BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO RAQUITISMO DAS
SOQUEIRAS DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* sp.) E
AVALIAÇÃO DO CAPIM ELEFANTE (*Pennisetum purpureum*
Schum.) COMO INDICADORA

SHINOBU SUDO

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 Fitopatologia.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Junho, 1980

À memória de meu pai,
à minha mãe e meus irmãos,
à minha esposa e filhos,

D E D I C O.

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

O autor expressa seus agradecimentos:

- Ao Professor Dr. HASIME TOKESHI, pela valiosa orientação, de dicação e estímulo;
- Aos Professores do Departamento de Fitopatologia, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, pelas importantes sugestões e estímulo;
- À EMBRAPA, pelas facilidades concedidas durante o período da realização do Curso;
- Aos Professores Charles Frederick Robbs e Osamu Kimura, da UFRRJ, pela colaboração na determinação de bactérias e fornecimento de culturas bacterianas e material bibliográfico;
- Ao Engº-Agrº Alonzo Keese Dodson, pela contribuição em estí mulo e importantes sugestões;
- Ao Engº-Agrº Dr. Álvaro Sanguino, da COPERSUCAR, pela contribuição em coleta de materiais e importantes sugestões;
- Ao Professor M.S. Fujio Akiba, da UFRRJ, pelas sugestões e estímulo;
- Ao Engº-Agrº M.S. Yodiro Masuda, do IAA-PLANALSUCAR, pelas sugestões e estímulo;

- Ao Professor Dr. Raul de Lucena Duarte Ribeiro, da UFRRJ, pelas sugestões e revisão dos originais;
- Ao Eng^o-Agr^o Dr. Sizuo Matsuoka, do IAA-PLANALSUCAR, pelas importantes informações e material bibliográfico;
- Ao Sr. José Ferreira da Costa, da EMBRAPA, pela colaboração na análise estatística dos experimentos;
- A COPERSUCAR e IAA-PLANALSUCAR, pelas contribuições no fornecimento de cultivares de cana-de-açúcar utilizadas e material bibliográfico;
- Ao Instituto Zimotécnico da ESALQ e Departamento de Fitopatologia da FCMBB, pelo fornecimento de material utilizado;
- Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pela colaboração nos trabalhos de laboratório e campo;
- Aos Funcionários da Secretaria do Curso de Pós-graduação da ESALQ, pela correspondência remetida e informações prestadas;
- As Sras. Jacy da Silva, Euza da Rocha Masullo e Flora Maria de Souza Cardoso, pela colaboração prestada.

Í N D I C E

	Pág.
1 - RESUMO	1
2 - INTRODUÇÃO	4
3 - REVISÃO DE LITERATURA	8
3.1 - Agente causal do RSD	8
3.2 - Sintomas para diagnose do RSD	11
3.3 - Inativação térmica "in vivo" e "in vitro" do agente causal do RSD	15
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 - Isolamento de bactérias de colmos de ca- na-de-açúcar com sintomas de RSD	20
4.1.1 - Características dos materiais e mé- todos de isolamento	20
4.1.2 - Identificação das bactérias isola- das de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD	23
4.1.3 - Teste de patogenicidade das bactê- rias isoladas de colmos de cana-de- açúcar com sintomas de RSD	23
4.1.4 - Avaliação das populações de <i>Erwinia</i> <i>herbicola</i> presentes no caldo obtido dos nós de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD	26
4.1.5 - Isolamento de bactérias de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD, após o tratamento térmico dos toletes	27

4.1.6 - Ponto de inativação térmica "in vi tro" das bactérias isoladas de col mos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD	28
4.2 - Especificidade do teste de capim Elefan- te na diagnose do RSD da cana-de-açúcar ...	29
4.2.1 - Reação do capim Elefante à inocula ção com algumas bactérias fitopato gências	31
4.2.2 - Reação do capim Elefante à inocula ção com bactérias e fungos isola - dos de cana-de-açúcar e leveduras encontradas em destilarias de aguar dente de cana-de-açúcar	32
4.2.3 - Reação do capim Elefante à <i>Fusarium</i> <i>moniliforme</i> , <i>Candida cruzei</i> , <i>Han</i> <i>senula anomala</i> e <i>Saccharomyces ce</i> <i>revisiae</i> , inoculados, em diferen - tes concentrações	33
4.2.4 - Reação do capim Elefante à inocula ção com bactérias isoladas de col mos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD, em diferentes concentrações .	34
4.2.5 - Reação do capim Elefante ao caldo extraído e às bactérias isoladas de colmos de cana-de-açúcar com sinto mas de RSD, submetidas ou não à ina tivação térmica	35

	Pág.
5 - RESULTADOS	37
5.1 - Isolamento de bactérias dos colmos de <u>ca</u> na-de-açúcar com sintomas de RSD	37
5.1.1 - Características das bactérias iso- ladas dos colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD	37
5.1.2 - Identificação das bactérias isola- das de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD	39
5.1.3 - Teste de patogenicidade das bactê- rias isoladas de colmos de cana-de açúcar com sintomas de RSD	39
5.1.4 - Avaliação das populações de <i>Erwi</i> - <i>nia herbicola</i> presentes no caldo ob- tido dos nós de colmos de cana-de- açúcar com sintomas de RSD	40
5.1.5 - Isolamento de bactérias de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD, após o tratamento térmico dos toletes	41
5.1.6 - Ponto de inativação térmica "in <u>vi</u> tro" das bactérias isoladas de col- mos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD	42
5.2 - Especificidade do teste de capim Elefan- te na diagnose do RSD de cana-de-açúcar ...	43
5.2.1 - Reação do capim Elefante à inocula- ção com algumas bactérias fitopato- gênicas	43

5.2.2 -	Reação do capim Elefante à inoculação com bactérias e fungos isolados de cana-de-açúcar e leveduras encontradas em destilarias de aguardente de cana-de-açúcar	44
5.2.3 -	Reação do capim Elefante à <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Candida cruzei</i> , <i>Hansenula anomala</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inoculados, em diferentes concentrações	44
5.2.4 -	Reação do capim Elefante à inoculação com bactérias isoladas de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD em diferentes concentrações ..	45
5.2.5 -	Reação do capim Elefante ao caldo e às bactérias isoladas de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD submetidos ou não à inativação térmica	46
6 -	DISCUSSÃO	47
6.1 -	Caracterização de bactérias associadas ao RSD da cana-de-açúcar	47
6.2 -	Validade do teste com capim Elefante para diagnose do RSD da cana-de-açúcar	55
7 -	CONCLUSÕES	58
8 -	SUMMARY	60
9 -	LITERATURA CITADA	63

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1 - Tratamentos empregados no teste de patogenicidade de bactérias isoladas de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD ..	74
TABELA 2 - Bactérias fitopatogênicas usadas para testar a reação do capim Elefante	75
TABELA 3 - Organismos usados para testar a reação do capim Elefante à inoculação com bactérias e fungos isolados da cana-de-açúcar, e leveduras encontradas em destilarias de aguardente de cana-de-açúcar	76
TABELA 4 - Tratamentos empregados para testar a reação do capim Elefante à inoculação com diferentes concentrações de: <i>Candida cruzi</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>Hansenula anomala</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	77
TABELA 5 - Tratamentos usados no teste de reação do capim Elefante à inoculação com diferentes concentrações de bactérias isoladas dos colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD	77
TABELA 6 - Tratamentos empregados para testar a reação do capim Elefante à inoculação com caldo extraído e com bactérias isoladas de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD, submetidos ou não à inativação térmica	78

TABELA 7 -	Teste de patogenicidade das bactérias isoladas de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD, em cana-de-açúcar, cultivar CP 44-101	79
TABELA 8 -	Populações de <i>E. herbicola</i> (C 1) em caldo obtido dos nós de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD	80
TABELA 9 -	Ponto de inativação térmica "in vitro" das bactérias isoladas de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD	81
TABELA 10 -	Descoloração vascular do capim Elefante após inoculação com algumas bactérias fitopatogênicas	82
TABELA 11 -	Descoloração vascular do capim Elefante após a inoculação com bactérias e fungos isolados de cana-de-açúcar e com leveduras mais comumente encontradas em destilarias e aguardente de cana-de-açúcar	83
TABELA 12 -	Descoloração vascular do capim Elefante após inoculação com <i>F. moniliiforme</i> e diversas leveduras, em diferentes concentrações	84
TABELA 13 -	Descoloração vascular do capim Elefante após inoculação com diferentes concentrações de bactérias isoladas de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD	85

TABELA 14 - Descoloração vascular do capim Elefante após a inoculação com caldo extraído e com bactérias isoladas de colmos de ca- na-de-açúcar com sintomas de RSD , sub- metidas ou não à tratamento térmico	86
--	----

1 - RESUMO

Estudos realizados a partir de material de cana-de-açúcar com sintomas de raquitismo das soqueiras ("Ratoon Stunting Disease") revelaram a presença de bactérias identificadoras como *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *E. herbicola* foi constatada em todas as cultivares trabalhadas: IAC 52/326 , Q 28 , CP 44-101 , CB 41-76 , CB 49-260 e IAC 48/65 , ao passo que *P. rubrisubalbicans* só foi detectada nas cultivares IAC 52/326 , Q 28 e CP 44-101. A patogenicidade dessas bactérias foi aferida, inoculando-se plantas de cana-de-açúcar, cultivar CP 44-101, que mostraram sintomas internos de descoloração vascular associados ao raquitismo das soqueiras.

Avaliações das populações de *E. herbicola* presentes no caldo extraído da região nodal de colmos de cana-de-açúcar com sintomas da doença revelaram níveis da ordem de $1,2$ a $2,8 \cdot 10^8$ e $0,7$ a $3,8 \cdot 10^6$ células viáveis por mililitro pa

ra as cultivares IAC 48/65 e IAC 52/326, respectivamente.

Os resultados do estudo sugeriram que *E. herbicola* deve estar envolvida na etiologia do raquitismo das soqueiras e que *P. rubrisubalbicans* merece ser melhor investigada sob esse ângulo. *E. herbicola* revelou estar constantemente associada com material doente, reproduziu parte dos sintomas quando inoculada em cana-de-açúcar e atingiu populações relativamente altas em tecidos do colmo.

Isolamentos efetuados após o tratamento térmico de toletes originados de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD, a 50,5°C por duas horas, indicaram que esse tratamento foi capaz de proporcionar inativação total de *P. rubrisubalbicans*, porém, inativação apenas parcial no que tange a *E. herbicola*.

Tratamento térmico em água quente de *E. herbicola* e *P. rubrisubalbicans*, "in vitro", revelou que *P. rubrisubalbicans* é completamente inativada quando submetida à temperatura de 50°C por 20 minutos, enquanto que, para *E. herbicola* e para igual período de imersão, temperaturas de até 52°C não foram suficientes para inativação total. Para essa última espécie, inativação total somente foi obtida à temperatura de 54°C.

Para aquilatar a validade do teste de capim Elefante (MATSUOKA, 1972a) na diagnose do RSD, foram conduzidos vários ensaios, inoculando-se plantas da cultivar Merker dessa gramínea com diversas espécies de bactérias, fungos e leveduras. O capim Elefante reagiu positivamente, através do apare

cimento de descoloração vascular, quando inoculado com *Erwinia herbicola*, *E. carotovora*, *Pseudomonas rubrisubalbicans*, *P. rubrilineans*, *P. mori*, *Xanthomonas albilineas*, *Fusarium moniliiforme*, *Candida cruzei*, *Hansenula anomala* e *Saccharomyces cerevisiae*. Os sintomas internos observados pareceram idênticos àqueles induzidos na planta-teste quando inoculada com caldo bruto extraído de colmos de cana-de-açúcar com raquitismo das soqueiras. Foi observado também que a intensidade da reação do capim Elefante depende do microorganismo inoculado e do número de propágulos presentes no inóculo. A concentração mais baixa capaz de induzir resposta positiva foi de, aproximadamente, 10^1 propágulos por mililitro de suspensão, conseguida com *F. moniliiforme*. Esses dados somaram evidências de que o capim Elefante reage inespecificamente, por descoloração dos vasos da região dos nós, não sendo, portanto recomendado como indicadora para diagnóstico do raquitismo das soqueiras.

2 - INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é uma das explorações agrícolas de mais ampla distribuição geográfica, revestindo-se de grande importância econômica e social. As inúmeras empresas e instituições que subsistem em função da cana-de-açúcar na produção e transformação do açúcar, geram através dessa atividade riquezas de considerável expressão, tanto em divisas, como em empregos, beneficiando, assim, todos os países onde é cultivada em grande escala.

O Brasil, como maior produtor mundial de açúcar de cana e em decorrência da escassez e carestia do petróleo, parte agora para a produção em escala comercial de álcool combustível, programa este que, certamente, contribuirá para grande economia de divisas, reduzindo as importações de petróleo. Dentro da execução dessa programação, vários projetos já estão em andamento e muitos outros em fase de planejamento, visando à expansão da cultura, bem como a implantação

de novas usinas e destilarias de álcool.

Contudo, a produtividade da cana-de-açúcar no Brasil está ainda muito aquém daquelas conseguidas no Hawaí, na África do Sul ou na Austrália. Sem dúvida alguma, um dos fatores que mais concorrem para nossa baixa produtividade é representado pelo conjunto de doenças e pragas que incidem sobre os canaviais.

Das inúmeras doenças que afetam a cana-de-açúcar, o raquitismo das soqueiras (RSD), representa uma das mais importantes. Segundo GALLI *et alii* (1968) essa enfermidade pode causar uma queda de produção da ordem de 20 a 60%.

O raquitismo das soqueiras foi constatado inicialmente na Austrália por volta de 1944 - 1945 (STEINDL e RUGHES, 1953), causando quebras na tonelagem de soqueiras da cultivar Q 28. Atualmente, a doença está disseminada por todas as regiões do Globo que se dedicam à cultura de cana-de-açúcar. No Brasil, os primeiros relatos de raquitismo das soqueiras foram os de VEIGA (1956) e DANTAS (1956).

Durante muitos anos o agente incitante da doença foi considerado como de natureza viral. No entanto, a partir de 1970, muitos pesquisadores passaram a manifestar dúvidas a esse respeito. Dentre eles, STEIB e TANTERA (1970), referiram-se à possibilidade da associação de um micoplasma com a moléstia. PLAUSIC-BANJAC e MARAMOROSHI (1972), GIL - LASPIE JR. *et alli* (1973) e TEAKLE *et alii* (1974) encontraram constante associação de bactérias com plantas apresentanan

do sintomas da doença. De canas com raquitismo, LIU *et alii* (1974) isolaram uma bactéria similar a *Xanthomonas vasculorum* e TOKESHI *et alii* (1974), uma outra bactéria com características idênticas a *X. albilineans*. Vários outros autores como CHEM *et alii* (1975), GILLASPIE JR. *et alii* (1976), DAMANN e DERRICK (1976), RICAUD *et alii* (1976) e MAMIUNTEN e WAKIMOTO (1976), relataram uma constante associação de bactérias corineformes com plantas afetadas pela doença. Assim, atualmente desenvolveu-se um consenso geral de que o RSD é uma doença de etiologia bacteriana. Todavia, existem ainda dúvidas quanto à identidade da bactéria ou bactérias que causam a enfermidade.

