1985	
Março	-	57,27	-	-	-	-	-
Abril	2,04	12,73	59,38	6,00	32,68	43,68	18,81
Maio	-	40,91	64,59	16,00	81,19	182,76	77,09
Junho	5,10	58,18	30,21	54,00	195,05	51,73	65,72
Julho	-	16,36	32,20	14,00	2,97	79,31	28,97
Agosto	6,12	6,36	8,34	12,00	0,99	47,13	13,49
Setembro	5,10	0,00	2,09	4,00	0,00	8,05	3,38
Outubro	1,02	0,00	0,00	6,00	-	3,45	2,10
Novembro	-	0,91	0,00	12,00	1,98	8,05	4,59
Dezembro	-	1,81	1,05	2,00	-	1,16	1,50
Total	19,38	194,53	197,86	126,00	315,85	425,32	-

OBS: Em 1978, no total, foram tiradas 1,5 touceiras/ha; em 1979 não há relato de ocorrência de ESC no viveiro primário, ou seja, 0 touceira/ha.

* Até este ano foi uma origem de muda; a partir de então, foi outra origem.

Tabela 25. Ocorrência de escaldadura das folhas nos "roguings" do viveiro secundário de NA56-79 na ESU-Araras nos anos de 1978 a 1985 (dados em nº de touceiras/ha).

Mês	Ano						Média
	1980	1981*	1982	1983	1984	1985	
Abril	1,41	0,0	11,61	28,12	18,39	33,92	15,58
Maio	2,94	1,09	9,16	18,55	44,54	47,74	20,67
Junho	1,76	3,40	12,06	65,22	17,82	15,33	19,27
Julho	4,71	0,49	13,17	15,95	9,20	57,79	16,89
Agosto	6,82	1,94	2,46	31,02	2,02	18,85	10,52
Setembro	0,82	8,86	0,23	5,80	2,02	5,53	3,88
Outubro	0,71	12,62	1,34	2,32	-	4,02	4,21
Novembro	-	11,17	1,34	2,90	1,15	11,06	5,53
Dezembro	-	1,21	2,91	1,45	0,58	1,76	1,58
Total	19,17	40,78	54,28	171,33	95,72	196,00	-

OBS: em 1978 foram tiradas um total de 1,7 touceiras/ha; em 1979, 0,86 touceiras/ha.

* até este ano foi um, origem de muda; a partir de então foi outra origem.

das mudas de NA56-79 destinada ao plantio do viveiro primário e se implementou uma maior frequência de "roguings". Esta incidência cresceu tanto no viveiro primário, como no secundário, apesar do viveiro primário de 1985 ter sido formado com mudas que já haviam sofrido 5 ciclos de tratamento térmico (pois a muda a ser tratada é sempre tirada do viveiro primário); além disso, deve-se considerar que muitos e muitos "roguings" foram feitos como medida auxiliar para se conseguir a sanidade em relação à escaldadura, e mesmo assim esta doença mantém-se presente.

Nota-se que, a partir de 1980, o viveiro primário sempre acusou mais escaldadura por unidade de área do que o viveiro secundário; este fato é interessante e sugere que a bactéria *X. albilineans* encontra melhores condições para expressar sintomas em mudas tratadas termicamente. Na análise dos dados mês a mês, verifica-se também que a incidência é bem maior nos meses de abril a junho pelas facilidades da operação de "roguing", pelo porte ainda baixo das plantas e por estas serem as primeiras inspeções.

Deste modo, fica patente a necessidade de se encontrar uma outra medida de controle eficaz contra a escaldadura das folhas. Acredita-se que esta doença já esteja ocorrendo generalizadamente, de modo endêmico, na variedade NA56-79 e possivelmente em todas as variedades comerciais, causando prejuízos que, infelizmente, até o momento não puderam ser mensurados.

4.6.4. Presença de *X. albilineans* nas gotículas de gutação

Nas tentativas de isolamento diretamente em W-2 transferindo-se as gotículas de gutação, constatou-se na maioria dos casos a presença de *E. herbicola* e mais duas outras bactérias não identificadas; uma delas apresentava colônias bem parecidas com as de *X. albilineans*, porém com crescimento muito mais rápido e a qual a serologia não confirmou a identidade. Provavelmente, *X. albilineans* foi menos apta e não conseguiu crescer em meio de cultura, em competição com as outras 3 bactérias.

Porém, quando as gotículas de gutação foram inoculadas em milho doce Cuba, foram constatados sintomas típicos de escaldadura, como mostra a Tabela 26.

Reisolou-se a bactéria das plantas que manifestaram sintomas. Tanto o hábito de crescimento e forma de colônias como a reação serológica, confirmaram ser *X. albilineans*. A reinoculação da suspensão bacteriana em milho doce Cuba resultou novamente em sintomas típicos de escaldadura, confirmando a patogenicidade e fechando os postulados de Koch. O milho doce Cuba funcionou, portanto, como um "filtro biológico", só multiplicando *X. albilineans* e possibilitando seu isolamento.

Portanto, a bactéria mostrou-se presente nas gotículas de gutação de folhas de milho doce Cuba e cana-de-açúcar infectadas por esta bactéria, e provavelmente exsudando

Tabela 26. Manifestação de sintomas externos causados por *X. albilineans* em milho doce Cuba inoculado com gotículas de gutação.

Condições das plantas das quais foi coletada a gutação	Número de plantas de milho doce inoculadas ⁽¹⁾	Número de plantas de milho doce com escaldadura
- Milho doce com sintomas de Escaldadura	08	07
- Milho doce sadio	08	0
- Cana-de-açúcar com sintomas de Escaldadura	40	35
- Cana-de-açúcar sadia	12	0

(1) não se inoculou em cana-de-açúcar devido a ocorrência de infecção latente e ausência de sintomas.

em altas concentrações, sugerindo a possibilidade da escaldadura se disseminar no campo sem a interferência do homem, já que a gutação é um fenômeno fisiológico que ocorre praticamente a cada amanhecer, durante o longo ciclo da cultura; as folhas de cana-de-açúcar, com suas margens serreadas, atritando-se sob a ação do vento, podem servir como instrumentos de micro-cortes, transmitindo a bactéria de touceiras doentes para touceiras sadias.

Este fato pode explicar as constatações de disseminação natural relatadas por EGAN (1970) e PERSLEY (1971 e 1973a) e também uma transmissão natural ocorrida em recente pesquisa da ESALQ e IAA/PLANALSUCAR sobre a inoculação precoce para "screening" de resistência, onde a doença foi constatada em plântulas não inoculadas altamente suscetível plantadas ao lado do mesmo genótipo inoculado (H.P. HOFFMANN, comunicação pessoal).

Deve-se aprofundar os estudos para mensurar a importância epidemiológica desta possível forma de transmissão, determinando-se a viabilidade da população epífita de *X. albilineans* sobre as folhas, assim como a transmissão natural em condições de campo. Mas, sem dúvida, estas constatações sugerem a necessidade de maiores cuidados na produção de mudas de cana-de-açúcar.

4.7. Cura por termoterapia *in vivo* e cultura de ápice meristemático

4.7.1. No clone RB739331

A avaliação visual dos sintomas internos e externos de escaldadura das plantas do lote I, no momento da extração dos ápices meristemáticos, demonstrou que somente o tratamento C (3 semanas de termoterapia) acusou alguma melhora em relação às condições das plantas não expostas à termoterapia (tratamento D), as quais estavam totalmente infectadas. Com 4 semanas a 40°C (tratamento E), houve um depauperamento acentuado das plantas, com seca de folhas e oxidação intensa na região meristemática. O tratamento F (4 semanas na sala de termoterapia) mostrou-se promissor, estando as plantas aparentemente menos infectadas.