Por outro lado, a difícil diagnose da doença conduziu vários pesquisadores a investigar métodos mais práticos, rápidos e eficientes para detectar plantas afetadas. Alguns deles como STEINDL e HUGHES (1953), SCHEXNAYDER (1960), GILLASPIE JR. *et alii* (1966) e RICAUD (1974) recorreram a inoculações em cultivares de cana-de-açúcar suscetíveis que mostrassem sintomas precoces de raquitismo. Outros, como GILLASPIE JR. *et alii* (1973), STEINDL e TEAKLE (1974) e STEINDL (1976), recorreram ao exame de material suspeito no microscópio eletrônico ou de contraste de fase. MATSUOKA (1972a) desenvolveu um método de diagnose rápido do raquitismo utilizando o capim Elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. CV. Merker) como planta indicadora. No entanto, BETTI *et alii* (1976) contestaram os resultados de MATSUOKA (1972a), mencionando que vā-

rias espécies bacterianas eram capazes de provocar sintomas semelhantes em capim Elefante quando veiculadas através do suco extraído de touceiras de cana doentes.

O presente trabalho teve como objetivos principais:

1) contribuir para a identificação de bactérias associadas aos sintomas de raquitismo das soqueiras ; e 2) determinar a reação e a sensibilidade do capim Elefante em relação à inoculação com diversos microorganismos, devidamente identificados, passíveis de mascarar a diagnose da doença pelo método preconizado por MATSUOKA (1972a).

Nesta pesquisa, o raquitismo das soqueiras é sempre referido como RSD , sigla esta derivada de "Ratoon Stunting Disease" , designação aceita e empregada internacionalmente no trato científico com a enfermidade.

O mesmo foi desenvolvido no Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" , da Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - Agente Causal do RSD

Segundo STEINDL e HUGHES (1953) o RSD ("Ratoon Stunting Disease"), foi observado pela primeira vez em Queensland, na Austrália, no distrito de Makay, por volta dos anos 1944 - 1945. A doença incidia sobre a cultivar Q 28 e os sintomas apresentados eram traduzidos por um crescimento subnormal e irregular da soqueira. No Brasil, as primeiras constatações são de VEIGA (1956), em Campos, no Estado do Rio de Janeiro e de DANTAS (1956) em Pernambuco. Atualmente a enfermidade está disseminada por todos os Estados do Brasil e por todos os países canavieiros do mundo (GALLI *et alii*, 1968).

Conforme relatam STEINDL (1961) , CARVALHO (1963), e GALLI *et alii* (1968), a rápida propagação da doença por todas as regiões de cana-de-açúcar do mundo, deve-se, principal

mente, às constantes trocas de material vegetativo entre os principais países produtores.

Pela dificuldade de se visualizar quaisquer microorganismos associados aos sintomas e pela sua fácil transmissibilidade para plantas sadias, durante longo tempo, muitos autores como STEINDL e HUGHES (1953) , HUGHES e STEINDL (1955), SCHEXNAYDER (1956) , FORBES *et alii* (1960) , LING (1960) , TODD (1960) , STEINDL (1961) , ADSUAR e ROSA (1962) , CARVALHO (1963) , GILLASPIE *et alii* (1966) , EL-BANNA e MOURSI (1967) , GALLI *et alii* (1968) , GILLASPIE (1970a e 1970b , 1971) e ZUMMO (1974), consideraram o agente causal do RSD como sendo, possivelmente, um vírus. STEIB e TANTERA (1970), foram os primeiros a estabelecer dúvidas quanto à etiologia viral da doença referindo-se à possível associação de um micoplasma com os sintomas de RSD.

Vários trabalhos sucederam-se, como os de PLAUSIC - BANJAC e MARAMOROSCH (1972) , GILLASPIE JR. *et alii* (1973) , TEAKLE *et alii* (1974) , TEAKLE (1974) , GILLASPIE JR. (1974) e GILLASPIE JR. *et alii* (1974), mostrando existir constante associação de bactérias com plantas apresentando sintomas de RSD. Em Porto Rico, LIU *et alii* (1974) isolaram uma bactéria de plantas com sintomas de RSD, considerada similar a *Xanthomonas vasculorum*. TOKESHI *et alii* (1974), por seu turno, isolaram uma bactéria com características semelhantes a *X. albilineans* e a responsabilizaram como possível agente causal do RSD, mostrando, ainda, que a diferença entre as estirpes dessa espécie -

cie associadas com a escaldadura e com o RSD, residia apenas nas temperaturas requeridas para inativação. Trabalhos mais recentes de CHEN *et alii* (1975) , GILLASPIE JR. *et alii* (1976). DAMMAN e DERRICK (1976) , RICAUD *et alii* (1976) e MAMIUNTEN e WAKIMOTO (1976), confirmam que uma bactéria corineforme encontra-se associada a plantas com RSD.

GILLASPIE JR. *et alii* (1976), estudando comparativamente as bactérias associadas ao RSD por diferentes pesquisadores, com aquelas achadas por eles na Louisiana, chegaram à conclusão de que há certa discrepância com respeito às dimensões desses organismos. Enquanto outros autores, citam valores variando entre 0,12 - 0,5 x 0,6 - 3,0 micrômetros, as células detectadas por GILLASPIE JR. *et alii* (1976) estão na faixa de 0,3 - 0,5 x 5,0 - 10,0 micrômetros.

BAILEY (1977), examinando plantas de três cultivares de cana-de-açúcar com RSD, verificou que a bactéria está presente em todas as partes da planta, sendo que nas regiões basais as populações eram sempre mais elevadas que nas partes superiores dos colmos. BAILEY (1977) notou ainda que essas populações variavam de acordo com a maior ou menor suscetibilidade da cultivar.

Apesar desses autores referirem-se ao envolvimento de bactérias com o RSD, a maioria deles não comprovou a patogenicidade dos microorganismos associados à doença. Apenas TOKESHI *et alii* (1974) o fizeram, utilizando-se, para tal, de plantas indicadoras e de cultivares de cana-de-açúcar recomendadas para diagnóstico do RSD.

3.2 - Sintomas para Diagnose do RSD

O RSD foi considerado, durante algum tempo, como doença sem sintomas característicos ou específicos que pudessem distinguí-lo de outras doenças que induzissem colmos atrofiados, subdesenvolvimento e variações na altura e no rendimento das plantas no campo. HUGHES e STEINDL (1955) descreveram, pela primeira vez, sintomas internos do RSD que, em determinadas cultivares, manifestam-se na forma de pontuações, vírgulas ou bastonetes rosados, amarelados ou avermelhados, nos feixes vasculares da região nodal de colmos maduros e que, em nós imaturos próximos ao meristema apical, apresentam coloração ligeiramente rósea, observados logo após efetuar-se o corte dos colmos doentes.

SCHEXNAYDER (1960) , STEINDL (1961) , GILLASPIE JR. *et alii* (1966) , CARVALHO (1963) , GALII *et alii* (1968) e MATSUOKA (1971 e 1972a) referem-se, também, aos sintomas acima descritos, em associação ao RSD.

HUGHES e STEINDL (1955) e GILLASPIE JR. *et alii* (1966) salientam que os sintomas internos de modificação de cor dos vasos, devem ser encontrados em vários nós dos colmos para diagnose segura do RSD e que pontuações castanho-avermelhadas, mais escuras, devem ser disconsideradas, uma vez que mesmo plantas sadias podem possuí-las. Mencionam ainda o fato de que os sintomas de RSD variam com a idade do colmo e com as condições climáticas das regiões de cultivo. STEINDL (1961) e ROSSLER (1974), submetendo cultivares de cana com RSD

a diferentes níveis de irrigação, confirmaram a existência de fatores que influenciam e dificultam o diagnóstico através de sintomas internos.

RICAUD (1974), referindo-se à diagnose do RSD, indica que muitos são os fatores que podem influenciar a manifestação dos sintomas e que, em determinadas condições, os sintomas internos não permitem uma interpretação acurada de suas causas. Devido às dificuldades para diagnose do RSD, sugere RICAUD (1974) que esforços devam concentrar-se no isolamento de seu agente causal e no desenvolvimento de métodos mais específicos para essa diagnose, objetivando confirmar a ocorrência da doença em diferentes regiões geográficas.

Para GILLASPIE JR. *et alii* (1973), o RSD da cana-de-açúcar pode ser diagnosticado pelo exame do exsudato do xilema ou do caldo extraído de canas doentes, empregando microscópios de contraste de fase ou de campo escuro, pela visualização da pequena e delgada bactéria associada à doença.

STEINDL e TEAKLE (1974), propõem a identificação do RSD através de quatro métodos: 1) existência de sintomas internos em plantas afetadas ; 2) reprodução do sintomas pela inoculação do caldo extraído de colmos doentes na cultivar Q 28 ; 3) manifestação de sintomas em plantas indicadoras como capim Elefante, clone Bana ; e 4) detecção de uma pequena bactéria no extrato da seiva da região fibro-vascular de canas afetadas, usando o microscópio eletrônico

STEINDL (1976) relatando um novo método para identificação de RSD, afirma que na seiva retirada a vácuo dos vasos e posteriormente concentrada por meio de centrifugação, é possível observar grande quantidade de diminutas e cilíndricas células bacterianas ao microscópio de fase, que evidenciam tratar-se do RSD. Friza, também, que esse método de diagnose é muito mais rápido e satisfatório do que aquele baseado no teste em capim Elefante ou na observação ao microscópio eletrônico. STEINDL (1976) recomenda o método para confirmação da diagnose, quando os exames rotineiros deixam dúvidas. No entanto, enfatiza que nenhum método é mais eficiente do que a inoculação do caldo na cultivar Q 28 de cana-de-açúcar.

Em decorrência dos problemas ligados à diagnose do RSD pela simples interpretação aos sintomas, vários pesquisadores têm recorrido a métodos de diagnose envolvendo a inoculação de plantas-teste. Assim, STEINDL e HUGHES (1953) utilizaram a cultivar Q 28 como indicadora; SCHEXMAYDER (1960), testou sete cultivares de cana, sendo que a CP 36-105 foi a que melhor se comportou, com 100% das plantas inoculadas apresentando reação positiva. Segundo GILLASPIE JR. *et alii* (1966), sintomas precoces de RSD foram exibidos mais nitidamente pela cultivar CP 44-101. MATSUOKA (1971 e 1972a) preconiza o uso do capim Elefante no diagnóstico do RSD, inoculando-se o caldo extraído de canas doentes ou suspeitas por meio de corte de palmito foliar. No caso de caldo proveniente de canas com RSD, as plantas-teste reagem mostrando descoloração dos vasos

da região basal do palmito inoculado, em apenas três semanas. RICAUD (1974), relata que a diagnose do RSD pode ser feita através da inoculação de cultivares indicadoras de cana, tais como: Q 28 , CP 36-105 , CP 44-101 e Co 421. Salienta, no entanto, que essas cultivares apresentam o inconveniente de não mostrarem sintomas nos casos em que a concentração do inóculo é baixa. TOKESHI *et alii* (1974) comprovaram a patogenicidade de *X. albilineans* , estirpe X RSD , citada como agente incitante do RSD, através de sintomas positivos obtidos após inoculações em milho doce, capim Elefante e nas cultivares de cana-de-açúcar CP 44-101 , CB 45-155 , Trojan , H 507209 e CB 44-77. IRWINE (1976), recomenda a cultivar CP 44-101 para diagnose do RSD , observando que plantas adubadas semanalmente com nitrato de amônio ou fórmula N P K completa, respondem com sintomas mais acentuados e que, nessas condições, os sintomas expressaram-se em 100% dos indivíduos, com 43 dias de inoculados. BECHET (1976), cita que certos clones de Bana grass (híbrido de *Pennisetum purpureum* x *P. americanum*) mostraram-se promissores como hospedeiros indicadores para rápido diagnóstico do RSD e que o tempo necessário para leitura dos sintomas foi de apenas três semanas. Esses resultados, entretanto, pouco diferem daqueles obtidos por MATSUOKA (1972.a e 1972.b) com capim Elefante cultivar Merker.

As primeiras tentativas de diagnose do RSD através do uso de métodos serológicos foram as de STEINDL e HUGHES (1953) que, contudo, não chegaram a resultados satisfatórios.

STEINDL (1961) afirma que até aquela data, todas as tentativas para obtenção de antissoro contra o agente do RSD haviam falhado. Mais recentemente, GILLASPIE JR. *et alii* (1976) e GILLASPIE JR. (1977), sugerem que o método sorológico poderia ser utilizado na diagnose do RSD, mas que, no entanto, isso somente seria possível tratando-se de cultivares que apresentassem alta concentração de bactérias. Assim sendo, concluem esses últimos autores que a serodiagnose ainda não é um método adequado para o caso de cultivares de cana-de-açúcar menos suscetíveis ao agente do RSD. VALARINI (1978), estudando o fluxo de água em colmos de cana-de-açúcar, observou a existência de grandes diferenças entre plantas atacadas de RSD e plantas sadias, principalmente nas cultivares mais suscetíveis. Já nas cultivares tolerantes, essas diferenças foram bem pequenas. As plantas atacadas apresentaram fluxo sempre menor do que as sadias. O autor salienta que, por esse método, não só é possível diagnosticar plantas afetadas com RSD como também aquilatar o grau de suscetibilidade de uma determinada cultivar.

3.3 - Inativação térmica "in vivo" e "in vitro" do agente causal do RSD

O método mais comumente empregado para o controle do RSD tem por base o tratamento térmico dos colmos das canas-plantas visando à obtenção de material propagativo sadio para os

campos de multiplicação.

STEINDL e HUGHES (1953), recomendam o uso de água quente no tratamento dos colmos, para eliminar o agente causal do RSD. Frizam todavia que a temperatura da água e o tempo de imersão dos toletes são fatores críticos que devem ser cuidadosamente observados. Assim, à temperatura de 50°C , o tempo de imersão deverá ser de 90 minutos; à 52°C , de 60 a 90 minutos; a 54°C , de 45 a 75 minutos; à 55°C , de 60 minutos e a 58°C , de 30 minutos. Mencionam, também, que trata a 50°C por 24 horas ou a 54°C por oito horas, utilizando água quente, podem, da mesma forma, erradicar o agente do RSD na cultivar Q 28. Em pesquisa subsequente, HUGHES e STEINDL (1955), recomendam o emprego de ar quente a $53 - 54^{\circ}\text{C}$ por oito horas ou a 50°C por 24 horas, em conformidade com os resultados do trabalho anterior; porém, no que tange ao tratamento com água quente a 50°C , afirmam que o tempo de imersão deve ser aumentado para 120 minutos.

SCHEXNAYDER (1956), relata que a cura de plantas infectadas pelo agente do RSD pode ser conseguida através da aplicação de ar quente a 54°C por oito horas e que, apesar desse tratamento não erradicar totalmente o agente infeccioso, proporciona grande aumento na produtividade. O próprio SCHEXNAYDER (1960), em trabalho de seleção de plantas-teste para diagnóstico do RSD, obteve controle total da doença, tratando os toletes, antes da extração do caldo para inoculação, em água quente a 50°C por duas horas e meia.

FORBES *et alii* (1960), recomendam o tratamento dos toletes com ar quente a 58 ou 59°C , dependendo da cultivar , por oito horas, para se obter controle satisfatório do RSD. TODD (1960), cita que, na Flórida, o tratamento com água quente a 51°C por duas horas ou a 50°C por duas horas e meia é recomendado para máximo controle da enfermidade. CHENULU (1960) conseguiu a cura de toletes doentes pelo tratamento com água quente a 50°C por 90 minutos ; 52°C por 60 minutos ; 54°C por 45 minutos e 58°C por 30 minutos. Outra alternativa que CHENULU (1960) recomenda o uso de ar quente a 50°C por 24 horas ou a 54°C por 8 horas. Os dados referentes aos tratamentos são idênticos aos indicados por STEINDL e HUGHES (1953) e HUGHES e STEINDL (1955), com a diferença de que às temperaturas de 52°C e 54°C , CHENULU (1960) recomenda os tempos de imersão mínimos, de 60 e 45 minutos ao invés de 60 a 90 e 45 a 75 minutos, respectivamente. BOURNE (1962), preconiza o tratamento em água quente a 50°C por 24 horas para se obter 100% de eficiência no controle ao RSD.

CARVALHO (1963) concluiu que o tratamento com água quente a 50 - 52°C por 3 a 4 horas, é o mais eficaz e o mais empregado, ressaltando que temperaturas abaixo de 50°C não inativam o vírus e que, acima desse nível, as gemas dos toletes são destruídas. EL-BANNA e MOURSI (1967) obtiveram resultados satisfatórios com o uso de água quente a 52°C por 90 minutos , 54°C por 75 minutos e 56°C por 60 minutos. Salientam que o tratamento a 50°C por 120 minutos não foi suficiente pa

ra completa inativação do vírus. Já através da aplicação de ar quente, os melhores tratamentos foram obtidos com 50°C por 6 horas e 56°C por 1 hora e meia a 2 horas. GALLI *et alii* (1968), recomendam o tratamento térmico dos toletes, imergindo-os em água quente a 50,5°C por 2 horas. LOPES-ROSA e AD-SUAR (1970) demonstraram que o tratamento de canas infectadas com o vírus do RSD em água quente a 50°C por 3 horas, não erradica o agente da doença, mas proporciona controle muito bom, verificando-se diferenças na produção da ordem de 20% entre canas tratadas e não tratadas. STEIB e CHILTON (1972) enfatizam, também, a importância do controle do RSD e efetuando o tratamento dos toletes com ar quente obtiveram aumentos de produção da ordem de 12,1 a 32,8% no primeiro corte e de 28,7 a 45,8% no segundo corte, com as cultivares CP 61-37 , L 60-25 e L 62-96. SILVA (1976), trabalhando com gemas individuais e tratando-as a 50,5°C por 2 horas, pôde controlar totalmente o RSD na formação de canas-planta. STEIB *et alii* (1976), obtiveram ótimos resultados através do uso de vapor quente a 51°C por 4 horas. Com esse novo método, conseguiram controle completo do RSD , mantendo uma germinação de 90% em três cultivares testadas.

Analisando conjuntamente os dados constantes da literatura revista, observa-se que todos os tratamentos envolvendo temperaturas acima de 51°C conduziram a resultados satisfatórios no controle do RSD. Quando, em contra-partida, as temperaturas do tratamento situaram-se na faixa de 50 a 51°C,

alguns autores obtiveram resultados satisfatórios, enquanto outros não os conseguiram.

Com relação à inativação térmica "in vitro" do agente do RSD, poucos são os trabalhos até hoje registrados. FARRAR (1957), verificou que o agente do RSD era inativo quando aquecido o caldo a 52°C por 15 minutos ou a 55°C por 10 minutos. MATSUOKA (1972a), utilizando o teste em capim Elefante, observou que o agente do RSD era totalmente inativado quando o caldo bruto de canas doentes era aquecido a 55 - 60°C por 10 minutos. TOKESHI et alii (1974) mostraram que a bactéria por eles isolada de material com RSD (*X. albilineans* X RSD) resistiu a temperaturas de até 54°C durante 15 minutos.

Com respeito às exposições a temperaturas baixas, HUGHES (1957) constatou sobrevivência do agente do RSD, "in vivo", por mais de 138 dias à temperatura de - 20°C. MATSUOKA (1972a) demonstrou a manutenção da viabilidade do agente do RSD por mais de 81 dias, "in vitro", e por mais de 125 dias, "in vivo", à temperatura de - 15°C. TOKESHI et alii (1974), verificaram que *X. albilineans* X 419, (isolada de canas com escaldadura), resistiu à temperatura de - 15°C por mais de 182 dias, "in vitro", e por mais de 355 dias, "in vivo". Assim, essas investigações mostraram perfeitamente que, a temperaturas de congelamento (até - 20°C), o agente do RSD permanece viável por um período consideravelmente longo.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Isolamento de Bactérias de Colmos de Cana-de-Açúcar com Sintomas de RSD

4.1.1 - Características dos materiais e métodos de isolamento

Para os isolamentos de bactérias de cana-de-açúcar com sintomas de RSD, foram usados colmos de três cultivares altamente suscetíveis: IAC 52/326 , Q 28 e CP 44-101 e duas menos suscetíveis: CB 41-76 e CB 49-260 (VALARINI, 1978 e GALLI *et alii*, 1980).

Canas das cultivares IAC 52/326 , Q 28 , CB 41-76 e CB 49-260 com RSD , foram provenientes da Estação Experimental de Araras, Estado de São Paulo, pertencente ao IAA-PLANAL SUCAR ; canas da cultivar CP 44-101 foram obtidas na Estação Experimental da COPERSUCAR em Piracicaba, Estado de São Paulo.

As canas das cultivares IAC 52/326 e Q 28 foram colhidas de touceiras de cana-soca, originadas de toletes tratados termicamente, antes do plantio, pelo método convencional ($50,5^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas) recomendado para eliminar o agente causal do RSD (GALLI *et alii*, 1968).. Apesar das plantas não apresentarem nenhum sintoma externo, grande número de vasos na região dos nós apresentavam-se descoloridos. As canas das cultivares CB 41-76 e CB 49-260 eram do primeiro corte e, da mesma forma, oriundas de toletes submetidos a tratamento térmico ; essas canas não apresentavam sintomas externos e mostravam, apenas uma leve descoloração vascular nas regiões nodais.

Canas da cultivar CP 44-101 eram também de primeiro corte, sendo, no entanto, derivadas de toletes que não receberam o tratamento térmico convencional ; seu desenvolvimento era aparentemente normal, mas apresentavam sintomas severos de vasos descoloridos. De cada cultivar, foram escolhidos cinco colmos provenientes de touceiras diferentes sem broca ou rachadura e revelando nítida descoloração vascular. Dessa maneira, o critério fundamental empregado para diagnóstico do RSD residiu na constatação da presença de vasos descoloridos na região dos nós.

Na cultivar IAC 52/326 os colmos foram cortados, aproveitando-se, apenas, a parte basal, portando de 5 a 7 gemas. No laboratório, esses toletes foram raspados com canivete, mergulhados em álcool, flambados em fogo direto e descas-

cados assepticamente. Os vasos descoloridos foram localizados por meio de cortes longitudinais paralelos, eliminando-se, gradativamente, finas camadas de tecidos das regiões nodais, até atingir os feixes vasculares profundos. Estes foram retirados cuidadosamente com a ponta do canivete, selecionando-se dez seguimentos por colmo. Os segmentos extraídos tinham de 2 a 3 milímetros de comprimento e diâmetro variável. Uma vez separados, foram colocados em placas de Petri esterilizadas, mergulhados em água esterilizada e macerados com bastão de vidro flambado. Após a maceração, a suspensão foi deixada em repouso por cerca de 15 a 20 minutos. Passado esse período, 0,1 ml da suspensão foram transferidos para placas de Petri contendo Wilbrink-agar (TUIITE, 1969) como meio de cultura, nas quais foram riscados com auxílio de espátula de Drigawski. Para cada uma das suspensões preparadas foram utilizadas 10 placas que, após a riscagem, foram incubadas em estufa regulada à temperatura de 28°C.

Com as cultivares Q 28, CP 44-101, CB 41-76 e CB 49-260, os colmos foram cortados, transportados ao laboratório e manipulados do modo já descrito. Uma vez confirmada a existência de vasos descoloridos, três nós da região mediana do colmo foram cortados com cerca de 3 centímetros de comprimento e, com auxílio do expremedor manual descrito por MATSUOKA (1972), deles extraiu-se o caldo, logo colocado em tubos de cultura esterilizados. A partir dos caldos assim obtidos foram preparadas diluições a 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em água es-

terilizada. Os isolamentos foram feitos plaqueando as suspensões em meio Wilbrink - agar, procedendo-se de forma idêntica àquela utilizada anteriormente.

4.1.2 - Identificação das bactérias isoladas de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD

As identificações das diversas bactérias obtidas dos isolamentos foram feitas nos laboratórios de Fitopatologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelos Professores Charles Frederick Robbs e Osamu Kimura.

4.1.3 - Teste de patogenicidade das bactérias isoladas de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD

A patogenicidade das bactérias isoladas foi aferida inoculando-se plantas de cana-de-açúcar da cultivar CP 44-101 considerada como altamente suscetível ao RSD (GILLASPIE *et alii*, 1966). Essas plantas foram obtidas de toletes previamente submetidos a tratamento térmico (50,5°C por 2 horas) a fim de minimizar as possibilidades de erros devidos a infecções já existentes do agente do RSD.

As plantas-teste de CP 44-101 foram obtidas plantando-se toletes em sacos plásticos, medindo 10 cm de diâmetro por 20 cm de altura, transparentes, com 8 furos de 0,5 cm dis

tribuídos na metade inferior. Esses recipientes continham mistura de solo e compostos orgânico em proporções iguais, previamente esterilizada em autoclave à pressão de $1,0 \text{ kg/cm}^2$, por 2 horas. Os toletes mediam em torno de 15 cm de comprimento, foram plantados na vertical e exibiam de 2 a 3 gemas, dependendo do comprimento dos entre-nós. Apenas a gema do primeiro nó superior foi conservada, eliminando-se as demais.

As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação, com dispositivo para circulação de ar frio quando a temperatura atingia 30°C . Receberam duas aplicações de fertilizantes NPK (20 - 20 - 20), na base de 50 mililitros por planta em solução a 0,3%. A primeira aplicação foi efetuada no dia do plantio e a segunda três semanas depois.

Com 25 dias de idade as plantas foram selecionadas pelo desenvolvimento dos brotos (7 a 15 cm) e transferida para estrados de madeira colocados a 80 cm do piso, antes de submetidas à inoculação.

O método de inoculação utilizado foi idêntico ao descrito por MATSUOKA (1972) para os testes da diagnose do RSD com capim Elefante.

Devido ao número relativamente pequeno de plantas selecionadas para inoculação, o teste de patogenicidade foi montado com parcelas simples, sem repetições e compostas de 12 - 15 plantas para cada tratamento. Os tratamentos foram aqueles que constam da Tabela 1.

As cepas de *E. herbicola* e *P. rubrisubalbicans* empregadas, correspondem a isolados obtidos no presente trabalho. A cepa de *X. albilineans* foi cedida pelo Professor Dr. Hasime Tokeshi, da ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo e corresponde a isolado usado nos estudos sobre etiologia do RSD por TOKESHI *et alii* (1974).

A inclusão de dois tratamentos com *P. rubrisubalbicans* deveu-se ao fato de que foram obtidos dos isolamentos duas bactérias com características diferentes (C_2 e C_3), julgando-se, a princípio, tratarem-se de espécies distintas de *Pseudomonas*. As identificações posteriores, todavia, revelaram que ambos os isolados pertenciam àquela espécie.

Os inóculos foram preparados partindo-se de culturas puras dos diversos organismos com 7 dias de idade, crescendo em placas de Petri com meio de Wilbrink - agar. Dessas culturas, preparam-se suspensões em água destilada e esterilizada, sendo as concentrações calibradas pela escala de Mc Farland ou com o auxílio de espectrofotômetro. As concentrações das suspensões foram confirmadas através da contagem direta do número de colônias, após riscagem de volumes conhecidos em placas de cultura. O caldo bruto extraído dos nós, por meio do espremedor manual, não sofreu nenhuma diluição e foi incluído como inóculo para controle do trabalho. O segundo tratamento controle consistiu de água destilada e esterilizada.

A avaliação da patogenicidade dos diferentes organismos foi efetuada 45 dias após a inoculação, por meio de e-

exames internos dos colmos, principalmente na região basal dos brotos. Segundo GILLASPIE *et alii* (1966), as leituras de sintomas internos de RSD devem ser feitas de 4 a 6 semanas após a inoculação. Foram consideradas doentes as plantas que apresentavam descolorações dos vasos.

Das plantas com descoloração vascular foram feitas tentativas de re-isolamento das bactérias originalmente inoculadas pelo mesmo método utilizado nos isolamentos a partir de materiais com infecção natural.

4.1.4 - Avaliação das populações de *Erwinia herbicola* presentes no caldo obtido dos nós de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD

Para esse trabalho foram usadas as cultivares Q 48-65 e IAC 52/326, com sintomas típicos de descoloração dos vasos na região dos nós. Foram utilizadas cinco plantas de cada cultivar, sem brocas ou rachaduras e numeradas de 1 a 5 para IAC 48/65 e de 6 a 10 para IAC 52/326. As plantas eram provenientes do segundo corte (1ª soca) e os toletes que deram origem às touceiras tinham sido tratadas termicamente por ocasião do plantio. Três nós basais de cada colmo foram descascados assepticamente e retirados com cerca de 2,5 cm de comprimento. O caldo desses nós foi extraído com o espremedor manual e vertido em tubos de cultura esterilizados. Para evitar a multiplicação subsequente de bactérias, os tubos foram imediatamente imersos em água com gelo fundente.