Depois de 25-35 dias dentro dos tubos, começou a ocorrer o enraizamento dos "explants". Passados mais 10 dias, foram transplantados para copos plásticos com vermiculita, em casa de vegetação. As plântulas permaneceram nestas condições por mais 30 dias recebendo adubação com ULTRAFOLIAR (3 ml/l de água) duas vezes por semana, sendo transplantados a seguir para sacos de polietileno pretos de 20 cm de altura x 15 cm de diâmetro, em solo esterilizado. Nestas condições permaneceram por mais algumas semanas, aonde foram avaliados quanto à sua sanidade frente à escaldadura das folhas.

A Tabela 27 resume as anotações de contaminação, mortes no transplântio, etc., assim como a avaliação de escaldadura baseada na observação visual. A Tabela 28 comple-

Tabela 27. Efeito de diferentes regimes de termoterapia *in vivo* na cura de escaldadura das folhas através da cultura de ápices meristemáticos do clone RB739331. Lote I.

Protocolo	Tratamentos *						Total/média
	A	B	C	D	E	F	
- Nº de ápices retirados(a)	20	20	20	20	16	32	128
- Nº de ápices:							
. contaminados	5**	0	10	5	4	8	32
. não crescidos	1	2	1	8	3	0	15
. mortos no transplântio	10	16	8	4	6	8	52
- "explants" adultos formados(b)	4	2	1	3	3	16	29
- % contaminação no tubo	25,0	0,0	50,0	25,0	25,0	25,0	25,0
. não crescimento no tubo	5,0	10,0	5,0	40,0	18,8	0,0	11,7
. morte transplântio	50,0	80,0	40,0	20,0	37,5	25,0	40,6
. pegamento	20,0	10,0	5,0	15,0	18,8	50,0	22,7
- nº "explants" com ESC:							
. no tubo	1***	0	0	0	0	0	1
. no saquinho em casa veg.	1***	0	0	0	0	0	1
. no campo	1	0	0	2	0	3	6
- nº "explants" sadios (c)	3	2	1	1	3	13	23
- % de Escaldadura:							
. no tubo	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8
. no saquinho	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8
. no campo	25,0	0,0	0,0	66,7	0,0	18,8	20,7
- % cura final:							
. relativa ($\frac{c}{b} \times 100$)	75,0	100,0	100,0	33,3	100,0	81,3	79,3
. absoluta ($\frac{c}{a} \times 100$)	15,0	10,0	5,0	5,0	18,8	40,6	18,0

* A, B, C e E respectivamente 1, 2, 3 e 4 semanas de termoterapia na câmara; F = 4 semanas de termoterapia na sala; D = sem termoterapia

** computado a escaldadura no tubo

*** não transplantados para o campo.

menta a diagnose, com os resultados da inoculação do caldo de cada um dos "explants" obtidos no milho doce Cuba.

Percebe-se que houve uma contaminação considerável nos tubos com meio de cultura nos quais os ápices estavam se desenvolvendo, em média 25%; também destaca-se a alta porcentagem de ápices que não se desenvolveram, cerca de 40% no tratamento D, sem termoterapia. Porém, o que mais prejudicou o "pegamento" dos "explants" foi a alta porcentagem de morte no transplântio, pois trabalhou-se com uma vermiculita não adequada, fato que só foi elucidado no final do lote IV.

Notou-se o aparecimento de escaldadura já de início, no tubo de ensaio, com sintomas idênticos apresentados por ROTT e CHAGUARDIEFF (1984), ou no copinho com vermiculita no tratamento A (1 semana de termoterapia), não sendo portanto transplantadas. Após transplantadas definitivamente para o campo, cerca de 6 meses após, apareceram sintomas da doença nas plantas oriundas dos tratamentos A, D e F (Tabela 27). A avaliação no milho doce Cuba, porém, foi algo confusa (Tabela 28) pois, em nenhum caso, houve a manifestação de sintomas externos, além do fato de acusar descoloração vascular em um caso, quando inoculado com caldo do "explant" E3a, que não tinha originalmente sintomas de escaldadura. Isto demonstra que nos "explants" com sintomas a concentração de *X. albilineans* é muito baixa.

Analizando-se as porcentagens de cura relativa (número de "explants" sadios em relação aos "explants" adultos

Tabela 28. Diagnóstico de escaldadura das folhas, em "explants" de RB739331, através da avaliação visual e da inoculação do caldo em milho doce Cuba. Lote 1.

"Explant"(1)	Avaliação visual		Infecção no milho doce nas repetições(2)				
	Sintoma interno	Sintoma externo	1	2	3	4	Testemunha
A1a	-	+	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
A2a prim.	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
A5a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
A5b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
B3a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
B4a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
C3a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
D3a	-	+	2(-)	2(-)	1(-)	1(-)	1(-)
D4a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
D5a	-	+	3(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
E2a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
E3a prim	-	-	3(-)	2(-)	2(-)	1(-)	1(-)
E4a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
F1a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
F1b	-	+	3(-)	2(-)	1(-)	1(-)	1(-)
F1c prim	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
F2a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
F2b prim	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
F3a prim	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
F3b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
F5a prim	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
F5b	+	+	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
F5c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
F7a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
F8a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
F8b	+	+	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
F8c prim	-	-	2(-)	4(-)	3(-)	1(-)	1(-)
F9a prim	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
F9b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)

(1) a 1ª letra maiúscula corresponde ao tratamento de termoterapia; o número corresponde à planta utilizada; a letra minúscula corresponde a caracterização dos perfilhos da planta.

(2) cada repetição = 1 planta; critério de avaliação: 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%; os sinais entre parênteses significam a ausência (-) ou presença (+) de sintomas externos.

formados) e a cura absoluta (número de "explants" sadios em relação ao total de ápices retirados), percebe-se claramente que no tratamento D, sem termoterapia, foi onde proporcionalmente se obteve menor número de "explants" sadios. Os tratamentos A, B, C e F (1, 2, 3 e 4 semanas de termoterapia), apesar de altas porcentagens de cura relativa, foram muito prejudicados pela contaminação e morte no transplântio, fazendo com que o número de "explants" formados fosse muito baixo e consequentemente tiveram baixas porcentagem de cura absoluta.

Por ocasião da retirada dos ápices do lote 11, notou-se que todas as plantas estavam com infecção muito acentuada de escaldadura, principalmente o perfilho primário. No entanto, o alongamento causado pela aplicação de Giberelina foi marcante, conforme constatado por GONÇALVES (1984).

As Tabelas 29 e 30 trazem os resultados obtidos no lote 11. Novamente obteve-se uma porcentagem de pegamento baixa (18,8%), devido às contaminações dentro dos tubos, morte no transplântio ou simplesmente não desenvolvimento dos ápices. Notou-se o aparecimento de Escaldadura em dois "explants" dos tratamentos GF e GH, que não tiveram aplicação de GA3 nem foram tratados termicamente. Estes "explants" foram passados para o solo como os outros e na avaliação feita quando da inoculação de caldo em milho doce Cuba (Tabela 30) somente o "explant" GH2 ocasionou sintomas de escaldadura no milho, sendo que no GF2a não havia sintomas de doença e consequentemente o seu inóculo não causou infecção na

Tabela 29. Efeito de diferentes regimes de termoterapia *in vivo* na cura de escaldadura das folhas através da cultura de ápices meristemáticos do clone RB739331. Lote II.

Protocolo	Tratamentos*							Total/média
	GA	GB	GC	GD	GE	GF	GH	
- nº de ápices retirados(a)	16	8	8	8	8	8	8	64
- nº de ápices:								
. contaminados	4	3	3	1	1	1	1	14
. não crescidos	7	2	4	3	5	0	3	24
. mortos no transplântio	4	0	1	2	1	5	1	14
- "explants" adultos formados(b)	1	3	0	2	1	2	3	12
- % contaminação no tubo	25,0	37,5	37,5	12,5	12,5	12,5	12,5	21,9
. não crescimento no tubo	43,8	25,0	50,0	37,5	62,5	0,0	37,5	37,5
. morte transplântio	25,0	0,0	12,5	25,0	12,5	62,5	12,5	21,9
. pegamento	6,3	37,5	0,0	25,0	12,5	25,0	37,5	18,8
- nº de "explants" com ESC:								
. no tubo	0	0	0	0	0	0	0	0
. no saquinho em casa veg.	0	0	-	0	0	1**	1**	2
. no campo	0	0	-	0	0	0	0	0
- nº de "explants" sadios(c)	1	3	-	2	1	1	2	10
- % de Escaldadura:								
. no tubo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
. no saquinho	0,0	0,0	-	0,0	0,0	50,0	33,3	16,7
. no campo	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
- % de cura final:								
. relativa ($\frac{c}{b} \times 100$)	100,0	100,0	-	100,0	100,0	50,0	66,7	83,3
. absoluta ($\frac{c}{a} \times 100$)	6,3	37,5	-	25,0	12,5	12,5	25,0	15,63

* ver detalhamento no texto página 53.

** transplantados

Tabela 30. Diagnóstico de escaldadura das folhas em "explants" de RB739331, através de avaliação visual e da inoculação do caldo em milho doce Cuba. Lote II.

"Explant"(1)	Avaliação visual		Infecção no milho doce nas repetições (2)			
	Sintoma		Testemunha			
	interno	externo	1	2	3	4
GA4a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
GB1a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
BG1b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
GB2	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
GD1a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
GD1b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
GE2a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
GF2a	-	(3)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
GF2b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
GH1a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
GH1b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
GH2	+	+	2(+)	3(+)	1(-)	2(+)

(1) a 1ª letra maiúscula corresponde ao tratamento de termoterapia; o número corresponde à planta utilizada; a letra minúscula corresponde a caracterização dos perfílios da planta.

(2) cada repetição = 1 planta; critério de avaliação: 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100% de vasos descoloridos; os sinais entre parênteses significam a ausência (-) ou presença (+) de sintomas externos.

(3) havia apresentado Escaldadura anteriormente no copinho com vermiculita.

planta teste.

Como o número de "explants" obtidos foi pequeno não foi possível uma avaliação precisa do efeito do alongamento de internódios na possibilidade de escape da infecção por *X. albilineans* mas ainda não se pode descartar a idéia de que esta aplicação de GA3, associada à termoterapia e à cultura de ápices meristemáticos, possa servir como método de cura de escaudadura.

Outra técnica testada foi a permanência das plantas sob luz contínua quando da realização da termoterapia, baseados nas afirmações de DALY (1976) e BUCHANAN *et alii* (1981) de que sob efeito de luz contínua, a fotossíntese é incrementada e conseqüentemente as plantas tem aumentada a sua resistência aos mais diferentes tipos de patógenos. Deste modo, no lote III, foi avaliada esta exposição, cujos resultados encontram-se nas Tabelas 31 e 32. Os tratamentos C e E correspondem a permanência das plantas na sala de termoterapia com luz contínua.

Notou-se uma nítida melhora nas plantas expostas à luz contínua através da avaliação visual da infecção por *X. albilineans* na ocasião da retirada dos ápices meristemáticos (tratamento C e E). Porém, houve uma deficiência pronunciada de Cu e Zn, demonstradas através de um sintoma foliar de pequenas lesões necróticas marrom, sendo necessárias duas aplicações de uma solução 20 ppm dos dois micronutrientes. Mesmo assim, as plantas estavam depauperadas, o que acarretou nu-

Tabela 31. Efeito de diferentes regimes de termoterapia *in vivo* na cura de escaldadura das folhas através da cultura de ápices meristemáticos do clone RB739331. Lote III.

Protocolo	Tratamentos*				Total/média
	A	B	C	E	
- nº de ápices retirados (a)	24	23	38	34	119
- nº de ápices:					
. contaminados	5	10**	13**	19	47
. não crescidos	2	1	0	3	6
. mortos no transplântio	13	7	21	9	50
- "explants" adultos formados (b)	4	5	4	3	16
- % contaminação no tubo	20,8	43,5	34,2	55,9	39,5
. não crescimento no tubo	8,3	4,4	0,0	8,8	5,1
. morte no transplântio	54,2	30,4	55,3	26,5	42,0
. pegamento	16,7	21,7	10,5	8,8	13,5
- nº de "explants" com ESC:					
. no tubo	0	3***	1***	0	4
. no saquinho em casa veg.	0	0	0	0	0
. no campo	0	0	0	0	0
- nº de "explants" sadios (c)	4	5	4	3	16
- % de Escaldadura:					
. no tubo	0,0	13,1	2,6	0,0	3,4
. no saquinho	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
. no campo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
- % de cura final:					
. relativa ($\frac{c}{b} \times 100$)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
. absoluta ($\frac{c}{a} \times 100$)	16,7	21,7	10,5	8,8	13,5

* A e B = 17 e 30 dias de termoterapia na câmara; C e E = 20 e 40 dias de termoterapia na sala sob luz contínua.

** computado a escaldadura no tubo

*** não transplântados

Tabela 32. Diagnóstico de escaldadura das folhas em "explants" de RB739331, através da avaliação visual e da inoculação do caldo em milho doce Cuba. Lote III.

"Explant"(1)	Avaliação visual		Infecção no milho doce nas repetições (2)			
	Sintoma interno	Sintoma externo	1	2	3	4
A3a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
A4a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
A4b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
A6a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
B1a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
B1b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
B2a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
B2b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
B4a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
C6a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
C9a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
C10a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
C10b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
E3a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
E4a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
E5a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)

(1) a 1ª letra maiúscula corresponde ao tratamento de termoterapia; o número corresponde à planta utilizada; a letra minúscula corresponde a caracterização dos perfis das plantas:

(2) cada repetição = 1 planta; critério de avaliação: 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%; os sinais entre parênteses significam a ausência (-) ou presença (+) de sintomas externos

ma alta contaminação dos tubos.

Neste lote ocorreram as maiores porcentagens de morte no transplântio prejudicando sobremaneira os resultados, chegando-se a um pequeno número de plantas no campo. Mesmo assim o aparecimento de sintomas de escaldadura se restringiu a 4 "explants" ainda nos tubos de ensaio.

A avaliação feita por inoculação do caldo dos "explants" no milho doce Cuba (Tabela 32) mostrou que os mesmos estavam isentos de *X. albilineans* ou com uma concentração baixíssima, não detectada.

No lote IV procurou-se conjugar a permanência das plantas em luz contínua, na sala de termoterapia, a aplicação de GA3 (tratamento SCG), comparando-se com outros tratamentos (câmara com GA3, câmara sem GA3 e sala sem GA3).

Os resultados deste lote encontram-se nas Tabelas 33 e 34. Na Tabela 33 percebe-se que os ápices retirados das plantas que não receberam GA3 e ficaram na câmara (CSG), tiveram uma alta porcentagem de contaminação dentro dos tubos de ensaio. Neste lote conseguiu-se um melhor pegamento dos "explants" com uma menor taxa de mortalidade no transplântio, pois detectou-se que a vermiculita que se estava trabalhando não era a adequada, contendo resíduos tóxicos ao desenvolvimento normal dos "explants". Foi então trocada por outra marca que não apresenta este problema.

O diagnóstico de escaldadura neste lote (Tabela 34), nos mostra que somente o caldo dos dois "explants" que já

Tabela 33. Efeito de diferentes regimes de termoterapia *in vivo* na cura de escaldadura das folhas através da cultura de ápices meristemáticos do clone RB739331. Lote IV.