Como não se conhecia o nível populacional das bactérias presentes na ocasião do isolamento, os caldos extraídos foram plaqueados nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Com cada diluição, foram inoculadas cinco placas contendo meio de Wilbrink - agar, pipetando-se 0,1 mililitros por placa. As placas foram incubadas em estufa a 28°C e o número de colônias determinado do segundo ao décimo dia.

4.1.5 - Isolamento de bactérias de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD, após o tratamento térmico dos toletes

Como os testes de inativação térmica "in vitro" das bactérias isoladas de cana-de-açúcar com sintomas de RSD revelaram alguma sobrevivência a temperaturas acima de 50°C , pesquisou-se a possibilidade de se isolar esses microorganismos de toletes tratados termicamente. Foram coletados dez colmos de diferentes touceiras da cultivar CP 44-101, todos com sintomas de RSD, sem broca e sem rachaduras. Da base desses colmos foram obtidos toletes com três gemas, os quais foram tratados termicamente por 2 horas a $50,5^{\circ}\text{C}$. A seguir, extraiu-se o caldo dos nós sob condições assépticas, conforme descrito no item 4.1.1. O caldo obtido de cada tolete foi riscado nas diluições de 10^{-1} e 10^{-2} , em placas com meio de cultura de Wilbrink - agar, usando-se cinco placas para cada diluição e 0,1 ml de volume por placa. As placas foram incubadas em estufa a 28°C e observadas durante duas semanas.

4.1.6 - Ponto de inativação térmica "in vitro" das bactérias isoladas de cana-de-açúcar com sintomas de RSD

Bactérias isoladas de canas com RSD foram submetidas a diferentes temperaturas objetivando determinar a faixa letal para cada uma delas.

De culturas puras de *Xanthomonas albilineans* (X RSD) e *X. albilineans* (X LSD), ambas utilizadas por TOKESHI *et alii* (1974), *Erwinia herbicola* (C 1) e *Pseudomonas rubrisubalbicans* (C 2 e C 3), todas com sete dias de idade, foram preparadas suspensões em água esterilizada, calibrando-se as concentrações para, aproximadamente, $2,5 \cdot 10^8$ células por mililitro, por espectrofotometria. De cada bactéria, foram preparados seis tubos contendo, cada um, 5 mililitros de suspensão. O tratamento térmico foi feito em banho-maria, empregando-se aparelho da marca "Scientific Precision", com precisão de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Para cada temperatura a testar foi usado um dos tubos de cultura de cada bactéria. Os tubos eram de vidro, de tampa rosqueada, possuindo 7 cm de comprimento por 1,5 cm de diâmetro. As temperaturas empregadas foram 28 , 48 , 50 , 52, 54 e 56°C ; o tempo de imersão dos tubos foi padronizado em 20 minutos, contados a partir do momento em que se estabeleceu equilíbrio entre as temperaturas do interior do tubo e do banho. Após o tratamento os tubos foram resfriados naturalmente até a temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se ao plaqueamento das suspensões em meio de Wilbrink-agar, pipetando-as 0,1 ml por placa e riscando-se com espátula de Drigawski.

Para cada tratamento foram utilizadas cinco placas. A incubação teve lugar em estufa a 28°C . As observações das placas foram realizadas do segundo até o décimo dia, pesquisando-se a ocorrência de colônias típicas de cada bactéria.

O tratamento das suspensões à temperatura de 28°C serviu de controle no teste, assegurando-se a viabilidade das culturas empregadas.

4.2 - Especificidade do Teste do Capim Elefante na Diagnose do RSD da Cana-de-açúcar

Para verificar a especificidade do teste de capim Elefante na diagnose do RSD de cana-de-açúcar, foram efetuados cinco experimentos, nos quais foi empregada a metodologia descrita por MATSUOKA (1972), com algumas modificações.

Plantas de capim Elefante cultivar Merker foram desenvolvidas em sacos plásticos, medindo 10 cm de diâmetro por 20 cm de altura, transparentes, com 8 furos de 0,5 cm distribuídos na metade inferior e contendo mistura de solo e composto orgânico, em proporções iguais, previamente esterilizada em autoclave à pressão de $1,0 \text{ kg/cm}^2$, por duas horas.

As plantas foram obtidas a partir de toletes de 2 nós, plantadas verticalmente, enterrando-se apenas o nó inferior cuja gema foi extraída para estimular o enraizamento. Portanto, as plantas foram sempre formadas pela brotação da gema do nó superior. Somente colmos ainda verdes foram escolhi

dos para fornecimento de estacas, obtendo-se, assim, brotações mais uniformes. Os toletes foram imersos por 15 minutos em suspensão de Benomyl (Benlate) a 0,05% de princípio ativo.

Após esse tratamento, foram imediatamente plantados, permanecendo em casa-de-vegetação com controle parcial de temperatura (20 - 30°C). As plantas receberam duas adubações com a fórmula NPK (20 - 20 - 20) na base de 50 ml de solução a 0,3% por planta. A primeira aplicação, foi efetuada no dia do plantio e a segunda duas semanas depois. As mudas atingiram o ponto de inoculação dentre de um período de 18 a 23 dias e foram mantidas, desde o início, sobre estrados de madeira.

O método de inoculação consistiu do corte do cartucho foliar (MATSUOKA, 1972a), com canivete previamente contaminado no inóculo. Brotações laterais, quando existentes, foram também inoculadas.

Os canivetes e os demais instrumentos utilizados nas inoculações foram lavados e esterilizados por flambagem, a cada mudança de tratamento. Da mesma forma, as mãos foram lavadas, desinfestadas com solução de Hyamine-1622 a 0,2% , enxaguadas com álcool e enxugadas com papel toalha a cada mudança de tratamento.

As avaliações foram normalmente procedidas 21 dias após a inoculação, mediante exames da parte interna dos colmos com cortes finos longitudinais e paralelos. Qualquer descoloração observada nos vasos foi considerada como reação positiva.

Por questões de conveniência e maior clareza os delineamentos experimentais serão abordados separadamente para cada experimento.

4.2.1 - Reação do capim Elefante à inoculação com algumas bactérias fitopatogênicas

Face ao fato de que *X. albilineans* é capaz de induzir descoloração vascular em capim Elefante, TOKESHI *et alii* (1974) , testou-se a hipótese de que outros microorganismos fitopatogênicos pudessem provocar reações semelhantes nessa planta-teste. Foram investigadas as espécies de bactérias apresentadas na Tabela 2 , procedentes de diversas instituições , sendo que aquelas tidas como patogênicas à cana-de-açúcar foram utilizadas especialmente para controle do trabalho.

Culturas puras das bactérias foram desenvolvidas por 7 dias em placas com meio de Wilbrink - agar. As suspensões bacterianas preparadas dessas culturas foram padronizadas pela escala de Mc Farland para uma concentração correspondente a 10^8 células de *Bacillus subtilis* por mililitro.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com 11 tratamentos, 3 repetições e 20 plantas por parcela. Os toletes foram plantados em 18/03/75 , as plantas inoculadas em 07/04/75 e os resultados avaliados em 28/04/75.

4.2.2 - Reação do Capim Elefante à Inoculação com Bactérias e Fungos Isolados de Cana-de-açúcar e Leveduras Encontradas em Destilarias de Aguardente de Cana-de-açúcar

Desse experimento fizeram parte três espécies de bactérias isoladas de cana-de-açúcar com sintoma de RSD: *E. herbicola* (C 1) , *P. rubrisubalbicans* (C 2 e C 3) e *X. albilineans* (X RSD). Os fungos testados foram *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliiforme* , que causam prejuízos em praticamente todas as regiões onde a cana é cultivada. Foram utilizadas três cepas de *F. moniliiforme*: C 17 , C 24 e C 29 reveladas como as mais patogênicas pelo trabalho de EIRA (1972), de quem as culturas foram obtidas. As espécies de leveduras incluídas foram aquelas encontradas com maior frequência nas destilarias de aguardente de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, NEDER (1957). Os tratamentos e origem dos materiais que constituem o ensaio encontram-se na Tabela 3.

Com relação as leveduras, parece lícito supor que possam ocorrer também com frequência em canaviais e que possam, portanto, contaminar eventualmente o caldo por ocasião de sua extração e interferir no resultado do teste em capim Elefante para diagnose do RSD.

Para os fungos e as leveduras, a concentração dos inóculos foi de, aproximadamente, 10^6 talos por mililitro, tendo sido determinada com o auxílio do hemacitômetro.

As concentrações das suspensões bacterianas foram calibradas usando-se colorímetro Bausch & Lomb, modelo Spectronic-20 , ajustando-se para 75% de transmitância, com compri -

mento de onde de 580 nanômetros. Fazendo-se o plaqueamento , após essa calibragem, pelo processo de diluição em série, verificou-se que a concentração era de $2,5 \cdot 10^8$ células viáveis por mililitro para *E. herbicola* (C 1). Entretanto, para outras bactérias, inclusive *X. albilineans* (X RSD), não foi possível determinar a concentração com precisão, uma vez que a diluição 10^{-5} , nenhuma colônia se desenvolvia ao passo que a 10^{-4} tornava-se impraticável proceder à contagem devido a um número excessivo de colônias formadas. Diante dessa dificuldade optou-se por utilizar os dados de Fujio Akiba (comunicação pessoal), que estimou em $8 \cdot 10^8$ células por mililitro, a concentração de *X. albilineans* na escala 3 de Mc Farland.

O esquema experimental empregado foi o de blocos ao acaso, com 15 tratamentos e 3 repetições, com 12 plantas por parcela. Os toletes de capim Elefante foram plantados em 03/05/1975, as plantas inoculadas em 26/05/75 e a avaliação final feita em 16/06/1975. Para controle do trabalho, utilizou-se água destilada e esterilizada como um dos tratamentos.

4.2.3 - Reação do Capim Elefante à *Fusarium moniliforme* , *Candida cruzei* , *Hansenula anomala* e *Saccharomyces cerevisiae* , inoculados em diferentes concentrações

A razão principal de se efetuar esse experimento foi de que em estudo anterior ficou patenteado que tanto o *Fusarium* como algumas leveduras, eram capazes de provocar intensa

reação de descoloração vascular no capim Elefante, quando inoculados em concentrações elevadas.

Partindo-se de suspensões de *C. cruzei*, *F. moniliforme*, *H. anomala* e *S. cerevisiae* com 10^6 talos por mililitro, fez-se diluições sucessivas em água esterilizada até 10^1 talos por mililitro. As parcelas testemunhas foram tratadas com água esterilizada. Os tratamentos que constituíram o ensaio encontram-se na Tabela 4.

O esquema experimental foi o de blocos ao acaso com 13 tratamentos e 3 repetições, com as parcelas formadas por 12 plantas. Os toletes de capim Elefante foram plantados em 04/07/1975, as plantas inoculadas em 26/07/1975, e a avaliação final do experimento realizada em 21/08/1975.

4.2.4 - Reação do Capim Elefante à Inoculação com Bactérias Isoladas de Cana-de-açúcar com Sintomas de RSD, em Diferentes Concentrações

Os tratamentos incluídos nesse teste são apresentados na Tabela 5. As suspensões bacterianas foram calibradas para concentrações de 10^3 e 10^4 células viáveis por mililitro em água destilada e esterilizada.

O esquema experimental foi o de blocos ao acaso com 11 tratamentos e 3 repetições com as parcelas formadas por 12 plantas. Os toletes de capim Elefante foram plantados em 06/08/75, as plantas inoculadas em 27/08/75 e a avaliação final do teste realizada em 18/09/75.

4.2.5 - Reação do Capim Elefante ao Caldo Extraído e às Bactérias Isoladas de Colmos de Cana-de-açúcar com Sintomas de RSD , Submetidas ou não à Inativação Térmica

Para essa investigação, utilizou-se a cultivar CP 44-101, de primeiro corte e com 15 meses de idade. Oito toletes de três gemas foram obtidos de plantas selecionadas; quatro destes foram tratados termicamente em água quente a $50,5^{\circ}\text{C}$, durante 2 horas. Todos os toletes (tratados ou não tratados termicamente) foram raspados, mergulhados em álcool, flambados em fogo direto, descascados e separados os nós, dos quais foi extraído o caldo com espremedor manual, de acordo com MATSUOKA (1972a). Os instrumentos usados foram esterilizados por flambagem para eliminar os possíveis contaminantes. Os caldos obtidos foram vertidos em tubos de cultura esterilizados, sendo que o caldo extraído dos toletes não tratados termicamente foi dividido em duas alíquotas, sendo uma delas submetida a tratamento térmico.

Os caldos foram aplicados sem diluição, enquanto que a concentração das suspensões bacterianas foi calibrada pela escala 3 de Mc Farland. A inativação dos organismos foi processada colocando-se 10 ml do caldo e das suspensões bacterianas em tubos de vidro com tampa rosqueada (medindo 10 cm de comprimento por 1,5 cm de diâmetro) e mergulhando-os completamente em água a 60°C , durante 25 minutos. Os tratamentos empregados no experimento estão na Tabela 6.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com 11 tratamentos, 3 repetições, sendo as parcelas compostas de 10 plantas. O plantio dos toletes de capim Elefante foi realizado em 15/11/75, a inoculação das plantas efetuada em 03/12/75 e a avaliação final do teste feita em 27/12/75.

5 - RESULTADOS

5.1 - Isolamento de Bactérias dos Colmos de Cana-de-Açúcar com Sintomas de RSD

5.1.1 - Características das Bactérias Isoladas dos Colmos de Cana-de-açúcar com Sintomas de RSD

Da cultivar IAC 52/326, primeiro material utilizado, os isolamentos a partir de vasos descoloridos da região nodal produziram colônias bacterianas de três tipos distintos que surgiram em todas as placas.

As colônias que primeiro apareceram (C 1) eram de coloração amarelo-claro, convexas, circulares, de bordos lisos, cheiro ativo e crescimento muito rápido no meio de cultura. Aquelas surgidas 5 dias após o plaqueamento eram claras, brancas, circulares, tinham crescimento lento, sendo algumas de

bordos lisos (C 2) e outras de bordos irregulares (C 3). Destes três tipos de colônias foram obtidas culturas puras. A quantidade de colônias do tipo C 1 , era sempre bem maior em relação aos outros dois tipos (C 2 e C 3).

Os isolamentos obtidos das cultivares Q 28 e CP 44-101, plaqueando-se o caldo extraído dos nos, produziram colônias idênticas às obtidas da cultivar IAC 52/326. As do tipo C 1 ocorreram em todas as placas, incluindo aquelas inocula - das com caldo diluído a 10^{-3} . Colônias do tipo C 2 e C 3 o - correram principalmente nas placas inoculadas com caldo diluí do a 10^{-1} . Nas placas inoculadas com caldo não diluído o nu mero de colônias do tipo C 1 foi tão elevado que não permitiu distinguir qualquer outro tipo de colônia. Nas placas inocu - ladas com diluição a 10^{-3} , so apareceram colônias do tipo C 1 (3 a 8 colônias por placa).