Protocolo	Tratamentos*				Total/média
	CCG	CSG	SSG	SCG	
- nº de ápices retirados (a)	18	15	15	61	109
- nº de ápices:					
. contaminados	4	8	4	16	32
. não crescidos	1	1	1	5	8
. mortes no transplântio	4	4	4	10	22
- "explants" adulto formados (b)	9	2	6	30	47
- % contaminação no tubo	22,2	53,3	26,7	26,2	29,4
. não crescimento no tubo	5,6	6,7	6,7	8,2	7,3
. morte no transplântio	22,2	22,7	26,7	16,4	20,2
. pegamento	50,0	13,34	40,0	49,2	43,1
- nº de "explants" com ESC:					
. no tubo	0	0	0	0	0
. no saquinho em casa veg.	1**	0	0	1**	2
. no campo	0	0	0	0	0
- nº de "explants" sadios (c)	8	2	6	29	45
- % de Escaldadura:					
. no tubo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
. no saquinho	11,1	0,0	0,0	3,3	4,3
. no campo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
- % de cura final:					
. relativa ($\frac{c}{b} \times 100$)	88,9	100,0	100,0	96,7	95,8
. absoluta ($\frac{c}{a} \times 100$)	44,5	13,3	40,0	47,5	41,3

* CCG = câmara com GA3; CSG = câmara sem GA3; SSG = sala sem GA3; SCG = sala com GA3.

** transplantados

Tabela 34. Diagnóstico de escaldadura das folhas em "explants" de RB739331, através da avaliação visual e da inoculação do caldo em milho doce Cuba. Lote IV.

"Explant" (1)	Avaliação visual		Infecção no milho doce nas repetições (2)				
	Sintoma interno	Sintoma externo	1	2	3	4	Testemunha
CSG1a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
CSG2a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
CCG1a	+	+	2(+)	2(+)	3(+)	3(+)	1(-)
CCG1b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
CCG2a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
CCG2b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
CCG2c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
CCG3a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
CCG3b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
CCG4a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
CCG4b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SSG1a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SSG1b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SSG1c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SSG2a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SSG3a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SSG3b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG1a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG1b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG2a (3)	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG3a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG3b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG4a (3)	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG4b (3)	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG5a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG5b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG6a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG7a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG7b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG8a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG8b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG9a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG9b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG9c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG10a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG10b	+	+	2(+)	2(+)	3(+)	3(+)	1(-)
SCG11a (3)	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG12a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG12b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG12c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG14a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG14b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG14c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG15a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG15b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG15c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
SCG15d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)

(1) a 1ª letra maiúscula corresponde ao tratamento de termoterapia; o número corresponde à planta utilizada; a letra maiúscula corresponde à caracterização dos perfílios da planta.

(2) cada repetição = 1 planta; critério de avaliação: 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100%; os sinais entre parênteses significam a ausência (-) ou presença (+) de sintomas externos.

(3) "planta-mãe" tinha sintoma forte de Escaldadura.

havia acusado sintomas externos visíveis (CCG1a e SCG10b) propiciou o aparecimento de sintomas no milho doce Cuba.

Voltando-se à Tabela 33, percebe-se que não foram detectados sintomas nos "explants" no campo, o que faz as porcentagens de cura absoluta serem as mais altas já conseguidas nestes 4 lotes que se seguiram, particularmente nos tratamentos que receberam aplicação de GA3.

Procurando-se compilar os dados das Tabelas 27, 29, 31 e 33 foi montada a Tabela 35, que compara os "explants" obtidos de plantas que passaram pela temperatura *in vivo* com aqueles que não passaram por esta técnica. Destaca-se, neste último caso, a alta porcentagem (32,7%) de ápices que não chegaram a se desenvolver nos tubos, apesar de não estarem contaminados. As porcentagens de "explants" com escaldadura também foram maiores quando não se fez primeiramente a termoterapia, isto tudo refletindo numa menor porcentagem de cura final, tanto relativa (63,6%) quanto absoluta (13,5%). Diante destes dados pode-se afirmar que a termoterapia *in vivo* a 40°C propiciou uma ajuda satisfatória na obtenção de "explants" sadios, melhorando a técnica. Outra evidência foi a vantagem de se fazer esta termoterapia na sala com luz contínua.

Uma comparação interessante que se procurou fazer foi os resultados da aplicação ou não de GA3, tanto nos tratamentos com termoterapia anterior quanto nos sem termoterapia anterior (Tabela 36). Percebe-se que o alongamento conseguido pela aplicação de GA3 ajuda na obtenção de "explants"

Tabela 35. Comparação da porcentagem de cura de escaldadura das folhas através da cultura de ápices meristemáticos das plantas que passaram por termoterapia *in vivo* contra aquelas que não sofreram tal processo.

Protocolo	Tratamentos			Sem termoterapia	Total/média
	Com termoterapia				
	câmara	sala	Total		
- nº de ápices retirados(a)	188	180	368	52	420
- nº de ápices:					
. contaminados	52	60	112	13	125
. não crescidos	27	9	36	17	53
. mortos no transplântio	75	52	127	11	138
- "explants" adultos formados(b)	34	59	93	11	104
- %.contaminação no tubo	27,7	32,8	30,4	21,2	29,8
. não crescimento no tubo	14,4	5,0	9,8	32,7	12,6
. morte transplântio	39,9	28,9	34,5	21,2	32,9
. pegamento	18,1	32,8	25,3	21,2	24,8
- nº de "explants" com ESC:					
. no tubo	4	1	5	0	5
. no saquinho em casa veg.	2	1	3	2	5
. no campo	1	3	4	2	6
- nº de "explants" sadios(c)	32	55	87	7	94
- % de Escaldadura:					
. no tubo	2,1	0,6	1,4	0,0	1,2
. no saquinho	5,9	1,7	3,2	18,2	4,8
. no campo	2,9	5,1	4,3	18,2	5,8
- % de cura final:					
. relativa ($\frac{c}{b} \times 100$)	94,1	93,1	93,4	63,6	90,4
. absoluta ($\frac{c}{a} \times 100$)	17,0	30,6	23,6	13,5	22,4

Tabela 36. Comparação da porcentagem de cura de escaldadura das folhas através da cultura de ápices meristemáticos entre as plantas que receberam ou não aplicação de ácido giberélico.

Protocolo	Tratamentos			
	Com termoterapia		Sem termoterapia	
	Com GA3	Sem GA3	Com GA3	Sem GA3
- nº de ápices retirados (a)	95	273	16	36
- nº de ápices :				
. contaminados	24	88	6	7
. não crescidos	13	23	6	11
. mortos no transplântio	18	109	1	10
- "explants" adultos formados (b)	40	53	3	8
- %.contaminação no tubo	25,3	32,2	37,5	19,5
. não crescimento no tubo	13,1	8,4	37,5	30,6
. morte transplântio	19,0	39,9	6,3	27,8
. pegamento	42,1	19,4	18,8	22,2
- nº de "explants" com ESC:				
. no tubo	0	5*	0	0
. no saquinho em casa veg.	2	1*	0	2
. no campo	0	4	0	2
- nº de "explants" sadios (c)	38	49	3	4
- % de Escaldadura:				
. no tubo	0,0	1,8	0,0	0,0
. no saquinho	5,0	1,9	0,0	25,0
. no campo	0,0	7,5	0,0	25,0
- % de cura final:				
. relativa ($\frac{c}{b} \times 100$)	95,0	92,5	100,0	50,0
. absoluta ($\frac{c}{a} \times 100$)	40,0	17,9	18,8	11,1

* Não transplantados.

sadios, tanto na porcentagem de cura absoluta (40,0% contra 17,9% e 18,8% contra 11,1%) quando na cura relativa (95,0% contra 92,5% e 100,0% contra 50,0%).