Nas placas de isolamento correspondentes às cultivares CB 41-67 e CB 49-260, cresceram apenas colônias do tipo C 1 e em quantidade bastante reduzida.

Assim, bactérias formando colônias do tipo C 1 fo - ram isoladas de todas as plantas e de todas as cinco cultiva - res testadas, o mesmo não ocorrendo com relação àquelas per - tencentes aos tipos C 2 e C 3.

5.1.2 - Identificação das Bactérias Isoladas de Colmos de Cana-de-açúcar com Sintomas de RSD

Do relatório de identificação das bactérias, fornecido pelo Professor Charles F. Robbs e Osamu Kimura, conclui-se que a bactéria produzindo colônias do tipo C 1 era *Erwinia herbicola* (Lohnis) Bye, de acordo com os resultados de testes bioquímicos e culturais empregados na diferenciação dos três grupos ("Amylovora" , "Herbicola" e "Caratovora") que compõem esse gênero (LELLIOT, 1974). Alguns desses testes serviram para enquadrar o organismo como *Erwinia herbicola* var. *herbicola*, distinguindo-se de *E. herbicola* var. *ananas* , *E. stewartii* e *E. uredovora* que, juntos, constituem o grupo "Herbicola".

Aquelas formando colônias de tipo C 2 e C 3 foram identificadas como *Pseudomonas rubrisubalbicans* (Christopher e Edgerton) Krasil'nikov (sensu Hale e Wilkie, 1972). Esse organismo foi negativo para atividade lipolítica, produziu ácido de lactose em meio de HAYWARD (1962) e utilizou malonato ou tartarato como fontes únicas de carbono para crescimento, características essas que o distinguem de *P. rubrilineans* , agente causal das estrias vermelhas da cana-de-açúcar.

5.1.3 - Testes de Patogenicidade das Bactérias Isoladas de Colmos de Cana-de-Açúcar com Sintomas de RSD

Os resultados do teste de patogenicidade das bactérias isoladas de cana-de-açúcar com sintomas de RSD , encon -

tram-se na Tabela 7.

Plantas inoculadas com caldo bruto e *E. herbicola* (C 1), mostraram acentuada descoloração dos vasos da região basal da brotação. Nas plantas inoculadas com *Pseudomonas rubrisubalbicans* (C 2), *P. rubrisubalbicans* (C 3) e *Xanthomonas albilineans* (X RSD), os sintomas foram bem menos intensos, tanto no grau de descoloração como no número de vasos descoloridos. Os tratamentos mais eficientes foram o caldo bruto e *E. herbicola* (C 1), produzindo resposta positiva em 100% e 73% das plantas inoculadas, respectivamente. *P. rubrisubalbicans* (C 2 e C 3) situou-se como intermediária entre *E. herbicola* (C 1) e *X. albilineans* (X RSD) na indução de descoloração vascular em cana-de-açúcar.

Reisolamentos foram obtidos apenas para *E. herbicola* (C 1) sendo que para *P. rubrisubalbicans* (C 2 e C 3) e *X. albilineans* (X RSD) as tentativas foram negativas. Das plantas inoculadas com caldo bruto foi possível o isolamento de bactérias com as mesmas características de *E. herbicola*.

5.1.4 - Avaliação das Populações de *E. herbicola* Presentes no Caldo Obtido nos nós de Colmos de Cana-de-açúcar com Sintomas de RSD

Nas placas inoculadas com caldo não diluído e diluído a 10^{-1} , o número de colônias de *E. herbicola* foi demasiado elevado impossibilitando a contagem. Nas placas com diluição de 10^{-2} , até o quinto dia foi possível contar colônias in

dividuais, tornando-se impraticável a contagem após esse período devido à coalescência das colônias. As placas mais adequadas para contagem de colônias da bactéria foram aquelas inoculadas com a diluição de 10^{-3} .

Resultados satisfatórios foi obtido para quatro plantas da cultivar IAC 48/65 e para três plantas da cultivar IAC 52/326. Nos demais casos houve contaminação das placas, principalmente com *Fusarium* spp.

A avaliação final do número de colônias de *E. herbicola* (C 1) nas placas inoculadas com caldo diluído a 10^{-3} , encontra-se na Tabela 8. As populações do organismo, variaram entre $1,2 \cdot 10^5$ e $2,8 \cdot 10^5$ células viáveis por mililitro de caldo na cultivar IAC 48/65 e entre $0,7 \cdot 10^6$ e $3,8 \cdot 10^6$ células viáveis por mililitro de caldo, na cultivar IAC 52/326. Assim, nas 4 plantas avaliadas da cultivar IAC 48/65 registraram-se populações em torno de 10^5 células viáveis por mililitro, enquanto que na cultivar IAC 52/326 as populações atingiram níveis bem mais altos.

Colônias idênticas às de *P. rubrisubalbicans* (C 2 e C 3) apareceram em número reduzido nas placas inoculadas com caldo diluído até 10^{-3} . No entanto, não foi possível fazer a contagem dessas colônias, pois as placas foram rapidamente tomadas pelo crescimento de *E. herbicola* (C 1).

5.1.5 - Isolamento de Bactérias de Colmos de Cana-de-açúcar com Sintomas de RSD, após o Tratamento Térmico dos Toletes

Nas placas inoculadas com caldo diluído a 10^{-2} , não

se constatou crescimento de qualquer tipo de bactéria. Em todas as placas inoculadas com caldos originários de 10 plantas, diluídos a 10^{-1} , formaram-se colônias de *E. herbicola* (C 1) mas nenhuma de *P. rubrisubalbicans* (C 2 ou C 3). Em uma das plantas, notou-se, após 7 dias, a presença de pequeninas colônias idênticas às de *X. albilineans* (X RSD). Tais colônias eram translúcidas, brilhantes, lisas, de crescimento lento e ocorriam em grupos, muito próximas umas das outras.

A fim de se comparar essa última bactéria com *X. albilineans* (X RSD), isolada e estudada por TOKESHI *et alii* (1974), tentou-se obtê-la em cultura pura a partir do material inoculado. Essas tentativas, todavia, foram infrutíferas pela invariável interferência de *E. herbicola* nas placas de isolamento e pela incapacidade de fazer crescimento sobre o meio utilizado.

5.1.6 - Ponto de Inativação Térmica "in vitro" das Bactérias Isoladas de Cana-de-açúcar com Sintomas de RSD

Os resultados do teste para verificar o ponto de inativação térmica "in vitro" das bactérias isoladas de cana-de-açúcar com sintomas de RSD, encontram-se na Tabela 9. Nenhuma das bactérias resistiu ao tratamento por imersão em água quente à temperatura de 56°C durante 20 minutos. As temperaturas de 48°C e de 50°C foram suficientes para inativar

completamente *P. rubrisubalbicans* (C 2 e C 3) e *X. albilineans* (X LSD), respectivamente. *E. herbicola* (C 1) resistiu a 52°C mas foi totalmente inativada a 54°C. *X. albilineans* (X RSD), apesar de resistir às temperaturas de 52°C e 54°C, produziu colônias em número consideravelmente menor do que aquele registrado a partir de suspensões submetidas a temperaturas mais baixas.

5.2 - Especificidade do Teste de Capim Elefante na Diagnose do RSD de Cana-de-açúcar

5.2.1 - Reação do Capim Elefante à Inoculação com Algumas Bactérias Fitopatogênicas

Os resultados relativos às observações de descoloração vascular após inoculação do capim Elefante com algumas bactérias fitopatogênicas, encontram-se na Tabela 10.

A análise de variância mostrou diferenças altamente significativas entre tratamentos. Os tratamentos representados pelas bactérias *E. herbicola* (ENA 2041), *E. herbicola* (ENA 2130) e *X. phaseoli*, não diferiram da testemunha (água esterilizada). Contudo, *E. herbicola* (ENA 2041) e *E. herbicola* (ENA 2130) não diferiram também dos tratamentos classificados em segundo lugar, o que não aconteceu em relação a *X. phaseoli*. Assim, todas as bactérias inoculadas, com exceção da *X. phaseoli*, foram capazes de provocar sintomas internos quando ino

culadas em capim Elefante. As cepas de *X. albilineans* (X LSD e X RSD) foram capazes de provocar reação positiva em todas as plantas inoculadas.

5.2.2 - Reação do Capim Elefante à Inoculação com Bactérias e Fungos Isolados de Cana-de-açúcar e Leveduras Encontradas em Destilarias de Aguardente de Cana-de-açúcar

Os resultados das inoculações em capim Elefante com bactérias e fungos isolados de cana-de-açúcar e com leveduras mais comumente encontradas nas destilarias de aguardente de cana, encontram-se na Tabela 11.

A análise de variância mostrou diferenças altamente significativas entre tratamentos. Os tratamentos com *Colletotrichum falcatum*, *Candida tropicalis*, *Schizosaccharomyces pombae* e *Saccharomyces carlsbergensis*, não diferiram da testemunha não tratada. Os demais tratamentos diferiram da testemunha, podendo-se daí concluir que induzem reação positiva de descoloração de vasos por inoculação em capim Elefante.

5.2.3 - Reação do Capim Elefante à *Fusarium moniliforme*, *Candida cruzei*, *Hansenula anomala* e *Saccharomyces cerevisiae*, Inoculados em Diferentes Concentrações

Os resultados das inoculações em capim Elefante com

F. moniliforme , *C. cruzei* , *H. anomala* e *S. cerevisiae*, em diferentes concentrações, encontram-se na Tabela 12.

A análise de variância mostrou diferenças altamente significativas entre tratamentos. Todos os tratamentos nas concentrações máximas induziram alto número de plantas com sintomas internos. Mesmo em concentrações relativamente baixas ($5 \text{ a } 7 \cdot 10^2$ células viáveis por mililitro), todos os tratamentos empregados diferiram da testemunha e devem ser considerados como capazes de provocar descoloração dos vasos quando inoculados em capim Elefante.

5.2.4 - Reação do Capim Elefante à Inoculação com Bactérias Isoladas de Cana-de-açúcar com Sintomas de RSD, em Diferentes Concentrações

Os resultados das inoculações em capim Elefante com bactérias isoladas de cana-de-açúcar com sintomas de RSD, em diferentes concentrações, encontram-se na Tabela 13.

A análise de variância mostrou diferenças altamente significativas entre tratamentos. Todos os tratamentos a concentrações iguais ou superiores a $2,5 \cdot 10^3$ células viáveis por mililitro, foram capazes de provocar reação positiva em capim Elefante, com exceção de *P. rubrisubalbicans* (C 2) e *P. rubrisubalbicans* (C 3) que só provocaram essas reações quando inoculadas em concentrações iguais ou superiores a $2,5 \cdot 10^4$ células viáveis por mililitro.

5.2.5 - Reação do Capim Elefante ao Caldo e às Bactérias Isoladas de Colmos de Cana-de-açúcar com Sintomas de RSD, Submetidos ou não à Inativação Térmica

Os resultados das inoculações em capim Elefante com os caldos extraídos e com as bactérias isoladas de cana-de-açúcar com sintomas de RSD, submetidas ou não ao tratamento térmico, encontram-se na Tabela 14.

A análise de variância mostrou diferenças altamente significativas entre tratamentos. Todos os tratamentos submetidos a 60°C não produziram reação no capim Elefante, ao passo que todos os tratamentos representando bactérias vivas em suspensão provocaram pronta reação. O caldo bruto, quando inoculado em estado natural, não diferiu dos tratamentos constituídos de culturas de bactérias vivas, mas quando tratado a 60,0°C mostrou-se inócuo. Quando tratado a 50,5°C, no entanto, o caldo bruto foi capaz de induzir reação em 50% das plantas inoculadas.

6 - DISCUSSÃO

Inicialmente serão discutidos os resultados referentes à caracterização das bactérias isoladas de plantas de cana-de-açúcar com sintomas de RSD , seguindo-se os resultados dos experimentos destinados a aferir a validade do teste com capim Elefante na diagnose da doença.

6.1 - Caracterização de Bactérias Associadas ao RSD da Cana-de-açúcar

A bactéria isolada de cana-de-açúcar com sintomas de RSD e identificada como *Erwinia herbicola* , revelou-se presente em todas as cultivares testadas, quais sejam: IAC 52/326 , Q 28 , CP 44-101 , IAC 48/65 , CB 41-76 e CB 49-260. O organismo identificado como *Pseudomonas rubrisubalbicans* foi encontrado em todas as cultivares suscetíveis ao RSD, não tendo sido recuperado, contudo, de cultivares suscetíveis à mo-

lêstia CB 41-76 e CB 49-260. As mesmas bactérias foram obtidas tanto pelo método de isolamento a partir de vasos descolados, como pelo método de extração do caldo dos nós por espremedura.

O isolamento de bactérias com características de *X. albilineans* X RSD (TOKESHI *et alii*, 1974), só foi conseguida em uma única oportunidade e, coincidentemente da mesma cultivar (CP 44-101) por eles trabalhada.

Quando GILLASPIE JR. *et alii* (1973) , TEAKLE *et alii* (1973) , GILLASPIE JR. (1974) , TEAKLE (1974) e WORLEY e GILLASPIE JR. (1975) demonstraram a associação de bactérias com canas apresentando sintomas de RSD, é possível que estivessem lidando com os organismos agora constatados.

A espécie *Erwinia herbicola* (Lohnis) Dye possui duas variedades reconhecidas. A primeira delas é *E. herbicola* var. *ananas*, agente causal de uma podridão ("pink disease") de frutos de abacaxi, recentemente estudado por CHO *et alii* (1978). A segunda variedade é designada como *E. herbicola* var. *herbicola*. A questão da patogenicidade da var. *herbicola* ainda não está completamente elucidada. Segundo GIBBINS (1978), há evidências de que esse organismo pode estar envolvido tanto na alteração da predisposição de plantas ao ataque de patógenos, como na modificação da virulência e da atividade de bactérias fitopatogênicas "in situ".

Embora primariamente tidas como saprófitas, estirpes de *E. herbicola* têm sido diretamente implicados em doenças

de plantas. CROSSE (1971) considera que organismos do grupo de *E. herbicola* sejam componentes importantes de complexos cau sais de enfermidades sob condições naturais. Bactérias reconhecidas como fitopatogênicas e hoje na sinonímia de *E. herbicola* var. *herbicola* , são: *E. lathiri* , que incita doença em *Lathyrus* spp. (GRAHAM, 1958), *E. milletiae* , responsável por galhas em "Millet" (SUZUKI e UCHIDA, 1965) e o agente causal da necrose interna ("Boll Rot") de maçãs do algodoeiro (ASCODLAY *et alii*, 1970).