Desta maneira visualiza-se como de melhores resultados de cura de escaldadura, os "explants" de RB739331 obtidos de plantas que passaram por termoterapia a 40°C por 2 a 3 semanas sob luz contínua e que receberam ou não a aplicação de hormônio para maior alongamento dos internódios. Estes resultados foram seguidos nos lotes a seguir, onde se trabalhou com a variedade NA56-79, mais plantada no País e de reação intermediária à escaldadura das folhas.

As plantas mãe da RB739331 (das quais se retiraram os ápices para cultura) dos quatro lotes voltaram para o pátio e em todas elas houve o ressurgimento dos sintomas de escaldadura, mostrando que todas as variações de termoterapia não propiciaram numa única planta sadia, ou seja, a cura apenas por termoterapia *in vivo* foi nula.

4.7.2. Na variedade NA56-79

Por ocasião da retirada dos ápices meristemáticos no lote V notou-se que todos os perfilhos primários de todas as plantas estavam com os vasos totalmente infectados, inclusive perto da região meristemática. Os outros perfilhos estavam um pouco melhores, porém, ainda pequenos.

No lote VI, em que fez-se a aplicação de GA3, o

aspecto visual de infecção dos perfilhos primários melhorou um pouco em relação ao lote anterior, porém alongando-se menos que os outros perfilhos secundários e terciários, os quais neste lote apresentaram-se sem infecção e oxidação de vasos.

Nota-se então que o estado da planta no momento de se aplicar GA3 e iniciar a termoterapia é muito importante para o sucesso ou não da técnica, ou seja, em plantas muito infectadas por escaldadura, a possibilidade de alongamento e cura pode ser menor.

No lote VII, sem GA3, apesar das "plantas-mãe" estarem com sintomas fortes de escaldadura nos perfilhos primários, inclusive com brotação lateral, depois de termoterapia, houve uma certa recuperação do estado geral das plantas, desaparecendo os sintomas de escaldadura na maioria dos perfilhos secundários e terciários.

A Tabela 37 traz os resultados gerais dos três lotes da NA56-79 e as Tabelas 38, 39 e 40 a diagnose feita em cada lote, através da inoculação do caldo de cada um dos "explants" em milho doce Cuba.

A primeira grande diferença destes lotes de NA56-79, em relação aos lotes anteriores de RB739331, foi que melhorou-se muito as condições de transplante dos "explants", obtendo-se uma porcentagem de pegamento bem superior do que até então estava-se conseguindo.

Apesar de não aparecer nenhum caso de escaldadura dentro dos tubos de ensaio, depois de transplantados para

Tabela 37. Cura de escaldadura das folhas obtida pela cultura de ápices meristemáticos da variedade NA56-79 conforme os diferentes lotes (regimes) de termoterapia *in vivo*.

Protocolo	Lotes			Total/média
	V	VI*	VII	
- nº de ápices retirados (a)	73	74	80	227
- nº de ápices :				
. contaminados	20	15	18	53
. não crescidos	18	10	10	38
. mortos no transplântio	3	3	1	7
- "explants" adultos formados (b)	32	46	51	129
- % contaminação no tubo	27,4	20,3	22,5	23,3
. não crescimento no tubo	24,7	13,5	12,5	16,7
. morte no transplântio	4,1	4,1	1,3	3,1
. pegamento	43,8	62,2	62,5	56,8
- nº de "explants" com ESC:				
. no tubo	0	0	0	0
. no saquinho em casa veg.	2**	1**	2***	5
. no campo	0	2	1	3
- nº de "explants" sadios (c)	30	43	48	121
- % de Escaldadura :				
. no tubo	0,0	0,0	0,0	0,0
. no saquinho	6,3	2,2	3,9	3,9
. no campo	0,0	4,3	2,0	2,3
- % de cura final:				
. relativa ($\frac{c}{b} \times 100$)	93,8	93,5	94,1	93,8
. absoluta ($\frac{c}{a} \times 100$)	41,1	58,1	60,0	53,3

* Aplicação de ácido giberélico antes da termoterapia

** Transplantado

*** Não transplantado

Tabela 38. Diagnóstico de escaldadura das folhas em "explants" de NA56-79, através da avaliação visual e da inoculação do caldo em milho doce Cuba.Lote V.

"Explant"(1)	Avaliação visual		Infecção no milho doce nas repetições (2)				
	Sintoma interno	Sintoma externo	1	2	3	4	Testemunha
1a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
1d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
3d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
4b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
4d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
5d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
8a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
8b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
8c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
9a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
9d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
10b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
11c	+	+	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
12b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
12c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
13a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
14a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
14b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
14c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
14d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
15b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
15c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
16a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
16c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
16d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
17a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
17d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
18a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
18b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
18d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
19a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
19d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)

(1) o número corresponde à "planta-mãe"; a letra minúscula corresponde ao perfilho de tal planta.

(2) cada repetição = 1 planta; critério de avaliação: 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100% de vasos descoloridos; os sinais entre parênteses significam a ausência (-) ou presença (+) de sintomas externos.

Tabela 39. Diagnóstico de escaudadura das folhas em "explants" de NA56-79, através da avaliação visual e da inoculação do caldo em milho doce Cuba. Lote VI.

"Explant" (1)	Avaliação visual		Infecção no milho doce nas repetições (2)				
	Sintoma interno	Sintoma externo	1	2	3	4	Testemunha
21b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
21c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
22a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
23a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
23b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
23c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
23d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
24b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
25b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
25d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
26c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
26d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
27e	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
27b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
27d	-	+	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
28a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
28b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
28c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
28d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
29a	-	+	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
29b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
29c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
29d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
30a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
30b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
30d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
31a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
31c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
32d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
33a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
34a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
34b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
34c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
35a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
35c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
35d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
36b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
36c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
37a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
37d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
38c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
39a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
39b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
39d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
40c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
40d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)

(1) o número corresponde à "planta-mãe"; a letra minúscula corresponde ao perfilho de tal planta.

(2) cada repetição = 1 planta; critério de avaliação: 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100% de vasos descoloridos; os sinais entre parênteses significam a ausência (-) ou presença de sintomas externos.

Tabela 40. Diagnóstico de escaldadura das folhas em "explants" de NA56-79, através da avaliação visual e da inoculação do caldo em milho doce Cuba. Lote VII.

"Explant" (1)	Avaliação visual		Infecção no milho doce nas repetições (2)				
	Sintoma interno	Sintoma externo	1	2	3	4	Testemunha
41c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
41d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
42a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
42c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
42d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
43a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
43b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
43c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
43d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
44a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
44b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
45a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
45b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
46a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
46b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
46c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
47a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
47c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
47d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
48b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
48c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
48d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
49b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
49c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
49d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
50c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
51a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
52a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
52b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
52c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
53b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
53d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
54a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
54b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
54c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
55a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
56b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
56c	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
56d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
57d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
58b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
58d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
59a	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
59b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
59d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
60b	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)
60d	-	-	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)	1(-)

(1) o número corresponde à "planta-mãe"; a letra minúscula corresponde ao perfilho de tal planta.

(2) cada repetição = 1 planta; critério de avaliação: 1 = 0%; 2 = 1 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75%; 5 = 76 a 100% de vasos descoloridos; os sinais entre parênteses significam a ausência (-) ou presença de sintomas externos.

vermiculita em casa de vegetação, houve um total de 5 "explants" que não haviam sido curados e outros 3 que só mostraram sintomas depois de transplantados para o campo.

Isto fez com que a porcentagem de cura relativa nestes 3 lotes de NA56-79 estivesse no mesmo nível do que a conseguida com o clone RB739331, porém a porcentagem de cura absoluta foi bem maior (53,5% em média dos 3 lotes) devido à maior eficiência de manuseio do material, ou melhor pegamento.

Não existiu diferença entre aplicação ou não de GA3 (lote VI comparado ao lote VII) em propiciar maior porcentagem de cura.