A par dessas citações, *E. herbicola* é considerada co mo forma predominante da microflora residente em superfícies vegetais (saprófita) (GIBBINS, 1978) e é frequentemente isolada de tecidos de plantas doentes, algumas vezes atingindo populações consideravelmente elevadas (ZUET, 1969). Nos últi mos anos, representantes do grupo "Herbicola" têm sido associados a problemas de ordem médico e veterinária (GIBBINS, 1978).

A literatura universal sobre *E. herbicola* foi recentemente revista por SANHUEZA (1979) e inclui outros autores não relacionados ou comentados na presente dissertação.

A espécie *Pseudomonas rubrisubalbicans* (Christopher e Edgerton) Krasil'nikov 1949 foi retida como espécie válida na recente proposição de YOUNG *et alii* (1978) sobre classificação e nomenclatura de bactérias fitopatogênicas.

Essa espécie faz parte de um grupamento de *Pseudomonas* fitopatogênicas caracterizadas por se apresentarem como

não fluorescentes e por acumularem poli- β -hidroxibutirato como substância de reserva (DOUDOROFF e PALLERONI, 1974).

Estudo comparativo entre espécies de *Pseudomonas* patogênicas ao sorgo (HALE e WILKIE, 1972), permitiu separá-las na base de um conjunto de características morfológicas, cultu rais e bioquímicas. Usando o esquema proposto pelos autores acima, *P. rubrisubalbicans* pode ser diferenciado claramente de *P. rubrilineans*, que causa as estrias vermelhas da cana-de-açúcar.

P. rubrisubalbicans foi originalmente descrita como responsável pela doença designada de "Mottled Stripe", descrita sobre cana-de-açúcar na Louisiana, E.U.A. (CHRISTOPHER e EDGERTON, 1930). É, também, patogênica ao sorgo quando inoculada artificialmente (HALE e WILKIE, 1972).

Os resultados contidos na Tabela 7, indicam que tanto *E. herbicola* como *P. rubrisubalbicans* são patogênicas ã cana-de-açúcar, ambos capazes de infectar a cultivar CP 44-101, recomendada por GILLASPIE JR. *et alii* (1966) e por IRWINE (1976), para diagnose do RSD. Os testes de patogenicidade, evidenciaram, ainda, que tanto *E. herbicola* como *P. rubrisubalbicans* não sendo patógeno específico do sistema vascular, devem induzir maior reação de defesa e descoloração vascular. A *X. albilineans*, sendo sistêmica e adaptada ao xilema deverá produzir maior infecção porém, com menor intensidade de descoloração vascular.

O fato de que todas as plantas inoculadas com o caldo extraído dos nós de indivíduos com RSD mostraram sintomas, demonstra a adequabilidade do uso da cultivar CP 44-101 para o teste, assim como indica a eficácia do método de inoculação empregado. Mostra, também, que caldo de plantas doentes deve conter algum componente ou fator que acelera ou acentua a reação da planta inoculada ao agente do RSD. Como GILLASPIE JR. *et alii* (1966) e IRWINE (1976) não trabalharam com inóculos porvenientes de culturas bacterianas puras, não puderam notar certas influências que por ventura poderiam estar ocorrendo. Por outro lado, é possível que, se a leitura dos testes de patogenicidade usando culturas puras tivessem sido efetuada aos 90 dias, conforme TOKESHI *et alii* (1974) o fizeram, todas as plantas inoculadas apresentassem reação positiva.

P. rubrisubalbicans não pôde ser reisolada de plantas inoculadas. Com relação a isso, é possível que tenha ocorrido problema análogo àquele verificado por ocasião da calibragem do inóculo através do plaqueamento de diluições sucessivas. Durante essa calibragem notou-se que a bactéria deseenvolvia-se muito bem até a concentração de 10^4 células por mililitro, enquanto que a 10^3 células por mililitro a viabilidade caía a zero, com ausência total de colônias no meio semeado (item 4.2.2). Portanto, é provável que na ocasião do reisolamento a concentração da bactéria, na suspensão obtida após a maceração dos tecidos afetados, ten-a atingido níveis excessivamente baixos que não permitiram sua recuperação pelo

método empregado.

Os plaqueamentos realizados visando a determinar a população de bactérias na região nodal de plantas com sintomas de RSD, mostraram que estas são bastante altas nas cultivares suscetíveis, conforme se pode constatar pelos dados da Tabela 8. Nas cultivares IAC 48/65 e IAC 52/326 as populações de *E. herbicola*, foram bem mais elevadas do que em outras cultivares suscetíveis, Q 28 e CP 44-101. Nestas duas últimas cultivares, as populações da bactéria não ultrapassaram 10^4 células viáveis por mililitro de caldo. Tal diferença pode ter ocorrido em decorrência da idade das touceiras, pois as touceiras de IAC 48/65 e IAC 52/326 provieram de cana soca enquanto que as das duas outras cultivares eram, ainda, de cana na planta.

Apesar de que as canas da cultivar Q 28 foram provenientes de touceiras cujos toletes matrizes haviam sido tratadas termicamente, não houve diferenças na população das bactérias, em relação à cultivar CP 44-101 proveniente de material propagativo que não recebeu o tratamento térmico.

Nas cultivares consideradas suscetíveis, CB 41-76 e CB 49-260, as populações bacterianas nunca foram superiores a 10^3 células viáveis por mililitro de caldo. Esses dados indicam que em cultivares suscetíveis existem mecanismo de defesa que restringem as populações de bactérias na região nodal, ao passo que em cultivares altamente suscetíveis há maior proliferação desses microorganismos a ponto de prejudicar o desen-

volvimento das plantas. Corroborando essa hipótese, BAILEY (1977) e VALARINI (1978), mostraram que, realmente, em plantas severamente afetadas pelo RSD, o fluxo d'água pelos vasos do colmo foi drasticamente reduzido, enquanto que nas cultivares mais tolerantes a redução do fluxo não foi tão acentuada. Isto parece demonstrar que a alta concentração de bactérias nos colmos de cultivares suscetíveis contribui para a obstrução dos vasos, impedindo o fluxo normal da água. Com base nos resultados descritos, pode-se concluir que quando a planta é afetada pelo agente do RSD, a redução no crescimento vegetativo que se verifica é em função da má circulação da seiva através dos vasos.

Se no sistema vascular de plantas doentes os índices de crescimento das populações das bactérias forem comparáveis àqueles observados "in vitro", os danos causados por *E. herbicola* seriam bem maiores do que aqueles devido a *P. rubrisubalbicans* ou *X. albilineans* (X RSD). Entretanto, podem ocorrer fatores de estímulo nas plantas que façam com que tanto *P. rubrisubalbicans* como *X. albilineans* (X RSD) multipliquem-se mais intensamente "in situ", acarretando prejuízos ao desenvolvimento das touceiras atacadas. Segundo SANHUEZA (1979), *E. herbicola* estimula a multiplicação de *X. albilineans*, ao passo que inibe a de *Pseudomonas* sp. Por outro lado, *Pseudomonas* sp. inibe o crescimento de *X. albilineans*. Com base nos dados de SANHUEZA (1979), era de se esperar que, *X. albi*

lineans fosse isolada com frequência de material com RSD , o que na realidade não ocorreu durante a presente pesquisa.

Os isolamentos efetuados após o tratamento térmico dos toletes a 50,5°C por duas horas, demonstrando que esse tratamento teve eficiência apenas parcial para eliminação de *E. herbicola* , ao passo que se mostrou totalmente eficaz para *P. rubrisubalbicans*.

Observando os dados da Tabela 9, referente aos testes em que as bactérias foram submetidas a diferentes temperaturas "in vitro", pode-se constatar que, realmente, *E. herbicola* é mais resistente ao tratamento térmico, tolerando temperaturas de até 52°C.

Os resultados obtidos indicam uma das razões do aparecimento de plantss com RSD quando provenientes de colmos tratados, antes do plantio, com temperaturas abaixo de 52°C, conforme relatam EL-BANNA e MOURSI (1967) , LOPES-ROSA e ADSUAR (1970) , MATSUOKA (1972a) e GALLI *et alii* (1980).

Levando em consideração o fato de que *P. rubrisubal*
bicans pode ser facilmente inativada pelos tratamentos térmicos convencionais, bem como os resultados de TOKESHI *et alii* (1974), parece haver boas evidências de que *E. herbicola* e *X. albilineans* constituem espécies bacterianas envolvidas na etiologia do RSD da cana-de-açúcar.

6.2 - Validade do Teste com Capim Elefante para Diagnose do RSD da Cana-de-açúcar

Os resultados obtidos revelaram que o capim Elefante, recomendado por MATSUOKA (1971, 1972a e 1972b) como planta indicadora na diagnose do RSD, não deve ser utilizado para tal finalidade.

Os dados da Tabela 10, mostram que o capim Elefante reage com os mesmos sintomas de descoloração dos vasos da região nodal quando inoculado com suspensões de diversas bactérias, dentre as quais *Pseudomonas rubrilineans*, agente das estrias vermelhas da cana-de-açúcar; *Xanthomonas albilineans*, agente da escaldadura da cana-de-açúcar; *Erwinia carotovora*, causadora de podridões moles em grande número de hospedeiros, e *P. mori* incitante da mancha bacteriana da amoreira. Dentre as bactérias testadas, somente *X. phaseoli*, agente do crestamento bacteriano do feijoeiro, não induziu reação positiva. Esses dados confirmaram aqueles anteriormente obtidos por BETTI *et alii* (1976) que conseguiram produzir sintomas de descoloração dos vasos em capim Elefante após inoculações com várias outras bactérias.

Pelos resultados contidos na Tabela 11, verifica-se que diversos fungos e leveduras são também capazes de induzir reações semelhantes no capim Elefante. Neste grupo destacaram-se *Fusarium moniliforme*, *Candida cruzei*, *Hansenula anomala* e *Saccharomyces cerevisiae*. Por outro lado, as plantas não reagiram às inoculações com *S. carlsbergensis*, *Schizos-*

cccharomyces pombe , *C. tropicalis* e *Colletotrichum falcatum*.

Em relação a *F. moniliiforme* , *C. cruzei* , *H. anomala* e *S. cerevisiae* o capim Elefante mostrou-se altamente sensível, reagindo positivamente mesmo com concentrações de inóculo da ordem de $5 \cdot 10^1$ talos por mililitro (Tabelas 11 e 12). A resposta do capim Elefante é, também, bastante nítida para as espécies *E. herbicola* (C 1) e *P. rubrisubalbicans* (C 2 e C 3), isoladas de cana-de-açúcar com sintomas de RSD. As plantas reagem mais intensamente e em maior frequência com as concentrações mais altas dos inóculos dessas bactérias ($2,5 \cdot 10^8$ células viáveis por mililitro). No entanto, ainda reagem, embora em menor frequência, com concentrações de $2,5 \cdot 10^4$ células viáveis por mililitro para *P. rubrisubalbicans* (C 2 e C 3) e de $2,5 \cdot 10^3$ células viáveis por mililitro para *E. herbicola* (C 1).

Analisando comparativamente os dados das Tabelas 10, 13 e 14 , observa-se que há diferenças na capacidade de induzir reação em capim Elefante entre as cepas de *E. herbicola*. As cepas de *E. herbicola* (ENA 2041) isolada da bananeira e de *E. herbicola* (ENA 2130) isolada do guaraná, mesmo quando inoculadas na concentração de 10^8 células viáveis por mililitro, induziram respostas positivas em menor frequência do que a cepa de *E. herbicola* (C 1) isolada da cana-de-açúcar na concentração de $2,5 \cdot 10^3$ células bacterianas por mililitro. Os resultados demonstraram ainda que o capim Elefante reage muito bem para *X. albilineans* (X RSD) inoculada em concentrações al

tas.

Os dados da Tabela 14, mostram que todos os inóculos tratados a 60⁰C perderam a capacidade de induzir reação no capim Elefante. Isso vem confirmar que o que realmente provoca essa reação são os componentes vivos de cada inóculo. Ficou ainda comprovado que o tratamento térmico a 50,5⁰C não elimina por completo o patógeno presente no caldo bruto extraído de canas doentes, visto que 50% das plantas de capim Elefante reagiram positivamente.

7 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem formular as seguintes conclusões:

- a - O teste do capim Elefante revelou-se inespecífico para a bactéria do RSD , dando reações positivas para diversas bactérias, fungos e leveduras;
- b - O teste do capim Elefante não deve ser usado para o diagnóstico do raquitismo das soqueiras (RSD);
- c - A bactéria *Erwinia herbicola* está constantemente associada com cana-de-açúcar apresentando sintomas de RSD, ocorrendo em níveis populacionais elevados na região vascular de colmos provenientes de touceiras doentes;
- d - Com base nos testes bioquímicos "in vitro", este é o primeiro relato de ocorrência de *Pseudomonas rubrisubalbicans* causando infecção sistêmica na cana-de-açúcar;

- e - Demonstrou-se experimentalmente que *E. herbicola* é patogênica à cana-de-açúcar, atendendo aos postulados de Kock.
- f - A *P. rubrisubalbicans* é passível de causar descoloração vascular em cana-de-açúcar;
- g - O tratamento térmico convencional de colmos de cana-de-açúcar (imersão em água quente a 50,5°C por duas horas) para controle do RSD, não foi suficiente para inativar totalmente a bactéria *E. herbicola* de material infectado;
- h - Existe a possibilidade de que o RSD , até agora considerada como sendo causada por uma bactéria, seja na verdade causada por um complexo de bactérias;
- i - Para se avaliar a importância destes organismos estudados como parte do complexo de agentes causais do RSD da cana-de-açúcar, os testes de patogenicidade devem ser complementados com experimento de campo que possibilitem averiguar a capacidade de cada organismo isolado provocar danos e reproduzir o quadro sintomatológico completo da enfermidade.

8 - SUMMARY

Isolations performed from sugar cane stalks showing symptoms of ratoon stunting disease (RSD) yielded bacteria identified as *Erwinia herbicola* and *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *E. herbicola* was found in all cultivars tested: IAC 52/326 , Q 28 , CP 44-101 , CB 41-76 , CB 49-260 , and IAC 48/65 , whereas *P. rubrisubalbicans* was detected in the cultivars IAC 52/326 , Q 28 and CP 44-101. Pathogenicity of these bacteria was checked by inoculating plants of cultivar CP 44-101 known to react with early symptoms of internal vascular discoloration supposedly due to infection with the causal agent of RSD.

Evaluations of *E. herbicola* populations present in the juice extracted from the nodal region of sugar cane stalks showing disease symptoms revealed levels in the range of 1.2 to 2.8×10^8 and 0.7 to 3.8×10^6 viable cells per milliliter for the cultivars IAC 48/65 and IAC 52/326 , respectively.

Results indicated that *E. herbicola* must be involved in the etiology of RSD and that *P. rubrisubalbicans* should be investigated further. *E. herbicola* was found to be constantly associated with diseased tissues, was able to reproduce part of the symptoms when inoculated in sugar cane, and reached relatively high populations in sugar cane stalks.

Isolations performed after heat treatment (50.5°C for 2 hours) of sugar cane cuttings from plants with RSD symptoms indicated that this treatment is capable of providing complete inactivation of *P. rubrisubalbicans*, but only partial inactivation of *E. herbicola*.

Hot water treatment of *E. herbicola* and *P. rubrisubalbicans*, "in vitro", revealed that *P. rubrisubalbicans* is completely inactivated when submitted to temperatures of 50°C for 20 minutes, whereas for *E. herbicola*, over the same immersion time, temperatures of 54°C were required for total inactivation.

Several studies were carried out to investigate the adequacy of using Elephant grass (MATSUOKA, 1972a) as a test plant for RSD diagnosis. Inoculations of the cultivar Merker of this gramineous species were secured with several bacteria, fungi and yeast species. Elephant grass reacted positively and showed vascular discoloration when inoculated with *Erwinia herbicola*, *E. carotovora*, *Pseudomonas rubrisubalbicans*, *P. rubrilineans*, *P. mori*, *Xanthomonas albilineans*, *Fusarium moniliforme*, *Candida cruzei*, *Hansenula anomala* and

Saccharomyces cerevisiae . The internal symptoms observed seemed identical to those induced in the test plant inoculated with raw juice extracted from sugar cane stalks with RSD. It was also observed that the degree of reaction depended on the microorganism inoculated and or the number of propagules present in the inoculum. The lowest concentration capable of inducing a positive response was approximately 10^1 propagules per milliliter of suspension, which was achieved with *F. moni**liforme*. These data further support that Elephant grass reacts unspecifically through vascular discoloration of nodal regions. Therefore it should not be recommended for RSD diagnostic.

9 - LITERATURA CITADA

- ASWORTH JR., L. J. ; D. C. HILDEBRAND e M. N. SCHROTH, 1970. *Erwinia* - induced internal necrosis of immature cotton bolls. Phytopathology, 60: 602-607.
- BAILEY, R. D., 1977. The systemic distribution and relative occurrence of bacteria in sugarcane varieties affected by ratoon stunting disease. Proceedings of the South Sugar African Technologists' Association. Durban, p. 55-56.
- BECHET, G. R., 1976. Ratoon stunting disease and rapid diagnostic techniques. Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association. Durban, p. 1-4.
- BENDA, G. T. A., 1972. Hot water treatment for mosaic and RSD control. Sugar Journal. N. Orleans, 34(10): 32-39.

- BETTI, J. A. ; A. S. COSTA ; O. PARADELA Fº ; J. SOAVE e S. MATSUOKA, 1976. Descoloração vascular na região dos nós em capim Elefante causada por várias espécies de bactérias. Sociedade Brasileira de Fitopatologia. IX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Paulo, p. 81 (Resumo).
- BOURNE, B. A., 1963. Studies on the heat treatment for the control of ratoon stunting disease of sugarcane in Florida. Proceedings of the 11st Congress of the International Society of Sugarcane Technologists. Mauritius, p. 776-788.
- BRADBURY, J. F., 1967. *Erwinia herbicola*. Commonwealth Mycological Institute. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. nº 232.
- BUCHANAN, R. E. e N. E. GIBBONS, 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8 ed. Baltimore, Williams e Wilkins Company, 1.246 p.
- CARVALHO, P. C. T., 1963. As viroses da cana-de-açúcar. In: Pragas e Doenças da Cana-de-Açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP. Depto. de Fitopatologia e Entomologia, p. 75-90.
- CHEN, C. T. ; S. M. LEE e M. J. CHEN, 1975. Small coryneform bacteria in ratoon stunted sugarcane. Sugarcane Pathologists Newsletter. Sydney, (13/14): 6-8.
- CHENULU, V. V., 1960. Ratoon stunting disease of sugarcane. A. review. Indian Journal of Sugarcane Research and Development, 5(1): 59-61
- CHO, J. J. ; K. E. ROHRBACH e A. C. HAYWARD, 1978. An *Erwinia herbicola* strains causing pink disease in pineapple. Proc. IVth Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria, 2: 433-442.

- CHRISTOPHER, W. N. e C. W. EDGERTON, 1930. Bacterial stripe diseases of sugarcane in Louisiana. J. Agric. Res., 41: 259-267.
- CROSSE, J. E., 1971. Interactions between saprophytic and pathogenic bacteria in plant disease. In: Ecology of leaf-surface organisms. (T. F. PREECE and C. H. DICKIRSON, Eds.), London, Academic Press, p. 283-290.
- DAMANN JR., K. E. e K. S. DERRICK, 1976. Bacterium associated with ratoon stunting disease in Louisiana. Sugarcane Pathologists Newsletter. Sidney (15/16): 20-22.
- DANTAS, B., 1956. Plano quadrienal para o estudo das principais doenças e pragas da cana-de-açúcar em Pernambuco. Publicação nº 2, Comissão de Combate às Pragas de Cana-de-Açúcar no Estado de Pernambuco. Recife, 58 p.
- DOUDOROFF; M. e N. J. PALLERONE, 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8 ed., Baltimore, Maryland, p. 217-243.
- EIRA, A. P., 1972. Fatores que influem na triagem das variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) ao *Fusarium moniliforme* Sheldon, agente causal do "Pokkah Boeng". Tese Doutor em Ciência. F.C.M.B.B., Botucatu, SP. 66 p. mimeografado.
- EL-BANNA, M. T. ; M. A. MOURSI e F. NOUR-EL-DIN, 1967. Studies on sugarcane ratoon stunting virus disease. (A) Properties of the causal virus and control of the disease. The Agricultural Research Review. Cairo, 45: 74-92.

- FORBES, I. L. ; R. J. STEIB e S. J. P. CHILTON, 1960. Ratoon stunting disease of sugarcane. Agricultural Experiment Station. Bulletin 532. Louisiana, 23 p.
- GALLI, F. ; H. TOKESHI ; P. C. T. CARVALHO ; E. BALMER ; H. KIMATI ; C. O. N. CARDOSO e C. L. SALGADO, 1968. Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas e seu controle. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres, 640 p.
- GALLI, F. ; P. C. T. CARVALHO ; H. TOKESHI ; E. BALMER ; H. KIMATI ; C. O. CARDOSO ; C. L. SALGADO ; T. L. KRUGNER ; E. J. B. N. CARDOSO e A. BERGAMIN Fº, 1980. Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres, 2ª ed., vol. 2 , 587 p.
- GIBBINS, L. N., 1978. *Erwinia herbicola*: A review and perspective. Proc. IVth Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria, 2: 403-432.
- GILLASPIE JR., A. G., 1970a. Evidence that ratoon stunting disease of sugarcane is caused by virus and not mycoplasma. Phytopathology. Lancaster, 60(10): 1448-1450.
- GILLASPIE JR., A. G., 1970b. Ratoon stunting disease: distribution in the sugarcane plant. Sugar Bulletin. Louisiana, 48(16): 200-201.
- GILLASPIE JR., A. G., 1971. Ratoon stunting disease virus: problems in purification. American Society of Sugar Cane Technologists. Baton Rouge, 1: 52-56.
- GILLASPIE JR., A. G. ; R. E. DAVIS e J. F. WORLEY, 1973. Diagnosis of ratoon stunting disease based on the presence of a specific microorganism. Plant Disease Report. Washington, 57(12): 987-990.

GILLASPIE JR., A. G. ; R. E. DAVIS e J. F. WORLEY, 1976. Nature of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. Sugarcane Pathologists Newsletter. Sydney (15/16): 11-15.

GILLASPIE JR., A. G. ; R. E. DAVIS e J. F. WORLEY, 1975. Nature of the ratoon stunting disease agent. Sugar Journal. N. Orleans, 38(4): 7-10.

GRAHAM, D. C., 1958. The status of *Erwinia lathyri* and related bacteria. Commonwealth Phytopathol - News, 4: 49-51.

HALE, C. N. e J. P. WILKIE, 1972. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. N. Z. J. Agric. Res., 15: 448-456.

HAYWARD, A. C., 1962. Studies on bacterial pathogens of sugarcane. II. Differentiation, taxonomy, and nomenclature of the bacteria causing red stripe and mottled stripe diseases. Mauritius Sugar Industry Research Institute Occasional Paper (13): 13-27.

HUGHES, C. G., 1955. Some recent development in the study of ratoon stunting disease. Cane Growers' Quarterly Bulletin. Brisbane, 19(1): 27-28.

HUGHES, C. G., 1956. Disease investigations: Ratoon stunting disease. Annual Report, Queensland Bureau of Sugar Experiment Stations. Brisbane, nº 56, p. 81-84.

HUGHES, C. G. e D. R. L. STEINDL, 1955. Ratoon stunting disease of sugarcane. Technical Communication. Queensland Bureau of Sugar Experiment Stations, Brisbane, nº 2 , 54 p.

- IRWINE, J. E., 1976. Factors affecting the expression of juvenile symptoms of the ratoon stunting disease. Proceedings of the American Society of Sugarcane Technologists. Baton Rouge, 5 (NS): 109-113.
- LELLIOT, R. A., 1974. In: BUCHANAN, R. E. e N. E. GIBBONS, (Editores). Bergey's Manual of Determination Bacteriology. 8 ed., Baltimore, Maryland, The Williams & Wilkins Co., Ltd. p. 332-339.
- LOPEZ-ROSA, J. e H. ADSUAR, 1970. Effect of stunting disease on yield of some sugarcane varieties in Puerto Rico. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico, 54: 149-169.
- MAMIUNTEN, H. e S. WAKIMOTO; 1976. Coryneform bacteria found in xylem of the ratoon stunting diseased sugarcane. Annual Phytopathological Society of Japan, 42: 500-503.
- MATSUOKA, S., 1971. Elephant grass, an indicator for ratoon stunting virus of sugarcane. Plant Protection Bulletin. FAO , Rome, 9(5): 110-115.
- MATSUOKA, S., 1972a. Raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar: diagnose da moléstia e estudos sobre o seu agente causal. Piracicaba, ESALQ/USP, 77 p. (Tese de Doutorado).
- MATSUOKA, S., 1972b. Ratoon stunting disease diagnosis with elephant-grass as a indicator plant. Sugarcane Pathologists Newsletter. Sydney (8): 10-11.

- NEDER, R. N., 1957. Contribuição ao estudo de algumas leveduras regionais de fábricas de aguardente de cana - posição sistemática e valor industrial. Piracicaba, ESALQ/USP. 79 p. (Tese de Doutorado).
- RICAUD, C., 1974. Problems in the diagnosis of ratoon stunting disease. Proceedings of the 15th Congress. International Society of Sugarcane Technologists. Durban, p. 241-249.
- RICAUD, C. ; S. SULLIVAN e J. C. AUTREY, 1976. Presence of the RSD associated bacterium in Mauritius. Sugarcane Pathologists Newsletter. Sydney, (17): 37-39.
- SANHUEZA, R. M. V., 1979. Relações entre *Xanthomonas albilineans*, *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas* sp. em Caná-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP. 77 p. (Dissertação de Mestrado).
- SCHEXNAYDER, C. A., 1956. The effect of stunting disease of sugarcane on yield of cane and sugar in Louisiana, and the use of heat treatment for control. Sugar Bulletin, New Orleans, 34(22): 349-355.
- SCHEXNAYDER, C. A., 1960. The use of sugarcane "test plant" as a means of detecting the presence of ratoon stunting disease in sugarcane. Proceedings of the 10th Congress. International Society of Sugarcane Technologists. Honolulu, p. 1068-1072.
- SILVA, W. M., 1976. Termoterapia em gemas isoladas assegura o controle do raquitismo. Boletim Técnico da Copersucar. Piracicaba, 76 p.

- STEIB, R. J. e D. M. TANTERA, 1970. Studies to determine the effect of tetracycline antibiotic on the ratoon stunting disease (RSD) of sugarcane. Sugar Bulletin. N. Orleans, 48(17): 217-219.
- STEIB, R. J. ; O. M. CIFUENTES ; B. COCHRAN e M. M. MAYEUX, 1976. Control of RSD of sugarcane by use of aerated steam. Sugar Journal. N. Orleans, 39(2): 20-23.
- STEIB, R. J. e S. J. P. CHILTON, 1972. Losses caused by RSD and need for hot air treatment. Sugar Bulletin. N. Orleans, 50(19): 8-11.
- STEINDL, D. R. L., 1976a. New method of identifying ratoon stunting disease. Cane Growers Quarterly Bulletin. Brisbane, 39(4): 130-131.
- STEINDL, D. R. L., 1976b. The use of phase-contrast microscopy in the identification of ratoon stunting disease. Proceedings of Queensland Society of Sugarcane Technologists. 43rd Conference. Brisbane, p. 71-72.
- STEINDL; D. R. L. e C. G. HUGHES, 1953. Ratoon stunting disease. Cane Growers' Quarterly Bulletin. Brisbane, 16(3): 79-95.
- STEINDL, D. R. L. e D. S. TEAKLE, 1974. Recent developments in the identification of ratoon stunting disease. Proceedings of the Queensland Society of Sugarcane Technologists. 41st Conference, Brisbane, p. 101-104.
- SUZUKI, Y. e UCHIDA, K., 1965. Microbiological studies of phytopathogenic bacteria. I. On 2-ketogluconic acid fermentation by the bacteria belonging to the *Erwinia amylovora* Group. Agric. Biol. Chem. (Tokyo), 29: 462-470.

- TEAKLE, D. S., 1974. The causal agent of sugarcane ratoon stunting disease (RSD). Proceedings of the 15th Congress. International Society of Sugarcane Technologists. Durban, p. 225-233.
- TEAKLE, D. S. ; P. M. SMITH e D. R. L. STEINDL, 1973. Association of a small coryneform bacterium with the ratoon stunting disease of sugarcane. Australian Journal of Agricultural Research. Melbourne, 24: p.869-874.
- TODD, E., 1960. The ratoon stunting disease of sugarcane and its control in Florida. U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service, 34(12): 1-7.
- TOKESHI, H. ; A. SANGUINO e F. AKIBA, 1974. *Xanthomonas albilineans*, provável agente causal de raquitismo da soqueira e escaldadura de cana-de-açúcar. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 84(6): 28-40.
- TUITE, J., 1969. Plant Pathological Methods: fungi and bacteria. Minneapolis, Burgess, 239 p.
- 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, 78 p. (Dissertação de Mestrado).
- VEIGA, F. M., 1956. Notas sobre o raquitismo das socas em campos. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 47: 81-83.
- YOURG, J. M. ; D. W. DYE ; J. F. BRADBURY ; C. G. PANAGOPOULOS e C. F. ROBBS, 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. N. Z. J. Agric. Res., 21: 153-177.

ZUET, T. Van Der, 1969. Study of "fire blight" cankers and associated bacteria in pear. Phytopathology, 59: 607-613.