A diagnose dos "explants" através da planta-teste (Tabelas 38, 39 e 40) mostrou-se novamente problemática na variedade NA56-79 como já detectado no ítem 4.6.2. Houve 3 casos ("explants" 11C, 27D e 29A) em que apesar de estarem com sintomas foliares bem definidos, o caldo de seus colmos não causou sintomas externos no milho doce.

As "plantas-mãe" destes 3 lotes, levadas novamente para o pátio, não estavam curadas de escaldadura, mostrando que a técnica de termoterapia *in vivo* realmente não é eficaz para esta doença.

Como discussão geral, deve-se considerar que não foram tentadas maiores variações na técnica de cultura de ápice meristemático, como por exemplo, a diminuição do tamanho do meristema retirado para menos de 1,5 mm, o que poderá melhorar as porcentagens de cura conseguida.

Por fim, a avaliação feita nos "explants" obtidos foi baseada no que de mais prático e exequível se tem até o momento, não sendo uma diagnose definitiva, devendo-se portanto acompanhar todo o material básico, para verificar se haverá ou não o surgimento da doença ao longo das multiplicações ou nas socas obtidas. Porém, até o momento, dada a possibilidade de cura, pode-se começar outros tipos de estudo, como por exemplo perdas de produção devido à escaldadura. Fica também viabilizada a técnica de inoculação precoce da doença, pois tem-se já disponível este método de limpeza do material.

4.8. Cura natural no clone RB739331

Das 330 gemas infectadas por escaldadura retiradas do clone RB739331 e postas a germinar, conseguiu-se 300 plantas. Um mês após a germinação, descartou-se 23 plantas com escaldadura; após mais 15 dias, descartou-se novamente mais 205 plantas com a doença, transplantando-se o restante para saquinho plástico com solo esterilizado.

Após 45 dias, mais 53 plantas foram descartadas restando apenas 20; das quais após um mês 15 apresentaram escaldadura. As 5 restantes foram transplantadas para o campo, mas após 30 dias todas elas mostraram-se infectadas por *X. albilineans*.

Portanto, a cura natural no clone RB739331 não existiu neste material que foi o mesmo no qual se fez os estu-

dos de cura por termoterapia e cultura de ápice meristemático.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo permite as seguintes conclusões:

- . a determinação da curva de crescimento *in vitro* de *X. albilineans* e a inoculação de diluições da suspensão bacteriana em milho doce, mostraram que é preciso mais do que uma célula bacteriana para se obter a Unidade Formadora de Colônia (UFC).
- . *X. albilineans* tem um comportamento tolerante a altas temperatura no seu crescimento *in vitro* suportando até 6 dias à 40°C sem perder a patogenicidade; ao se fazer termoterapia *in vivo* para seu controle, estes devem ser, portanto, os parâmetros mínimos de permanência das plantas e de temperatura.
- . o milho doce Cuba pode ser usado em qualquer fase de seu de-

envolvimento como planta teste para a escaldadura das folhas da cana-de-açúcar preferencialmente quando as plantas têm de 20 a 30 dias de idade; *E. herbicola* e *F. moniliiforme* causam sintomas de descoloração vascular no milho doce semelhantes aos causados por *X. albilineans*, cujos sintomas foliares, porém, são singulares e inconfundíveis, o que deve ser considerado no diagnóstico.

- . o milho doce Cuba não foi capaz de detectar infecção latente de *X. albilineans* em variedades de reação intermediária a esta doença, as quais tem mecanismos de restrição da colonização da bactéria.
- . a detecção de *X. albilineans* por planta teste está aparentemente no mesmo nível de precisão que os métodos serológicos.
- . *X. albilineans* está presente nas gotículas de gutação de folhas de milho doce e cana-de-açúcar infectadas, sugerindo a possibilidade desta doença de disseminar no campo sem a interferência do homem, e exigindo-se cuidados ainda maiores nos viveiros de mudas de cana-de-açúcar.
- . não existe cura natural ou recuperação da doença durante a brotação (germinação) de gemas infectadas por *X. albilineans* no clone suscetível RB739331.
- . termoterapia *in vivo*, até por 40 dias a 40°C, não cura escaldadura das folhas no clone suscetível RB739331 e variedade intermediária NA56-79.
- . a associação das técnicas de temperatura *in vivo* com a cultura de ápices meristemáticos, propicia altas porcentagens de

plantas sadias oriundas de material doente do clone suscetível RB739331 e variedade NA56-79. Esta cura é comparativamente maior quando as plantas infectadas ficam, durante a termoterapia, em luz contínua e se faz aplicação prévia de ácido giberélico.

- a metodologia de cura de escaldadura das folhas por termoterapia *in vivo* e cultura de ápice meristemático, é uma opção complementar para a formação de viveiros matrizes de cana-de-açúcar com maior nível de sanidade.

LITERATURA CITADA

- AKIBA, F., 1978. Isolamento, inoculação e sobrevivência de *Xanthomonas albilineans* e avaliação de resistência à Escaldadura das folhas em cana-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP, 97p. (Dissertação de Mestrado).
- ANTOINE, R., 1965. Testing the reaction to major diseases of sugar cane seedlings during selection. In: Proceedings of the XII Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, San Juan, p. 1178-1182.
- ARRUDA, S.C., 1944. A escaldadura das folhas; doença da Cana-de-açúcar, nova no Brasil. Arq. Inst. Biol. São Paulo, 15:141-199.
- BAILEY, R.A., 1976. Heat treatment and leaf scald. Sugarcane Pathologists' Newsletter. Réduit, (17):14-16.

- BAKER, K.F., 1962. Thermotherapy of planting material. Phytopathology. St. Paul, 52:1244-1255.
- BAKER, K.F. e R.G. LINDERMAN, 1979. Unique features of the pathology of ornamental plants. Ann. Rev. Phytopathol. Palo Alto, 17:253-277.
- BAKER, R. e D.J. PHILLIPS, 1962. Obtaining pathogen-free stock by shoot tip culture. Phytopathology. St. Paul, 52: 1242-1244
- BELL, A.R. e W. CONTRELL-DORMER, 1932. An improved method for isolation of leaf scald organism. In: Proceedings of the IV Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, San Juan, p. 72-80.
- BISESSAR, S., 1970. Grading sugarcane varieties for resistance to leaf scald in Guyana. Sugarcane Pathologists' Newsletter. Réduit, (4):38.
- BREED, R.S.; E.G.D. MURRAY e N.R. SMITH, 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7th. ed. Baltimore, Williams & Wilkins Comp., 1094p.
- BRIEGER, F.O., 1970. Diseases and varieties. Sugarcane Pathologists' Newsletter. Réduit, (4):26.
- BUCHANAN, B.B.; S.W. HUTCHESON; A.C. MAGYAROSY e P. MONTALBINI, 1981. Photosynthesis in healthy and diseased plants. In: AYRES, P.G. (Ed.). Effects of disease in the physiology of the growing plant. New York, Cambridge University Press, p.13-28.
- BULL, T.A., 1964. The effects of temperature, variety and

- age on the response of *Saccharum* spp to applied gibberellic acid. Australian Journal of Agricultural Research. Melbourne, 15:77-84.
- CHAGAS, P.R.R., 1986. Método de coloração do xilema pelo fluxo transpiratório aplicado na determinação de infecção do raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP, 123 p. (Dissertação de Mestrado).
- CHEN, W.H.; M.C. LIU e C.Y. CHAO, 1979. The growth of sugarcane downy mildew fungus in tissue culture. Can. J. Bot. Ottawa, 57:528-533.
- DAL PICCOLO, C.R.; S. MATSUOKA e Y. MASUDA, 1980. Translocação do herbicida "Roundup" pelo tolete de cana-de-açúcar e sintomas colaterais causados. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 95:200-207.
- DALY, J.M., 1976. The carbon balance of diseased plants; changes in respiration, photosynthesis and translocations. In: HEITEFUSS, R. e P.H. WILLIAMS (Eds.). Physiology Plant Pathology. New York, Springer-Verlag, Vol. 3. p.450-479.
- DANTAS, B., 1958. A escaldadura das folhas de cana-de-açúcar. Recife, Comissão de Combate às Pragas de Cana-de-Açúcar no Estado de Pernambuco, 9p. (Publicação, 7).
- DEAN, J.L., 1974. A method for isolating *Xanthomonas albilineans* from sugarcane leaves. Plant Dis. Repr. Washington, 58:439-441
- DE FAZIO, G.M., 1976. A cultura de tecidos vegetais - pers-

pectivas para sua utilização prática em fitopatologia.
Summa Phytopathologica. Piracicaba, 2:145-153.

DIMOCK, A.W., 1962. Obtaining pathogen-free stock by cultured cutting techniques. Phytopathology. St. Paul, 52: 1239-1241.

DOWSON, W.J., 1943. On the generic names *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Bacterium* for certain bacterial plant pathogens. Trans. Brit. Mycol. Soc. Cambridge, 26:4-14

EGAN, B.T., 1968. Evaluation of the aluminum-cap method for leaf scald disease resistance testing in Queensland. In: Proceedings of the XIII Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Taiwan, p.1153-1158.

EGAN, B.T., 1970. Leaf scald disease of sugarcane. Sugarcane Pathologists' Newsletter. Réduit(5):28.

EGAN, B.T., 1971a. Breeding for resistance to leaf scald disease. In: Proceedings of the XIV Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, New Orleans, p.920-924.

EGAN, B.T., 1971b. The decline of leaf scald as a major disease in Northern Queensland. In: Proceedings of the XXXVIII Conference of the Queensland Society of Sugar Cane Technologists, Cairns, p.157-161.

EGAN, B.T. e O.W. STURGESS, 1980. Commercial control of leaf scald disease by thermotherapy and a clean seed programme. In: Proceedings of the XVII Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Manila, p.1602-1606.

- EIRA, A.F., 1972. Fatores que interferem na triagem das variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) ao *Fusarium moniliforme* SHELDON, agente causal do "Pokkah Boeng". Botucatu, F.C.M.B./UNESP, 50p. (Tese de Doutorado)
- FRIDLUND, P.R., 1962. An inexpensive heat chamber for curing virus diseased plants. Plant Dis. Repr. Washington, 46: 703-705.
- GOHEEN, A.C.; C.F. LUHN e W.B. HEWITT, 1965. Inactivation of grapevine viruses in vivo. In: Proceedings of the International Conference Virus Vector Perennial Hosts, Davis, p.255-265.
- GOHEEN, A.C.; J.R. MCGREW e J.B. SMITH, 1956. Tolerance of strawberry plants to hot-water therapy. Plant. Dis. Repr. Washington, 40:446-451.
- GONÇALVES, M.B., 1984. Efeitos da Giberelina e Ethefon no crescimento inicial, nutrição mineral, morfologia e anatomia da cana-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP, 123p. (Dissertação de Mestrado)
- HAMID, A. e S.B. LOCKE, 1961. Heat inactivation of leaf-roll virus in potatoes tubers tissues. Am. Potato J. Orono, 38:304-310
- HANDJOJO, H., 1984. Resistance testing against mosaic, leaf scald and smut disease in Indonesia. ISSCT Pathology Workshop, Beltsville, Oct.28 - Nov. 2 (Abstracts).
- HENDRE, R.R.; R.S. IYER; M. KOTWAL; S.S. KHUSPE e A.F. MASCA RENHAS, 1983. Rapid multiplication of sugar cane by

- tissue culture. Sugar Cane. High Wicombe, 1:5-8.
- HOLLINGS, M., 1965. Disease control through virus-free stocks. Ann. Rev. Phytopathol. Palo Alto, 3:367-396.
- HOLLINGS, M. e O.M. STONE, 1968. Techniques and problems in the production of virus testing planting material. Sci. Hort. Amsterdam, 20:57-72.
- HUGHES, C.G., 1968. Transmission of leaf scald by soil leachate. Sugarcane Pathologists' Newsletter. Réduit,(1): 27-28.
- HUTCHINSON, P.B. e J.R. ROBERTSON, 1953. Leaf scald in British Guyana. In: Proceedings of the VIII Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Brisbane, p.877-884.
- KAISER, W.J., 1980. Use of thermotherapy to free potatoes tubers of alfafa mosaic, potato leaf roll and tomato black ring viruses. Phytopathology. St. Paul, 70:1119-1122.
- KOIKE, H., 1965. The aluminum-cap method for testing sugar cane varieties against leaf scald disease. Phytopathology. St. Paul, 55:317-319.
- KOIKE, H., 1971. Testing sugarcane varieties for leaf scald disease resistance. In: Proceedings of the XIV Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, New Orleans, p.909-919.
- LEBEN, C., 1981. Control of *Pseudomonas lachrymans* in cucumber seed by a temperature-relative humidity method. Phytopathology. St. Paul, 71(2):235 (Abstracts)

- LEE, T.S.G., 1985. Micropropagação da cana-de-açúcar através de cultura de meristema apical. Araras, IAA/PLANALSUCAR. COSUL, 12p.
- LÉOVILLE, F. e A. COLÉNO, 1976. Détection de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, agent de l'échaudure de la canne à sucre dans des boutures contaminées. Ann. Phytopathol. Versailles, 8:233-236.
- LEU, L.S., 1972. Freeing sugarcane from mosaic virus by apical meristem culture and tissue culture. Rep. Taiwan Sugar Res. Inst. Tainan, (57):57-63.
- LIU, M.C., 1981. In vitro methods applied to sugar cane improvement. In: THORPE, T.A. (Ed.) Plant tissue culture; methods and applications in agriculture. New York, Academic Press, p.299-323.
- LIU, M.C.; W.H. CHEN e S.C. SHIH, 1980. Sites of sugarcane callus formation in young leaf and stem tip explants. In: Proceedings of the XVII Congress of International Society of Sugar Cane Technologists, Manila, p.458-469.
- LIU, P.B.W. e J.B. LOY, 1976. Action to gibberellic acid on cell proliferation in the sub apical shoot meristem of watermelon seedlings. Amer. J. Bot. New York, 63:700-704
- LOZANO, J.C. e L. SEQUEIRA, 1974. Bacterial blight of cassava in Colombia; epidemiology and control. Phytopathology. St. Paul, 64:83-88
- MARTIN, J.P. e P.E. ROBINSON, 1961. Leaf scald. In: MARTIN, J.P.; E.V. ABBOTT e C.G. HUGHES (Ed.) Sugarcane diseases

- of the world. New York, Elsevier, 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)
- MASUDA, Y. e H. TOKESHI, 1978. A useful method for diagnosis and isolation of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, causal agent of leaf scald in sugarcane. Sugarcane Pathologists' Newsletter. Réduit, (20):22-23.
- MASUDA, Y.; H. ARIZONO; S. MARTINS e S. MATSUOKA, 1983. Selection of sugarcane clones resistant to leaf scald disease starting at the seedling stage. Summa Phytopathologica. Piracicaba, 9:21-22
- MASUDA, Y.; S. MARTINS; H. ARIZONO, J.E.T. BARCELLOS, J. ABRA MO Fº; S. MATSUOKA e H. TOKESHI, 1984. Seleção precoce de clones resistentes à escaldadura das folhas. In: Anais do III Congresso Nacional da STAB e V Convenção da ACTALAC, São Paulo, p.235-239.
- 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).
- MIKKELSEN, E.P. e P.M. HASEGAWA, 1981. Propagation of higher plants through tissue culture: emerging technologies and strategies - Report of the round-table discussion on ornamentals. Environmental and Experimental Botany. Elmsford, 21:411-413.

- MORALES, R.C., 1977. Influence of various levels of light intensity on sugarcane differentiation and plantlet development in vitro. The Philippine Journal of Crop Science, 2:180-194.
- MOREL, G., 1975. Meristem culture techniques for the long-term storage of cultivated plants. In: FRANKEL, O.H. e J.G. HAWKES (Ed.) Crop genetic resources for today and tomorrow. Cambridge, Univ. Press, p.327-332.
- MURASHIGE, T., 1974. Plant propagations through tissues culture. Ann. Rev. Plant Physiol. Palo Alto, 25:135-165.
- NORSE, D., 1973. A quantitative inoculation technique for screening sugarcane varieties for resistance to leaf scald. Plant Dis. Repr. Washington, 57:582-583.
- NYLAND, G. e A.C. GOHEEN, 1969. Heat therapy of virus diseases of perennial plants. Ann. Rev. Phytopathol. Palo Alto, 7:331-354.
- OLIVEIRA, A.R.; T. NAKAMURA, H.P. LIU e M.H. SUGIMORI, 1977. Serological tests applied to leaf scald disease of sugarcane. In: Proceedings of the XVI Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, São Paulo, p.459-468.
- PANIZZI, R.C., 1983. Obtenção de inóculo de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson in vitro e metodologia de inoculação. Piracicaba, ESALQ/USP, 95p. (Dissertação de Mestrado).
- PÉROMBELON, M.C.M. e A. KELMAN, 1980. Ecology of the soft

- rot Erwinias. Ann. Rev. Phytopathol. Palo Alto, 18: 361-387.
- PERSLEY, G.J., 1971. A progress report on leaf scald investigations. In: Proceedings of the XXXVIII Conference of the Queensland Society of Sugar Cane Technologists, Cairns, p. 163-168.
- PERSLEY, G.J., 1972. Isolation methods for the causal agent of leaf scald disease. Sugarcane Pathologists' Newsletter. Réduit, (8):24.
- PERSLEY, G.J., 1973a. Epiphytology of leaf scald in the central district of Queensland. Sugarcane Pathologists' Newsletter. Réduit, (10):30-31.
- PERSLEY, G.J., 1973b. Naturally occurring alternative hosts of *Xanthomonas albilineans* in Queensland. Plant. Dis. Repr. Washington, 57:1040-1042.
- QUAK, F., 1961. Heat treatment and substances inhibiting virus multiplication in meristem culture to obtain virus-free plants. Advan. Hort. Sci., 1:144-148.
- RICAUD, C., 1962. Cane diseases: a method for inoculating leaf scald in field trials. Ann. Rep. Sugar Ind. Res. Inst. Mauritius 1961. Port Louis, :55-56
- RICAUD, C., 1974. Problems in the diagnoses of ratoon stunting disease. In: Proceedings of the XV Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Durban, p.241-249.
- RICAUD, C. e M.E. PAULO, 1970. Leaf scald. Ann. Rep. Mauri-

- tius Sug. Ind. Res. Inst. Port Louis, :87-92.
- RICAUD, C.; C. SULLIVAN; S. FÉLIX e P. FERRÉ, 1977. Comparison of serological and inoculation methods for detecting latent infection of leaf scald. In: Proceedings of the XVI Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, São Paulo, p.439-448.
- RICAUD, C.; S. SULLIVAN; S. FÉLIX e P. FERRÉ, 1978. A rapid technique for confirming leaf scald diagnosis. Sugarcane Pathologists' Newsletter. Réduit, (21):7.
- ROTH, G., 1969. The elimination of the virus disease, streak, by thermotherapy and tissue culturing. In: Proceedings of the XLIII Congress of the South African Sugar Technologists Association, Mount Edgecombe, p.66-71.
- ROTT, P., 1984. Apport des cultures in vitro a l'étude de l'échaudure des feuilles de canne à sucre (*Saccharum* sp.) causée par *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. Université de Paris-Sud, Centre D'Orsay, 185p. (Thèse Docteur 3e Cycle).
- ROTT, P. e P. CHAGDWARDIEFF, 1984. Inoculation de la canne à sucre (*Saccharum* sp.) cultivée in vitro avec *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. L'Agronomie Tropicale. Paris, 39:89-92.
- RYAN, C.C.; D.M. HOGARTH e B.J. CROFT, 1980. Leaf scald, ratings of foreign and comercial varieties in Queensland. Sugarcane Pathologists' Newsletter. Réduit, (24):16-18.
- SATYANARAYANA, Y. e M. ACHUTARAMA RAO, 1981. Further report

on leaf scald disease of sugarcane in Andhra Pradesh (India). Sugarcane Pathologists' Newsletter. Réduit, (25): 16-17.

SCOWCROFT, W.R., 1977. Somat cell genetics and plant improvement. In: N.C. BRADY (Ed). Advances in Agronomy. New York, Academic Press, p.39.

STACE-SMITH, R. e F.C. MELLOR, 1968. Erradication of potato viruses X and S by thermotherapy and axillary bud culture. Phytopathology. St. Paul, 58:199-203.

STEINDL, D.R.L., 1965. Testing sugarcane varieties for disease resistance at the Bureau Pathology Farm, Queensland. In: Proceedings of the XII Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, San Juan, p.1133-1137.

STEINDL, D.R.L., 1971. The elimination of leaf scald disease from infected plant material. In: Proceedings of the XIV Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Brisbane, p.925-929.

STUBBS, L.L., 1963. Phytotron cabinet for heat-therapy studies with virus infected plants. Commonwealth Phytopathol. News., 9:49-52.

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).

- Ten HOUTEN, J.G.; F. QUAK e F.A. vander MEER, 1968. Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free plant material. Neth. J. Plant. Pathol. Wageningen, 74:17-24.
- THOMPSON, V., 1982. A rapid method of testing the resistance of sugarcane to leaf scald disease. Sugarcane Pathologists' Newsletter. Réduit, (29):34-35.
- THOMSON, A.D., 1956. Heat treatment and tissue culture as a means of freeing potatoes from virus Y. Nature. London, 177:709
- THURSTON, H.D., 1980. International potatoe disease research for developing countries. Plant Disease. St. Paul, 64:252-257.
- TOKESHI, H., 1980. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F.; P.C.T. CARVALHO; H. TOKESHI; E. BALMER; H. KIMATI; C.O.N. CARDOSO; C.L. SALGADO; T.L. KRUGNER; E.J.B.N. CARDOSO e A. BERGAMIN Fº (Eds) Manual de Fitopatologia; doenças das plantas cultivadas. São Paulo, Ed. Agron. Ceres, v.2, Cap. 12, p.141-206
- TUITE, J., 1969. Plant pathological methods; fungi and bacteria. Minneapolis, Burgess, 239p.
- 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).
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M., 1979. Relações entre *Xanthomo-*

- nas albilíneas, Erwinia herbicola e Pseudomonas* sp em cana-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP, 77p. (Dissertação de Mestrado).
- VIEIRA, I.M.S., 1983. Cultura de tecidos de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp). Piracicaba, ESALQ/USP, Departamento de Genética, 52p. (Trabalho de Revisão Bibliográfica).
- WILBRINK, G., 1920. De Gomziekte van net sui Rerriit, hare Oorzaak em hare Bestrijding. Arch. Suikerindus Ned.Indie. 28:1389-1525.
- WISMER, C.A., 1969. Methods for testing the resistance of sugarcane disease. (6) Leaf scald. Sugarcane Pathologists' Newsletter. Réduit, (2):24-26.
- WISMER, C.A. e H. KOIKE, 1965. Testing sugarcane varieties against eye spot, brown spot, red rot, and leaf scald disease in Hawaii. In: Proceedings of the XII Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, San Juan, p.1144-1153.