10 - A P Ê N D I C E

TABELA 1 - Tratamentos empregados no teste de patogenicidade de bactérias isoladas de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD.

Tratamentos	Leitura na Escala de Mc Farland	Concentração Aproximada do inóculo
<i>Erwinia herbicola</i> (C 1)	3	$2,5 \cdot 10^8$ células viáveis/ml
<i>Pseudomonas rubrisubalbicans</i> (C 2)	3	$2,5 \cdot 10^8$ células viáveis/ml
<i>Pseudomonas rubrisubalbicans</i> (C 3)	3	$2,5 \cdot 10^8$ células viáveis/ml
<i>Xanthomonas albilineans</i> (X RSD) ^a	3	$8 \cdot 10^8$ células viáveis/ml
Caldo bruto não diluído ^b	-	- - -
Água esterilizada	0	- - -

(a) Recebida do Prof. Fujio Akiba (Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro)

(b) Extraído dos nós das plantas com sintomas de RSD

TABELA 2 - Bactérias fitopatogênicas usadas para testar a reação do capim Elefante

Culturas	Procedência (*)	Hospedeiro
<i>E. carotovora</i>	Depto. Fitop. UFRRJ-ENA 2069	Cenoura (<i>D. carota</i> L.)
<i>E. carotovora</i>	Depto. Fitop. UFRRJ-ENA 2143	Pimentão (<i>C. annuum</i> L.)
<i>E. herbicola</i>	Depto. Fitop. UFRRJ-ENA 2041	Bananeira (<i>Musa</i> sp.)
<i>E. herbicola</i>	Depto. Fitop. UFRRJ-ENA 2130	Guaranã (<i>Paullinea</i> sp.)
<i>P. mori</i>	Depto. Fitop. ESALQ/USP	Amoreira (<i>Morus</i> sp.)
<i>P. rubrilineans</i>	Depto. Fitop. ESALQ/USP	Cana-de-açúcar (<i>S. officinarum</i> L.)
<i>X. albilineans</i> (X LSD) **	Depto. Fitop. ESALQ/USP	Cana-de-açúcar (<i>S. officinarum</i> L.)
<i>X. albilineans</i> (X RSD) ***	Depto. Fitop. ESALQ/USP	Cana-de-açúcar (<i>S. officinarum</i> L.)
<i>X. phaseoli</i>	Depto. Fitop. ESALQ/USP	Feijoeiro (<i>P. vulgaris</i> L.)

- (*) UFRRJ-ENA - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
ESALQ/USP - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP.
- (**) *X. albilineans* (X LSD) Isolada da cana-de-açúcar com sintoma de escaladaduras das folhas
- (***) *X. albilineans* (X RSD) Isolada da cana-de-açúcar com sintomas de RSD (TOKESHI *et alii*, 1974).

TABELA 3 - Organismos usados para testar a reação do capim Elefante à inoculação com bactérias e fungos isolados da cana-de-açúcar, e leveduras encontradas em destilarias de aguardente de cana-de-açúcar

Organismos	Procedência (*)
Bactérias:	
<i>E. herbicola</i> (C 1)	Depto. Fitop. ESALQ/USP
<i>E. rubrisubalticans</i> (C 2)	Depto. Fitop. ESALQ/USP
<i>E. rubrisubalbicans</i> (C 3)	Depto. Fitop. ESALQ/USP
<i>Xanthomonas albilineans</i> (X RSD)	Depto. Fitop. ESALQ/USP
Fungos:	
<i>Colletotrichum falcatum</i>	Depto. Fitop. ESALQ/USP
<i>Fusarium moniliiforme</i> (C 17)	Depto. Fitop. FCMBB/UNESP
<i>Fusarium moniliiforme</i> (C 24)	Depto. Fitop. FCMBB/UNESP
<i>Fusarium moniliiforme</i> (C 29)	Depto. Fitop. FCMBB/UNESP
Leveduras:	
<i>Candida cruzei</i>	Inst. Zimot. ESALQ/USP
<i>Candida tropicalis</i>	Inst. Zimot. ESALQ/USP
<i>Hansenula anomala</i>	Inst. Zimot. ESALQ/USP
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> (I.Z. 284 L.)	Inst. Zimot. ESALQ/USP
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (I. Z. 1716)	Inst. Zimot. ESALQ/USP
<i>Schnizosaccharomyces pombae</i> (I.Z. 1354)	Inst. Zimot. ESALQ/USP

(*) ESALQ/USP: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo

FCMBB/UNESP: Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu - Universidade de São Paulo

TABELA 4 - Tratamentos empregados para testar a reação do capim Elefante à inoculação com diferentes concentrações de: *Candida cruzei*, *Fusarium moniliforme*, *Hansenula anomala* e *Saccharomyces cerevisiae*

Tratamentos	Concentrações em talos / ml		
	Máxima	Média	Mínima
<i>C. cruzei</i>	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^1$
<i>F. moniliforme</i>	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^1$
<i>H. anomala</i>	$6 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^2$	$6 \cdot 10^1$
<i>S. cerevisiae</i>	$7 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^2$	$7 \cdot 10^1$
Água esterilizada	0	0	0

TABELA 5 - Tratamentos usados no teste de reação do capim Elefante à inoculação com diferentes concentrações de bactérias isoladas dos colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD

Tratamentos	Concentrações estimadas em células viáveis / ml		
	Máxima	Média	Mínima
<i>E. herbicola</i> (C 1)	$2,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^3$
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 2)	$2,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^3$
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 3)	$2,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^3$
<i>X. albilineans</i> (X RSD)	$8,0 \cdot 10^8$	-	-
Água esterilizada	0	0	0

TABELA 6 - Tratamentos empregados para testar a reação do capim Elefante à inoculação com caldo extraído e com bactérias isoladas de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD, submetidos ou não à inativação térmica

Tratamentos	Inativação Térmica a 60°C por 25 minutos
Caldo bruto dos colmos	Sem
Caldo bruto dos colmos	Com
Caldo bruto dos colmos tratados a 50,5°C ^a	Sem
<i>E. herbicola</i> (C 1)	Sem
<i>E. herbicola</i> (C 1)	Com
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 2)	Com
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 3)	Com
<i>X. albilineans</i> (X LSD)	Com
<i>X. albilineans</i> (X RSD)	Sem
<i>X. albilineans</i> (X RSD)	Com
Água esterilizada	-

(a) Tempo de tratamento dos colmos = 2 horas

TABELA 7 - Teste de patogenicidade das bactérias isoladas de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD, em cana-de-açúcar cultivar CB 44-101

Tratamentos	Nº plantas inoculadas	Nº plantas c/sintomas	% plantas c/sintomas
Caldo bruto	15	15	100,0
<i>E. herbicola</i> (C 1)	15	11	73,3
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 2)	15	7	46,7
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 3)	15	7	46,7
<i>X. albilineans</i> (X RSD)	12	3	25,0
Água esterilizada	15	1	6,7

TABELA 8 - Populações de *E. herbicola* (C 1) em caldo obtido dos nós de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD

Cultivares	Nº da planta	Médias do número de colônias nas Placas ^a	Número de células viáveis por ml de caldo
IAC 48/65	1	21,1	$2,11 \cdot 10^5$
	2	17,4	$1,74 \cdot 10^5$
	3	28,0	$2,80 \cdot 10^5$
	4	22,5	$2,25 \cdot 10^5$
	5	eliminado	---
IAC 52/326	6	eliminado	---
	7	220,3	$2,20 \cdot 10^6$
	8	70,1	$0,70 \cdot 10^6$
	9	eliminado	---
	10	380,1	$3,80 \cdot 10^6$

(a) Média de cinco placas inoculadas com caldo diluído a 10^{-3}

TABELA 9 - Ponto de inativação térmica "in vitro" das bactérias isoladas de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD

Bactérias	Temperatura de tratamento por 20 minutos					
	28 ^o C	48 ^o C	50 ^o C	52 ^o C	54 ^o C	56 ^o C
<i>E. herbicola</i> (C 1)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 2)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 2)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>X. albilineans</i> (X LSD)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>X. albilineans</i> (X RSD)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)

(+): Presença de células viáveis após o tratamento

(-): Ausência de células viáveis após o tratamento

TABELA 10 - Descoloração vascular do capim Elefante após inoculação com algumas bactérias fitopatogênicas

Tratamentos	Número de plantas com descoloração vascular em 20 plantas inoculadas por repetição			(a) Médias
	I	II	III	
<i>X. albilineans</i> (X LSD)	20	20	20	20,00 a
<i>X. albilineans</i> (X RSD)	20	20	20	20,00 a
<i>P. subalbilineans</i>	17	20	16	17,67 a
<i>E. caratovora</i> (ENA 2069)	9	9	7	8,33 b
<i>P. mori</i>	8	7	6	7,00 b
<i>E. caratovora</i> (ENA 2129)	7	5	6	6,00 bc
<i>E. caratovora</i> (ENA 2143)	6	6	5	5,67 bc
<i>E. herbicola</i> (ENA 2041)	3	3	4	3,33 cd
<i>E. herbicola</i> (ENA 2130)	3	2	3	2,67 cd
<i>X. phaseoli</i>	1	3	1	1,67 d
Testemunha (água esterilizada)	1	2	1	1,33 d
C. V. = 10,4%		$\Delta 1\% = 3,33$ (Tuckey)		

(a): Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente

TABELA 11 - Descoloração vascular do capim Elefante após a inoculação com bactérias e fungos isolados de cana-de-açúcar e com leveduras mais comumente encontradas em destilarias de aguardente de cana-de-açúcar

Tratamentos	Número de plantas com descoloração vascular em 20 plantas inoculadas por repetição			(a) Média
	I	II	III	
<i>F. moniliiforme</i> (C 17)	12	12	12	12,00 a
<i>F. moniliiforme</i> (C 24)	12	12	12	12,00 a
<i>F. moniliiforme</i> (C 29)	12	12	12	12,00 a
<i>X. albilineans</i> (X RSD)	12	12	12	12,00 a
<i>C. cruzei</i>	8	10	10	9,33 b
<i>E. herbicola</i> (C 1)	10	8	10	9,33 b
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 2)	10	8	10	9,33 b
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 3)	9	9	10	9,33 b
<i>H. anomala</i>	5	7	7	6,33 c
<i>S. cerevisiae</i>	5	6	6	5,67 c
<i>S. carlsbergensis</i>	2	1	2	1,67 d
<i>S. pombae</i>	1	1	2	1,33 d
<i>C. tropicalis</i>	0	1	2	1,00 d
<i>C. falcatum</i>	0	0	1	0,33 d
Testemunha (água esterilizada)	0	0	1	0,33 d
C. V. = 9,6% $\Delta 1\% = 2,31$ (Tuckey)				

(a): Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente

TABELA 12 - Descoloração vascular do capim Elefante após inoculação com *Fusarium moniliforme* e diversas leveduras, em diferentes concentrações

Tratamentos	Talos por mililitro	Número de plantas com descoloração vascular em doze plantas inoculadas por repetição			(a) Médias
		I	II	III	
<i>F. moniliforme</i>	5 . 10 ⁶	12	12	12	12,00 a
<i>H. anomala</i>	6 . 10 ⁶	8	10	10	9,33 ab
<i>C. cruzei</i>	5 . 10 ⁶	7	7	9	7,67 bc
<i>S. cerevisiae</i>	7 . 10 ⁶	6	9	8	7,67 bc
<i>F. moniliforme</i>	5 . 10 ²	7	6	5	6,00 bcd
<i>S. cerevisiae</i>	7 . 10 ²	7	5	5	5,67 cd
<i>H. anomala</i>	6 . 10 ²	5	4	6	5,00 cde
<i>S. cerevisiae</i>	7 . 10 ¹	4	5	5	4,67 cde
<i>C. cruzei</i>	5 . 10 ²	3	4	5	4,00 def
<i>F. moniliforme</i>	5 . 10 ¹	3	2	4	3,00 def
<i>H. anomala</i>	6 . 10 ¹	2	3	2	2,33 ef
<i>C. cruzei</i>	5 . 10 ¹	3	2	2	2,33 ef
Testemunha (água esterilizada)	0	1	1	1	1,00 f
C. V. = 17,1%		Δ 1% = 3,33 (Tuckey)			

(a): Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente

TABELA 13 - Descoloração vascular de capim Elefante após inoculação com diferentes concentrações de bactérias isoladas de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD

Tratamentos	Células viáveis por mililitro	Número de plantas com descolora- ção vascular em doze plantas ino-			(a)
		I	II	III	
<i>X. albilineans</i> (X RSD)	8,0 . 10 ⁸	11	12	12	11,67 a
<i>E. herbicola</i> (C 1)	2,5 . 10 ⁸	12	10	12	11,33 a
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 2)	2,5 . 10 ⁸	12	10	10	10,67 a
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 3)	2,5 . 10 ⁸	6	6	7	6,33 b
<i>E. herbicola</i> (C 1)	2,5 . 10 ⁴	6	5	7	6,00 b
<i>E. herbicola</i> (C 1)	2,5 . 10 ³	4	5	5	4,67 b
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 2)	2,5 . 10 ⁴	3	4	4	3,67 bc
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 3)	2,5 . 10 ⁴	2	1	1	1,33 cd
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 2)	2,5 . 10 ³	1	1	0	0,67 d
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 3)	2,5 . 10 ³	0	1	0	0,33 d
Testemunha (água esterilizada)	0	0	0	0	0,00 d

C. V. = 14,8%

Δ 1% = 2,72 (Tuckey)

(a): Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente

TABELA 14 - Descoloração vascular do capim Elefante após a inoculação com caldo extraído e com bactérias isoladas de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de RSD, submetidas ou não a tratamento térmico

Tratamentos	Tratamento térmico em °C (a)	Número de plantas com descoloração vascular em dez plantas inoculadas por repetição				(b) Médias
		I	II	III		
Caldo bruto	-	9	10	10		9,67 a
<i>X. albilineans</i> (X RSD)	-	10	9	9		9,33 a
<i>E. herbicola</i> (C 1)	-	9	8	10		9,00 a
Caldo bruto	50,5	6	5	4		5,00 b
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 3)	60,0	2	2	1		1,67 c
<i>P. rubrisubalbicans</i> (C 2)	60,0	2	1	1		1,33 c
<i>E. herbicola</i> (C 1)	60,0	1	0	1		0,67 c
Caldo bruto	60,0	1	1	0		0,67 c
<i>X. albilineans</i> (X RSD)	60,0	1	0	0		0,33 c
<i>X. albilineans</i> (X LSD)	60,0	1	0	0		0,33 c
Testemunha (água esterilizada)	-	0	1	0		0,33 c
C. V. = 16,5%		1% = 2,23 (Tuckey)				

(a): Tempo de inativação de 20 minutos

(b): Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente