

PODRIDÃO DE RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR: FUNGOS  
ASSOCIADOS E REAÇÃO DE CULTIVARES  
*A *Dythium arrhenomanes**

ROSA MARIA VALDEBENITO SANHUEZA

Orientador: Prof. ERIC BALMER

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

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Dezembro, 1982

A Marcos, Paulina e Marco Estéban

Aos meus pais e irmãos

Aos meus amigos

Dedico

## AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos

- Ao Professor Dr. Eric Balmer pela valiosa orientação, dedicação e estímulo.
- Ao Professor Dr. Hasime Tokeshi, pela constante colaboração e importantes sugestões.
- Aos Professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, em especial aos Drs. Hiroshi Kimati, Tasso Leo Krugner e Armando Bergamin Fº, pelas contribuições no período de desenvolvimento do Curso.
- Aos Professores Dr. Aduino Ivo Milanez, do Instituto de Botânica de São Paulo e Dr. Ivo de Carvalho, da Universidade de Goiania, pela importante orientação e assistência na identificação das espécies de *Pythium*.
- Aos Pesquisadores do Programa de Melhoramento do PLANALSUCAR, em especial ao Engº Agrº MS Carlos Alberto B. Zacarias, Engº Agrº Shinji Suzuki, Estação Experimental Central da COEST, e ao Dr. Sizuo Matsuoka, Dr. Yodiro Masuda e Engº Agrº MS Marineide M.M. Aguilera, da Estação Experimental Central da COSUL, pelas facilidades concedidas durante a realização do trabalho.
- Ao Professor Dr. Décio Barbin, da ESALQ, pelas sugestões quanto ao delineamento e análise dos resultados dos experimentos.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa outorgada.
- Ao Convênio estabelecido entre o PLANALSUCAR e a FEALQ, que objetivando auxiliar o programa de produção de novas variedades RB na região do Rio de Janeiro estimulou e implementou o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, e de forma especial aos Eng<sup>os</sup> Agr<sup>os</sup> MS Nilse K. Yokomizo e Nilton Luiz de Souza, pelo estímulo e amizade.

Ao Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> MS Nicesio F.J. de A. Pinto e esposa, pela amizade e revisão dos originais.

A Srta. Cloris Alessi, Bibliotecária da ESALQ pelas valiosas sugestões e amizade.

Aos Funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, especialmente aos Srs. Pedro Silva, José Pereira Sobrinho e Armando A. de Oliveira, pela amizade e colaboração nos trabalhos de laboratório e casa-de-vegetação.

Às Sras. Maluli Delgado e Margareth Pyles Wagner, do PLANALSUCAR pela valiosa colaboração.

Aos Funcionários da Secretaria do Curso de Pós-Graduação e da Biblioteca Central da ESALQ, pela colaboração prestada.

À todas as pessoas, que de forma direta ou indireta, com sua colaboração, contribuíram para a realização deste trabalho.

A pesquisa aqui apresentada é propriedade do Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar - PLANALSUCAR e da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ, como resultado do Convênio estabelecido entre o PLANALSUCAR e a Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz - FEALQ.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO .....	xi
SUMMARY .....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Sintomas e prejuízos causados pela doença .....	3
2.2. Fungos associados às lesões de raízes de cana-de-açúcar ..	5
2.3. Taxonomia de espécies de <i>Pythium</i> .....	8
2.4. Características de espécies de <i>Pythium</i> com ênfase em <i>Pythium arrhenomanes</i> Drechsler .....	10
2.4.1. Aspectos ecológicos e fisiológicos gerais para espécies do gênero <i>Pythium</i> .....	10
2.4.2. Tecidos afetados por <i>P. arrhenomanes</i> .....	10
2.4.3. Características morfológicas de <i>Pythium arhe-</i> <i>nomanes</i> .....	11
2.4.4. Variabilidade de <i>P. arrhenomanes</i> .....	11
2.4.5. Características e condições para infecção por espécies de <i>Pythium</i> e em especial, por <i>P. ar-</i> <i>rhenomanes</i> .....	12
2.5. Relações entre diferentes espécies de <i>Pythium</i> e ou- tros agentes patogênicos em raízes de cana-de-açúcar .....	14
2.6. Reações de cultivares a <i>P. arrhenomanes</i> .....	16
2.6.1. Generalidades .....	16
2.6.2. Obtenção de plantas para a inoculação .....	18
2.6.3. Substratos utilizados para o desenvolvimento das reações patógeno-hospedeiro em testes de patogenicidade .....	19
2.6.4. Forma e preparo do inóculo .....	19
2.6.5. Estágios de desenvolvimento das plantas e ino- culação com espécies de <i>Pythium</i> .....	20

2.6.6. Condução de experimentos para testes de patogenicidade em condições de casa-de-vegetação .....	21
2.6.7. Avaliação das reações das cultivares a patógenos inoculados .....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
3.1. Levantamento de fungos associados às podridões de raízes .....	26
3.2. Aspectos taxonômicos e metodológicos para a identificação de espécies de <i>Pythium</i> .....	29
3.3. Generalidades da metodologia utilizada nos testes de patogenicidade .....	31
3.3.1. Cultivares de cana-de-açúcar testadas .....	31
3.3.2. Origem e preservação dos isolados das espécies de fungos testados .....	31
3.3.3. Obtenção das plantas para a inoculação .....	33
3.3.4. Substrato para produção de inóculo .....	34
3.3.5. Preparo do inóculo .....	34
3.3.6. Substrato para o desenvolvimento das plantas utilizadas nos testes de patogenicidade .....	35
3.3.7. Inoculação e condução dos experimentos .....	37
3.3.8. Avaliação da patogenicidade .....	38
3.3.9. Delineamento experimental .....	39
3.4. Avaliação do efeito de tipos e níveis de inóculo na reação de cultivares .....	39
3.4.1. Efeito do inóculo constituído de raízes naturalmente infectadas, oriundas de diferentes cultivares de cana-de-açúcar .....	39
3.4.2. Efeito do inóculo constituído de raízes naturalmente infectadas, oriundas da cultivar NA 56-79 .....	41

3.4.3. Efeito do inóculo constituído de raízes naturalmente infectadas comparado com o de cultura pura de <i>P. arrhenomanes</i> .....	42
3.4.4. Efeito dos meios V-8 ágar, areia-quirera de milho e areia-farinha de milho como substratos para a produção de inóculo de <i>P. arrhenomanes</i> .....	43
3.5. Patogenicidade de fungos isolados de lesões de raízes de cana-de-açúcar, no mesmo hospedeiro .....	44
3.5.1. Patogenicidade de <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>P. arrhenomanes</i> e complexo <i>P. acanthicum</i> - <i>P. oligandrum</i> .....	44
3.5.2. Patogenicidade de <i>P. arrhenomanes</i> , <i>P. mamillatum</i> e <i>P. nagaii</i> (?) nas cultivares CB 47-89 e NA 56-79 .....	46
3.5.3. Patogenicidade de <i>P. arrhenomanes</i> e complexo <i>P. acanthicum</i> - <i>P. oligandrum</i> nas cultivares CB 47-89, CP 51-22 e RB 705007 .....	47
3.6. Patogenicidade de diferentes isolados de <i>P. arrhenomanes</i> na cultivar CB 47-89 .....	48
3.7. Reações de cultivares de cana-de-açúcar à inoculação com <i>P. arrhenomanes</i> .....	49
3.7.1. Reação de sete cultivares de cana-de-açúcar à <i>P. arrhenomanes</i> .....	49
3.7.2. Reação de seis cultivares de cana-de-açúcar à <i>P. arrhenomanes</i> .....	50
3.7.3. Reação de dez cultivares de cana-de-açúcar à <i>P. arrhenomanes</i> .....	51
3.7.4. Reação de nove cultivares de cana-de-açúcar à <i>P. arrhenomanes</i> .....	52
3.8. Reação das cultivares CB 47-89 e RB 705146 às espécies de <i>Pythium</i> inoculadas em conjunto ou separadamente .....	54



	Página
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
4.1. Levantamento de fungos associados à podridões de raízes .....	55
4.2. Identificação das espécies de <i>Pythium</i> .....	60
4.3. Aspectos gerais relacionados com a apresentação de resultados dos experimentos desenvolvidos em casa de vegetação .....	62
4.4. Efeito de tipos e níveis de inóculo na reação de cultivares .....	63
4.4.1. Efeito do inóculo constituído de raízes naturalmente infectadas oriundas de diferentes cultivares de cana-de-açúcar .....	63
4.4.2. Efeito do inóculo constituído de raízes naturalmente infectadas da cultivar Na 56-79 .....	67
4.4.3. Efeito do inóculo constituído de raízes naturalmente infectadas, comparado com o de cultura pura de <i>P. arrhenomanes</i> .....	71
4.4.4. Efeitos dos meios V-8 ágar, areia-quirera de milho e areia - farinha de milho como substratos para a produção de inóculo de <i>P. arrhenomanes</i> .....	76
4.5. Patogenicidade de fungos isolados de lesões de raízes de cana-de-açúcar, no mesmo hospedeiro .....	85
4.5.1. Patogenicidade de <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>P. arrhenomanes</i> e complexo <i>P. acanthicum</i> - <i>P. oligandrum</i> .....	85
4.5.2. Patogenicidade de <i>P. arrhenomanes</i> , <i>P. millatum</i> e <i>P. nagaii</i> (?) nas cultivares CB 47-89 e NA 56-79 .....	92
4.5.3. Patogenicidade de <i>P. arrhenomanes</i> e do complexo <i>P. acanthicum</i> - <i>P. oligandrum</i> nas cultivares CB 47-89, CP 51-22 e RB 705007 .....	96

	Página
4.6. Patogenicidade de diferentes isolados de <i>P. arrhenomanes</i> na cultivar CB 47-89 .....	103
4.7. Reações de cultivares de cana-de-açúcar a inoculação com <i>P. arrhenomanes</i> .....	107
4.7.1. Reação de sete cultivares de cana-de-açúcar ã inoculação com <i>P. arrhenomanes</i> .....	107
4.7.2. Reação de seis cultivares de cana-de-açúcar ã inoculação com <i>P. arrhenomanes</i> .....	110
4.7.3. Reação de dez cultivares de cana-de-açúcar ã inoculação com <i>P. arrhenomanes</i> .....	116
4.7.4. Reação de nove cultivares de cana-de-açúcar ã inoculação com <i>P. arrhenomanes</i> .....	123
4.8. Reação das cultivares CB 47-89 e RB 705146 às espécies de <i>Pythium</i> inoculadas em conjunto ou separadamente .....	130
5. DISCUSSÃO GERAL .....	141
6. CONCLUSÕES .....	152
LITERATURA CITADA .....	155
APÊNDICE - GLOSSÁRIO .....	167

PODRIDÃO DE RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR: FUNGOS ASSOCIADOS E  
REAÇÃO DE CULTIVARES A *Pythium arrhenomanes*

Rosa Maria Valdebenito Sanhueza

Orientador: Prof. Eric Balmer

RESUMO

A podridão de raízes de cana-de-açúcar, que ocorre em Campos, RJ foi pesquisada quanto aos fungos associados às lesões das raízes, constatando-se alta frequência dos gêneros *Curvularia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Trichoderma*.

As espécies de *Pythium* isoladas foram identificadas como *P. arrhenomanes* Drechsler, complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum* sensu Watanabe, *P. mamillatum* Meurs, *P. periplocum* Drechsler e *P. nagaii*(?) Ito e Tokunaga. Nos testes de patogenicidade, realizados com *F. oxysporum* e as diferentes espécies de *Pythium*, *P. arrhenomanes* causou maiores prejuízos induzindo, em cana-de-açúcar, sintomas semelhantes aos detectados em condições de campo.

Foram observadas tendências para a variação da patogenicidade de diferentes isolados de *P. arrhenomanes* e também, diferenças significativas quanto a suscetibilidade de algumas cultivares de cana-de-açúcar, quando inoculadas com diferentes espécies de *Pythium*.

A metodologia desenvolvida para os testes de patogenicidade de espécies de *Pythium* em cana-de-açúcar constou de: utilização de plantas previamente desenvolvidas em areia autoclavada, transferência destas para sacos de polietileno, contendo areia esterilizada e o inóculo em camada, 3cm abaixo da planta. Os sacos foram introduzidos em cilindros de policloreto de vinila (PVC) opaco, de cor marrom. Os melhores resultados foram conseguidos mediante a utilização do inóculo preparado em V-8 ágar ou em areia - quirera de milho.

A inoculação de cana-de-açúcar com *P. arrhenomanes*, em casa de vegetação, permitiu o agrupamento das nove cultivares estudadas em três classes: suscetível, intermediária ou resistente. Estes grupos foram estabelecidos tomando-se por base o índice de sintomas nas raízes e o peso fresco da parte aérea e do sistema radicular das plantas inoculadas, em relação as respectivas testemunhas.

SUGARCANE ROOT ROT DISEASE: RELATED FUNGI AND REACTION OF  
CULTIVARS TO *Pythium arrhenomanes*

Rosa Maria Valdebenito Sanhueza

Adviser: Prof. Eric Balmer

### SUMMARY

A sugarcane root rot disease occurring in Campos, RJ, State of Brazil, was studied in relation to associated fungi. The most frequent genera of fungi isolated from root lesions were *Curvularia*, *Fusarium*, *Pythium* and *Trichoderma*.

*Pythium* species were identified as *P. arrhenomanes* Drechsler, *P. acanthicum* - *P. oligandrum* complex sensu Watanabe, *P. mamillatum* Meurs, *P. periplocum* Drechsler e *P. nagaii* (?) Ito and Tokunaga. Pathogenicity tests were performed with these *Pythium* species and *Fusarium oxysporum*. *P. arrhenomanes* proved to be the most harmful specie, causing in sugarcane symptoms similar to those found in the field.

Different isolates of *P. arrhenomanes* tended to show pathogenicity variation. Also significant differences on susceptibility of some sugarcane cultivars, when inoculated with different species of *Pythium*, were observed.

A *Pythium* pathogenicity test method was developed, where plants previously grown in autoclaved sand were transferred to a

polyethylene bag filled with sterilized sand and with an inoculum layer. The bags were supported by a brown opaque polyvinyl chloride (PVC) cylinder. Best results were obtained utilizing inoculum produced on V-8 agar or in a mixture of sand and coarse corn meal.

Inoculation of sugarcane cultivars with *P. arrhenomanes* under greenhouse conditions allowed the classifications of nine cultivars into susceptible, intermediate or resistant classes. These groups were determined based on a root rot symptom index and on the fresh weight of shoots and roots.

## 1. RESUMO

Avaliou-se qualitativa e quantitativamente a população bacteriana interna em cana sadia e inoculada com *Xanthomonas albilineans* (ASHBY) Dowson, e estudou-se, *in vivo* e *in vitro*, as relações entre o patógeno e *Erwinia herbicola* (Lohnis) Dye e/ou *Pseudomonas* sp.

As populações bacterianas residentes internamente no colmo sadio e doente foram diferentes.

Nos experimentos de relações em laboratório, comparou-se o crescimento das três bactérias em caldo de Wilbrink-metionina e em filtrado da cultura de *E. herbicola* (FEh), e do patógeno, em filtrado da cultura de *Pseudomonas* sp. O FEh favoreceu o crescimento de *X. albilineans* e inibiu a *Pseudomonas* sp e seu próprio crescimento. Este efeito aumentou com maior concentração de talos na cultura filtrada de *E. herbicola* e diminuiu com aquecimento. O filtrado de *Pseudomonas* sp. inibiu o crescimento do patógeno.

Em casa de vegetação, plantas de milho doce (Cuba), mostraram diminuição crescente de sintomas externos de Escaldadura das Folhas, quando foram inoculadas com *X. albilineans* mais *E. herbicola* viva,

No Brasil, sintomas de podridão de raízes tem sido constatadas nos Estados de Alagoas, Pernambuco e Rio de Janeiro, em condições de solos com problemas de drenagem. No Estado de São Paulo, *P. arrhenomanes* foi isolado de raízes de cana-de-açúcar, e seu potencial patogênico comentado pelos autores dessa pesquisa (CARVALHO e AZZI, 1964).

Os antecedentes acima referidos, juntamente com a interferência que esta doença causa nas avaliações dos programas de melhora-mento nessas regiões, e a falta de informação pertinente ao assunto fo-ram as razões principais que justificaram e motivaram este tra-balho.

Assim, os objetivos da presente pesquisa foram:

- levantamento dos fungos associados às lesões de raízes de cana-de-açúcar;
- identificação das principais espécies de fungos pato-gênicos;
- desenvolvimento de uma metodologia para testar a pato-genicidade de organismos isolados de raízes de cana-de-açúcar; e
- testes das reações de cultivares ao principal agente causal isolado de lesões em raízes de cana-de-açúcar.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Sintomas e prejuízos causados pela doença

No estudo deste problema, diversos nomes foram dados, dentre eles: complexo da podridão da raiz, complexo de falha no crescimento, doença da raiz, podridão de raiz (EDGERTON *et alii* 1929) ou também, doença complexa da raiz (CARPENTER, 1928).

Os sintomas primários desta doença foram descritos por EDGERTON *et alii* (1929) e RANDES e DOPP (1938). Estes autores mencionaram que o sistema radicular de plantas doentes apresentava lesões com manchas avermelhadas, às vezes estrangulando a raiz, e com perda na rigidez dos tecidos nas pontas das raízes. A morte das extremidades de crescimento estimulava a ramificação da parte anterior da raiz, fazendo com que as raízes doentes se apresentassem curtas, ramificadas e deformadas. As lesões, em raízes dos brotos, eram inicialmente translúcidas, encharcadas e amareladas. Poderia haver eliminação total das raízes fibrosas. Uma característica marcante era a destruição generalizada das raízes mais finas, das secundárias e das radículas. As raízes finas

eram logo invadidas por outros microorganismos e após sua destruição restava somente sua cicatriz na raiz principal. Nas regiões velhas das raízes maiores, as lesões poderiam ter cor marrom e até preta, porém, sem causar prejuízos para a condução de água. Oosporos, esporângios e micélio do patógeno eram observados nas raízes doentes.

RANDS e DOPP (1938) comentaram ainda que os sintomas na parte aérea eram amarelecimento, enrolamento das folhas e murcha, diminuição do perfilhamento, atraso do amadurecimento e morte das plantas. Na época favorável para crescimento da planta, havia substituição de raízes e a atividade do patógeno era limitada ao córtex e à podridão de radículas.

De maneira geral, condições de seca agravaria os sintomas da parte aérea (CARPENTER, 1919).

Os prejuízos causados pela doença eram variáveis (RANDS e DOPP, 1938), dependendo do nível de resistência das cultivares utilizadas.

Assim, nas variedades suscetíveis haveria agravamento dos sintomas antes descritos até a morte de plantas; nas resistentes, haveria capacidade de estabelecer um sistema radicular forte, antes da ocorrência da podridão. O ataque do *Pythium arrhenomanes*, neste caso, aconteceria somente nas raízes laterais mais finas e nos ápices de crescimento, podendo ocorrer, às vezes, lesões localizadas, indicando restrição no avanço da podridão (RANDS e DOPP, 1938).

Nas variedades intermediárias em resistência, o efeito da perda de raízes era evidenciado na soca, onde havia diminuição do

perfilamento e atraso do amadurecimento ocasionando a queda da produção (RANDS e DOPP, 1938).

No Brasil, ARRUDA (1946), CARVALHO e AZZI (1964) e DANTAS (1970) comentaram a importância potencial desta doença e coincidiram em recomendar a intensificação dos estudos neste tema, visando a obtenção de variedades comerciais resistentes à podridão das raízes, nas nossas condições.

## 2.2. Fungos associados às lesões de raízes de cana-de-açúcar

Os primeiros estudos sistemáticos dos fungos associados à podridão foram realizados, nos Estados Unidos da América do Norte (EUA) por CARPENTER (1928) e EDGERTON *et alii* (1929), no Havai e na Luisiana, por RANDS e DOPP (1938).

Esses autores, assim como CHU *et alii* (1966) e KOIKE (1969), concordaram em estabelecer que *Pythium arrhenomanes* Drechsler era o principal agente patogênico desta doença.

Segundo CARPENTER (1928), *P. arrhenomanes* é considerado o patógeno mais importante, sendo que a sua ampla distribuição nos canaviais de diversos países e a utilização de cultivares suscetíveis, tornou possível o surto ocorrido na mesma época em diferentes regiões do mundo.

RANDS (1930) e (1938) justificou a ênfase dada aos estudos com *P. arrhenomanes*, em relação à podridão de raízes de cana-de-açúcar, baseado no maior potencial patogênico, em comparação com os outros

organismos associados ao problema, e pelo fato de causar prejuízos semelhantes aos que ocorrem no campo.

Nos levantamentos de fungos que ocorriam nas raízes de cana-de-açúcar foi observado que no geral, os gêneros *Fusarium*, *Trichoderma*, *Pythium* e *Rhizoctonia* foram os mais frequentemente isolados, tanto nos EUA como em Porto Rico e em Formosa. Os resultados de tais trabalhos foram apresentados respectivamente, por RANDES (1930); KOIKE (1969) e TZEAN *et alii* (1974). Outros gêneros citados por esses autores foram *Marasmius*, *Curvularia*, *Helminthosporium* e *Verticillium*. As condições ambientais e os métodos de isolamento utilizados foram fatores citados por RANDES (1930) e TZEAN *et alii* (1974), respectivamente, como sendo elementos que interferem nos resultados deste tipo de trabalho. Por esta razão, TZEAN *et alii* (1974) comentaram que a importância de determinadas espécies, na etiologia de uma doença, não pode ser baseada somente na frequência dos microorganismos isolados.

TZEAN *et alii* (1974) concordando com WARCUP (1959), afirmaram que, em condições de monocultura, os tipos de fungos do solo, patogênicos e não patogênicos, seriam qualitativamente semelhantes e independeriam do ambiente em que desenvolver-se-ia a cultura, variando, somente, quanto a frequência. Este aspecto tinha sido comentado por KOIKE (1969) que não constatou diferenças marcantes entre populações dos diferentes locais estudados.

Para o isolamento de fungos que colonizam as raízes de plantas, os pesquisadores utilizam, geralmente, técnicas semelhantes que são: desinfecção superficial e/ou lavagem prolongada das amostras em

água corrente (EDGERTON *et alii*, 1929; RANDES e DOPP, 1938); e secagem com papel absorvente e transferência das raízes para ágar-agua contido em placas-de-petri (TZEAN *et alii*, 1974). A obtenção de isolados, nesses casos, é conseguida com a manutenção das raízes no meio de ágar-agua durante 16 a 24 h. a 20-24°C, no escuro. Pontas hifálicas, então desenvolvidas, são transferidas para meios mais nutritivos tais como batata-dextrose-ágar (BDA).

Algumas técnicas específicas são recomendadas por alguns autores quando é provável o isolamento de *Pythium*. Esses métodos se relacionam à inibição de outros microorganismos mais competitivos que *Pythium*, em meio de cultura, os quais foram revisados por TSAO (1970) e por HENDRIX e CAMPBELL (1974).

A descrição e agrupamento das principais espécies de *Pythium* isoladas em Formosa, com morfologia documentada fotograficamente, foram apresentadas por WATANABE *et alii* (1974), WATANABE (1974; 1975; 1975a; 1975b; 1975c) e WATANABE e SHIYOMI (1975).

No estudo de fungos relacionados com lesões nas raízes de cana-de-açúcar, foram citadas outras espécies do gênero *Pythium*, além de *P. arrhenomanes*. Assim, no Havaí, CARPENTER (1928) relatou que diferentes espécies de *Pythium* eram agentes causais da podridão de raízes de cana-de-açúcar. RANDES e DOPP (1938), isolaram em diferentes regiões de Luisiana, EUA, *P. aphanidermatum*, *P. complectens*, *P. complens*, *P. debaryanum*, *P. dissotocum*, *P. graminicolum*, *P. irregulare*, *P. mamillatum*, *P. periculum* e *P. ultimum*. Em Formosa, HSU (1965) isolou *P. catenulatum*, enquanto que, em Porto Rico, KOIKE (1971) relatou a ocorrência de *P. graminicola* e *P. tardicrescens*.

Estudos posteriores em Formosa resultaram no isolamento de outras espécies de *Pythium* relacionadas com o problema de diminuição da brotação da cana-de-açúcar. Estas espécies foram: *P. afertile*, *P. deliense*, *P. inflatum*, complexo de *P. acanthicum*-*P. oligandrum* e complexo de *P. arrhenomanes*-*P. graminicola* (WATANABE, 1974).

No Brasil, CARVALHO e AZZI (1964) relataram que, além de *P. arrhenomanes*, no Estado de São Paulo, *P. megalacanthum* e *P. graminiculum* junto com outras espécies de *Pythium* não identificadas, foram isoladas de cana-de-açúcar.

### 2.3. Taxonomia de espécies de *Pythium*

Para a identificação de espécies de *Pythium*, existem algumas referências clássicas tais como MIDDLETON (1943), WATERHOUSE (1967) e (1968) e FREZZI (1956). Estes autores apresentaram a descrição morfológica e algumas características fisiológicas das espécies, juntamente com chaves para identificação das espécies descritas. Uma nova revisão de espécies e chave taxonômica para o gênero *Pythium* é apresentada por PLAATS-NITERINK (1981).

Levantamentos de espécies de *Pythium* que ocorrem em diversos países foram baseados principalmente nas publicações mencionadas acima (QUIMIO e ABILAY, 1977; WATANABE *et alii*, 1977; PLAATS-NITERINK, 1975; ROBERTSON, 1980).

Nos últimos anos, os critérios taxonômicos utilizados nas chaves acima referidas são postos em dúvida, devido a variabilidade das características consideradas e ao número restrito de isolados usados, para caracterizar cada nova espécie (HENDRIX e CAMPBELL, 1974a e 1974b).

Assim, HENDRIX e PAPA, 1974, propuseram o agrupamento de espécies morfológicamente relacionadas, com diferenças pouco marcantes, nos chamados complexos de espécies. WATANABE (1974) estudando isolados de obtidos de cana-de-açúcar, em Formosa, concordou com o agrupamento de espécies por encontrar muita variação nos caracteres que definem uma espécie. O autor referiu-se, por exemplo, ao complexo *P. arthenomanes* - *P. graminicolum*, e ao complexo *P. acanthicum*-*P. oligandrum*, onde as diferenças entre espécies não ocorrem de forma definida, na maioria dos isolados observados.

Nos estudos taxonômicos deste grupo de fungos, os meios de cultura mais usados para obtenção da fase sexuada são os seguintes: suco V-8 ágar (RAHINIAN e BANIHASTEMI, 1979; LITTRELL e McCARTER, 1970), ágar-farinha-de-milho (MILDENHALL *et alii*, 1971), meio de cultura sintético contendo esterol (HOITINK e SCHMITTHENNER, 1969) e meios de cultura com sementes de cânhamo (HENDRIX e CAMPBELL, 1974).

Blocos dos meios de cultura, acima mencionados, colocados em placas-de-petri, com água destilada com ou sem nutrientes, pedaços de limbo de folhas de capim, estimularam o desenvolvimento de esporângios (HENDRIX e PAPA, 1974). A formação e liberação de zoosporos era ativada pela oxigenação da água, obtida pela sua troca repetida nas placas com blocos de ágar (WATANABE, 1974).

## 2.4. Características de espécies de *Pythium* com ênfase em *Pythium arrhenomanes* Drechsler.

### 2.4.1. Aspectos ecológicos e fisiológicos gerais para espécies do gênero *Pythium*

HENDRIX e CAMPBELL (1974) na revisão da importância deste gênero, como patógeno de plantas, consideram *Pythium* como apresentando uma ampla distribuição, havendo somente algumas espécies restritas a certas condições de ambiente e hospedeiros. Este grupo de fungos tem baixa capacidade saprofítica competitiva, sendo afetado na sua sobrevivência pela atividade microbiológica do solo. Por esta razão, o oosporo considerar-se-ia a estrutura mais importante para a sobrevivência do patógeno em um solo onde não existisse um hospedeiro suscetível, constituindo-se esta estrutura, normalmente, no inóculo primário (HENDRIX e CAMPBELL, 1974).

A maior parte das espécies do gênero *Pythium* apresentam crescimento lento, infectando principalmente raízes absorventes e colo de plântulas ou pontas das raízes de plantas adultas.

### 2.4.2. Tecidos afetados por *P. arrhenomanes*

*P. arrhenomanes* é considerado um patógeno de raízes, não atacando o colo ou caule das plantas, e causando, principalmente, a morte das radículas (BRUEHL, 1953). Seus hospedeiros são listados por MIDDLETON (1943), constituindo-se majoritariamente por gramíneas e somente de algumas plantas leguminosas. Dentre os hospedeiros citados, é



marcante a sua importância no trigo, milho, sorgo, cevada e cana-de-açúcar.

#### 2.4.3. Características morfológicas de *Pythium arrhenomanes*

A descrição morfológica original de *P. arrhenomanes* foi apresentada por DRECHSLER (1928). De forma sucinta, estas características são: esporângio lobulado, oogônio liso e esférico, oosporo de parede lisa, plerótico, com alta frequência de oosporos apresentando degeneração, com anterídios, na maioria dos casos, díclinos e em número que varia de 3 até 20 por oogônio.

No estudo de podridões de raízes em cana-de-açúcar, foi relatada a ocorrência de *Pythium graminicola*, espécie com morfologia semelhante a *P. arrhenomanes* (RANDS, 1961). Segundo HSU (1965), *P. arrhenomanes* seria mais importante na Luisiana, e *P. graminicola*, no Havaí. As diferenças entre as duas espécies foram apresentadas por DRECHSLER (1936), havendo atualmente a tendência de taxonomistas em considerá-las complexo de espécies por não haver diferenças consistentes entre elas (WATANABE, 1974).

#### 2.4.4. Variabilidade de *P. arrhenomanes*

Estudos relacionados com a variabilidade de *P. arrhenomanes* foram feitos por RANDS e DOPP (1934). Aproximadamente 70 isolados, oriundos de diferentes Estados dos EUA, do Canadá e de Mauritius, obtidos de raízes de milho e de cana-de-açúcar, foram analisados com relação a diferentes aspectos. Os resultados deste trabalho revelaram que *P.*

*arrhenomanes* era um fungo que apresentava grande variabilidade nas características morfológicas, culturais e de patogenicidade.

RANDS e DOPP (1934) consideraram que, provavelmente, a grande variação encontrada para *P. arrhenomanes* teria como origem a ocorrência da hibridação entre tipos diferentes, fato este favorecido por possuir o patógeno anterídios díclinos. Segundo estes autores, os isolados obtidos de cultivares com um maior nível de resistência possuíam, geralmente, um maior nível de patogenicidade, quando comparados com isolados obtidos de raízes de cultivares suscetíveis. Desta forma RANDS (1939), baseando-se nestes antecedentes, recomendou a utilização do isolado mais patogênico da região, para testes de avaliação de resistência de cultivares, a podridão das raízes.

RANDS e DOPP (1934) advertiram para o fato de que esta podridão de raízes deve ser considerada como um problema dinâmico. Mencionando também, que grande parte das causas, que originam o declínio de variedades novas, estava provavelmente relacionada com a seleção de biotipos mais patogênicos para estas variedades.

#### 2.4.5. Características e condições para infecção por espécies de *Pythium* e em especial, por *P. arrhenomanes*

Em estudos feitos com milho para *P. arrhenomanes*, NAPI-ACEDO e EXCONDE (1965) relataram que a penetração era mecânica, com hifas inter e intracelulares que eram estabelecidas rapidamente no córtex. A invasão do cilindro central ocorria somente após a morte das células dessa seção da raiz. Estes autores comentaram, ainda, que este patógeno era

restrito no seu crescimento por tecido totalmente desenvolvido por hospedeiro.

Como parasita facultativo, *P. arrhenomanes* depende muito da temperatura, umidade, condições físicas e químicas do solo, relações com outros organismos e da vitalidade das plantas (EDGERTON *et alii*, 1929). As temperaturas ótimas e limite, para crescimento e patogenicidade deste fungo em cana-de-açúcar, foram estudadas por alguns investigadores.

RANDS e DOPP (1938) relataram que temperaturas mínima, ótima e máxima para o fungo foram, respectivamente, 6°C, 30°C e 36 a 38°C, enquanto que para a doença, a temperatura ótima se situou na faixa de 26 a 28°C. Os autores observaram, ainda, que em condições de 18 a 20°C foi obtido o maior grau de doença, provavelmente, por ocorrer limitação do crescimento radicular do hospedeiro. Em plantas que cresceram na faixa de temperatura de 36 a 39°C, não foi detectada podridão. Nas condições que permitiram um crescimento vigoroso, as raízes escaparam à infecção e, apesar de serem afetadas mais tarde, foi possível para a planta dispor de uma quantidade adequada de raízes, fato que permitiu o crescimento normal da parte aérea. Com relação a este aspecto, HUMPHRIES (1958), em estudos realizados com cevada e centeio, afirmou que nestas espécies, a taxa de crescimento da parte aérea somente era afetada de forma marcante, quando a destruição ou perda no sistema radicular fora da ordem de 50% ou mais.

Um dos elementos citados mais frequentemente, afetando a ocorrência da podridão de raízes, causadas por espécies de *Pythium*, é o

excesso de umidade no solo, especialmente em solos pesados, com pouco arejamento, más condições físicas e de má drenagem (RANDS e DOPP, 1938; van der ZWETT, 1958). Neste sentido, HENDRIX e CAMPBELL (1974) e GRIFFIN, (1969) comentaram que estas condições, apesar de favorecer a dispersão do inóculo na forma de zoosporos e permitir o crescimento do micélio, são mais importantes na medida que desfavorecem ao hospedeiro. Outros efeitos desfavoráveis estariam associados à baixa luminosidade e à acumulação de toxinas nos solos encharcados (RANDS e DOPP, 1938; GARRETT, 1948).

#### 2.5. Relações entre diferentes espécies de *Pythium* e outros agentes patogênicos em raízes de cana-de-açúcar

Em um meio ecológico complexo como o solo, ocorrem muitas relações entre seus componentes, incluindo-se as plantas.

Em plantas de cana-de-açúcar com podridão de raízes, foi observada uma permanente associação de vários gêneros de fungos além do gênero *Pythium*.

Assim, embora *P. arrhenomanes* e *P. graminicola* sejam considerados patógenos primários, é provável que outros fungos estejam envolvidos no processo, aumentando os danos causados às plantas.

FLENTJE (1970) comentou as implicações do estudo destes complexos no solo, discutindo os conceitos de organismos invasores primários, secundários e saprófitas. A importância do conceito de complexos etiológicos, sua ocorrência e dificuldade de estudo foram revisadas por WALLACE (1978).

Os estudos envolvendo as relações entre organismos de solo, para o caso da cana-de-açúcar, abrangem efeitos dos microorganismos antagônicos sobre fungos do gênero *Pythium* (LE BEAU, 1938; SRINIVASAN, 1968). O primeiro autor refere-se à ocorrência de espécies de *Trichoderma* como exercendo controle do patógeno. O segundo refere-se a observações sobre o efeito da cultivar no desenvolvimento de diferentes organismos na rizosfera, relacionando este fato com a resistência de cultivares à podridão induzida por *Pythium*.

Os efeitos de dois ou mais fungos inoculados simultaneamente em raízes de cana-de-açúcar já foram reportados. No estudo da etiologia da doença, RANDS e DOPP (1938) relataram que após a inoculação conjunta de *P. arrhenomanes*, com cada uma das diferentes espécies de *Pythium*, *P. dissotocum*, *P. complens* e *P. debaryanum*, somente foi reisolado *P. arrhenomanes*. Os autores concluíram que as outras espécies eram parasitas fracos e invasores secundários.

No HAWAI (1969), foi postulado que *P. acanthicum*, apesar de não ser altamente patogênico, pode aumentar o grau de doença pela supressão da flora antagônica a *P. graminicola*. KOIKE (1971) estudou a interação de *P. tardicrescens* e *P. graminicola*, verificando que a inoculação conjunta causou uma diminuição da doença, em relação ao nível atingido com inoculação isolada para *P. graminicola*.

## 2.6. Reações de cultivares a *P. arrhenomanes*

### 2.6.1. Generalidades

Para RANDES e DOPP (1938) o único método efetivo de controle para podridões de raízes é a obtenção de cultivares resistentes. Os experimentos conduzidos em casa-de-vegetação poderiam ser úteis para interpretar o provável comportamento das cultivares, em condições de campo.

Para ser atingido este objetivo, deverão ser levados em consideração: a variabilidade da patogenicidade de *P. arrhenomanes*; as condições que favorecem a ocorrência da doença; as características agrônômicas e de vigor das plantas.

Segundo GARRETT (1970) a resistência das plantas aos fungos do solo, pode ser fundamentalmente de três tipos: a pré-existente, a induzida pelo ataque do patógeno e a do tipo escape. As duas primeiras são conhecidas para diferentes tipos de doenças, enquanto que a terceira está relacionada com as características de resistência de campo das cultivares. O escape, para podridões de raízes, estaria relacionado ao desenvolvimento abundante do sistema radicular e poderia ser melhorado pela aplicação equilibrada de nitrogênio.

GARRETT (1970) comentou que plantas com um maior número de raízes, apesar de suscetíveis, poderão ter porcentagens iguais de redução nas raízes que as plantas com um sistema radicular menor. Porém, no primeiro caso, o número de raízes ativas será superior e suficiente para manter a planta. Este conceito estaria, também, baseado na distribuição não uniforme do inóculo no solo, o que propiciaria existência de

raízes sadias.

Assim, o sistema radicular e a relação parte aérea/sistema radicular das cultivares são fatores que deveriam ser avaliados, pois, indicariam a capacidade de tolerância que elas poderiam ter. O conceito de tolerância foi definido por BRUEHL (1953), como sendo a capacidade das cultivares em produzirem em solos onde ocorre a podridão de raízes.

Alguns autores referem que a capacidade de substituir ou compensar a área radicular destruída por diversos agentes, (RUSSELL, 1977), por exemplo, por um patógeno e especialmente, quando há morte da região de crescimento, é uma importante característica de resistência para diferentes doenças causadas por fungos do solo (CARPENTER, 1928; RANDE e DOPP, 1938; BRUEHL, 1953; ASHER, 1973; DEACON e HENRY, 1978).

Segundo LEACH (1947), a resistência tanto morfológica como fisiológica à podridão de raízes, depende do vigor do hospedeiro. Assim, condições muito favoráveis à ocorrência da doença e desfavoráveis ao desenvolvimento do hospedeiro poderão quebrar a resistência de algumas cultivares.

EDGERTON *et alii* (1929) comentaram que a influência do ambiente na relação patógeno-hospedeiro, é demonstrada em cana-de-açúcar, nos casos em que variedades marcadamente resistentes em condições de campo apresentam podridão quando testadas em condições de casa-de-vegetação. De forma semelhante, métodos de inoculação que resultam em doença, na maioria das vezes, apresentam uma menor eficiência, quando utilizados em períodos mais quentes.

Para ABBOTT *et alii* (1958), a metodologia sugerida por RANDES e DOPP (1938) seria de pouca utilidade para testes em grande escala, em condições de casa-de-vegetação.

RANDES e DOPP (1938) relataram que, nas variedades comerciais de cana-de-açúcar testadas, em condições de campo, a herança para a resistência a *P. arrhenomanes* é muito complexa. O caráter de resistência estaria geralmente, ligado à suscetibilidade à podridão vermelha e geralmente encontrado nas cultivares mais tardias.

#### 2.6.2. Obtenção de plantas para a inoculação

Diferentes modalidades de preparação de plantas de cana-de-açúcar para inoculação têm sido relatadas.

Assim, KOIKE (1965) e HSU e LIU (1966) relataram a utilização de plântulas, enquanto que a maioria dos outros autores mencionaram a inoculação de mudas formadas a partir de toletes. Estes toletes, de 1 a 3 gemas, tratados termicamente ou com desinfecção superficial, foram plantados diretamente no solo inoculado (EDGERTON *et alii*, 1929; WATANABE *et alii*, 1974). Uma outra alternativa desenvolvida, visando a diminuição da variação entre plantas a serem inoculadas, constou de toletes que foram submetidos ao tratamento térmico ou à desinfecção superficial, sendo em seguida, colocados em substratos esterilizados para o desenvolvimento de raízes e brotos (RANDES e DOPP, 1938; APT e KOIKE, 1962; YANG, 1972). Os substratos utilizados para este fim foram: torta de filtro ou vermiculita (YANG, 1972); solo (VALLE-LAMBOY e AYALA, 1980) e areia de quartzo (EDGERTON *et alii*, 1929).



### 2.6.3. Substratos utilizados para o desenvolvimento das reações patógeno-hospedeiro em testes de patogenicidade

São várias as alternativas para a utilização de substratos e de recipientes para a inoculação de plantas ou para o estudo do sistema radicular. Como referências gerais da metodologia utilizada para estes objetivos, existem aquelas apresentadas por JOHNSON e CURL (1972) e BÖHM (1979).

Com relação ao substrato e a esterilização deste, alguns autores usaram, para inoculação, vasos de argila contendo de 3 a 5 l de solo natural, esterilizado por autoclavagem (EDGERTON *et alii*, 1929). Em outros casos, a esterilização do solo foi realizada com brometo de metila (VALLE-LAMBOY e AYALA, 1980).

Hã variações quanto ao uso de substratos inertes, utilizados em mistura com solo ou isoladamente, sendo mencionados a vermiculita (LITTRELL e McCARTER, 1970; YANG, 1972) e a areia de quartzo com solução nutritiva (RANDS e DOPP, 1938; HALPIN *et alii*, 1952).

Uma opção diferente foi proposta por ADAIR (1968), ao recomendar para testes de inoculação de cana-de-açúcar, recipientes de vidros, que suportavam o tolete na parte superior, e que continham água arejada, permanentemente, para permitir o desenvolvimento das raízes.

### 2.6.4. Forma e preparo do inóculo

Para estudos, envolvendo a cana-de-açúcar, o inóculo de *P. arrhenomanes* utilizado tem sido de três tipos: meios de cultura

colonizados (RANDS e DOPP, 1938); substrato misto, constituído de areia-farinha de milho e, às vezes, areia-farinha de milho-solô (SRINIVASAN, 1958; KOIKE, 1965; KOIKE, 1971; KOIKE e YANG, 1971) e suspensão do inóculo (SRINIVASAN, 1958).

Em alguns trabalhos foi relatado o uso de raízes ou solo naturalmente infectado. Porém, os objetivos estavam restritos, geralmente, a estudos preliminares para isolamento ou reconhecimento de sintomas (CARPENTER, 1928; KOIKE e WARNER, 1965). As dificuldades na obtenção de uniformidade no potencial de inóculo justificaram a infrequente escolha deste tipo de inóculo (SRINIVASAN, 1968).

Em diferentes combinações de hospedeiros e espécies de *Pythium*, são recomendados vários métodos de inoculação.

No preparo do inóculo, foram utilizados meios de cultura sólidos (BRUEHL, 1953; LITRELL e McCARTER, 1970); meios de cultura líquidos (MILDENHALL *et alii*, 1971; WATANABE *et alii*, 1974); sementes de trigo (KLISIEWICZ, 1968); farinha de aveia ou de milho (SRINIVASAN, 1968; ASHER, 1973), respectivamente.

#### 2.6.5. Estágios de desenvolvimento das plantas e inoculação com espécies de *Pythium*

O estágio de desenvolvimento das plantas utilizadas nos testes, oriundas de toletes previamente enraizados em substrato estéril, foi variável. Assim, a idade cronológica das mudas inoculadas variou, tendo sido elas de 35 dias (KOIKE e ROMAN, 1970); de 21 até 30 dias

(APT e KOIKE, 1962); de 14 dias (YANG, 1972) e de 9 dias (RANDS e DOPP, 1938).

Com exceção de RANDS e DOPP (1938), que mencionaram a temperatura de 36°C, utilizada para o desenvolvimento das plantas, os outros autores não fizeram menção das condições reinantes, por ocasião da formação das mudas.

Os métodos de inoculação relatados para testes com *P. arrhenomanes* foram os seguintes: imersão de raízes em uma suspensão de micélio (SRINIVASAN, 1958) ou com zoosporos (ADAIR, 1968); meios de cultura com as estruturas do patógeno retirados das placas-de-petri, foram misturados com os 2/3 inferiores do conteúdo do recipiente ou distribuídos, após o plantio das mudas, em 4 locais por vaso (EDGERTON *et alii*, 1929); o uso da areia-farinha de milho colonizada pelo patógeno, misturada com o volume total do solo contido nos vasos ou também, utilizada na forma de uma camada de inóculo (KOIKE e ROMAN, 1970). Este método consistiu em colocar o substrato colonizado sobre o terço superior do vaso com solo e, em seguida, recoberto por areia, seguindo-se o plantio das mudas. BRUEHL (1953) e KOIKE (1965) recomendaram a distribuição do inóculo na forma de camada, visando diminuir o escape nos testes de comparação de cultivares no estágio de plântulas, em casa-de-vegetação.

#### 2.6.6. Condução de experimentos para testes de patogenicidade em condições de casa-de-vegetação

A colheita da maioria dos experimentos desenvolvidos com plantas obtidas, a partir de toletes, com a finalidade de comparar

cultivares ou testar a patogenicidade de *Pythium*, desenvolvidos em solução nutritiva ou em solo, foi realizada após períodos que variaram de 3 a 5 meses (EDGERTON *et alii*, 1929; RANDES e DOPP, 1938; KOIKE, 1965; HSU e LIU, 1966; KOIKE e ROMAN, 1970).

Uma duração menor para os experimentos foi relatada para testes de reação de cultivares, mediante inoculação, por imersão de raízes (SRINIVASAN, 1958) e para a observação da interação entre nematoides e *P. graminicola* (VALLE-LAMBOY e AYALA, 1980).

Os experimentos conduzidos por RANDES e DOPP (1938), visando obter dados com relação a perfilhos, tiveram uma duração de 3,5 a 4 meses. A análise dos resultados obtidos em casa-de-vegetação, segundo estes autores, eram variáveis, e somente podiam ser reproduzidos quando repetidos no mesmo período do ano. Fatores tais como a temperatura e a luminosidade, influenciando no vigor das plantas, interferiram nos resultados. Assim, a suscetibilidade à doença poderia ser avaliada, isoladamente, na época do inverno. As características de resistência de campo teriam semelhança aos resultados de experimentos conduzidos no verão (RANDES e DOPP, 1938).

O efeito da temperatura, no resultado dos testes da inoculação, foi marcante na intensidade de prejuízos causados por doenças, induzidas por diferentes patógenos do solo (LEACH, 1947).

Em alguns trabalhos foram relatadas as condições de temperatura, que foram conduzidas as pesquisas. Assim, RANDES e DOPP (1938) testaram cultivares a temperaturas de 18 a 25°C, aliando a este fator do ambiente, condições de dias curtos ou de dias longos. VALLE-LAMBOY e

AYALA (1980) também testaram diferentes tratamentos a temperaturas variando de 24 a 34°C.

Outras temperaturas relatadas, para o ambiente, em que se realizaram as pesquisas, estiveram na faixa de 17,3 a 35,2°C (KOIKE e ROMAN, 1970; KOIKE, 1971).

#### 2.6.7. Avaliação das reações das cultivares a patógenos inoculados

Os parâmetros utilizados na comparação de cultivares por RANDES e DOPP (1938) foram altura do broto primário, número de perfilhos, altura de todos os brotos e peso fresco da parte aérea. Esses parâmetros foram expressos em valores absolutos e em porcentagem de redução em relação às testemunhas.

No Havaí, foram procuradas variedades resistentes à podridão de raízes, problema responsável pela diminuição de produção. Os parâmetros utilizados para comparação de cultivares foram: peso seco da parte aérea e do sistema radicular, altura do broto primário e número de brotos secundários (HAWAII, 1963); peso fresco da parte aérea (KOIKE e WARNER, 1965); peso seco da parte aérea e raízes; número de brotos secundários, altura das plantas e diâmetro dos colmos (KOIKE, 1971). ADAIR (1968) propôs a comparação de cultivares, fundamentando-se nos sintomas das raízes inoculadas e nos efeitos da doença na parte aérea.

Em pesquisas desenvolvidas, visando testar ou comparar a patogenicidade de espécies de *Pythium* e/ou nematóides em cana-de-açúcar, em condições de casa-de-vegetação, sempre foram utilizados diferentes

parâmetros, para avaliar o efeito desses organismos.

Na avaliação da severidade de doença, SRINIVASAN (1968) utilizou índices baseados na intensidade da podridão, induzida por *P. graminicola* em cana-de-açúcar. A escala de valores apresentava os números 0, 1, 2, 3 e 4 que correspondiam, respectivamente, as plantas com raízes saudáveis, até 25% das raízes com lesões vermelhas, 50% e 75% das raízes com podridão e a totalidade das raízes aparentando podridão. Este índice foi utilizado juntamente com o peso seco das raízes, quando foram comparadas duas cultivares inoculadas, com diferentes concentrações de zoosporos.

Pesquisas desenvolvidas no Havai, Porto Rico e Luisiana, têm procurado analisar o efeito de interações, entre microorganismos, na destruição de raízes de cana-de-açúcar. Para tal propósito, os testes foram desenvolvidos, inoculando-se cultivares conhecidamente suscetíveis a patógenos e utilizando diversos parâmetros, para a comparação dos tratamentos.

Com relação aos parâmetros utilizados, APT e KOIKE (1962) utilizaram somente o peso seco da raiz e da parte aérea, levando o material a 80°C durante 72 h. KOIKE e ROMAN (1970) e KOIKE (1971) utilizaram o peso seco da parte aérea e da raiz (85°C durante 4 a 7 dias), a altura do broto principal e o número de perfilhos. KOIKE e YANG (1971) analisaram o peso fresco e seco da parte aérea (90°C durante 4 dias), a altura e a somatória do tamanho do broto principal e dos perfilhos. A altura do broto primário consistiu na medida da distância entre o nível do solo e a lígula da última folha formada.

A análise dos trabalhos acima indica que, em dois trabalhos que tiveram igual metodologia, o número de perfilhos e a diferença obtida para outros parâmetros tiveram comportamento variável. Desta forma, em um deles foi possível diferenciar tratamentos (KOIKE e ROMAN, 1970), enquanto que no outro, isto não ocorreu (KOIKE, 1971).

VALLE-LAMBOY e AYALA (1980) determinaram a altura do broto primário, perímetro do colmo 7,5cm acima do nível do solo, número de internódios, peso fresco e seco de raiz, folhas e colmos, número de perfilhos e índice de necrose da raiz. Neste trabalho, o número de perfilhos e o perímetro do colmo não foram sensíveis para a comparação de efeitos dos tratamentos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos de laboratório e casa-de-vegetação foram desenvolvidos nas instalações do Departamento de Fitopatologia, na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) da Universidade de São Paulo.

As mudas utilizadas e o suporte para o trabalho de campo foram dados pelas Estações Experimentais Centrais da Coordenadoria Este (COEST) de Campos, RJ e da Coordenadoria Sul (COSUL) de Araras, SP, do PLANALSUCAR.

Os experimentos desenvolvidos em condições de casa-de-vegetação serão apresentados de forma geral no item 3.3, sendo que as particularidades de cada um serão mencionadas por ocasião de suas apresentações.

#### 3.1. Levantamento de fungos associados às podridões de raízes

Raízes com podridões, de diferentes cultivares, foram colhidas em dois locais e duas épocas, na região de Campos, RJ. (Figura 1A, p. 36).



As cultivares amostradas foram CB 45-3, CB 47-89, CB 49-260 CP 51-22, NA 56-79, RB 705007, RB 705051 e RB 705146.

As raízes foram colhidas em diferentes locais da Estação Experimental do PLANALSUCAR, em Campos, e da Fazenda São Gonçalo, nesta mesma área. O solo do primeiro local apresentava características de um solo aluvial, pH de 5,6 a 6,1, e contendo 2,51% de matéria orgânica, enquanto que o solo da Fazenda São Gonçalo era do tipo hidromórfico, com pH de 6,2 e 4,66% de matéria orgânica.

A primeira colheita de raízes foi feita em novembro de 1980, após um período de seca. Sendo a segunda, feita após um período de chuvas, no verão do mesmo ano.

Na amostragem foram observadas para cada cultivar, plantas de diversas touceiras em locais diferentes, selecionando-se somente raízes com lesões bem evidentes, até completar, no mínimo, 30 amostras de 10 a 15 cm de comprimento. Estas raízes foram armazenadas em sacos plásticos, devidamente identificadas, e mantidas a  $\pm 7^{\circ}\text{C}$  até seu transporte a Piracicaba. Assim, 24 a 48 horas após, foi feito o isolamento dos fungos associados às lesões.

O método de isolamento utilizado constou da lavagem das raízes em água corrente, durante uma hora, desinfecção superficial em uma solução de hipoclorito de sódio comercial (5,2%), durante 30 segundos, seguido de lavagem em água destilada estéril com ou sem benomil (0,025%), por 1 minuto, e secagem em lenço de papel (Kleenex). Em seguida, foram selecionadas 25 amostras das raízes, que foram introduzidas sob a superfície do substrato ágar-água (2%), contido em placas de Petri com, aproxi-

madamente, 20cm<sup>3</sup> do meio de cultura, por placa.

O material foi mantido a 24°C por 24 a 48 horas no escuro. Depois deste período, as placas foram observadas, utilizando-se um estereomicroscópio de luz transmitida. O isolamento dos fungos foi feito, transferindo-se fragmentos do substrato ágar-água, com pontas de hifas dos fungos, para tubos, contendo batata-dextrose-ágar (BDA) (200 g, 10 g e 18 g/l). Os tubos foram incubados durante cinco dias a 26°C no escuro.

A identificação dos microorganismos isolados foi baseada nas características morfológicas, observadas ao microscópio. Durante a fase de identificação, o material foi guardado a 7°C no escuro. As placas após serem analisadas, foram mantidas em condições de ambiente de laboratório (25-26°C), até que a identificação dos fungos nelas contidas, fosse conferida com a identificação dos isolamentos nos tubos correspondentes.

A metodologia descrita foi adotada após a realização de testes preliminares, feitos com raízes de cana-de-açúcar, amostradas em diferentes épocas, nos anos de 1979-1980. Nos testes preliminares, foi testada, também, a possibilidade do uso de fungicidas e antibióticos, com o objetivo de conhecer, da melhor forma possível, os fungos associados às raízes com podridões e, simultaneamente, inibir, ao menos parcialmente, os organismos de crescimento rápido, como também o desenvolvimento de bactérias.

Na identificação dos gêneros de fungos, foram consultadas as chaves taxonômicas de BARNETT e HUNTER (1972), ARX (1974) e ALEXOPOULOS (1966).

As espécies de *Pythium* isoladas foram caracterizadas, tomando-se como base os trabalhos de MIDDLETON (1943), FREZZI (1956), WATERHOUSE (1967 e 1968), HENDRIX e PAPA (1974) e WATANABE (1974). A identificação foi feita de maneira conjunta com os professores Dr. Aduino Ivo Milanez (I. de Botânica, SP) e Ivo de Carvalho (Dep. Fitopatologia, U.de Goiânia, GO), no Instituto de Botânica, SP.

Os estudos relativos à caracterização das colônias, crescimento em meio de cultura e efeito da temperatura no desenvolvimento em meio de farinha de milho-ágar (FMA, Difco), foram desenvolvidos nos laboratórios do Departamento de Fitopatologia da ESALQ.

### 3.2. Aspectos taxonômicos e metodológicos para a identificação de espécies de *Pythium*

A obtenção das culturas dos fungos foi conseguida através do isolamento da ponta de uma hifa para cada isolado.

A preservação dos isolados obtidos no levantamento de fungos, associados a podridão de raízes de cana-de-açúcar, foi feita em tubos com BDA, mantidos em condições de laboratório, e, também, em vidros contendo água esterilizada, conservados a temperatura de 13°C, no escuro, segundo o método de Castellani (FIGUEIREDO, 1967).

Para a caracterização, os fungos foram transferidos para as placas-de-petri, contendo o meio de V-8 ágar desenvolvido durante os experimentos e constituído de 160mℓ de suco V-a (Campbell), 0,5g de CaCO<sub>3</sub> e 840 mℓ de água destilada; o meio de Schmitthenner-ágar (ROBERTSON, 1980); farinha de milho-ágar (FMA, Difco), e BDA.

Os meios de BDA e FMA foram utilizados para caracterizar o tipo de colônia e os outros dois meios acima citados, para as observações microscópicas da morfologia e tamanho das estruturas dos fungos, em diferentes condições de temperatura, foi feita em culturas desenvolvidas em meio de FMA. Os meios de V-8-ágar e de Schmitthenner-ágar foram empregados, principalmente, para a obtenção rápida das estruturas sexuadas dos isolados.

As características morfológicas foram também realizadas em culturas desenvolvidas em água esterilizada. Estas culturas foram obtidas a partir da transferência de blocos de meio de cultura, retirados do bordo de colônias em crescimento, e transferidos para água esterilizada, em placas-de-petri. Neste caso, foram também colocadas na água, sementes partidas de cânhamo.

No processo de obtenção das culturas puras, para diminuir a contaminação bacteriana, foi utilizada a técnica de repicagem em ágar-água, colocando-se um fragmento do meio de cultura com o micélio do fungo a ser purificado entre duas camadas do meio de cultura, incubando-se o conjunto a 23<sup>o</sup>C durante 24 a 48 horas. O isolamento foi feito repicando pontas de hifas, que se desenvolveram na superfície da camada superior do substrato, após atravessarem-na (SLEETH, 1945). Ocasionalmente, também foi usado para o mesmo objetivo o antibiótico vancomicina, incorporado ao FMA, na dosagem de 100mg/ℓ, fazendo a incubação e repicagem como descrito acima.

Foi adicionado benomil ao FMA na razão de 25mg/ℓ, incubando as culturas a 23-24<sup>o</sup>C, e fazendo repicagem de pontas de hifas após 24 a

48 horas com auxílio de estereo-microscópio, para a purificação de culturas de *Pythium* contaminadas com *Trichoderma* sp ou com *Fusarium* sp.

### 3.3. Generalidades da metodologia utilizada nos testes de patogenicidade

#### 3.3.1. Cultivares de cana-de-açúcar testadas

As cultivares utilizadas nos diferentes experimentos realizados foram CB 41-76, CB 45-3, CB 47-355, CB 47-89, CB 49-260, Co 281, Co 290, Co 421, CP 51-22, NA 56-79, RB 705007, RB 705051 e RB 705146.

De um total de 13 cultivares de cana-de-açúcar submetidas à inoculação nos diferentes testes, 11 delas são plantadas atualmente no Brasil, especialmente nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo. As cultivares Co 290 e Co 281 foram incluídas nos testes por terem sido consideradas padrões de resistência ou suscetibilidade na Luisiana, EUA, no período no qual a doença foi pesquisada.

#### 3.3.2. Origem e preservação dos isolados das espécies de fungos testados

Nos diferentes experimentos, foram utilizados isolados de seis espécies de fungos, sendo eles. *Pythium arrhenomanes*, complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*, *P. mamillatum*, *P. periplocum*, *P. nagaii* (?) e *Fusarium oxysporum*.

Os isolados dos fungos estudados foram obtidos de lesões em raízes de cana-de-açúcar, provenientes de Campos, R.J. O método de isolamento e as características morfológicas e fisiológicas são apresentadas nos itens 3.1 e 3.2, respectivamente.

As cultivares das quais foram obtidos os isolados são apresentadas a seguir:

- a) *P. arrhenomanes*: isolados nº 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 da cultivar CB 47-89. O isolado nº 2 foi obtido da cultivar NA 56-79.
- b) complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*: os isolados nº 3 e 4 foram obtidos da cultivar CB 47-89 e o nº 11 da NA 56-79.
- c) *P. mamillatum*: isolado nº 1, da cultivar CB 49-260.
- d) *P. periplocum*: isolado nº 1, da cultivar CB 47-89.
- e) *P. nagaii* (?): isolado nº 1, da cultivar CB 45-3.

*Fusarium oxysporum*: isolados números 1 a 7, da cultivar CB 47-89.

As culturas puras dos isolados foram preservadas em água, utilizando-se o método de Castellani (FIGUEIREDO, 1967). Este sistema foi selecionado dentre outros recomendados, pela literatura, pela facilidade na manutenção. Culturas em tubos de ensaio com meio de FMA ou BDA foram também mantidas, fazendo repicagens periódicas.

### 3.3.3. Obtenção das plantas para a inoculação

As plantas para a utilização nos diferentes experimentos foram formadas a partir de toletes de uma gema, tratadas termicamente, mediante imersão em água aquecida a  $50,5^{\circ}\text{C}$ , por duas horas (SILVA, 1974), junto ou seguindo-se de imersão destes em suspensão de benomil na concentração de 25g de i.a./100ℓ de água.

Os toletes assim tratados, foram colocados em sacos de polietileno, perfurados na parte superior, contendo algodão umedecido, e convenientemente identificados. Estas embalagens foram, em seguida, colocadas em estufas a uma temperatura de  $32-33^{\circ}\text{C}$ , durante três a quatro dias, dependendo da cultivar, para favorecer o desenvolvimento de raízes e brotos. Após este período, os toletes viáveis eram geralmente imersos por três minutos em uma suspensão aquosa de fungicidas contendo 8,7g de terrazole + 34,8g de PCNB + 25g de benomil/100ℓ, sendo em seguida plantados em caixas de madeira (9 x 31 x 41cm) contendo areia esterilizada. Tanto as caixas quanto a areia foram previamente esterilizadas, mediante autoclavagem de uma atmosfera durante duas horas.

Após o plantio a superfície da areia foi regada com 600 ml da solução de fungicidas mencionadas acima. As caixas contendo os toletes foram mantidas em casa-de-vegetação com temperatura igual ou superior a  $28^{\circ}\text{C}$ , sendo regadas com água destilada sempre que necessário.

Este processo de obtenção de mudas foi baseado em testes preliminares que visaram obter plantas uniformes em tamanho e com sistema radicular livre de *Pythium* e de outros fungos.

### 3.3.4. Substrato para produção de inóculo

Os meios de cultura utilizados foram o meio de V-8-ágar e os meios constituídos de areia mais farinha ou quirera de milho. No preparo destes meios, 200g de areia seca ao ar foram misturados com 40g de farinha ou quirera de milho e 70 ml de água destilada, que foram colocadas em frascos Erlenmeyer, com capacidade de 500 ml, ou em frascos de vidro com capacidade para 1000 ml (Figura 1B, p.36). A esterilização foi feita mediante autoclavagem, durante uma hora, a uma atmosfera de pressão, dois dias consecutivos. Este tipo de substrato resultou de uma modificação daquele utilizado por KNAUSS (1978), para produção de inóculo de *Fusarium*.

### 3.3.5. Preparo do inóculo

Os isolados utilizados para a inoculação foram obtidos a partir de isolamentos feitos de lesões de raízes de cana-de-açúcar, aproximadamente uma semana antes de serem utilizados.

Os fungos a serem testados quanto à patogenicidade, foram cultivados inicialmente em meio de V-8-ágar, contido em placas-de-petri e incubados durante dois ou três dias a 24°C no escuro. Das bordas dessas colônias desenvolvidas neste meio, foram transferidos aqueles destinados à produção de inóculo.

Quando o meio de cultura utilizado na produção de inóculo foi V-8-ágar, blocos deste meio, contendo as estruturas do patógeno, foram transferidos para o centro das placas-de-petri, contendo aproximadamente, 15 ml do meio de cultura. A incubação foi feita durante cinco dias a 24°C, no escuro. Para a inoculação, o meio de cultura foi cortado em blocos de aproximadamente 0,5 a 1 cm<sup>2</sup> antes de serem colocados nos vasos em forma de camada.



Por ocasião da utilização do inóculo constituído de areia mais quirera ou farinha de milho colonizados pelos fungos, blocos de 0,5cm de diâmetro, retirados das margens de uma cultura em desenvolvimento, preparada na forma acima referida, foram transferidos aseticamente a esses substratos.

Os frascos com substrato e fungo foram incubados durante 6 dias a uma temperatura média de 27°C, sob luz artificial. A fonte de luz utilizada consistiu de nove lâmpadas fluorescentes, tipo luz do dia com 40 Watts, dispostas aproximadamente a um metro da superfície da mesa, onde foram colocados os frascos.

### 3.3.6. Substrato para o desenvolvimento das plantas utilizadas nos testes de patogenicidade

Os testes de patogenicidade foram realizados em sacos de polietileno de 0,05mm de espessura, 42 cm de altura e 10cm de diâmetro e com oito perfurações (0,5cm) no terço inferior, contendo areia esterilizada. Estes sacos de polietileno foram introduzidos em tubos de PVC (poli cloreto de vinila) opacos, de 40cm de altura, 10cm de diâmetro interno e 0,5cm de espessura da parede.

Estes tubos rígidos, ou "vasos" de cor marrom, foram dispostos em suportes de madeira, a fim de manter a sua posição vertical (Figura 1D, p.36).

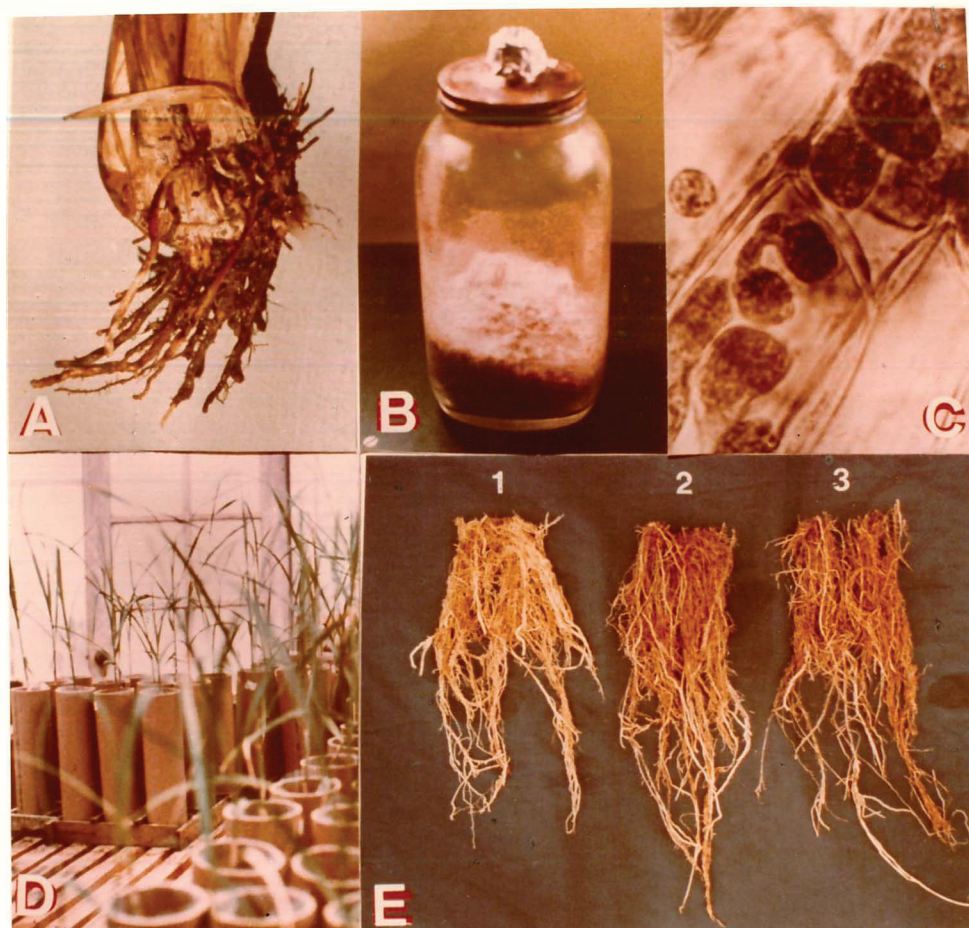


Figura 1. A - Amostra de cana-de-açúcar com podridão radicular. B - Frasco contendo inóculo. C - Esporângios de *P. arrhenomanes* em células das raízes. D - "Vasos" usados nos ensaios. E - Níveis de sintomas no sistema radicular. - (1 = baixo; 2 = médio; 3 = alto). (Fotos C e E, gentileza da Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup> M.S. N,K.Sh. Yokomizo e do Prof. Dr. H. Kimati, respectivamente).

### 3.3.7. Inoculação e condução dos experimentos

A inoculação foi feita depositando uma camada de inóculo no substrato, visando obter maior uniformidade na infecção das raízes. Testes prévios, comparando diversas formas de distribuição do inóculo no substrato revelaram as vantagens para este sistema. As plantas a serem inoculadas foram cuidadosamente retiradas das caixas com areia (item 3.3.3.), após 10 a 25 dias de desenvolvimento, e selecionadas quanto ao tamanho homogêneo das partes aérea e radicular

Na inoculação, as raízes naturalmente infectadas, os fragmentos do meio de cultura contendo o patógeno ou o inóculo na forma de areia-quirera ou farinha de milho, foram incorporados levemente na superfície de aproximadamente 2 l de areia contida nos sacos plásticos. Logo acima, foram colocadas sucessivamente uma camada de aproximadamente 3 cm de areia esterilizada, a planta e novamente areia esterilizada até cobrir as raízes e o tolete.

Todos os experimentos com inoculação foram desenvolvidos em casa-de-vegetação e a irrigação feita com água destilada, conforme a necessidade. A medição da temperatura do solo foi feita durante o desenvolvimento dos experimentos, colocando-se o tubo do termômetro aproximadamente 7 cm baixo a superfície.

Aproximadamente 10 dias após a instalação dos experimentos, foi feita uma aplicação com adubo foliar completo, constituído por NPK (9:18:6) e micronutrientes, na dose de 50 ml por planta, de uma solução aquosa 0,3% do produto comercial, sendo esta adubação depois repetida semanalmente (Greenzit, CIBA-GEIGY).

### 3.3.8. Avaliação da patogenicidade

Por ocasião do término do experimento, os sacos plásticos foram rasgados e as raízes cuidadosamente lavadas com bastante água. Esta primeira lavagem foi feita sobre uma peneira de quatro malhas por polegada quadrada. Em seguida, foi feita uma segunda lavagem, visando a eliminação ao máximo da areia do sistema radicular. Posteriormente, as raízes e os colmos foram separados dos toletes e colocados sobre jornal, para eliminar o excesso de água das raízes. Imediatamente, foram medidos a altura dos colmos, o número de nós, o peso fresco da parte aérea e das raízes. Procedeu-se a seguir a avaliação da intensidade dos sintomas no sistema radicular.

A altura dos colmos foi estimada, considerando-se a distância compreendida entre a região da união do tolete com o colmo e a lígula da última folha desenvolvida.

A avaliação da intensidade dos sintomas no sistema radicular foi feita mediante uma modificação da escala de doença, citada por SRINIVASAN (1968), constituindo-se das classes descritas a seguir:

- 0 = raízes brancas, sem lesões escuras ou avermelhadas
- 1 = até 25% das raízes apresentando lesões marrom escuro e avermelhadas
- 2 = de 26 a 50% das raízes apresentando lesões marrom escuro e avermelhadas

3 = mais de 50% das raízes apresentando lesões marrom escuro e avermelhadas (Figura 1E, p.36).

Outros parâmetros avaliados foram o peso seco da parte aérea e do sistema radicular. A secagem deste material foi feita em sacos de papel colocados em estufa a uma temperatura de 74 ou 80°C, até a obtenção de peso constante.

### 3.3.9. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, sendo cada parcela constituída de um "vaso" com uma planta. De maneira geral, quando os tratamentos comparados incluíram níveis de inóculo e diferentes cultivares, a análise foi de acordo a um arranjo de tipo fatorial.

## 3.4. Avaliação do efeito de tipos e níveis de inóculo na reação de cultivares

### 3.4.1. Efeito do inóculo constituído de raízes naturalmente infectadas, oriundas de diferentes cultivares de cana-de-açúcar

O objetivo deste experimento foi caracterizar o desenvolvimento da doença nas cultivares CB 47-89 e NA 56-79, quando as raízes naturalmente infectadas foram utilizadas como inóculo.

O ensaio foi instalado em fevereiro e avaliado em março, tendo sido conduzido em condições de temperatura do solo que variaram entre a mínima de 19°C e máxima de 38°C.

As plantas das duas cultivares originaram-se de toletes de uma gema submetidos aos tratamentos descritos no item 3.3.3, e desenvolvidos durante 22 dias em caixas com areia, sem aplicação qualquer de tratamentos fungicidas durante este período.

Plantas de tamanho uniforme foram transplantadas para sacos plásticos com areia contidos nos suportes rígidos de PVC, nos quais tinha sido colocada uma camada com 50 ou 100cm<sup>3</sup> de raízes naturalmente infectadas (item 3.3.7). Estas raízes, previamente lavadas, foram cortadas em segmentos de 2 a 3cm, antes de serem incorporadas à superfície da areia. O volume de raízes utilizado em cada tratamento foi obtido colocando-se os segmentos em um becker de tamanho apropriado, pressionando-se levemente o conteúdo a fim de conseguir o volume desejado. Nas testemunhas foram incorporados 50cm<sup>3</sup> de raízes naturalmente infectadas, porém previamente esterilizadas durante uma hora a uma atmosfera de pressão.

Para obtenção destas raízes, vista a inviabilidade de contar frequentemente com material doente, foi instalado, em Piracicaba, em condições de campo, seis meses antes da montagem do ensaio, um "infectário". Este local consistiu de um canteiro com solo hidromórfico de Campos, RJ, onde foi observada uma alta incidência de podridão de raízes. Neste solo foram plantadas seis cultivares, das quais foram colhidas as raízes infectadas, seis meses após o plantio.

Na avaliação da patogenicidade foi considerado o peso fresco da parte aérea. O sistema radicular foi pesquisado quanto ao tipo de lesões, locais atingidos e microorganismos associados. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com quatro repetições por tratamento.

### 3.4.2. Efeito do inóculo constituído de raízes naturalmente infectadas, oriundas da cultivar NA 56-79

O objetivo do teste foi verificar o efeito do inóculo constituído de raízes naturalmente infectadas da cultivar NA 56-79, no desenvolvimento da doença nas cultivares CB 47-89 e NA 56-79, esta cultivar relativamente nova na região de Campos, RJ.

O experimento, com trinta dias de duração, foi conduzido durante o mês de abril e as temperaturas, mínima e máxima, foram de 16 e 30°C, respectivamente.

Plantas oriundas de toletes de uma gema (item 3.3.3.), com 20 dias de desenvolvimento em caixas com areia, sem fungicida, foram transplantadas para sacos plásticos, contendo areia e o inóculo (item 3.3.7.). Como inóculo, foram utilizados 50cm<sup>3</sup> de segmentos de raízes naturalmente infectadas, seguindo-se o método descrito no item 3.4.1. As testemunhas receberam 50cm<sup>3</sup> dessas raízes previamente esterilizadas por autoclavagem a uma atmosfera de pressão durante uma hora. As raízes foram coletadas de plantas apresentando desenvolvimento de um ano, na Estação Experimental Frederico M. Veiga, RJ, do PLANALSUCAR, e utilizadas como inóculo, aproximadamente dois dias após a colheita.

Os parâmetros avaliados foram o peso fresco da parte aérea e do sistema radicular, o tamanho dos colmos, o número de nós e o grau de sintomas no sistema radicular.

O delineamento experimental seguido foi o de blocos casualizados com três repetições por tratamento.

### 3.4.3. Efeito do inóculo constituído de raízes naturalmente infectadas comparado com o de cultura pura de *P. arrhenomanes*

O objetivo do teste foi comparar o efeito do inóculo constituído por raízes naturalmente infectadas da cultivar NA 56-79, de introdução recente na região de Campos, RJ, com uma cultura pura de *P. arrhenomanes*, isolada de raízes da cultivar CB 47-89. O inóculo desta cultura foi utilizado em diferentes quantidades, quando testado nas cultivares CB 47-89 e NA 56-79.

O ensaio foi conduzido durante 30 dias, nos meses de maio a junho, sendo a temperatura do ambiente mantida a 28°C, em condições de iluminação natural, própria da época.

Plantas com 15 dias de desenvolvimento em areia e que haviam sido tratadas previamente com fungicidas por ocasião do plantio, foram transplantadas para os sacos plásticos contendo areia e inóculo.

Os níveis de inóculo foram 50cm<sup>3</sup> de raízes naturalmente infectadas, 3/4 ou 1/2, do meio de cultura V-8-ágar, contido em uma placa-de-petri, colonizado pelo isolado nº 1 de *P. arrhenomanes*. As raízes haviam sido armazenadas durante um mês em geladeira com temperatura de ± 7°C. Nas testemunhas, foram utilizados 50cm<sup>3</sup> de raízes esterilizadas por autoclavagem durante uma hora a uma atmosfera de pressão ou 3/4 do meio de V-8 ágar contido em uma placa-de-petri.

Os parâmetros avaliados foram o peso fresco da parte aérea e das raízes e o tamanho dos colmos.



O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com três repetições por tratamento.

#### 3.4.4. Efeito dos meios V-8-ágar, areia-quirera de milho e areia farinha de milho como substratos para a produção de inóculo de *P. arrhenomanes*

O ensaio teve como objetivo comparar os efeitos de diferentes tipos de inóculo, produzidos em laboratório; V-8-ágar, areia-quirera de milho (AQM) e areia-farinha de milho (AFM), para *P. arrhenomanes*, quando inoculado na cultivar CB 47-89. Estes dois últimos meios, AQM e AFM, foram testados, visando-se a sua provável utilização em testes, envolvendo um grande número de plantas, ou em geral, quando houvesse a necessidade de preparação do inóculo, em grande quantidade.

O experimento foi conduzido em condições de temperatura que variaram entre 17 e 37°C (mínima e máxima), tendo uma duração de 68 dias, e realizado no período compreendido nos meses de fevereiro a abril.

O isolado de *P. arrhenomanes* foi o de nº 3. Cada tipo de inóculo foi utilizado em dois níveis, havendo uma testemunha com o nível maior do substrato esterilizado, separadamente para as diferentes formas de inóculo. Para o meio de V-8-ágar, os dois níveis de inóculo corresponderam ao 3/4 ou a todo o meio contido em uma placa-de-petri. Para o caso de AFM e AQM os níveis testados foram 25 e 50cm<sup>3</sup> de inóculo diluído em areia esterilizada (1:1 v/v), por "vaso".

As plantas utilizadas foram originadas de toletes de uma gema, submetidas aos tratamentos descritos no item 3.3.3., porém sem desenvolvimento na areia. O uso de plantas recém formadas, a partir do mini-tolete poderia ser vantajoso pelo fato de diminuir o período de duração de cada teste.

Os parâmetros avaliados foram os pesos fresco e seco da parte aérea e da raiz, a altura dos colmos, e o índice de sintomas nas raízes.

O delineamento experimental seguido foi de blocos casualizados, com quatro repetições.

### 3.5. Patogenicidade de fungos isolados de lesões de raízes de cana-de-açúcar, no mesmo hospedeiro

Diferentes gêneros de fungos foram isolados de raízes apresentando lesões. No entanto, *Pythium* spp e *Fusarium* spp revelaram uma maior patogenicidade nos testes preliminares de inoculação.

Desta forma, foram planejados testes de patogenicidade para algumas espécies, dando ênfase ao grupo de patógenos pertencentes ao gênero *Pythium*.

#### 3.5.1. Patogenicidade de *Fusarium oxysporum*, *P. arrhenomanes* e complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*

O ensaio teve os seguintes objetivos: determinar os efeitos

dos patógenos nas diferentes cultivares, CB 45-3, CB 47-89, NA 56-79 e RB 705051, e verificar a reação destes aos agentes patogênicos.

O experimento teve duração de 39 dias sendo instalado em novembro e colhido em dezembro. A temperatura variou entre 19 a 38°C (mínima e máxima), durante este período.

As plantas utilizadas se originaram de toletes de uma gema, os quais tinham emitido brotos e raízes, conforme já mencionado no item 3.3., sem passar, no entanto, pelo posterior desenvolvimento em areia.

Os organismos inoculados foram *P. a-rhenomanes* (isolado nº 1) complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum* (isolado nº 1) e *F. oxysporum*, (isolados nº 1 a 7), sendo os isolados, obtidos a partir de raízes da cultivar CB 47-89, desenvolvida em solo hidromórfico, em Campos, RJ.

Para os isolados de *Pythium* a quantidade do inóculo usada por parcela, correspondeu ao 3/4 do volume do meio de V-8-ágar contido em uma placa-de-petri, colonizado pelas diferentes espécies de *Pythium*. No caso de *Fusarium*, o inóculo foi aplicado na forma de uma suspensão de micélio e conídios. Esta última foi conseguida através da homogeneização do conteúdo de sete tubos de ensaio, contendo cada um 6ml de BDA inclinado, colonizado pelo fungo, em 250ml de água. Estas culturas foram incubadas por um período de 15 dias no escuro à temperatura de 24°C. A inoculação foi feita através da imersão das raízes, durante cinco minutos, na suspensão obtida, seguindo-se o plantio. Em seguida, cada planta foi regada com mais 20ml desse inóculo. As testemunhas receberam 3/4 do V-8-ágar contido em uma placa-de-petri, não colonizado.

Os parâmetros avaliados foram os pesos fresco e seco da parte aérea e da raiz, o tamanho dos colmos e a intensidade dos sintomas no sistema radicular.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com três repetições.

### 3.5.2. Patogenicidade de *P. arrhenomanes*, *P. mamillatum* e *P. nagaii* (?) nas cultivares CB 47-89 e NA 56-79

O experimento teve por objetivo avaliar a patogenicidade destas três espécies de *Pythium*, obtidas de lesões de raízes de cana-de-açúcar.

O ensaio foi conduzido durante o mês de abril, tendo 30 dias de duração.

As plantas foram desenvolvidas durante 3 semanas em areia, conforme descrito no item 3.3, porém, sem tratamento fungicida algum, por ocasião do plantio em areia.

O isolado inoculado foi o de nº 1 de cada espécie sendo que o inóculo consistiu de 3/4 do meio de V-8-água contido em uma placa-de-petri, colonizado, separadamente, por cada um dos isolados.

O tratamento correspondente à testemunha recebeu o meio de cultura esterilizado, sem o desenvolvimento do patógeno.

Na colheita foram avaliados o peso fresco da parte aérea e da raiz, o tamanho dos colmos e a intensidade dos sintomas no sistema radicular.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com três repetições.

3.5.3. Patogenicidade de *P. arrhenomanes* e complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum* nas cultivares CB 47-89, CP 51-22 e RB 705007

O experimento teve por objetivo comparar os efeitos da patogenicidade destas espécies de *Pythium*, *P. arrhenomanes* e do complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum* nas diferentes cultivares de cana-de-açúcar: CB 47-89, CP 51-22 e RB 705007.

O experimento teve duração de 85 dias e foi conduzido nos meses de julho a setembro, em casa-de-vegetação aquecida a 28-30°C.

As plantas utilizadas desenvolveram-se durante 15 dias, em areia, conforme o método descrito no item 3.3.

Os isolados utilizados foram os de nº 3, 5 e 7 de *P. arrhenomanes* e os de nº 3, 4 e 11 do complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*.

O inóculo consistiu de 3/4 do volume de meio V-8-ágar contido em uma placa-de-petri, colonizado pela espécie ou pelo complexo. Por ocasião da inoculação, foram misturados três isolados de um mesmo patógeno. Assim, de cada isolado foi utilizado, por parcela, 1/4 do volume de V-8-ágar colonizado por ele. Cada cultivar teve as respectivas testemunhas, ou seja, meio V-8-ágar sem o patógeno, em igual quantidade que nos tratamentos que receberam o inóculo.

Os parâmetros avaliados foram os pesos fresco e seco da parte aérea e da raiz, a altura dos colmos e o índice de sintomas no sistema radicular.

### 3.6. Patogenicidade de diferentes isolados de *P. arrhenomanes* na cultivar CB 47-89

A disponibilidade de diferentes isolados de *P. arrhenomanes* e os antecedentes relativos à variabilidade da patogenicidade (RANDS e DOPP, 1934) motivaram este ensaio, destinado a detectar a provável ocorrência desta característica do patógeno, quando inoculada a cultivar CB 47-89, em condições brasileiras.

O experimento foi conduzido nos meses de novembro a dezembro, teve 39 dias de duração, sendo que a temperatura variou entre 15 e 36°C, mínima e máxima, respectivamente.

Os isolados inoculados foram os de nº 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, oriundos de isolamentos feitos a partir de raízes da mesma cultivar CB 47-89, obtidas na região de Campos, RJ.

As plantas foram inoculadas quando tinham 10 dias de desenvolvimento em areia, após o tratamento com fungicida (item 3.3.3.).

O inóculo consistiu de 3/4 do meio de V-8-ágar, contido em uma placa de Petri, colonizado pelo patógeno, para cada planta. A testemunha recebeu igual quantidade do meio de cultura não colonizado.

Por ocasião da avaliação, foram tomados os dados referentes aos pesos fresco e seco da parte aérea e da raiz das plantas, o tamanho do colmo e a intensidade dos sintomas nas raízes.

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, sendo cada tratamento repetido três vezes.

### 3.7. Reações de cultivares de cana-de-açúcar à inoculação com *P. arrhenomanes*

As plantas inoculadas nestes experimentos receberam inóculo em meio de agar V-8 ou em areia-quirera de milho.

Os testes foram repetidos em diferentes épocas do ano, variando-se a duração dos experimentos. O objetivo foi detectar possíveis efeitos da variação nas condições do ambiente e do período de desenvolvimento das plantas, na intensidade dos sintomas apresentados pelas diferentes cultivares. Neste estudo foi tomado como referência o comportamento da cultivar CB 47-89.

Foram incluídas também, nestes experimentos, algumas cultivares de reação conhecida ao patógeno, na região de Luisiana, EUA, e outras estimadas promissoras para a região de Campos, RJ.

Como nos testes descritos anteriormente, (itens 3.4, 3.5 e 3.6) foram feitos esforços para se conhecer as características próprias de cada cultivar e as reações sintomatológicas nas raízes, procurando-se fazer a análise dos parâmetros que melhor refletissem a interação patógeno-cultivar.

#### 3.7.1. Reação de sete cultivares de cana-de-açúcar a *P. arrhenomanes*

Este experimento teve por objetivo observar as reações a *P. arrhenomanes* nas seguintes cultivares de cana-de-açúcar: CB 41-76, CB 47-89, CB 47-355, CB 49-260, Co 421, CP 51-22 e NA 56-79.

O ensaio foi estabelecido durante o mês de abril, contando com 30 dias de duração e temperaturas que variaram em torno de 28 a 30°C, condição obtida pelo aquecimento do ambiente.

Plantas de 20 dias de desenvolvimento em areia (item 3.3.3), foram transferidas para os "vasos" com ou sem o inóculo.

O isolado de *P. arrhenomanes* utilizado foi o de nº 1. O inóculo foi constituído de 3/4 do meio V-8-ágar contido em uma placa-de-petri, colonizado pelo patógeno. A testemunha recebeu meio V-8-ágar em igual quantidade que os tratamentos inoculados.

Os parâmetros avaliados foram: os pesos fresco e seco da parte aérea das plantas, o tamanho dos colmos, o número de nós e o índice dos sintomas no sistema radicular.

O delineamento seguido foi o de blocos casualizados com três repetições.

### 3.7.2. Reação de seis cultivares de cana-de-açúcar à *P. arrhenomanes*

O experimento teve como objetivo observar as reações de algumas cultivares de cana-de-açúcar plantadas na região de Campos, RJ, (CB 45-3, CB 47-89, Co 421 e RB 705051) e das cultivares Co 290 e Co 281 consideradas, na Luisiana, como sendo cultivares, respectivamente possuidoras de alta resistência e suscetibilidade, em condições de campo.

O ensaio foi conduzido durante os meses de novembro a dezembro, com duração de 42 dias. As condições de temperatura variaram de 19 a 36°C.



As plantas utilizadas nos experimentos foram desenvolvidas durante 10 dias em areia (item 3.3.3), antes de serem transferidas aos vasos com ou sem o inóculo.

O isolado de *P. arrhenomanes* inoculado, foi o de nº 3. O inóculo foi constituído por 3/4 do meio V-8-ágar, contido em uma placa-de-petri, colonizado pelo fungo. A testemunha recebeu o correspondente ao meio de cultura não colonizado.

Os parâmetros avaliados foram: os pesos fresco e seco da parte aérea e raízes das plantas, a altura dos colmos e a intensidade dos sintomas no sistema radicular.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com três repetições.

### 3.7.3. Reação de dez cultivares de cana-de-açúcar a *P. arrhenomanes*

Este ensaio teve como objetivo observar o comportamento de cultivares plantadas em Campos, RJ, e no Estado de São Paulo, quando inoculadas com *P. arrhenomanes*. As cultivares testadas foram CB 41-76, CB 45-3, CB 47-89, CB 49-260, Co 421, CP 51-22, NA 56-79, RB 705007, RB 705051 e RB 705146.

O experimento foi conduzido durante os meses de março a maio, tendo 70 dias de duração. As temperaturas mínima e máxima foram, respectivamente, de 15 a 32°C, durante este período.

As plantas inoculadas foram desenvolvidas durante 16 dias em areia (item 3.3.3), com exceção das plantas da cultivar NA 56-79, que tinham 9 dias de crescimento nas caixas com areia.

O isolado de *P. arrhenomanes* utilizado foi de nº 3. O inóculo foi constituído de 3/4 do meio V-8-ágar, contido em uma placa-de-petri, colonizado pelo patógeno. A testemunha recebeu igual quantidade do meio de cultura, sem o fungo.

Os parâmetros avaliados foram: os pesos fresco e seco da parte aérea e da raiz das plantas, a altura dos colmos e o índice de sintomas no sistema radicular.

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados e quatro repetições.

#### 3.7.4. Reação de nove cultivares de cana-de-açúcar à *P. arrhenomanes*

O experimento foi planejado tendo como um dos objetivos avaliar o comportamento das cultivares, quando inoculadas com *P. arrhenomanes*, colonizando o substrato areia-quirera de milho. Um outro objetivo foi o de observar as vantagens da manutenção do experimento durante 4 meses. Este período é semelhante ao citado por alguns autores, para estudos desta doença em cana-de-açúcar. (HSU e LIU, 1966; KOIKE, 1965; KOIKE e ROMAN, 1970).

O ensaio teve 120 dias de duração, sendo conduzido entre os meses de julho até novembro. A casa-de-vegetação foi aquecida nos dois primeiros meses a uma temperatura de 28 a 30°C. As plantas utilizadas no

experimento tiveram 14 dias de desenvolvimento na areia, conforme o método descrito no item 3.3.3.

O isolado de *P. arrhenomanes* utilizado foi o de nº 3. O inóculo consistiu de 25cm<sup>3</sup> da diluição com areia do substrato areia-quirera de milho colonizado, na razão 1:1 v/v. A testemunha recebeu igual quantidade de areia-quirera de milho esterilizado.

Os parâmetros avaliados foram os pesos fresco e seco da parte aérea e raiz das plantas, a altura dos colmos e o índice de sintomas no sistema radicular.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com cinco repetições.

### 3.8. Reação das cultivares CB 47-89 e RB 705146 à espécies de *Pythium* inoculadas em conjunto ou separadamente

O experimento teve como objetivo observar o efeito da ação conjunta das duas espécies de *Pythium*, que apresentaram-se com maior frequência nos isolamentos: *P. arrhenomanes* e complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*. Um outro objetivo foi conhecer a importância de *P. periplocum* nestas duas cultivares de cana-de-açúcar.

O experimento foi desenvolvido durante os meses de agosto até novembro, tendo uma duração de 125 dias. A temperatura da casa-de-vegetação foi mantida em torno de 28°C, durante o primeiro mês, sendo que, a seguir, a temperatura do ambiente variou na faixa de 17 a 38°C, mínima e máxima, respectivamente.

As plantas das cultivares tinham 15 dias de desenvolvimento em areia (item 3.3.3), no momento da inoculação.

O inóculo constituiu-se de 3/4 do volume do meio V-8-ágar colonizado, contido em uma placa-de-petri, para cada patógeno e por planta. Quando inoculados em associação *P. arrhenomanes* e o complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*, o inóculo constituiu-se de 3/8 de cada um dos patógenos. A testemunha recebeu igual quantidade de meio V-8-ágar sem o patógeno. Os isolados utilizados foram o de nº 3, de *P. arrhenomanes*, o de nº 3 do complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum* e o de nº 1 de *P. periplocum*.

Na colheita do experimento foram avaliados: os pesos fresco e seco da parte aérea e da raiz das plantas, a altura dos colmos e a intensidade de sintomas na raiz.

O delineamento seguido foi o de blocos ao acaso com três repetições.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Levantamento de fungos associados às podridões de raízes

No levantamento de fungos associados às raízes de cana-de-açúcar, com sintomas de podridão, foi obtido um total de 1.136 isolados, para as duas épocas, nos dois locais e nas diferentes cultivares estudadas.

A frequência dos diferentes gêneros de fungos, obtida na amostragem, é apresentada nas Tabelas 1, 2 e 3, sendo agrupadas as espécies dos gêneros: *Trichoderma*, *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Curvularia*. Espécies pertencentes a outros gêneros foram agrupadas sob o item denominado: "Outros Gêneros".

Os resultados revelaram diferentes tendências para a frequência no isolamento, dos diferentes gêneros de fungos isolados, dependendo do tipo de tratamento da amostra e também do local de onde foram obtidas as raízes.

Tabela 1. Efeito do fungicida benomil, na frequência de isolamento de fungos, associados à podridão de raízes de cana-de-açúcar, na região de Campos, R.J.

Tratamento	Porcentagens de isolamento obtidas para diferentes gêneros de fungos					Total de Isolados	
	<i>Trichoderma</i> spp	<i>Fusarium</i> spp	<i>Pythium</i> spp	<i>Rhizoctonia</i> spp	<i>Curvularia</i> spp		Outros gêneros
Benomil (0,025% i.a.)	21,90*	37,50	22,40	9,05	3,12	5,78	547 (100%)
Sem benomil	31,95	38,00	7,35	12,65	5,51	4,32	489 (100%)

\* Porcentagem do número total de isolados obtidos para nove cultivares, amostrados no período seco e 12 cultivares no período úmido, em dois tipos de solo, analisados conjuntamente.

Tabela 2. Influência de épocas de amostragem na frequência de isolamento de fungos associados à podridão de raízes de cana-de-açúcar, na região de Campos, R.J.

Épocas	Porcentagens de isolamento obtidos para os diferentes gêneros de fungos					Total de Isolados	
	<i>Trichoderma</i> spp	<i>Fusarium</i> spp	<i>Pythium</i> spp	<i>Rhizoctonia</i> spp	<i>Curvularia</i> spp		Outros gêneros
Período Seco (Novembro)	25,9*	43,3	14,6	11,7	1,0	3,1	477 (100%)
Período Úmido (Fevereiro)	28,2	32,3	14,5	10,1	7,7	6,9	659 (100%)

\* Porcentagem do total de isolados obtidos de nove cultivares amostrados no período seco e doze no período úmido, de raízes tratadas com ou sem benomil (0,025% i.a.) e oriundas de dois tipos de solo, analisadas em conjunto.

Tabela 3. Influência do tipo de solo na frequência de isolamento de fungos associados à podridão de raízes de cana-de-açúcar, em diferentes locais da região de Campos, R.J.

Locais	Porcentagens de isolamento obtidos para os diferentes gêneros					Total de Isolados	
	<i>Trichoderma</i> spp	<i>Fusarium</i> spp	<i>Pythium</i> spp	<i>Rhizoctonia</i> spp	<i>Curvularia</i> spp		Outros gêneros
Solo aluvial	21,7*	28,0	15,5	22,2	10,1	4,3	207 (100%)
Solo hidromórfico	30,3	33,8	20,3	6,4	0,4	8,4	201 (100%)

\* Dados correspondentes a 4 cultivares amostradas nos dois locais, em duas épocas e de raízes tratadas com e sem benomil (0,025% i.a.)

A utilização do benomil, no processo de desinfecção superficial das raízes, foi considerada útil para aumentar a eficiência no isolamento de *Pythium* (Tabela 1), fungo pouco competitivo em meio de cultura. Houve diminuição leve nos outros gêneros mencionados, com exceção feita para *Fusarium* spp. e o grupo de "outros gêneros".

A tendência observada para a diminuição no isolamento de alguns grupos de fungos, poderia ser devida a ocasional associação externa desses fungos às raízes (SALT, 1979). Também, devido ao efeito inibitório exercido seletivamente pelo benomil para fungos diferentes de *Pythium* ou *Phytophthora* (RIBEIRO, 1978).

Os dados apresentados na Tabela 2 revelaram que os fungos dos gêneros *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Trichoderma* apresentaram tendências semelhantes, quando comparadas as frequências observadas nas duas épocas. Na época úmida, *Curvularia* e os fungos envolvidos no grupo, que inclui os outros gêneros, revelaram um aumento marcante no isolamento. O inverso aconteceu com o grupo, envolvendo espécies de *Fusarium*. O fato de não terem sido detectadas diferenças marcantes para o efeito da época de amostragem na frequência de isolamento de fungos patogênicos, tais como: *Pythium* e *Rhizoctonia* e para *Trichoderma*, habitante de raízes e antagonista dos outros dois gêneros (BAKER e COOK, 1974), provavelmente, está relacionado com o tipo de amostragem utilizada. Desta forma, sempre que existiam lesões, esses fungos encontravam-se colonizando o tecido interno das raízes, não refletindo, portanto, o efeito do ambiente sobre a dinâmica da população no solo.



A influência do tipo de solo, na frequência de isolamento dos diferentes fungos é apresentada na Tabela 3. No solo hidromórfico, com maior porcentagem de matéria orgânica, foi observada uma tendência para o aumento na porcentagem de isolamentos de *Trichoderma*, *Pythium* e *Fusarium*. Para *Rhizoctonia* e *Curvularia* foi observada uma diminuição.

A maior capacidade de retenção de umidade do solo hidromórfico, provavelmente, tem uma relação com a maior frequência de associação de *Pythium* às lesões de raízes nestas condições. Esta observação já tinha sido feita por RANDES, (1930). As características deste solo, provavelmente, devem agir estimulando o desenvolvimento do fungo e o crescimento do sistema radicular, aumentando a disponibilidade de sítios para a penetração. O aumento na frequência observada para *Trichoderma* neste solo, coincide com as referências para associação destes fungos, com a matéria orgânica, especialmente, pela sua capacidade celulolítica e grande capacidade competitiva. Por outra parte, o efeito antagônico de espécies de *Trichoderma* (BAKER e COOK, 1974) exercido sobre espécies de *Pythium* e *Rhizoctonia*, ora isolados, pode, também, justificar a alta frequência desse gênero (RANDES e DOPP, 1938).

De modo geral, os gêneros de fungos associados às raízes, na região de Campos, RJ, coincidem com aqueles envolvidos com a podridão de raízes de cana-de-açúcar no Havai (RANDES e DOPP, 1938), em Porto Rico (KOIKE, 1969) e em Formosa (HSU e CHU, 1962, CHU *et alii*, 1966 e TZEAN *et alii*, 1974).

Em relação às espécies de *Pythium*, encontradas em associação às raízes, foi constatado que *P. arrhenomanes* foi isolado numa frequência da ordem de 60, 7%. Outras espécies isoladas foram: complexo *P. acanthicum*-*P. oligandrum* (18%), *P. periplocum* (6,1%), *P. mamillatum* (7,8%) e *P. nagaii*(?) (3,6%).

Quanto aos isolados pertencentes ao gênero *Fusarium*, *F. oxysporum* foi a espécie mais frequentemente isolada, assim como, *Rhizoctonia solani* foi para o gênero *Rhizoctonia*, concordando as características morfológicas destas duas espécies, com as descritas por WATANABE (1975b) e por WATANABE e SHIYOMI (1975), respectivamente.

No presente trabalho foi dada ênfase ao gênero *Pythium*, devido a sua maior patogenicidade, razão pela qual não foi feita a identificação de todas as espécies de fungos obtidas no processo de isolamento.

No processo de isolamento, diversas técnicas foram testadas. Após diversos testes, foi tomada a decisão de não serem utilizados antibióticos, visto que se tratava de um isolamento geral para fungos, não se sabendo de antemão o efeito que os antibióticos poderiam ter sobre os fungos. Esta precaução foi tomada, baseando-se, principalmente, no efeito de antibióticos em diversas espécies de *Pythium* (HINE, 1962).

Desta forma, a metodologia utilizada, para o tratamento das amostras, foi adequada para este tipo de raízes e nas condições em que elas se desenvolveram, dando uma idéia geral do tipo de fungos, provavelmente, envolvidos no complexo de podridão de raízes de cana-de-açúcar.

#### 4.2. Identificação das espécies de *Pythium*

As espécies de *Pythium* isoladas de lesões em raízes de cana-de-açúcar, foram identificadas de acordo com a metodologia descrita no item 3.2. As espécies são apresentadas a seguir, conjuntamente com uma descrição sucinta dos caracteres morfológicos e fisiológicos, que contribuíram para a identificação da espécie:

a) *Pythium arhenomanes* Drechsler: micélio aéreo vigoroso, colônia de aspecto aracnoide, esporângios diferenciados da hifa vegetativa, lobulados (19 a 32 $\mu$ m), zoosporos presentes, oogônios lisos, (17 a 31 e média 23 $\mu$ m), oosporos pleróticos frequentemente degenerados, anterídios diclinos não originados próximo do oogônio e terminal, ramos anteridiaais frequentemente divididos, 3 a 6 células anteridiaais por oogônio.

b) Complexo *Pythium acanthicum* - *P. oligandrum*. (sensu WATANABE, 1974): micélio aéreo escasso, colônias de crescimento cumuliforme, esporângios esferoidais e contíguos, oogônios equinulados (17 $\mu$ m a 22 e média 20 $\mu$ m), oosporos pleróticos e apleróticos. Ramos anteridiaais simples, diclinos, com 1 a 2 células anteridiaais por oogônio.

c) *Pythium mamillatum* Meurs: micélio aéreo escasso, colônia em forma de roseta, esporângios esferoidais, não contíguos, oogônios com protuberância do tipo mamiforme (17 a 26  $\mu$ m e média 20,5 $\mu$ m), oosporos pleróticos, ramos anteridiaais monoclinos, com uma a duas células anteridiaais por oogônio.

d) *Pythium periplocum* Drechsler: micélio aéreo escasso, colônia de crescimento do tipo cumuliforme, esporangios diferenciados da hifa vegetativa, lobulados, oogônios equinulados (19 a 28  $\mu$ m, média de 23,5  $\mu$ m), oosporos apleróticos, ramos anteridiaais diclinos, com uma ou duas células anteridiaais por oogônio.

e) *Pythium nagaii*(?) Ito Tokunaga: micélio aéreo vigoroso, colônia de tipo aracnóide, esporangios esferoidais e prolíferos (22 a 32 e média de 27  $\mu$ m), oogônios de paredes lisas (20 a 26 e média de

24,1  $\mu\text{m}$ ), oosporos com parede lisa e aparentemente não inspissada, apleróticos. Ramos anteridiaes monóclinos, com uma célula anteridial por oogônio. Um glossário referente às principais características morfológicas utilizadas na identificação de espécies de *Pythium* é apresentado no Apêndice.

Durante a identificação destas espécies, foi observada uma alta frequência de espécies com oogônios ornamentados e a inadequação das chaves taxonômicas para o gênero *Pythium*.

Problemas tais como a indefinição do tipo plerótico ou aplerótico dos oosporos e a variação marcante nas medidas das estruturas como consequência, provavelmente, das repicagens periódicas foram observados frequentemente. Estas observações coincidem com relatos sobre variabilidade de características em espécies de *Pythium* (HENDRIX e CAMPBELL, 1974a e 1974b), tornando recomendável a opção por complexos de espécies ou "galaxias" com isolados que possuam diferenças pouco marcantes entre eles (WATANABE, 1974 e HENDRIX e PAPA, 1974).

#### 4.3. Aspectos gerais relacionados com a apresentação de resultados dos experimentos desenvolvidos em casa de vegetação

Na apresentação de cada teste, são acompanhadas algumas características metodológicas, consideradas importantes, para se situar na análise dos resultados.

Numerosos parâmetros foram avaliados nos diferentes experimentos. Apesar de que alguns deles não estimassem com grande sensibilidade as características biológicas, que se desejava avaliar quantitativamente, eles serão incluídos nos resultados de cada experimento, para demonstrar as características de cada um deles, nas condições de cada experimento.

Os resultados de sintomas, nas raízes das cultivares, foram analisados, considerando plantas inoculadas e testemunhas, visto que: os dados referentes às plantas testemunhas apresentavam alguma variação; as tendências reveladas pelas cultivares inoculadas, não se modificavam substancialmente quando submetidas a este tipo de análise em relação a análise isolada de plantas inoculadas; por último, porque melhorava a apresentação dos dados, dando a conhecer o nível dos sintomas detectados em relação às plantas testemunhas.

Nas tabelas que contêm as médias, obtidas em cada parâmetro avaliado nos diferentes ensaios, se apresentam somente as diferenças mínimas significativas (DMS), que podem servir para a discussão.

Nos experimentos de reação de cultivares, a inoculação com *P. arrhenomanes*, são feitas algumas comparações de características do desenvolvimento das plantas, tanto da parte aérea, quanto do sistema radicular. Este tipo de análise é considerado necessário para a compreensão do comportamento de cada cultivar, quando inoculado e, por certo, limitam-se as condições destes experimentos. Um resumo das reações das cultivares nos diferentes ensaios quanto ao índice de sintomas e do peso fresco da parte aérea e do sistema radicular é apresentado na Tabela 59.

#### 4.4. Efeito de tipos e níveis de inóculo na reação de cultivares

##### 4.4.1. Efeito do inóculo constituído de raízes naturalmente infectadas, oriundas de diferentes cultivares de cana-de-açúcar

Neste experimento foram utilizados dois níveis de inóculo, constituído de raízes naturalmente infectadas, oriundas de uma mistura de cultivares, as quais foram inoculadas em duas cultivares de cana-de-açúcar-

durante os meses de fevereiro a março (30 dias). As plantas submetidas ao teste tinham 22 dias de desenvolvimento em areia, sendo que a temperatura, durante este período foi de 19 a 38°C. Os resultados obtidos para o peso fresco da parte aérea e a altura dos colmos são apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4. Peso fresco da parte aérea das cultivares CB 47-89 e NA 56-79, inoculadas com raízes naturalmente infectadas, de uma mistura de cultivares

Cultivar (C)	Quantidade do inóculo (I)			Médias
	0 cm <sup>3</sup>	50 cm <sup>3</sup>	100 cm <sup>3</sup>	
CB 47-89	11,82* b**	6,79 a	1,18 a	6,60
NA 56-79	14,60 a	16,82 a	23,10 a	18,17

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha ou coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1%)

CV (%) = 40,80

DMS (1%) C dentro de I = 9,12

Tabela 5. Altura dos colmos (cm) das cultivares CB 47-89 e NA 56-79 inoculadas com raízes naturalmente infectadas, de uma mistura de cultivares

Cultivar (C)	Quantidade do inóculo (I)			Médias
	0 cm <sup>3</sup>	50 cm <sup>3</sup>	100 cm <sup>3</sup>	
CB 47-89	15,77* b**	18,95 b	5,42 a	13,18
NA 56-79	25,37 a	26,90 a	26,85 a	26,37

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 22,06

DMS (1%) C dentro de I = 10,25

Os diferentes níveis de inóculo constituído pelas raízes, naturalmente infectadas, obtidas de uma mistura de cultivares, causaram uma redução significativa na cultivar CB 47-89, tanto para o peso fresco da parte aérea, como para a altura dos colmos. Um efeito semelhante não foi detectado para a cultivar NA 56-79.

Quando avaliado o experimento, a cultivar CB 47-89 apresentava os sintomas de amarelecimento da parte aérea e morte de plantas.

A cultivar NA 56-79, apesar de apresentar sintomas no sistema radicular, não foi afetada quanto ao seu desenvolvimento da parte aérea, levando-se em consideração, tanto o peso fresco da parte aérea como a altura dos colmos.

Devido a este ser um dos primeiros experimentos desenvolvido, o sistema radicular foi utilizado para isolamento e conhecimento dos tipos de lesões, que podiam ocorrer nas raízes dos diferentes cultivares. Por essa razão, não foram utilizadas para pesagem ou avaliação do índice de sintomas.

A necessidade de grande quantidade de raízes infectadas, a serem utilizadas como fonte de inóculo nos testes, revelou que este método seria pouco viável para a inoculação em larga escala. A vantagem deste método, no entanto, reside no fato de se poder discriminar sintomas e agentes envolvidos nas podridões, a partir de lesões iniciais nas raízes das plantas inoculadas.

Das raízes das plantas da cultivar CB 47-89 submetidas à inoculação, foi facilmente isolado *P. arrhenomanes*, sendo este fato menos frequente na cultivar NA 56-79. Outros fungos isolados das raízes foram *Trichoderma* spp, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. moniliiforme* e *Curvularia* sp.

As plantas utilizadas como testemunhas apresentavam algumas raízes necrosadas, das quais foram isolados fungos dos gêneros *Fusarium*, *Trichoderma* e *Curvularia*, originados, provavelmente, de contaminação do ambiente e/ou dos toletes.



Nas condições deste experimento, a cultivar NA 56-79 apresentou características de resistência ao inóculo, contido nas raízes infectadas, quando comparada com a cultivar CB 47-89, que se revelou mais suscetível.

#### 4.4.2. Efeito do inóculo constituído de raízes naturalmente infectadas da cultivar NA 56-79

Este experimento desenvolvido durante o mês de abril, teve duração de trinta dias. O inóculo, ou seja, as raízes das plantas doentes, foi transferido aos vasos, dois dias após ter sido colhido. As plantas submetidas ao teste tinham 20 dias de desenvolvimento em areia, sendo que a temperatura durante este período foi de 16 a 30°C.

Os dados referentes às médias, para o peso fresco da parte aérea, peso fresco do sistema radicular, altura dos colmos, número de nós e índice de sintomas nas raízes são apresentados nas Tabelas 6, 7, 8, 9 e 10, respectivamente.

## 8. SUMMARY

In this work, qualitative and quantitative internal bacterial population of healthy sugarcane plants and others that had been inoculated with *Xanthomonas albilineans* (Ashby) DAWSON were evaluated; also *in vivo* and *in vitro* studies were performed in connection with the relationships between the pathogen and *Erwinia herbicola* (Lohms) Dye and/or with *Pseudomonas* sp.

Bacterial populations living inside healthy and diseased stalks were differente.

In laboratory experiments of relationship, the growth of three bacterias were compared in the Wilbrink's methionine broth, filtrate of *Erwinia herbicola* (FEh) culture and in the filtrate of *Pseudomonas* sp. culture. The FEh inhanced the growth of *X.albilineans* but inhibited *Pseudomonas* sp. This effect increased with higher concentration of cells in the filtrate culture of *Erwinia herbicola* and decreased with heating.

Tabela 8. Altura dos colmos (cm) das cultivares CB 47-89 e NA 56-79, inoculadas com raízes naturalmente infectadas da cultivar NA 56-79

Inoculação (I)	Cultivares (C)		Médias
	CB 47-89	NA 56-79	
Inoculadas	10,20*a**	14,70a	12,44a
Testemunha	26,00b	23,50b	24,75b

\*Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 17,67

DMS (1%) I = 6,37

DMS (5%) I dentro de C = 6,18

Tabela 9. Número de nós nas cultivares CB 47-89 e NA 56-79, inoculadas com raízes naturalmente infectadas da cultivar NA 56-79

Inoculação (I)	Cultivares (C)		Médias
	CB 47-89	NA 56-79	
Inoculadas	2,00*a**	4,33a	3,16a
Testemunha	5,00b	5,66b	5,33b

\* Média de três repetições, cada uma constituída de 3 plantas

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 15,81

DMS (1%) I = 1,25

DMS (5%) I dentro de C = 1,21

Tabela 10. Intensidade de sintomas\*\*\* nas raízes das cultivares CB 47-89 e NA 56-79, inoculadas com raízes naturalmente infectadas da cultivar NA 56-79

Inoculação (I)	Cultivares (C)		Médias
	CB 47-89	NA 56-79	
Inoculadas	2,88*b**	2,33b	2,58b
Testemunha	1,33a	1,33a	1,33a

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1%)

\*\*\* Escala de 0 a 3, onde 0 = sem sintomas; 1 = até 25% das raízes com sintomas; 2 = 26 a 50% das raízes com sintomas; e 3 = mais de 50% das raízes com sintomas

CV (%) = 14,74

DMS (1%) I = 0,55

DMS (1%) I dentro de C = 0,79

O inóculo constituído de raízes naturalmente infectadas da cultivar NA 56-79, causou um efeito significativo nas duas cultivares, considerando-se o peso fresco da parte aérea, a altura dos colmos e o número de nós e o índice de sintomas no sistema radicular, não se detectando diferenças na reação das duas cultivares testadas.

Houve uma alta variação no peso fresco do sistema radicular das plantas avaliadas, e, especialmente, nas inoculadas. Esta foi, provavelmente, uma das razões pelas quais não foi possível detectar diferenças significativas entre tratamentos, quando considerado este parâmetro.

Neste experimento, verificou-se, em linhas gerais, um efeito maior do complexo dos agentes causais, da podridão, na cultivar NA 56-79, em relação ao observado para esta no teste anterior. Nessa ocasião, o inóculo foi constituído por raízes naturalmente infectadas, oriundas de várias cultivares.

Este efeito, provavelmente, pode ser atribuído as condições sub-ótimas de temperatura e luz, que ocorreram por ocasião da realização do teste predispondo a cultivar NA 56-79 à doença. Outra alternativa, seria a ocorrência de isolados mais patogênicos nas raízes infectadas desta cultivar, utilizadas como inóculo.

A primeira hipótese estaria associada com o menor desenvolvimento do sistema radicular (RUSSELL, 1977), ou ainda, com as características fisiológicas relacionadas com a interação patógeno-hospedeiro. A segunda, relacionar-se-ia com a seleção de biótipos mais patogênicos de *Pythium*. Esta seleção seria exercida por uma cultivar de introdução, recente na região e com nível, provavelmente maior de resistência (RANDS e DOPP, 1938).

#### 4.4.3. Efeito do inóculo constituído de raízes naturalmente infectadas, comparado com o de cultura pura de *P. arrhenomanes*

O teste teve duração de trinta dias, sendo desenvolvido nos meses de maio a junho, contando com o ambiente aquecido à uma temperatura

em torno de 28 a 30°C. O inóculo constituído das raízes, naturalmente infectadas da cultivar NA 56-79, tinha sido armazenado, durante 30 dias, em geladeira a  $\pm 7^\circ\text{C}$ . As plantas submetidas ao teste tinham 15 dias de desenvolvimento em areia.

Os resultados expressos em peso fresco da parte aérea e do sistema radicular, altura dos colmos e índice de sintomas nas raízes são apresentados nas Tabelas 11, 12, 13 e 14, respectivamente.

Tabela 11. Peso fresco da parte aérea (g) das cultivares CB 47-89 e NA 56-79, inoculadas com raízes naturalmente infectadas e com uma cultura pura de *P. arrhenomanes*

Cultivar (C)	Tipo de inóculo (I)				Médias
	50cm <sup>3</sup> raízes	3/4*** V-8- ágar	1/2*** V-8- ágar	Testemunha	
CB 47-89	18,63* ab**	17,77 a	21,83 ab	35,68 b	23,48
NA 56-79	11,25 a	17,11 a	16,61 a	24,53 a	17,37

\* Média de 3 repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 5%)

\*\*\* 3/4 e 1/2 correspondem, respectivamente, a proporção do meio de cultura, contido em uma placa-de-petri, colonizado pelo patógeno

CV (%) = 33,71

DMS (5%) I dentro de C = 16,10

Tabela 12. Peso fresco do sistema radicular (g) das cultivares CB 47-89 e NA 56-79, inoculadas com raízes naturalmente infectadas e com uma cultura pura de *P. arrhenomanes*

Cultivar (C)	Tipo de inóculo (I)				Médias
	50cm <sup>3</sup> raízes	3/4** V-8- ágar	1/2** V-8- ágar	Testemunha	
CB 47-89	7,14* <sup>+</sup>	5,82	7,22	10,97	7,79
NA 56-79	6,16	7,57	7,51	13,85	8,77

\* Média de 3 repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* 3/4 e 1/2 correspondem, respectivamente à proporção de meio de cultura, contido em uma placa-de-petri, colonizado pelo patógeno

+ Para o parâmetro peso fresco do sistema radicular, a análise de variância não revelou diferenças estatísticas significativas entre os diferentes tratamentos.

CV (%) = 58,33%

Tabela 13. Altura dos colmos (cm) das cultivares CB 47-89 e NA 56-79, inoculadas com raízes infectadas naturalmente e com uma cultura pura de *P. arrhenomanes*

Cultivar (C)	Tipo de inóculo (I)				Médias
	50cm <sup>3</sup> raízes	3/4** V-8- ágar	1/2** V-8- ágar	Testemunha	
CB 47-89	22,93* <sup>+</sup>	23,63	25,50	31,10	25,79
NA 56-79	21,13	28,13	24,56	28,10	25,48

\* Média de 3 repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* 3/4 e 1/2 correspondem, respectivamente à proporção do meio de cultura, contido em uma placa-de-petri, colonizado pelo patógeno

+ Para o parâmetro altura dos colmos, a análise de variância não revelou diferenças estatísticas significativas entre diferentes tratamentos

CV (%) = 19,36

Tabela 14. Índice de sintomas\*\*\* no sistema radicular das cultivares CB 47-89 e NA 56-79 inoculadas com raízes naturalmente infectadas e com uma cultura pura de *P. arrhenomanes*

Cultivar (C)	Tipo de inóculo (I)				Médias
	50cm <sup>3</sup> raízes	3/4 <sup>0</sup> V-8- ágar	1/2 <sup>0</sup> V-8- ágar	Testemunha	
CB 47-89	2,33* b**	2,16 b	1,83 ab	1,00 a	1,83
NA 56-79	2,43 b	2,16 b	1,73 ab	1,16 a	1,87

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1%)

\*\*\* Escala de 0 a 3 onde 0 = sem sintomas; 1 = até 25% das raízes com sintomas; 2 = 26 a 50% das raízes com sintomas; 3 = mais de 50% de raízes

<sup>0</sup> 3/4 e 1/2 correspondem, respectivamente à proporção do meio de cultura, contido em uma placa-de-petri, colonizado pelo patógeno

CV (%) = 20,3

DMS (%) I dentro de C = 1,13

Nas condições deste ensaio, o efeito para tipos de inóculo foi detectado no caso do peso fresco da parte aérea na cultivar CB 47-89. A maior redução no desenvolvimento ocorreu para o tipo de inóculo correspondente às estruturas de *P. arrhenomanes*, desenvolvidas em 3/4 do meio de cultura de V-8-ágar, contido em uma placa-de-petri.

Reduções menores foram observadas, quando utilizadas raízes naturalmente infectadas, ou as estruturas do patógeno desenvolvidas na



metade do meio de cultura de V-8-ágar contidas em uma placa-de-petri.

O peso fresco do sistema radicular e a altura dos colmos não revelaram qualquer efeito dos tratamentos em nenhuma das cultivares, ocorrendo para o primeiro parâmetro, um elevado coeficiente de variação.

Foi observado que a cultivar NA 56-79 e a CB 47-89 apresentaram valores semelhantes para a severidade dos sintomas, no sistema radicular. No entanto, as cultivares não tiveram diferenças estatisticamente significativas, para o peso fresco da parte aérea entre as plantas inoculadas e as testemunhas.

Apesar do presente experimento ter tido uma duração semelhante ao anterior, a elevação da temperatura pode ter contribuído para um melhor desenvolvimento das plantas, mascarando assim, provavelmente, o efeito da doença na parte aérea da cultivar NA 56-79.

Por outro lado, o armazenamento das raízes, naturalmente infectadas e utilizadas como inóculo, pode ter influenciado na composição quantitativa ou qualitativa, do complexo de microorganismos existentes nas raízes, alterando seu potencial de patogenicidade nas cultivares.

Devido ao índice elevado de sintomas no sistema radicular, provavelmente, seria recomendável uma duração maior do experimento, para melhor evidenciar os efeitos dos tratamentos.

Quando analisado o efeito do tipo de inóculo, no índice de sintomas nas raízes, das duas cultivares foi observado que as raízes naturalmente infectadas e a dose maior da cultura de *P. arrhenomanes* desenvolvida em V-8-ágar, tiveram um efeito semelhante entre si, diferindo, no

entanto, das testemunhas. Por outro lado, quando foi aplicado somente o correspondente a metade da colônia do patógeno desenvolvido em V-8-ágar os sintomas alcançaram um nível intermediário, não diferindo da testemunha.

É importante ressaltar que, embora possa se obter resultados interessantes, utilizando-se como inóculo, raízes naturalmente infectadas, o uso deste tipo de inóculo representa limitações, pela dificuldade de obtenção e preservação deste tipo de inóculo em locais onde a doença não ocorre de maneira epidêmica.

#### 4.4.4. Efeitos dos meios V-8-ágar, areia-quirera de milho e areia, farinha de milho como substratos para a produção de inóculo de *P. arhenomanes*

O experimento teve uma duração de 68 dias, sendo conduzido no período de fevereiro a abril. As plantas submetidas ao teste, resultaram de toletes, que foram induzidos ao desenvolvimento das raízes e brotos, em estufa de incubação, sem desenvolvimento posterior em caixas com areia.

Os resultados referentes ao peso fresco da parte aérea e do sistema radicular, peso seco da parte aérea e das raízes, altura dos colmos e o índice de sintomas no sistema radicular são apresentados nas Tabelas 15, 16, 17, 18, 19 e 20, respectivamente.

Tabela 15. Peso fresco da parte aérea (g) da cultivar CB 47-89 inoculada com *P. arhenomanes* através de diferentes tipos e quantidades de inóculo

Quantidade de inóculo (N)	Tipo de inóculo			Médias
	Meio de V-8-ágar	areia-quirera de milho	areia-farinha de milho	
Uma placa-de-petri com V-8-ágar ou 50cm <sup>3</sup> da mistura em areia	50,72**	55,84	43,27	52,18
3/4 de placa-de-petri de V-8-ágar ou 25cm <sup>3</sup> da mistura em areia	60,45	57,99	61,54	59,99
Testemunhas (1 placa de V-8-ágar ou 50cm <sup>3</sup> da mistura em areia sem colonizar)	68,50	70,44	64,32	67,75
Médias	62,12	61,43	56,38	

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída por uma planta.

+ Para o peso fresco da parte aérea a análise de variância não revelou diferenças estatísticas significativas entre tratamentos

CV (%) = 34,14

Tabela 16. Peso fresco do sistema radicular (g) da cultivar CB 47-89 inoculada com *P. arrhenomanes* através de diferentes tipos e quantidades de inóculo

Quantidade de inóculo (N)	Tipo de inóculo (I)			Médias
	Meio de V-8-ágar	areia-quirera de milho	areia-farinha de milho	
Uma placa-de-petri com V-8-ágar ou 50cm <sup>3</sup> da mistura em areia	24,07*a** a	26,29a a	23,87a a	24,74a
3/4 de placa-de-petri com V-8-ágar ou 25cm <sup>3</sup> da mistura em areia	26,54a a	31,65a a	39,92a a	32,70ab
Testemunha (1 placa-de-petri com V-8-ágar ou 50cm <sup>3</sup> da mistura em areia, não colonizados)	61,72b a	48,67a a	41,27a a	50,60b

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 41,13

DMS (1%) N = 19,27

DMS (1%) N dentro de T = 33,37

DMS (5%) N dentro de T = 25,93

Tabela 17. Peso seco da parte aérea (g) da cultivar CB 47-89 inoculada com *P. arrhenomanes* através de diferentes tipos e quantidades de inóculo

Quantidade de inóculo (N)	Tipo de inóculo (T)			Médias
	Meio de V-8-ágar	areia-quirera de milho	areia-farinha de milho	
Uma placa-de-petri com V-8-ágar ou 50cm <sup>3</sup> da mistura em areia	11,96* a	11,63a a	9,35a a	10,98a**
3/4 de placa-de-petri com V-8-ágar ou 25cm <sup>3</sup> da mistura em areia	13,44a	12,63a	12,39a	12,97ab
Testemunhas (1 placa-de-petri com V-8-ágar ou 50cm <sup>3</sup> da mistura em areia, não colonizados)	16,45a	16,79a	17,16a	16,47b

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 5%)

CV (%) = 34,96

DMS (5%) N = 6,12

Tabela 18. Peso seco das raízes (g) da cultivar CB 47-89 inoculada com *P. arthenomanes* através de diferentes tipos e quantidades de inóculo

Quantidade de inóculo (N)	Tipo de inóculo (T)			Médias
	Meio de V-8-ágar	areia-quirera de milho	areia-farinha de milho	
Uma placa-de-petri com V-8-ágar ou 50cm <sup>3</sup> da mistura em areia	3,14* a	3,25a a	2,60a a	3,00a**
3/4 de placa-de-petri com V-8-ágar ou 25cm <sup>3</sup> da mistura em areia	3,61a a	4,72a a	3,42a a	3,92ab
Testemunhas (1 placa-de-petri com V-8-ágar ou 50cm <sup>3</sup> da mistura em areia, não colonizados)	6,45a a	6,22a a	5,38a a	6,01b

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1%)

CV (%) = 49,91

DMS (1%) N = 2,78

Tabela 19. Altura dos colmos (cm) da cultivar CB 47-89 inoculada com *P. arrhenomanes* através de diferentes tipos e quantidades de inóculo

Quantidade de inóculo (N)	Tipo de inóculo (T)			Médias
	Meio de V-8-ágar	areia-quirera de milho	areia-farinha de milho	
Uma placa-de-petri com V-8-ágar ou 50cm <sup>3</sup> da mistura em areia	41,25*a** a	40,00a a	36,25a a	39,16
3/4 de placa-de-petri com V-8-ágar ou 25cm <sup>3</sup> da mistura em areia	41,87a a	42,00a a	42,87ab a	42,25
Testemunhas (1 placa-de-petri com V-8-ágar ou 50cm <sup>3</sup> da mistura em areia, não colonizados)	39,12a a	44,75a a	51,75b a	45,20

\*Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 5%)

CV (%) = 16,87

DMS (%) N dentro de T = 12,46

Tabela 20. Índice de sintomas\*\*\* no sistema radicular da cultivar CB 47-89 inoculada com *P. arrhenomanes* através de diferentes tipos e quantidades de inóculo

Quantidade de inóculo (N)	Tipo de inóculo (T)			Médias
	Meio de V-8-ágar	areia-quirera de milho	areia-farinha de milho	
Uma placa-de-petri com V-8-ágar ou 50cm <sup>3</sup> da mistura em areia	2,87* <sup>b</sup> ** a	2,62b a	2,87b a	2,78c
3/4 de placa-de-petri com V-8-ágar ou 25cm <sup>3</sup> da mistura em areia	2,39b a	1,50ab a	2,00ab a	1,95b
Testemunhas (1 placa-de-petri com V-8-ágar ou 50cm <sup>3</sup> da mistura em areia, não colonizados)	1,12a a	1,12a a	1,12a a	1,12a

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha ou coluna, não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

\*\*\* Escala de 0 a 3 onde 0 = sem sintomas; 1 = até 25% das raízes com sintomas; 2 = 26 a 50% das raízes com sintomas; 3 = mais de 50% das raízes com sintomas

CV (%) = 24,69

DMS (1%) N = 0,62

DMS (5%) N = 0,48

DMS (1%) N dentro de T = 1,08



Nos resultados apresentados, foi observado que houve um maior desenvolvimento das plantas testadas, em virtude da maior duração do teste e das condições de temperatura mais favoráveis ao crescimento.

De modo geral, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias, de quantidade ou níveis de inóculo, considerando-se em conjunto todos os tipos de inóculo, para o peso fresco do sistema radicular, peso seco da parte aérea e das raízes e índice de sintomas no sistema radicular.

No entanto, considerando-se a quantidade ou níveis de inóculo, dentro dos diferentes tipos, somente o parâmetro índice de sintomas revelou diferenças significativas, ocorrendo nos diferentes níveis, dentro de cada tipo de inóculo.

Para os outros parâmetros, os efeitos de níveis, dentro dos tipos de inóculo, variaram segundo o parâmetro avaliado. Assim, diferentes níveis de inóculo, para o meio de V-8-ágar, influenciaram de maneira significativa no peso fresco do sistema radicular. Os diferentes níveis do inóculo, constituídos de areia-farinha de milho contendo as estruturas do patógeno, influenciaram, significativamente, na altura dos colmos.

Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas, entre as médias dos diferentes tipos de inóculo, nem para tipos dentro dos níveis de inóculo, em nenhum caso.

Visto que, para o parâmetro índice de sintomas nas raízes, os substratos constituídos por areia-quirera de milho e areia-farinha de

milho não diferiram significativamente entre si, quanto à severidade de doença induzida, pode-se considerar que o primeiro apresenta vantagens em relação ao segundo, devido a maior facilidade no preparo. Esta vantagem relaciona-se, também, com a maior facilidade da homogeneização conseguida no momento da inoculação. Este fato já foi relatado por ASHER (1973).

Por outra parte, a mistura de areia-quirera de milho revelou ser um bom substrato, para ser utilizado como fonte de inóculo de *P. arrhenomanes*, uma vez que não foram detectadas diferenças significativas, para tipos dentro de níveis de inóculo, para o parâmetro índice de sintomas nas raízes.

Considerando-se que as referências para tipos de substratos utilizados na produção do inóculo, em grande quantidade, indicam proporções maiores de farinha de milho (KOIKE e YANG, 1971), na mistura com areia (50cm<sup>3</sup>/4 l de areia), e um tempo de incubação também mais prolongado (12 dias), que o período ora utilizado, foi conseguido com as alterações introduzidas nesta oportunidade, uma maior eficiência no preparo deste material.

#### 4.5. Patogenicidade de fungos isolados de lesões de raízes de cana-de-açúcar, no mesmo hospedeiro

##### 4.5.1. Patogenicidade de *Fusarium oxysporum*, *P. arrhenomanes* e complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*

As cultivares foram inoculadas com os três fungos no período de novembro a dezembro, tendo o experimento uma duração de 39 dias.

Os resultados para o peso fresco da parte aérea, peso seco, da parte aérea e das raízes, altura dos colmos e índice de sintomas no sistema radicular são apresentados nas Tabelas 21, 22, 23, 24 e 25.

Tabela 21. Peso fresco (g) da parte aérea de quatro cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes patógenos

Patógenos (P)	Cultivares (C)				Médias
	CB 45-3	CB 47-89	NA 56-79	RB 705051	
<i>P. arrhenomanes</i>	18,23* <sup>+</sup>	22,63	23,30	15,06	19,80
Complexo <i>P. acanthicum</i> - <i>P. oligandrum</i>	24,43	18,53	23,83	28,86	23,91
<i>Fusarium oxysporum</i>	22,43	18,20	25,70	27,89	23,55
Testemunha	25,66	34,90	27,43	29,76	29,44

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

<sup>+</sup> A análise de variância não revelou diferenças significativas entre tratamentos

CV (%) = 33,64

Tabela 22. Peso seco (g) da parte aérea de quatro cultivadas de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes patógenos

Patógenos (P)	Cultivares (C)				Médias
	CB 45-3	CB 47-89	NA 56-79	RB 705051	
<i>P. arrhenomanes</i>	4,23*a**	5,00ab	5,30a	3,63a	4,54a
Complexo <i>P. acanthicum</i> <i>P. oligandrum</i>	5,56a	4,06a	4,73a	6,73ab	5,27ab
<i>Fusarium oxysporum</i>	4,69a	4,50ab	6,26a	6,63ab	5,52ab
Testemunha	5,70a	8,50b	5,53a	9,30b	7,25b

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 32,16

DMS (1%) P = 2,50

DMS (5%) P = 2,01

DMS (1%) P dentro de C = 5,01

DMS (5%) P dentro de C = 4,02

Tabela 23. Peso seco das raízes (g) de quatro cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes patógenos

Patógenos (P)	Cultivares (C)				Médias
	CB 45-3	CB 47-89	NA 56-79	RB 705051	
<i>P. arrhenomanes</i>	1,89*a**	2,16a	2,53a	2,29a	2,22a
Complexo <i>P. acanthicum</i> <i>P. oligandrum</i>	2,59a	2,09a	3,16a	3,56ab	2,85ab
<i>Fusarium oxysporum</i>	2,86a	1,76a	4,33a	4,03ab	3,24ab
Testemunha	4,16a	4,46a	2,86a	5,36b	4,21b

\*Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 40,84

DMS (1%) P = 1,76

DMS (5%) P dentro de C = 2,83

Tabela 24. Altura dos colmos (cm) de quatro cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes patógenos

Patógenos (P)	Cultivares (C)				Médias
	CB 45-3	CB 47-89	NA 56-79	RB 705051	
<i>P. arrhenomanes</i>	24,83*a**	24,33a	26,00a	20,00a	23,79a
Complexo <i>P. acanthi-</i> <i>cum P. oligandrum</i>	26,16a	21,83a	28,00a	33,83ab	27,45a
<i>Fusarium oxysporum</i>	19,83a	23,00a	26,16a	32,16ab	25,29a
Testemunha	27,83a	24,76a	26,33a	36,83b	28,94a

\*Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1%)

CV (%) = 19,90

DMS (1%) P dentro de C = 14,48

Tabela 25. Índice de sintomas\*\*\* no sistema radicular, de quatro cultivares de cana-de-açúcar, inoculadas com diferentes patógenos

Patógeno (P)	Cultivares (C)				Médias
	CB 45-3	CB 47-89	NA 56-79	RB 705051	
<i>P. arrhenomanes</i>	1,50a a	2,00**a ab	1,83a ab	2,66b b	2,00b
Complexo <i>P. acanthicum</i> <i>P. oligandrum</i>	1,16a a	1,83a a	1,50a a	1,33ab a	1,45ab
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,33a a	1,33a a	1,00a a	1,16a a	1,20a
Testemunha	1,00a a	1,00a a	1,00a a	1,00a a	1,00a
Médias	1,25	1,54	1,33	1,54	

\* Média de três repetições, cada uma constituída por uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha ou coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

\*\*\* Escala de 0 a 3 onde 0 = sem sintomas; 1 = até 25% das raízes com sintomas; 2 = 26 a 50% das raízes com sintomas; 3 = mais de 50% de raízes com sintomas

CV (%) = 34,90

DMS (1%) I = 0,68

DMS (1%) P dentro de C = 1,36

DMS (5%) C dentro de P = 1,09

A análise para os efeitos dos diferentes patógenos, considerando as cultivares em conjunto, revelou que houve diferenças significativas, entre os diferentes patógenos, considerando-se os parâmetros: peso seco da parte aérea e do sistema radicular e o índice de sintomas nas raízes. Para o peso seco da parte aérea e do sistema radicular, *P. arrhenomanes* causou uma redução significativa em relação a testemunha. Enquanto que os efeitos para o complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum* e *Fusarium* foram menos intensos, ocupando uma posição intermediária entre *P. arrhenomanes* e a testemunha.

Com relação ao índice de sintomas nas raízes, o efeito geral para *P. arrhenomanes*, considerando-se no conjunto, as diferentes cultivares, foi de uma maior patogenicidade que aquela observada para *Fusarium*. Este, por sua vez, não diferiu da testemunha. O complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum* revelou-se de modo geral, menos patogênico que *P. arrhenomanes*, ocupando uma posição intermediária entre este e o *Fusarium*.

Quanto ao efeito dos patógenos dentro das cultivares, foi verificado que houve variação quando considerados os parâmetros: peso seco da parte aérea e do sistema radicular, altura dos colmos e índice dos sintomas. Assim, as cultivares CB 45-3 e NA 56-79 não revelaram diferenças significativas quanto à patogenicidade dos diferentes patógenos, considerando-se os parâmetros acima mencionados. Na cultivar RB 705051, para os diferentes parâmetros *P. arrhenomanes* apresentou maior patogenicidade, ocupando o complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum* e *Fusarium*, uma posição intermediária entre aquele e as testemunhas.



Para a cultivar CB 47-89, o efeito de diferentes patógenos, dentro das cultivares, revelou diferenças significativas no caso do peso seco da parte aérea. O complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum* causou maior redução desse parâmetro em relação a *P. arrhenomanes*.

Em relação ao efeito de cultivares, dentro dos patógenos, quando analisado o índice de sintomas no sistema radicular, foi verificado que houve variação na reação aos diferentes patógenos. Assim, a RB 705051 teve maior índice médio de sintomas que CB 45-3, enquanto que as cultivares CB 47-89 e NA 56-79 ocuparam uma posição intermediária entre as últimas citadas. Para os demais patógenos, não foram verificadas diferenças significativas no comportamento das cultivares, considerando-se o índice de sintomas.

O índice de sintomas no sistema radicular foi o parâmetro mais sensível, para detectar os diferentes efeitos dos patógenos, nas cultivares.

A época de realização do teste foi propícia para o bom desenvolvimento das plantas, ocorrendo uma incidência de nível médio de doença, avaliada segundo os sintomas induzidos por *P. arrhenomanes*, em comparação com experimentos anteriores.

Neste ensaio, evidenciou-se a complexidade do problema de podridão das raízes da cana-de-açúcar, porque parece existir diferenças quanto a reação das cultivares, dependendo do patógeno em questão. Assim, poder-se-ia obter uma cultivar resistente a um dos organismos do complexo e ela vir a ser suscetível aos outros. Daí, a importância de se estudar o efeito

isolado de cada componente do complexo nas cultivares, e, também, da interação entre os diferentes organismos e sua influência na severidade da doença (WALLACE, 1978).

#### 4.5.2. Patogenicidade de *P. arrhenomanes*, *P. mamillatum* e *P. nagaii*(?) nas cultivares CB 47-89 e NA 56-79

Este ensaio foi conduzido durante o mês de abril, tendo trinta dias de duração e sem aquecimento do ambiente da casa-de-vegetação. As plantas inoculadas tinham três semanas de desenvolvimento em areia.

Os resultados do experimento, referentes ao peso fresco da parte aérea e das raízes, altura dos colmos e índice de sintomas no sistema radicular, são apresentados nas Tabelas 26, 27, 28 e 29.

Tabela 26. Peso fresco da parte aérea (g) das cultivares CB 47-89 e NA 56-79 inoculadas com três espécies de *Pythium*

Cultivares (C)	Patógenos (P)				Médias
	<i>P. arrhenomanes</i>	<i>P. mamillatum</i>	<i>P. nagaii</i> (?)	Testemunha	
CB 47-89	0,88* a**	10,17 b	3,43 a	11,18 b	6,41a
NA 56-79	6,93 a	12,29 b	12,77 b	11,83 b	10,95b

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1%)

CV (%) = 45,94

DMS (1%) C = 1,78

DMS (1%) P dentro de C = 4,47

Tabela 27. Peso fresco das raízes (g) das cultivares CB 47-89 e NA 56-79 inoculadas com três espécies de *Pythium*

Cultivares (C)	Patógenos (P)				Médias
	<i>P. arrhenomanes</i>	<i>P. mamillatum</i>	<i>P. nagaii</i> (?)	Testemunha	
CB 47-89	0,10*	0,91	0,40	1,63	0,76a**
NA 56-79	2,86	2,74	3,87	3,77	3,31b

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1%)

CV (%) = 45,94

DMS (1%) = 1,11

Tabela 28. Altura dos colmos (cm) das cultivares CB 47-89 e NA 56-79 inoculadas com três espécies de *Pythium*

Cultivares (C)	Patógenos (P)				Médias
	<i>P. arrhenomanes</i>	<i>P. mamillatum</i>	<i>P. nagaii</i> (?)	Testemunha	
CB 47-89	7,33* a**	20,29 b	9,80 a	22,26 b	14,94a
NA 56-79	16,33 a	24,43 ab	23,16 ab	25,63 b	22,39b

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha ou coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1%)

CV (%) = 15,65

DMS (1%) C = 3,48

DMS (1%) P dentro de C = 8,75

Tabela 29. Índice de sintomas\*\*\* nas raízes das cultivares CB 47-89 e NA 56-79 inoculadas com três espécies de *Pythium*

Cultivares (C)	Patógenos (P)				Médias
	<i>P. arrhenomanes</i>	<i>P. mamillatum</i>	<i>P. nagaii(?)</i>	Testemunha	
CB 47-89	3,00*b** b	1,00a a	2,66b b	1,00a a	1,91b
NA 56-79	1,83a ab	1,00a a	1,33a ab	1,00a a	1,29a

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha ou coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

\*\*\* Escala de 0 a 3 onde 0 = sem sintomas; 1 = até 25% das raízes com sintomas; 2 = 26 a 50% das raízes com sintomas; 3 = mais de 50% das raízes com sintomas

CV (%) = 19,08

DMS (1%) C = 0,96

DMS (1%) P dentro de C = 0,71

Analisando-se o efeito das espécies de *Pythium*, dentro de cultivares, foi observado que *P. arrhenomanes* causou reduções significativas no peso fresco da parte aérea e altura dos colmos. Houve um aumento significativo no índice de sintomas, nas duas cultivares, quando comparados com as respectivas testemunhas. No que concerne a *P. nagaii(?)* foram verificados efeitos significativos, para os parâmetros acima mencionados na cultivar CB 47-89, enquanto que para a cultivar NA 56-79, os efeitos não

diferiram significativamente, das testemunhas. Os efeitos de *P. mamillatum* não foram significativamente diferentes das testemunhas, em nenhum dos casos.

Assim, os dados revelaram três modalidades de interação plantas-microorganismos: *P. arrhenomanes* apresentou uma patogenicidade com efeitos nas duas cultivares; *P. nagaii*(?) afetou seriamente a cultivar CB 47-89; *P. mamillatum* não demonstrou ser patogênico, uma vez que seus efeitos não diferiram das testemunhas.

*P. mamillatum* foi relatado em Formosa, tendo sido indicado como possuidor de baixo potencial patogênico em cana-de-açúcar (HSU e LIU, 1966). Desta forma, os resultados destes autores concordam com os do experimento ora discutido, embora tenha sido usada uma metodologia diferente.

Em relação a *P. nagaii*(?) se confirmada a identificação, esta parece ser a primeira constatação de sua associação com a cana-de-açúcar, tendo importância potencial, apesar da baixa frequência de isolamento.

Provavelmente, nas condições de Brasil, como ocorre em EUA ou Formosa (RANDS e DOPP, 1938; HSU e LIU, 1966), a ação aditiva do efeito de *P. arrhenomanes*, com o complexo de outras espécies deste gênero, poderá aumentar o prejuízo do patógeno principal, havendo necessidade de testar a veracidade desta hipótese, em nossas condições.

4.5.3. Patogenicidade de *P. arrhenomanes* e do complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum* nas cultivares CB 47-89, CP 51-22 e RB 705007

O ensaio foi conduzido nos meses de julho a setembro, tendo uma duração de 85 dias. O inóculo foi aplicado na razão de 3/4 do conteúdo do V-8-ágar, contido em uma placa-de-petri, colonizado por cada um dos fungos.

Os resultados de peso fresco da parte aérea e do sistema radicular, peso seco da parte aérea, altura dos colmos e do índice dos sintomas nas raízes são apresentados nas Tabelas 30, 31, 32, 33, 34 e 35, respectivamente.

Tabela 30. Peso fresco da parte aérea (g) das cultivares CB 47-89, CP 51-22 e RB 705007 inoculadas com *P. arrhenomanes* e complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*

Patógenos (P)	Cultivares (I)			Médias
	CB 47-89	CP 51-22	RB 705007	
<i>P. arrhenomanes</i>	80,69*a**	58,57a	63,87a	67,71a
Complexo <i>P. acanthicum</i>				
<i>P. oligandrum</i>	82,32a	67,72a	75,85a	75,29ab
Testemunha	98,22a	64,92a	78,37a	80,50b

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 5%)

CV (%) = 13,7

DMS (5%) P = 10,31

DMS (5%) P dentro de C = 17,86

Tabela 31. Peso fresco das raízes (g) das cultivares CB 47-89, CP 51-22 e RB 705007, inoculadas com *P. arrhenomanes* e complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*

Patógenos (P)	Cultivares (C)			Médias
	CB 47-89	CP 51-22	RB 705007	
<i>P. arrhenomanes</i>	29,72*a**	27,02a	34,45a	30,39a
Complexo <i>P. acanthicum</i> <i>P. oligandrum</i>	44,95ab	28,27a	31,95a	35,05a
Testemunha	52,87b	31,39a	54,57b	46,28a

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 28,22

DMS (5%) P dentro de C = 18,39

Tabela 32. Peso seco da parte aérea (g) das cultivares CB 47-89, CP 51-22 e RB 705007, inoculadas com *P. arrhenomanes* e complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*

Patógenos (P)	Cultivares (C)			Médias
	CB 47-89	CP 51-22	RB 705007	
<i>P. arrhenomanes</i>	18,61* a	13,08 a	14,45 a	15,38a**
Complexo <i>P. acanthicum</i> <i>P. oligandrum</i>	17,34 a	14,50 a	16,36 a	16,07ab
Testemunha	21,16 a	15,00 a	18,31 a	18,16b

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 5%)

CV (%) = 15,53

DMS (5%) P = 2,59



Tabela 33. Peso seco das raízes (g) das cultivares CB 47-89, CP 51-22 e RB 705007 inoculadas com *P. arrhenomanes* e complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*

Patógenos (P)	Cultivares (C)			Médias
	CB 47-89	CP 51-22	RB 705007	
<i>P. arrhenomanes</i>	6,13*a**	4,05a	4,63a	4,93a
Complexo <i>P. acanthicum</i> <i>P. oligandrum</i>	7,11a	5,69a	5,44a	6,08ab
Testemunha	8,06a	4,70a	9,36b	7,37b

\*Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1%)

CV (%) = 24,53

DMS (1%) P dentro de C = 3,38

Tabela 34. Altura dos colmos (cm) das cultivares CB 47-89, CP 51-22 e RB 705007 inoculadas com *P. arrhenomanes* e complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*

Patógenos (P)	Cultivares (C)			Médias
	CB 47-89	CP 51-22	RB 705007	
<i>P. arrhenomanes</i>	55,25*ab**	36,75a	43,50a	45,16a
Complexo <i>P. acanthicum</i> <i>P. oligandrum</i>	51,62a	39,87a	45,50a	45,66a
Testemunha	60,37b	38,25a	48,62a	49,03b

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 7,79

DMS (5%) P = 3,67

DMS (1%) P dentro de C = 8,19

Tabela 35. Índice de sintomas\*\*\* no sistema radicular das cultivares CB 47-89, CP 51-22 e RB 705007 inoculadas com *P. arrhenomanes* e complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*

Patógenos (P)	Cultivares (C)			Médias
	CB 47-89	CP 51-22	RB 705007	
<i>P. arrhenomanes</i>	2,75 <sup>c**</sup> b	2,25 <sup>b</sup> a	2,25 <sup>c</sup> a	2,41 <sup>c</sup>
Complexo <i>P. acanthicum</i> <i>P. oligandrum</i>	1,87 <sup>b</sup> b	1,25 <sup>a</sup> a	1,50 <sup>b</sup> ab	1,54 <sup>b</sup>
Testemunha	1,00 <sup>a</sup> a	1,00 <sup>a</sup> a	1,00 <sup>a</sup> a	1,00 <sup>a</sup>

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha ou coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

\*\*\*Escala de 0 a 3 onde 0 = sem sintomas; 1 = até 25% das raízes com sintomas; 2 = 26 a 50% das raízes com sintomas; 3 = mais de 50% das raízes com sintomas

CV (%) = 17,22

DMS (1%) P = 0,37

DMS (5%) P dentro de C = 0,49

DMS (5%) C dentro de I = 0,49

As análises revelaram que, dependendo da cultivar, o peso do sistema radicular de cultivares de cana-de-açúcar pode sofrer uma redução significativa, quando estes são inoculados com *P. arrhenomanes* e complexo *P. acanthicum*-*P. oligandrum*.

Em relação às testemunhas, o peso fresco da parte aérea foi reduzido, significativamente, na cultivar CB 47-89, inoculada com *P. arrhenomanes*. O peso fresco do sistema radicular foi consideravelmente afetado nas cultivares CB 47-89 e RB 705007, respectivamente, por *P. arrhenomanes* e as duas espécies de *Pythium*.

Quanto aos efeitos dos diferentes fungos, e, considerando-se o peso fresco, *Pythium arrhenomanes*, causou maiores reduções no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular que o complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*, embora não tenham diferido estatisticamente entre si.

Com relação ao desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular, avaliado em peso seco, foi verificado que somente para a cultivar RB 705007, foi detectada uma redução no desenvolvimento radicular, quando inoculada com as duas espécies de *Pythium*.

Para o desenvolvimento das plantas, avaliado como altura dos colmos, foi observado que, ao nível de 5%, não foi detectada redução significativa no tamanho das mesmas, pelas duas espécies de *Pythium* testadas.

No tocante aos índices dos sintomas em plantas inoculadas, *P. arrhenomanes* e complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum* afetaram diferentemente as 3 cultivares de cana, sendo que *P. arrhenomanes* sempre causou um índice de doença mais severo nas três cultivares.

É interessante notar que para *P. arrhenomanes* e o complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*, neste ensaio, são mantidas certas tendências, observadas índice de sintomas apresentados no experimento 4.5.1. Muito provavelmente, as diferenças significativas observadas para o peso fresco a maior severidade dos sintomas, ora constatados, devem-se à maior duração do último experimento.

Este fato parece revelar um aspecto fundamental na pesquisa que é a influência do estágio de desenvolvimento das plantas, no momento da avaliação, na sensibilidade dos diferentes parâmetros utilizados, para se avaliar a patogenicidade dos isolados, em cultivares de cana-de-açúcar.

#### 4.6. Patogenicidade de diferentes isolados de *P. arrhenomanes* na cultivar CB 47-89

Diferentes isolados de *P. arrhenomanes* foram inoculados em plantas da cultivar CB 47-89, desenvolvidas durante 10 dias em areia. O teste foi conduzido durante novembro a dezembro (39 dias), em condições de casa-de-vegetação, com a temperatura variando de 15 a 36°C.

Os resultados para o peso fresco da parte aérea e das raízes, peso seco da parte aérea, peso seco das raízes, altura dos colmos e índice de sintomas na raiz, são apresentados na Tabela 36.

A variabilidade da patogenicidade a cana-de-açúcar, dos isolados de *P. arrhenomanes*, avaliada pela redução do peso fresco da parte aérea, foi observada por diferentes autores (RANDS e DOPP, 1934; RANDS e DOPP, 1938).

Tabela 36. Efeito da patogenicidade de sete isolados de *P. arthenomanes* sobre o peso fresco e seco da parte aérea e da raiz, na altura dos colmos e índice de sintomas nas raízes da cultivar CB 47-89.

Parâmetros	Número dos isolados									DMS		
	4	3	5	6	7	8	9	Testemunha	5%	1%	CV	
Peso fresco da parte aérea (g)	22,03* ab**	19,50 a	22,00 ab	24,23 ab	22,39 ab	23,36 ab	25,03 ab	35,50 b	14,8	-	21,5%	
Peso fresco da raiz (g)	22,56 ab	13,56 a	15,43 a	15,10 a	15,26 a	15,33 a	18,66 a	43,06 b	25,94	-	46,1%	
Peso seco da parte aérea (g)	5,56 ab	4,33 ab	4,26 ab	3,56 a	4,43 ab	4,83 ab	4,93 ab	7,40 b	3,45	4,29	24,8%	
Peso seco da raiz (g)	2,56	1,60	1,53	1,76	2,00	1,73	1,93	3,23	NS	NS	40,9%	
Altura dos colmos (cm)	25,26	23,16	24,16	24,46	23,10	24,50	24,83	27,66	NS	NS	7,65	
Índice de sintomas na raiz***	2,82 b	2,80 b	2,50 b	2,80 b	2,83 b	2,90 b	2,16 ab	1,16 a	1,08 0,96(10%)	1,34	15,3%	

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1, 5 ou 10%)

\*\*\*Escala de 0 a 3 onde 0 = sem sintomas; 1 = até 25% das raízes com sintomas; 2 = 26 a 50% das raízes com sintomas; 3 = mais de 50% das raízes com sintomas.

Neste experimento, quando analisados os efeitos da patogenicidade, dos diferentes isolados comparados, verificou-se que, daqueles de nº 3, 4, 5, 6, 7 e 8 com níveis iguais de índice de sintomas no sistema radicular somente o isolado de nº 3 reduziu, significativamente, o peso fresco da parte aérea e da raiz das plantas. Os outros isolados, do grupo acima citados, reduziram em nível intermediário o peso fresco da parte aérea. Com exceção do isolado nº 4, que exerceu menor redução do peso fresco do sistema radicular, todos os outros isolados induziram perda significativa de peso fresco da raiz das plantas.

As plantas inoculadas com o isolado nº 9 apresentaram um índice de sintomas, no sistema radicular, que foi intermediário entre o da testemunha e o das plantas inoculadas com os outros isolados, ao nível de 5% de probabilidade. Porém, causou uma redução de nível médio, do peso fresco da parte aérea e uma diminuição significativa do peso fresco do sistema radicular.

Quanto à patogenicidade dos isolados em relação ao peso fresco e seco da parte aérea, os isolados, de modo geral, apresentaram tendências semelhantes quanto ao efeito sobre o desenvolvimento das plantas, com exceção para os isolados de número 3 e 6 que, respectivamente, reduziram em grau maior o peso fresco e o peso seco da parte aérea, quando comparados com as testemunhas.

Neste experimento, no reisolamento do patógeno, foram isolados juntamente com *P. arhenomanes* outros fungos tais como: *Fusarium moniliforme*, *Curvularia* spp e *Trichoderma* spp, indicando que estes microorganismos podem ser patógenos ou invasores secundários, nas condições em que foi realizado o experimento ou ter um crescimento saprofítico nesses tecidos.

A variação nos efeitos exercidos, por alguns isolados testados, sobre os diferentes parâmetros avaliados neste experimento, está, provavelmente, relacionada à outras características fisiológicas dos isolados, ligados à capacidade de penetração ou colonização das raízes, ou por diferenças na interação com as plantas. Apesar de não terem sido encontradas referências neste sentido, com relação a *P. arrhenomanes* em cana-de-açúcar, já há relatos para este tipo de diferenças, exercidas por diferentes isolados de *P. irregulare*, que são relacionadas pelo autor, à produção de fitotoxinas para o caso de alguns isolados mais prejudiciais (Brandenburg, apud ENDO e COLT, 1974).

Assim, seria interessante pesquisar o aspecto de variação na patogenicidade dos isolados de *P. arrhenomanes*, com o intuito de melhor se compreender a natureza da patogenicidade, para a espécie em questão.

O experimento também revelou que, nas condições em que foi realizado, os diferentes parâmetros utilizados variaram quanto a sua sensibilidade, na detecção das diferenças de patogenicidade de isolados de uma mesma espécie. Assim, os parâmetros que permitiram uma melhor discriminação dos isolados, foram o peso fresco e seco da parte aérea e o índice de sintomas, coincidindo, deste modo, com os estudos desenvolvidos por RANDS e DOPP (1934).



#### 4.7. Reação de cultivares de cana-de-açúcar à inoculação com *P. arrhenomanes*

##### 4.7.1. Reação de sete cultivares de cana-de-açúcar à inoculação com *P. arrhenomanes*

Este experimento foi feito, visando testar em escala maior, a eficiência da metodologia de inoculação de *P. arrhenomanes*, para detectar diferenças entre cultivares quando inoculadas com o patógeno.

O ensaio, com uma duração de 30 dias, foi realizado durante o mês de abril, com a temperatura do ambiente, que variou em torno de 28 a 30°C. Esta condição foi obtida com aquecimento da casa de vegetação. As plantas submetidas ao teste, tinham 20 dias de desenvolvimento em areia.

Os resultados relativos ao peso fresco da parte aérea e das raízes, altura dos colmos e índice de sintomas no sistema radicular são apresentados, respectivamente, nas Tabelas 37, 38, 39 e 40.

Os resultados revelaram que, a quantidade de inóculo utilizado, não permitiu a ocorrência de escape. Pelo fato de não causar a morte das plantas, nas condições do experimento, foi possível detectar diferenças, entre cultivares, para certos parâmetros.

Assim, as cultivares, apesar de não diferirem entre si, quanto ao índice de sintomas e ao peso fresco do sistema radicular, revelaram comportamentos diferentes no que concerne aos parâmetros referentes à parte aérea. Desta forma, as cultivares CB 41-76, CB 51-22 e NA 56-79, quando inoculadas, não apresentaram uma redução significativa para o peso fresco da parte aérea e altura dos colmos. No entanto, ocorreu uma redução no

Tabela 37. Peso fresco da parte aérea (g) de sete cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. antheomonas*

Inoculação (I)	Cultivares (C)							Médias
	CB 41-76	CB 47-89	CB 47-355	CB 49-260	Co 421	CP 51-22	NA 56-79	
Inoculadas	21,81**a**	17,77a	10,91a	10,52a	5,63a	8,78a	16,95a	15,20a
Testemunhas	26,56a	35,68b	24,17b	22,25b	22,38b	16,85a	25,19a	24,20b

\* Média de três repetições cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan 1 ou 5%)

CV (%) = 29,88

DMS (1%) I = 4,84

DMS (5%) I dentro C = 9,49

Tabela 38. Peso fresco do sistema radicular (g) de sete cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. antheomonas*

Inoculação (I)	Cultivares (C)							Médias
	CB 41-76	CB 47-89	CB 47-355	CB 49-260	Co 421	CP 51-22	NA 56-79	
Inoculadas	6,89**a**	5,82a	3,16a	3,33a	2,63a	3,13a	7,57a	4,65a
Testemunhas	13,23b	11,08a	11,13b	8,83a	7,22a	6,82a	13,85b	10,31b

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan 1 ou 5%)

CV (%) = 49,40

DMS (1%) I = 3,15

DMS (5%) I dentro de C = 6,18

Tabela 39. Altura dos colmos (cm) de plantas de sete cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. arachidicola*

Inoculação (I)	Cultivares (C)							Médias
	CB 41-76	CB 47-89	CB 47-355	CB 49-260	Co 421	CP 51-22	NA 56-79	
Inoculadas	30,46**a**	23,63a	21,20a	18,26a	13,70a	20,33a	28,13a	22,24a
Testemunhas	27,76a	31,10b	26,06a	27,00b	30,00b	24,70a	28,10a	27,81b

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 11,76

DMS (1%) I = 2,51

DMS (5%) I dentro de C = 4,93

Tabela 40. Índice de sintomas\*\*\* nas raízes de plantas de sete cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. arachidicola*

Inoculação (I)	Cultivares (C)							Médias
	CB 41-76	CB 47-89	CB 47-355	CB 49-260	Co 421	CP 51-22	NA 56-79	
Inoculadas	1,93*b**	2,53b	2,20b	2,00b	2,33b	2,33b	2,16b	2,18a
Testemunhas	1,00a	1,00a	0,83a	1,00a	1,00a	1,00a	1,16a	1,00b

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan 1 ou 5%)

\*\*\*Escala de 0 a 3 onde 0 = sem sintomas; 1 = até 25% das raízes com sintomas; 2 = 26 a 50% das raízes com sintomas; 3 = mais de 50% de raízes com sintomas

CV (%) = 17,13

DMS (1%) I = 0,23

DMS (5%) I dentro de C = 0,61

caso das cultivares CB 47-89, CB 49-260 e Co 421. A cultivar CB 47-355 apresentou uma reação diferente daquelas descritas, para as outras cultivares.

Na avaliação do peso fresco do sistema radicular, de forma semelhante ao que aconteceu nos outros experimentos realizados, ocorreu um alto coeficiente de variação (49,4%). Apesar disto, foi possível detectar reduções significativas, no sistema radicular, nas cultivares CB 41-76, CB 47-355 e NA 56-79, sendo que CB 41-76 e NA 56-79 não apresentaram reduções significativas na parte aérea e a cultivar CB 47-355 teve uma redução no peso fresco da parte aérea.

Apesar de não se detectar diferenças entre os índices de sintomas, no sistema radicular dos diferentes cultivares com a duração e as condições de ambiente, próprias deste experimento, foi possível somente observar as diferenças significativas, entre as médias das plantas inoculadas e as respectivas testemunhas, dentro de cada cultivar. Isto, provavelmente, reflete a necessidade de uma maior duração do experimento e ou condições ambientais, mais propícias ao desenvolvimento das plantas a fim de que as características inerentes de cada cultivar, para a interação patógeno-hospedeiro, possam se manifestar.

#### 4.7.2. Reação de seis cultivares de cana-de-açúcar à inoculação com *P. arhenomanes*

O experimento teve 42 dias de duração, sendo realizado nos meses de novembro a dezembro. Nesta ocasião, a temperatura, na casa de

vegetação, variou de 19 a 36°C. As plantas submetidas ao teste, tinham dez dias de desenvolvimento em areia.

Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 41, 42, 43, 44, 45 e 46, correspondendo, respectivamente, ao peso fresco da parte aérea e da raiz, peso seco da parte aérea e da raiz, altura dos colmos e índice de sintomas no sistema radicular.

Quando analisados os diferentes parâmetros, foi verificado que, para a cultivar RB 705051, não foi detectado um efeito da inoculação no peso fresco da parte aérea e da raiz e na altura dos colmos. As cultivares CB 47-89, Co 281 e Co 421, quando inoculadas, apresentaram reduções no peso fresco da parte aérea, não se detectando para essas cultivares, o efeito da inoculação no peso fresco ou seco da raiz. Quando considerado o peso seco das raízes, a única cultivar que apresentou redução nas plantas inoculadas, em relação as testemunhas, foi a Co 290, sendo que para o peso fresco do sistema radicular, esta diferença foi evidente somente na cultivar CB 45-3.

As cultivares CB 47-89 e Co 290 apresentaram uma diminuição na altura dos colmos. As médias gerais das plantas inoculadas foram inferiores as das testemunhas, para o peso fresco e seco da parte aérea e das raízes e para a altura dos colmos.

Tabela 41. Peso fresco da parte aérea (g) de seis cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. arthenomanes*

Inoculação (I)	Cultivares (C)						Médias
	CB 45-3	CB 47-89	Co 281	Co 290	Co 421	RB 705051	
Iroculadas	27,26**a**	8,93a	15,60a	22,60a	17,96a	22,40a	19,12a
Testemunhas	31,13a	16,60b	24,46b	21,53a	25,96b	24,60a	24,54b

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 20,86

DMS (1%) I = 4,25

DMS (5%) I dentro de C = 7,68

Tabela 42. Peso fresco do sistema radicular (g) de seis cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. arthenomanes*

Inoculação (I)	Cultivares (C)						Médias
	CB 45-3	CB 47-89	Co 281	Co 290	Co 421	RB 705051	
Inoculadas	26,10**a**	4,50a	10,00a	13,90a	11,13a	21,23a	14,47a
Testemunhas	53,13b	13,63a	17,23a	18,13a	18,53a	24,73b	24,23b

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias com letras iguais na mesma coluna ou linha, não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan 1 ou 5%)

CV (%) = 39,9

DMS (5%) I = 7,22

DMS (1%) I dentro de C = 23,9

DMS (5%) I dentro de C = 17,69

Tabela 43. Peso seco da parte aérea (g) de seis cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. atthetomanes*

Inoculação (I)	Cultivares (C)					Médias	
	CB 45-3	CB 47-89	Co 281	Co 290	Co 421		RB 705051
Inoculadas	5,90*	2,13	4,59	3,10	3,63	4,23	3,93a**
Testemunhas	6,43	3,90	5,00	4,80	5,06	6,06	5,21b

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1%)

CV (%) = 25,66

DMS (1%) I = 2,63

Tabela 44. Peso seco do sistema radicular (g) de seis cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. atthetomanes*

Inoculação (I)	Cultivares (C)					Médias	
	CB 45-3	CB 47-89	Co 281	Co 290	Co 421		RB 705051
Inoculadas	4,13*a**	0,90a	1,95a	2,46a	1,96a	2,73a	2,25a
Testemunhas	7,06b	1,80a	2,20a	3,16a	2,83a	3,26a	3,38b
	b	a	a	ab	ab	ab	

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias com letras iguais na mesma coluna ou linha não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 49,39

DMS (5%) I = 0,95

DMS (1%) I dentro de C = 3,12

DMS (1%) C dentro de I = 4,32

Tabela 45. Altura dos colmos (cm) de seis cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. arthenomanes*

Inoculação (I)	Cultivares (C)						Médias
	CB 45-3	CB 47-89	Co 281	Co 290	Co 421	RB 705051	
Inoculadas	27,13 <sup>a</sup> **	18,50a	28,46a	23,36a	25,90a	26,16a	24,92a
Testemunhas	28,00a	23,83b	29,33a	30,73b	28,60a	25,60a	28,34b

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 10,72

DMS (1%) I = 2,66

DMS (5%) I dentro de C = 4,81

Tabela 46. Índice de sintomas\*\*\* nas raízes de seis cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. arthenomanes*

Inoculação (I)	Cultivares (C)						Médias
	CB 45-3	CB 47-89	Co 281	Co 290	Co 421	RB 705051	
Inoculadas	2,66 <sup>b</sup> **	2,66	2,83b	2,66b	2,33b	2,83b	2,66b
Testemunhas	1,00a	1,00a	1,16a	1,00a	1,00a	1,16a	1,05a

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1%)

\*\*\*Escala de 0 a 3 onde 0 = sem sintomas; 1 = até 25% das raízes com sintomas; 2 = 26 a 50% das raízes com sintomas; 3 = mais de 50% de raízes com sintomas

CV (%) = 20,02

DMS (1%) I = 0,25

DMS (1%) I dentro de C = 0,85



Através dos resultados, foi possível, também, observar, nos tratamentos testemunhas, a variação no peso fresco e seco do sistema radicular, característico de cada cultivar. Desta forma, a cultivar CB 45-3, teve maior desenvolvimento do sistema radicular, quando comparado com as outras, para as condições do teste.

Neste experimento, ocorreram índices de sintomas, no sistema radicular, considerados altos, e, provavelmente, devido a este fato, não foi possível detectar diferenças na suscetibilidade entre cultivares. Verificou-se, no entanto, em todos os casos, diferenças significativas entre as médias das plantas inoculadas e as respectivas testemunhas.

Considerando-se o número de parâmetros analisados, para os quais foi observada uma diferença significativa entre tratamentos inoculados e não inoculados, a cultivar CB 47-89 foi a mais afetada pelo efeito da inoculação.

Quando comparados os tratamentos inoculados e não inoculados das cultivares Co 281 e Co 290 designadas, respectivamente, como suscetível e resistente no Havai, (RANDS e DOPP, 1938), não foi possível detectar diferenças importantes no nível de resistência destas cultivares, uma vez que a reação delas variou dependendo do parâmetro analisado. O fato de não terem sido detectadas estas diferenças, pode ser, provavelmente, devido a diferente metodologia utilizada neste experimento, que o isolado utilizado tenha tido características de patogenicidade, diferentes a dos isolados inoculados nos EUA, mascarando essas diferenças, ou mais remotamente devido a erros na identificação destes cultivares. Variações nas

respostas das cultivares, dependendo do país onde foram feitos os testes, foram já verificadas. Assim, a resposta de suscetibilidade e resistência da Co 281 e Co 290 nos EUA, mudou para níveis inversos em testes desenvolvidos em Cuba (MARTIN, 1965).

#### 4.7.3. Reação de dez cultivares de cana-de-açúcar à inoculação com *P. arhenomanes*

Este experimento teve uma duração de 70 dias, tendo sido desenvolvido nos meses de março a maio. As plantas das cultivares utilizadas, foram desenvolvidas, durante duas semanas, em areia, antes de serem inoculadas. Uma exceção foi feita, no entanto, para aquelas da cultivar NA 56-79, que tinham somente 9 dias de desenvolvimento, no substrato de areia. As temperaturas mínima e máxima, respectivamente, foram 15 e 32°C, durante este período.

Os resultados do peso fresco da parte aérea e das raízes, do peso seco da parte aérea e das raízes, a altura dos colmos e o índice de sintomas no sistema radicular são apresentados nas Tabelas 47, 48, 49, 50, 51 e 52.

Neste ensaio, foi possível diminuir os coeficientes de variação, praticamente, para todos os parâmetros, obtendo-se uma maior diferenciação entre os efeitos da inoculação e a reação das cultivares. Fatores tais como: boa qualidade dos toletes de uma gema, a uniformidade das plantas e a utilização de quatro repetições devem ter contribuído para a redução dos referidos coeficientes.

Tabela 47. Peso fresco da parte aérea (g) de dez cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. atthenuomanes*

Inoculação (I)	Cultivares (C)										Médias
	CB 41-76	CB 45-3	CB 47-89	CB 49-260	Co 421	CP 51-22	Na 56-79	RB 705007	RB 705051	RB 705146	
Inoculadas	48,82**a**	60,57a	59,77a	66,32a	47,47a	58,80a	26,00a	69,65a	56,80a	51,72a	53,79a
Testemunhas	43,42a	68,22a	83,15b	82,92b	59,37a	68,94a	26,57a	71,95a	83,65b	76,92b	66,51b

\* Média de 4 repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 17,81

DMS (1%) I = 6,37

DMS (5%) I dentro de C = 15,16

DMS (1%) I dentro de C = 20,14

Tabela 48. Peso fresco da raiz (g) de dez cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. atthenuomanes*

Inoculação (I)	Cultivares (C)										Médias
	CB 41-76	CB 45-3	CB 47-89	CB 49-260	Co 421	CP 51-22	NA 56-79	RB 705007	RB 705051	RB 705146	
Inoculadas	37,77**a**	56,14a	49,22a	65,05a	41,47a	48,72a	16,32a	54,15a	60,82a	40,22a	46,99a
Testemunhas	43,17a	87,87b	66,22a	123,79b	81,57b	96,77b	17,02a	118,10b	57,95a	80,08b	77,23b
	ab	cdef	bcd	g	cde	defg	a	efg	bc	cde	

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna ou linha não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1%)

CV (%) = 20,77

DMS (1%) I = 7,67

DMS (1%) I dentro de C = 24,26

DMS (1%) C dentro de I = 35,17

Tabela 49. Peso seco da parte aérea (g) de dez cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. atkhenomaneas*

Inoculação (1)	Cultivares (C)										Médias
	CB 41-76	CB 45-3	CB 47-89	CB 49-260	Co 421	CP 51-22	NA 56-79	RB 705007	RB 705051	RB 705146	
Inoculadas	11,84**	15,23a	13,45a	16,23a	12,24a	15,51a	6,11a	17,07a	13,92a	12,49a	13,41a
Testemunhas	10,56a	17,11a	16,48a	17,56a	15,26a	17,77a	6,39a	18,47a	15,39a	18,94b	15,39b

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1%)

CV (%) = 18,23

DMS (1%) I = 1,56

DMS (1%) I dentro de C = 4,93

Tabela 50. Peso seco da raiz (g) de dez cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. atkhenomaneas*

Inoculação (1)	Cultivares (C)										Médias
	CB 41-76	CB 45-3	CB 47-89	CB 49-260	Co 421	CP 51-22	NA 56-79	RB 705007	RB 705051	RB 705146	
Inoculadas	5,16**	7,74a	6,59a	8,05a	6,39a	8,14a	2,28a	7,41a	7,59a	5,25a	6,46a
Testemunhas	5,21a	14,06b	15,41b	16,81b	12,58b	12,35b	2,32a	18,37b	14,83b	13,41b	12,54b

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 29,02

DMS (1%) I = 3,76

DMS (5%) I dentro de C = 3,92

Tabela 51. Altura dos colmos (cm) de dez cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. atthemonans*

Inoculação (I)	Cultivares (C)										Médias
	CB 41-76	CB 45-3	CB 47-89	CB 49-260	Co 421	CP 51-22	NA 56-79	RB 705007	RB 705051	RB 705146	
Inoculadas	38,38*	36,00	31,75	42,37	33,00	33,87	30,25	48,25	41,50	33,25	36,86
Testemunhas	34,12	36,25	37,55	43,87	35,62	36,62	30,37	42,87	38,75	39,25	37,53
Médias	36,25 bcd**	36,12 bc	34,65 bc	43,12 cde	34,31 abc	25,25 a	30,31 ab	45,56 de	40,12 cde	36,25 bcd	

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1%)

CV (%) = 12,8

DMS (1%)C = 9,12

Tabela 52. Índice de sintomas\*\*\* no sistema radicular de dez cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. atthemonans*

Inoculação (I)	Cultivares (C)										Médias
	CB 41-76	CB 45-3	CB 47-89	CB 49-260	Co 421	CP 51-22	NA 56-79	RB 705007	RB 705051	RB 705146	
Inoculadas	2,87*b**	2,75b b	2,82b b	2,82b b	2,72b b	2,72b b	1,87b a	2,37b ab	2,70b b	2,70b b	2,63b
Testemunhas	1,00a a	1,12a a	1,00a a	1,00a a	1,00a a	1,00a a	1,12a a	1,00a a	1,00a a	1,12a a	1,03a

\* Média de quatro repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias com letras iguais na mesma coluna ou linha não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1%)

\*\*\*Escala de 0 a 3, onde 0 = sem sintomas; 1 = até 25% das raízes com sintomas; 2 = 26 a 50% das raízes com sintomas; 3 = mais de 50% das raízes com sintomas

CV (%) = 11,55

DMS (1%) I = 0,12

DMS (1%) I dentro de C = 0,39

DMS (1%) C dentro de I = 0,57

A análise dos resultados deste experimento será baseada, principalmente, no comportamento das cultivares, em relação ao índice de sintomas, no sistema radicular.

Assim, com base no índice acima referido, para um teste com 70 dias de duração, apesar do elevado índice de sintomas que ocorreu, foi, no entanto, possível distinguir três grupos, segundo o comportamento das cultivares, que são apresentados a seguir:

CP 51-22; RB 705051 e RB 705146, grupo de cultivares apresentando índices maiores, constituindo o grupo das cultivares suscetíveis.

Grupo 2: RB 705007, apresentando um nível médio de sintomas e constituindo o grupo das cultivares, com reação intermediária.

Grupo 3: NA 56-79, constituindo o grupo das cultivares menos suscetíveis ou resistentes.

Quanto as cultivares do primeiro grupo, apesar do alto índice de sintomas observado, as reações das diferentes cultivares variaram, consideravelmente, levando-se em consideração: o peso fresco da parte aérea e o peso fresco e seco do sistema radicular.

Assim, as cultivares CB 49-260 e RB 705146 apresentaram redução, significativa, no peso seco da parte aérea e do sistema radicular, como também, no peso fresco das raízes. As cultivares CB 45-3, Co 421 e CP 51-22 apresentaram reduções, significativas, somente, para o peso fresco e seco

do sistema radicular, não se detectando este efeito no peso fresco da parte aérea. Por outro lado, as cultivares CB 47-89 e RB 705051 revelaram diferenças, significativas, quanto ao peso fresco e seco da parte aérea, sem que essa redução estivesse associada nesta última cultivar, à redução do peso fresco do sistema radicular. A cultivar CB 41-76, apesar de apresentar um elevado índice de sintomas no sistema radicular, não revelou reduções, significativas, que pudessem estar associadas ao efeito da inoculação, para os parâmetros peso fresco da parte aérea e peso fresco e seco do sistema radicular.

A cultivar RB 705007, enquadrada no nível médio de suscetibilidade, apresentou uma redução significativa do sistema radicular - peso fresco e seco, sem que, no entanto, fosse afetado, significativamente, o desenvolvimento da parte aérea.

Na cultivar NA 56-79, não foram detectados efeitos significativos, que pudessem ser atribuídos à inoculação, em nenhum dos parâmetros avaliados. A análise de variância não revelou diferenças, estatisticamente significativas, para a altura dos colmos das cultivares, quando comparadas as plantas inoculadas e não inoculadas.

Durante a avaliação dos sintomas, foi observada a ocorrência de lesões localizadas, nas cultivares NA 56-79, RB 705007 e CP 51-22 indicando, provavelmente, restrição da colonização. Este tipo de reação já havia sido observada em raízes de cana-de-açúcar por RANDS e DOPP (1938), e mais recentemente, por ADAIR (1968). Em estudos com outros hospedeiros, *Anthirrinum* e moranguinho, MELLANO *et alii* (1970), e NEMEC (1972) relacionaram este tipo de lesão com a ocorrência de barreiras fisiológicas, que se

opunham à colonização. No caso da cultivar CP 51-22, esta relação, provavelmente, não estaria ocorrendo, uma vez que, nas condições deste experimento, ela se revelou como suscetível.

Em relação à diminuição do peso do sistema radicular, foi observado ainda que, após 70 dias, período de duração do experimento, as cultivares CB 45-3, Co 421, CP 51-22 e RB 705007 não apresentaram reduções significativas na parte aérea, embora tivessem reduções consideráveis do sistema radicular. Este fato sugere que, muito provavelmente, a existência de um sistema radicular grande, ou muito eficiente, nessas cultivares. Esta característica poderia conferir as plantas, um bom desenvolvimento, apesar do fato de grande parte do sistema radicular, ter sido afetado pelo patógeno. Segundo GARRETT (1970), as plantas com um sistema radicular grande poderão apresentar a característica de tolerância à ação dos fungos, que causam destruição das raízes das plantas. Assim sendo, este fato poderia estar acontecendo para os casos acima mencionados.

Pode-se considerar que, aplicando a metodologia aqui utilizada, levando em consideração a época e duração do experimento, é possível conhecer a tendência, para a suscetibilidade e resistência das cultivares de cana-de-açúcar. Há ainda a necessidade de se discriminar melhor, as diferenças, entre o grande número de cultivares consideradas suscetíveis.

Neste propósito, torna-se necessária, a utilização do inóculo produzido em grande escala, nos níveis equivalentes em potencial de inóculo, a 3/4 do V-8-ágar colonizado com *P. arhenomanes*, contido em uma placa-de-petri. Uma outra sugestão, seria conduzir os experimentos por um período ainda mais longo.



#### 4.7.4. Reação de nove cultivares de cana-de-açúcar à inoculação com *P. arrhenomanes*

Este experimento, com duração de quatro meses, foi desenvolvido no período de julho a novembro. O ambiente da casa-de-vegetação foi aquecido, durante os dois primeiros meses a uma temperatura em torno de 28 a 30°C.

As plantas com quinze dias de desenvolvimento, em areia, foram inoculadas com 25cm<sup>3</sup> do inóculo, constituído de uma mistura na proporção de 1:1 v/v de areia, mais o substrato original colonizado pelo patógeno (areia e quirera de milho na razão de 5:1 p/p).

Os resultados do peso fresco da parte aérea e das raízes, peso seco da parte aérea e das raízes, altura dos colmos e índice de sintomas no sistema radicular são apresentados nas Tabelas 53, 54, 55, 56, 57 e 58, respectivamente.

Neste experimento, foi verificado que, com a dose de inóculo utilizada, ocorreu um nível médio de doença, tomando-se como base, o índice de sintomas nas raízes das plantas.

Segundo os índices de sintomas apresentados, nas condições deste ensaio, as cultivares podem ser agrupadas em três níveis:

Grupo 1: CB 47-89 e CP 51-22, cultivares suscetíveis.

Grupo 2: CB 41-76, CB 45-3, CB 49-260, RB 705051 e RB 705146, cultivares intermediárias.

Grupo 3: NA 56-79 e RB 705007, cultivares menos suscetíveis ou mesmo resistentes.

Tabela 53. Peso fresco da parte aérea (g) de nove cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. antheromonas*

Inoculação (I)	Cultivares (C)									Médias
	CB 41-76	CB 45-3	CB 47-89	CB 49-260	CP 51-22	NA 56-79	RB 705007	RB 705051	RB 705146	
Inoculadas	71,65**a**	91,61a	98,32a	87,43a	88,48a	76,64a	84,00a	88,64a	108,68a	88,96a
Testemunhas	70,83a	99,63a	116,62b	100,11a	119,03b	87,65a	93,00a	107,42b	111,28a	101,80b
	a	c	f	d	f	b	c	e	e	e

\* Média de cinco repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha ou coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 15,12

DMS (1%) I = 8,02

DMS (5%) I dentro de C = 18,14

DMS (1%) C dentro de I = 4,24

Tabela 54. Peso fresco das raízes (g) de nove cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. antheromonas*

Inoculação (I)	Cultivares (C)									Médias
	CB 41-76	CB 45-3	CB 47-89	CB 49-260	CP 51-22	NA 56-79	RB 705007	RB 705051	RB 705146	
Inoculadas	31,46**abc	34,24a	59,92a	42,09a	63,44a	32,87a	131,96a	52,26a	92,87a	60,12a
Testemunhas	61,75b	54,22b	90,90b	48,98a	95,41b	43,59a	146,99a	87,75b	103,66a	81,47b
	abc	ab	cd	ab	c	a	e	bcd	d	d

\* Média de cinco repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha ou coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 21,40

DMS (1%) I = 8,46

DMS (5%) I dentro de C = 19,13

DMS (1%) C dentro de I = 36,12

Tabela 55. Peso seco da parte aérea (g) de nove cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. arthemenomones*

Inoculação (I)	Cultivares (C)									Médias
	CB 41-76	CB 45-3	CB 47-89	CB 49-260	CP 51-22	NA 56-79	RB 705007	RB 705051	RB 705146	
Inoculadas	11,20**	18,09a	20,85a	15,75a	21,97a	14,13a	28,65b	18,16a	25,93a	19,42a
Testemunhas	16,18b	16,29a	26,95b	18,24a	27,85b	16,22a	24,44a	24,82b	24,62a	22,83b

\* Média de cinco repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 16,17

DMS (1%) I = 1,90

DMS (5%) I dentro de C = 4,31

Tabela 56. Peso seco das raízes (g) de nove cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. arthemenomones*

Inoculação (I)	Cultivares (C)									Médias
	CB 41-76	CB 45-3	CB 47-89	CB 49-260	CP 51-22	NA 56-79	RB 705007	RB 705051	RB 705146	
Inoculadas	4,75**	5,32a	9,63a	5,78a	9,48a	4,60a	11,80a	7,78a	12,83a	8,00a
Testemunhas	6,42a	4,17a	11,35a	7,30a	15,93b	4,17a	13,35a	17,62b	16,54b	10,76b
	a	a	b	a	cd	a	bc	d	cd	cd

\* Média de cinco repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha ou coluna, não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

CV (%) = 30,48

DMS (1%) = 1,59

DMS (1%) I dentro de C = 4,79

DMS (5%) C dentro de I = 3,61

Tabela 57. Altura dos colmos (cm) de nove cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. arthenomanes*

Inoculação (I)	Cultivares (C)									Médias
	CB 41-76	CB 45-3	CB 47-89	CB 49-260	CP 51-22	NA 56-79	RB 705007	RB 705051	RB 705146	
Inoculadas	44,90**	56,50a	54,20a	45,00a	49,40a	49,60a	55,50a	56,50a	56,50a	52,01a
Testemunhas	51,90a abc	57,70a cd	57,00a bcd	48,50a a	52,00a abc	57,70b cd	61,40a d	57,90a cd	50,10a ab	54,91b

\* Média de cinco repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha ou coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 5%)

CV (%) = 10,56

DMS (5%) I = 2,37

DMS (5%) I dentro de C = 7,13

Tabela 58. Índice de sintomas\*\*\* nas raízes de nove cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *P. arthenomanes*

Inoculação (I)	Cultivares (C)									Médias
	CB 41-76	CB 45-3	CB 47-89	CB 49-260	CP 51-22	NA 56-79	RB 705007	RB 705051	RB 705146	
Inoculadas	1,90b ab	2,00b ab	2,30b b	1,80b ab	2,20b b	1,50b a	1,50b a	1,90b ab	1,90b ab	1,88b
Testemunhas	1,00a a	1,00a a	1,00a a	1,00a a	1,00a a	1,00a a	1,00a a	1,00a a	1,00a a	1,00a

\* Média de cinco repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha ou coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1 ou 5%)

\*\*\*Escala de 0 a 3 onde 0 = sem sintomas; 1 = até 25% das raízes com sintomas; 2 = 26 a 50% das raízes com sintomas; 3 = mais de 50% das raízes com sintomas

CV (%) = 15,26

DMS (1%) I = 0,12

DMS (1%) C dentro de I = 0,52

Nas duas cultivares suscetíveis, CB 47-89 e CP 51-22, foi verificada uma redução, estatisticamente significativa, para o peso fresco e seco da parte aérea e do peso fresco da raiz. Para o cultivar CP 51-22 ocorreu, também, uma diminuição no peso seco do sistema radicular.

No grupo das cultivares intermediárias, foi observada uma variação, quanto ao efeito da inoculação, nos diferentes parâmetros analisados. Considerando-se os efeitos na parte aérea, estas cultivares podem ser agrupadas da seguinte maneira:

a) cultivares apresentando redução significativa do peso fresco e seco do sistema radicular e do peso fresco da parte aérea: RB 705051;

b) cultivares com redução no peso seco da parte aérea e peso fresco da raiz: cultivar CB 41-76;

c) cultivares sem redução significativa, no peso fresco e peso seco da parte aérea, apresentando reduções significativas ou para peso fresco ou seco das raízes: cultivar CB 45-3 e RB 705146, respectivamente;

d) cultivares sem reduções significativas para peso fresco e peso seco da parte aérea e do sistema radicular: CB 49-260.

Com relação ao grupo, apresentando menor índice de sintomas, considerando-se o peso fresco da parte aérea e das raízes, foi verificada somente uma redução significativa no peso seco da parte aérea na cultivar RB 705007. Não foram detectadas diferenças significativas para os demais parâmetros. A cultivar NA 56-79 não foi afetada, significativamente, em nenhum dos parâmetros mencionados acima.

Quando analisados os resultados da altura dos colmos das cultivares, foi verificado que, somente a cultivar NA 56-79 teve redução da altura das plantas, quando comparadas as plantas inoculadas e não inoculadas.

Com estes resultados, os grupos de suscetibilidade sugeridos, já no item 4.7.3, tornaram-se mais definidos. Desta forma, das cultivares mais suscetíveis, no experimento anterior, foi possível isolar a CB 47-89 e CP 51-22, que apresentavam maior suscetibilidade.

A cultivar RB 705007, no experimento anterior, considerada como pertencente ao grupo intermediário, passou a constituir, juntamente com a cultivar NA 56-79, o grupo das menos suscetíveis ou "resistentes".

O comportamento variável de algumas cultivares, em relação aos diferentes parâmetros avaliados e nas condições dos testes analisados, provavelmente, está relacionado às diferenças, quanto às condições de ambiente, duração do experimento e, certamente, as características inerentes das cultivares.

Assim, a parte aérea das duas cultivares, estimada através do peso fresco, é maior que aquela das outras cultivares, sendo que seus sistemas radiculares podem ser considerados de tamanho médio a grande. Porém, nas cultivares consideradas como menos suscetíveis, não houve coincidência neste sentido. A cultivar NA 56-79 apresentou um dos menores desenvolvimentos da parte aérea e das raízes, enquanto que na RB 705007 foi constatado um sistema radicular grande e um desenvolvimento intermediário, para a parte aérea.

Considera-se que, quando analisado o efeito de um agente, na destruição do sistema radicular, além da quantidade e, ou do tipo do

sistema radicular das cultivares, outros fatores devem, também, ser levados em consideração. Estes seriam a eficiência do sistema radicular, a quantidade tolerada na redução de raízes, sem que seja afetado o desenvolvimento das plantas e as características do crescimento de cada cultivar, em um determinado período de avaliação.

De outra parte, a destruição das raízes, por *P. arthenomanes*, envolve a interferência do patógeno na planta e a destruição de raízes finas, especialmente das regiões meristemáticas. Neste sentido, é oportuno ressaltar que, este tipo de prejuízo implica na diminuição da superfície de absorção, de água e nutrientes e interfere na produção de substâncias reguladoras do crescimento, tais como: giberelinas e ácido absídico, principalmente (RUSSELL, 1977).

Segundo GARRETT (1970) a característica de recuperação ou substituição de raízes danificadas constitui um fator importante na resistência às doenças, nas quais o sistema radicular é destruído. Porém, quando a cultivar for suscetível - como parece acontecer com a cultivar RB 705051 - esta produção de raízes poderá ser tão intensa que, pelo gasto energético requerido, possa induzir, também, uma diminuição do peso da parte aérea, sem evidenciar redução do peso do sistema radicular.

Tabela 59. Resumo das reações das cultivares de cana-de-açúcar quando inoculadas com *P. arhenomanes*, nos experimentos 3.7.1 a 3.7.4.

Cultivar	Experimento**	Peso fresco (g) da parte aérea	Peso fresco (g) da raiz	Índice de sintomas	Nível de Resistência
CB 41-76	3.7.1.	-*	+	b*	Intermediário
	3.7.3.	-	-	b	
	3.7.4.	-	+	b	
CB 45-3	3.7.2.	-	+	b	Intermediário
	3.7.3.	-	+	b	
	3.7.4.	-	+	ab	
CB 47-89	3.7.1.	+	-	b	Suscetível
	3.7.2.	+	-	b	
	3.7.3.	+	-	b	
	3.7.4.	+	+	b	
CB 49-260	3.7.1.	+	-	b	Resistente
	3.7.3.	+	+	b	
	3.7.4.	-	-	ab	
CP 51-22	3.7.1.	-	+	b	Suscetível
	3.7.3.	-	+	b	
	3.7.4.	+	+	b	
NA 56-79	3.7.1.	-	+	b	Resistente
	3.7.3.	-	-	a	
	3.7.4.	-	-	a	
RB 705007	3.7.3.	-	+	ab	Resistente
	3.7.4.	-	-	a	
RB 705051	3.7.2.	-	-	b*	Suscetível
	3.7.3.	+	-	b	
	3.7.4.	+	+	ab	
RB 705146	3.7.3.	+	+	b	Resistente
	3.7.4.	-	-	ab	

\* (-) = sem diferença estatística significativa entre plantas inoculadas e as testemunhas.

(+) = com diferença significativa entre plantas inoculadas e as testemunhas.

(a)(ab)(b) = letras iguais para o mesmo experimento não diferem estatisticamente, sendo a níveis menores de sintomas, ab níveis intermediários e b, o maior nível de sintomas.

\*\* Características principais dos experimentos

Exp. 3.7.1.: - 30 dias; 28 a 30°C; índice de sintomas na raiz 2,18 ( $\bar{x}$ )

Exp. 3.7.2.: - 42 dias; 19 a 36°C; índice de sintomas na raiz 2,66 ( $\bar{x}$ )

Exp. 3.7.3.: - 70 dias; 15 a 32°C; índice de sintomas na raiz 2,63 ( $\bar{x}$ )

Exp. 3.7.4.: - 120 dias; 28 a 30°C nos primeiros 60 dias, passando a 17 a 36°C no resto do período; índice de sintomas na raiz = 1,88 ( $\bar{x}$ )



4.8. Reação das cultivares CB 47-89 e RB 705146 às espécies de *Pythium* inoculadas em conjunto ou separadamente

O experimento teve uma duração de 125 dias, sendo conduzido nos meses de julho a novembro. As plantas submetidas ao teste tinham duas semanas de desenvolvimento na areia, no momento da inoculação. A temperatura do ambiente, na casa-de-vegetação, variou em torno de 28 a 30°C.

Os resultados do peso fresco da parte aérea e sistema radicular, o peso seco da parte aérea e das raízes, a altura dos colmos e o índice de sintomas nas raízes são apresentados nas Tabelas 60, 61, 62, 63, 64 e 65.

Tabela 60. Peso fresco da parte aérea (g) das cultivares CB 47-89 e RB 705146 inoculadas com diferentes espécies de *Pythium* \*

Patógenos (P)	Cultivares (C)		Médias
	CB 47-89	RB 705146	
Complexo <i>P. acanthicum</i> -			
<i>P. oligandrum</i> (P.a.o)	119,16**	147,96	133,56
<i>P. arrhenomanes</i> (P.a.)	95,46	132,66	114,06
P.a. + P.a.o.(1:1)	93,60	126,13	109,86
<i>P. periplocum</i>	119,23	148,93	134,08
Testemunha	129,39	153,93	141,66

\* Média de três repetições, cada uma constituída por uma planta

\*\* A análise de variância não revelou diferenças significativas entre tratamentos

CV (%) = 16,47%

Tabela 61. Peso fresco das raízes (g) das cultivares CB 47-89 e RB 705146 inoculadas com diferentes espécies de *Pythium*

Patógenos (P)	Cultivares (C)		Médias
	CB 47-89	RB 705146	
Complexo <i>P. acanthicum</i> - <i>P. oligandrum</i> (P.a.o)	149,93*b**	140,73ab	145,33ab
<i>P. arrhenomanes</i> (P.a.)	75,60a	102,83a	89,21a
P.a. + P.a.o.	63,60a	127,60ab	95,60a
<i>P. periplocum</i>	92,09ab	157,80ab	124,94ab
Testemunha	132,50ab	184,33b	158,41b

\* Média de três repetições, cada uma constituída por uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem, estatisticamente entre si (Teste Duncan, 1%)

CV (%) = 19,36

DMS (1%) = 51,22

DMS (1%) P dentro de C = 72,58

Tabela 62. Peso seco da parte aérea (g) das cultivares CB 47-89 e RB 705146 inoculadas com diferentes espécies de *Pythium*

Patógenos (P)	Cultivares (C)		Médias
	CB 47-89	RB 705146	
Complexo <i>P. acanthicum</i> - <i>P. oligandrum</i> (P.a.o.)	28,38*	38,05	33,22ab**
<i>P. arrhenomanes</i> (P.a.)	21,54	32,48	27,01ab
P.a. + P.a.o.	21,17	31,07	26,12a
<i>P. periplocum</i>	29,55	40,37	34,96ab
Testemunha	31,83	40,40	36,12b

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (Teste Duncan, 5%)

CV (%) = 16,87

DMS (5%) P = 9,17

Tabela 63. Peso seco das raízes (g) das cultivares CB 47-89 e RB 705146 inoculadas com diferentes espécies de *Pythium*

Patógenos (P)	Cultivares (C)		Médias
	CB 47-89	RB 705146	
Complexo <i>P. acanthicum</i> - <i>P. oligandrum</i> (P.a.o.)	21,20*c**	29,56b	25,38bc
<i>P. arrhenomanes</i> (P.a.)	11,10ab	16,48a	13,79a
P.a. + P.a.o.	9,29a	17,20a	13,25a
<i>P. periplocum</i>	18,91bc	25,65ab	22,28b
Testemunha	19,48bc	39,72c	29,60c

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, entre si (Teste Duncan, 1 a 5%)

CV (%) = 18,74

DMS (1%) P = 5,29

DMS (5%) P dentro de C = 9,55

Tabela 64. Altura das plantas (cm) das cultivares CB 47-89 e RB 705146 inoculadas com diferentes espécies de *Pythium*\*

Patógenos (P)	Cultivares (C)		Médias
	CB 47-89	RB 705146	
Complexo <i>P. acanthicum</i> - <i>P. oligandrum</i> (P.a.o.)	55,66**	65,33	60,50
<i>P. arrhenomanes</i> (P.a.)	49,83	67,66	58,75
P.a. + P.a.o.	50,83	56,30	53,76
<i>P. periplocum</i>	59,83	61,00	60,41
Testemunha	64,83	63,83	64,33

\* Média de três repetições, cada uma constituída de uma planta

\*\* A análise de variância não revelou diferenças significativas entre tratamentos

CV (%) = 13,32

Tabela 65. Índice de sintomas\*\*\* nas raízes das cultivares CB 47-89 e RB 705146 inoculadas com diferentes espécies de *Pythium*

Patógenos (P)	Cultivares (C)		Médias
	CB 47-89	RB 705146	
Complexo <i>P. acanthicum</i> - <i>P. oligandrum</i>	1,66*b**	1,33b	1,50b
<i>P. arrhenomanes</i>	2,33c	2,66c	2,50c
P.a. + P.a.o.	2,66c	2,50c	2,58c
<i>P. periplocum</i>	1,50ab	1,50b	1,50b
Testemunha	1,00a	1,00a	1,00a

\* Média de três repetições, cada uma constituída por uma planta

\*\* Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Duncan, 1%)

\*\*\* Escala de 0 a 3 onde 0 = sem sintomas; 1 = até 25% das raízes com sintomas; 2 = 26 a 50% das raízes com sintomas; 3 = mais de 50% das raízes com sintomas

CV (%) = 11,23

DMS (%) P = 0,44

DMS (1%) P dentro de C = 0,62

O desenvolvimento das plantas, avaliado como peso fresco da parte aérea, não foi significativamente, afetado pela patogenicidade das diferentes espécies. Houve uma tendência para um menor desenvolvimento das plantas, nos tratamentos que continham o inóculo da cultura de *P. arrhenomanes*.

Quanto ao efeito das diferentes espécies de *Pythium*, no desenvolvimento do sistema radicular, avaliado como peso fresco, foi verificado que, de um modo geral, os inóculos contendo *P. arrhenomanes*, isoladamente ou, em combinação com o complexo *P. acanthicum*-*P. oligandrum*, reduziram significativamente o desenvolvimento do sistema radicular, quando comparado com aquele das testemunhas. O complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum* e *P. periplocum*, causaram uma redução no desenvolvimento do sistema radicular, que, no entanto, ocupou uma posição intermediária, entre o efeito de *P. arrhenomanes* e a testemunha, não diferindo, significativamente, de qualquer uma das duas.

O efeito de cada espécie de *Pythium*, no desenvolvimento das duas cultivares, apresentou variações que, no entanto, não diferiram muito da tendência geral, para a patogenicidade de espécies, nas duas cultivares, acima mencionadas.

Com relação ao peso seco da parte aérea, à semelhança do que foi verificado para o peso fresco, não foram detectadas diferenças significativas, no desenvolvimento do sistema radicular, que pudessem ser atribuídas à patogenicidade, das espécies de *Pythium* testadas.

Quanto ao peso seco das raízes, a patogenicidade de cada espécie, consideradas as duas cultivares em conjunto, revelou diferenças significativas, no desenvolvimento do sistema radicular. As maiores reduções ocorreram para *P. arrhenomanes* e o inóculo constituído de *P. arrhenomanes* e complexo *P. acanthicum*-*P. oligandrum*. *P. periplocum*, considerando-se as duas cultivares em conjunto, ocupou uma posição intermediária e o desenvolvimento do sistema radicular diferiu, significativamente, daquele



observado para as inoculações feitas com *P. arrhenomanes* e a testemunha. O efeito do complexo *P. acanthicum*-*P. oligandrum*, no desenvolvimento do sistema radicular, não diferiu significativamente, da testemunha.

O efeito de cada espécie, no desenvolvimento do sistema radicular de cada variedade, apresentou variações, que, no entanto, não diferiram muito da tendência geral, para a patogenicidade das espécies consideradas, nas duas cultivares em conjunto.

Não foi detectado nenhum efeito das diferentes espécies, no desenvolvimento das cultivares, avaliado com base na altura do colmo.

Quanto à severidade dos sintomas observados, no sistema radicular, foi verificado, nas duas cultivares, que houve diferenças significativas, para os danos causados pelas diferentes espécies. *P. arrhenomanes* mostrou-se como sendo a espécie mais patogênica, seguida por *P. periplocum* e complexo *P. acanthicum*-*P. oligandrum*, que não diferiram entre si quanto à patogenicidade.

O teste revelou que, o complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum* foi menos patogênico que *P. arrhenomanes*. No entanto, quando ambas foram inoculadas em combinação, usando-se somente a metade do inóculo utilizado, para cada espécie testada separadamente, a severidade dos sintomas causados não diferiu, significativamente, daquela induzida por *P. arrhenomanes*, quando inoculada, separadamente, com o dobro do inóculo. O efeito induzido pela combinação dos dois patógenos, não pode ser ainda adequadamente qualificado, uma vez que os diferentes patógenos não foram testados, separadamente, com uma quantidade de inóculo correspondente à metade da quantidade utilizada. Este experimento revelou, serem necessários mais

estudos, visando a metodologia, para a inoculação conjunta de patógenos em raízes de cana-de-açúcar.

Com relação aos demais parâmetros, somente os pesos fresco e seco do sistema radicular revelaram diferenças significativas, que pudessem ser atribuídas aos diferentes patógenos, quando testados separadamente ou em conjunto. Os efeitos dos patógenos, sobre o desenvolvimento do sistema radicular, foi inversamente relacionado à severidade dos sintomas causados nas raízes.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

A análise qualitativa e quantitativa dos organismos associados às podridões de raízes de cana-de-açúcar revelaram-se importantes, para um enfoque geral do problema, não indicando, porém, a importância real de cada grupo de organismos no complexo dos agentes causadores da podridão de raízes. Este fato já havia sido constatado em Formosa por TZEAN *et alii* (1974).

A importância de fazer estudos preliminares para adotar uma técnica adequada ao estudo de um determinado material, neste caso, raízes de cana-de-açúcar, foi demonstrada, neste trabalho, e constitui parte importante do levantamento dos fungos associados às podridões. Assim, foi observado, por exemplo, um aumento na eficiência no isolamento de *Pythium* de raízes tratadas, com benomil, mediante a manutenção das amostras no meio de cultura, durante 24 a 48 horas, à temperatura de 23-24°C. A utilização do benomil incorporado ao meio de cultura, visando retardar o desenvolvimento de fungos de crescimento rápido foi citado por RIBEIRO (1978) dentre outros autores. Neste trabalho, na

parte referente ao isolamento das espécies de *Pythium*, optou-se pelo tratamento das raízes com o suspensão de benomil, por exercer menor inibição quando comparado à adição do fungicida ao meio de cultura. Os resultados apresentados (item 4.1) indicam as vantagens deste tratamento para raízes de cana-de-açúcar obtidas de plantas desenvolvidas em condições de campo, sendo que, no entanto, este método não pode ser utilizado indiscriminadamente para raízes de plantas doentes de diferentes tipos ou origens.

No material colhido, raízes de diferentes cultivares com iguais sintomas diferiram na frequência de isolamento de *Pythium*. Também, nas observações microscópicas da colonização das células das diferentes cultivares constatou-se que na NA 56-79 havia menor frequência de desenvolvimento de esporângios e oosporos nos tecidos, em comparação com a CB 47-89. Provavelmente o menor sucesso no isolamento, detectado nessa primeira cultivar, possa estar relacionado à presença de quantidade inferior de propágulos nela formados. (Figura 1 C, p.36).

Desta forma, seria recomendável pesquisar, a nível radicular, as cultivares que interferem no desenvolvimento de propágulos ou limitem o crescimento do patógeno, fato este, provavelmente, associado à resistência. O desenvolvimento restrito de fungo, nas raízes afetadas, induziria menor produção de inóculo secundário e determinaria, pelas características de baixa capacidade de disseminação do patógeno, a diminuição da taxa de infecção no novo sistema radicular formado pela planta.

As diferentes espécies de *Pythium* obtidas das raízes com lesões e suas características de patogenicidade, indicam a complexidade da origem desta doença e revela a importância de pesquisa na elucidação das funções que elas têm na etiologia da podridão de raízes de cana-de-açúcar.

Na identificação das espécies de *Pythium*, foi observada certa inadequação do tratamento taxonômico para este gênero. A variabilidade dos caracteres taxonômicos propostos dificultou a classificação de algumas espécies. Este fator e os problemas decorrentes da metodologia para isolamento e indução da formação de estruturas de reprodução de algumas espécies justificam a escassa informação, no Brasil, no tocante à identificação, ao nível de espécie, deste gênero de fungos, em outras culturas de importância. Neste sentido, é recomendável a padronização dos meios de culturas e condições ambientais para a identificação, como também, a preservação dos isolados identificados.

Para a inoculação dos organismos envolvidos com a podridão de raízes, diferentes formas de inóculo foram testadas. Nestes experimentos, foi observado que raízes naturalmente infectadas constituem uma fonte de inóculo que, apesar de reproduzir sintomas em plantas, pode ser extremamente variável quanto à sua composição e ao seu potencial patogênico. A necessidade de dispor de bastante material para inoculação e a impossibilidade de estocagem prolongada tornam o uso de raízes naturalmente infectadas pouco recomendável, para testes de grande quantidade de plantas, em um programa desenvolvido de forma permanente. Estas dificuldades foram também observadas quando foram utilizadas raízes

com solo ou solo naturalmente infectado. A construção de um canteiro com solo da região de Campos, para a manutenção do inóculo nas condições de Piracicaba, teve também pouco resultado prático, provavelmente, devido à variação quantitativa e qualitativa da microflora em função do ambiente de Piracicaba, e pelo crescimento vagaroso das raízes das plantas, produzindo-se pouco material em condições de ser utilizado como inóculo.

No primeiro experimento com raízes naturalmente infectadas (item 4.4.1), porém foi possível observar que houve diferentes reações das cultivares ao complexo de agentes causadores de podridões de raízes, sendo isto, possivelmente, devido ao fato do inóculo ter sido constituído de raízes de diferentes cultivares e o potencial do inóculo ter sido adequado. O potencial de inóculo adequado e a ocorrência de condições de ambiente favoráveis possibilitaram uma resposta quase que qualitativa, revelando a ocorrência de morte de plantas da CB 47-89 e danos menores nas plantas da cultivar NA 56-79.

Na condução e colheita dos diferentes ensaios, foi detectado um escurecimento nas raízes de plantas testemunhas. Devido a este fato, os sistemas radiculares não foram considerados totalmente saudios (nota de doença 0). Os maiores esforços foram feitos para eliminar essa contaminação de raízes, porém, apesar de se utilizar areia esterilizada, toletes submetidos ao tratamento térmico, irrigação com água destilada, aplicação de fungicidas e seleção das mudas por ocasião do plantio, sempre houve colonização por *Trichoderma* sp, *Curvularia* sp, e *Fusarium* spp. A origem destes fungos está relacionada com a contaminação

pelo ambiente e pelo tolete, já que alguns deles (*Curvularia* e *Fusarium*) suportaram o tratamento térmico. A disponibilidade de substrato para colonização por estes fungos, como consequência do processo de envelhecimento das raízes, deverá estar favorecendo a ocorrência deste problema (GLOVER, 1967). Sendo que o escurecimento ocorreu em todas as plantas e não estava associado à presença de *Pythium*, considerou-se que era possível fazer comparações entre tratamentos, nas condições em que foram realizados os experimentos.

A qualidade das plantas no momento do plantio e as condições de ambiente - temperatura e luz - são alguns dos fatores importantes a serem considerados nos testes de comparação de cultivares. Assim a cultivar NA 56-79, geralmente menos afetada pela doença (item 4.4.1), revelou maior suscetibilidade, fato em parte atribuído aos fatores do ambiente que foram menos favoráveis ao desenvolvimento das plantas (item 4.4.2). Esses fatores do ambiente já foram citados por RANDS e DOPP (1938), como influenciando no aumento da doença, em condições de campo. Logicamente, a variação no potencial de inóculo e a duração do teste deverão influir no desenvolvimento da doença nas diferentes cultivares.

Assim, a tolerância de uma cultivar, ou seja, a capacidade para suportar um certo nível de doença sem que as plantas exteriorizem os efeitos desta (SCHAFFER, 1971), estará relacionada, no caso de podridões de raízes, com a suscetibilidade ao patógeno, o potencial de inóculo e a velocidade de crescimento das raízes e o seu potencial de substituição das regiões destruídas pelo patógeno.

Este potencial de recuperação de raízes foi reportado como sendo a base para a tolerância do milho à lagarta das raízes (*Dia-brotica longicornis*), OWENS *et alii* (1974) e, também, para a cevada e o trigo afetados por *P. graminicola* e *P. arrhenomanes*, respectivamente, BRUEHL (1953). Provavelmente, a combinação destes fatores deve ter sido considerada, quando RANDS e DOPP (1938) mencionaram que a suscetibilidade das cultivares deveria ser testada no inverno enquanto que a resistência de campo seria avaliada na primavera-verão.

Nos testes de patogenicidade para as diferentes espécies de *Pythium* e uma espécie de *Fusarium*, todas elas, com a exceção de *P. arrhenomanes*, não se revelaram como sendo patógenos importantes (itens 4.5.1 a 4.5.3). Estes resultados são válidos para as condições do teste, mas poderão ser alterados se variados o ambiente, os isolados ou o potencial de inóculo, fatores não pesquisados neste trabalho. Assim sendo, nas condições desta pesquisa, *Pythium arrhenomanes* constitui-se no organismo mais prejudicial às raízes de plantas de cana-de-açúcar.

A variabilidade na patogenicidade de isolados de *P. arrhenomanes* foi provada com numerosos isolados por RANDS e DOPP (1934), constatando-se agora, também, com isolados da região de Campos, RJ. Porém devido, provavelmente, ao pequeno número de isolados testados neste experimento, não foram detectadas diferenças tão marcantes quanto a patogenicidade entre os isolados, em relação as obtidas naquele trabalho.

Sendo que o objetivo foi o de selecionar isolados com maior grau de patogenicidade, não foi dada continuidade aos estudos de variabilidade deste aspecto, uma vez que fora possível selecionar isolados com estas características.



Na avaliação da reação dos cultivares à inoculação com *P. arhenomanes*, deve ser lembrado que a doença por ele induzida é considerada "de tipo secundário" (SALT, 1979). Esta classificação significa que os prejuízos causados são pouco evidentes à simples observação, causando, no entanto, a destruição das raízes finas e das regiões meristemáticas, afetando as funções do sistema radicular e reduzindo a produtividade dos cultivos (SALT, 1979).

Estas características dificultaram a escolha de parâmetros eficientes para avaliar a reação das plantas à doença e justificaram o grande número de fatores considerados neste estudo, para a avaliação dos experimentos.

Desta forma, a utilização de diversos parâmetros, neste trabalho, tinha por finalidade conhecer o efeito da doença no desenvolvimento das plantas e seleccionar alguns deles, que servissem para avaliar, com rapidez, o comportamento das cultivares.

Assim, quando considerada a parte aérea, observou-se que, para a avaliação dos efeitos da inoculação, e em especial, para comparar a reação das cultivares, a pesagem da parte aérea foi o melhor parâmetro. A altura das plantas e o número de nós não se revelaram como fatores adequados para detectar os efeitos dos tratamentos, na maioria dos casos. De modo geral, somente quando o período do teste foi curto e o nível da doença foi elevado, foi possível observar uma diminuição significativa da altura das plantas.

Em relação ao sistema radicular, foi observado que: havia variação no peso do sistema radicular, entre plantas da mesma

cultivar; quando utilizadas para inoculação, plantas desenvolvidas em areia, esta variação era diminuída; dependendo do tamanho do sistema radicular, o grau de suscetibilidade aos patógenos e a capacidade de substituição das raízes afetadas, o peso do sistema radicular podia ou não indicar os prejuízos induzidos pela doença.

O índice de sintomas na raiz foi considerado bom parâmetro para avaliar a suscetibilidade, pois revelou diretamente o efeito da patogenicidade de *P. arrhenomanes*. As desvantagens deste índice, como as de todas as escalas de doença com valores subjetivos, foram os prováveis erros de avaliação que foram cometidos, a dificuldade de análise das raízes em plantas com sistemas radiculares diferentes em quantidade e em tipo, e a interferência da atividade de substituição das raízes na proporção de raízes observadas com sintomas.

Estimou-se que, os elementos de variação que interferiram no nível de doença nos diferentes experimentos poderiam ser controlados com uma ou mais cultivares testemunhas que, presentes nos diferentes testes, tivessem um comportamento mais ou menos esperado, o que se procurou conseguir com a inclusão da cultivar CB 47-89 em todos os experimentos, e da NA 56-79 e CB 45-3, que foram às vezes incluídas.

De acordo com os resultados obtidos, para experimentos com 120 dias de duração, um período recomendável para o desenvolvimento de testes visando a determinação da reação das cultivares de cana-de-açúcar à *P. arrhenomanes*, em condições de casa-de-vegetação, foi o compreendido entre os meses de julho a novembro, contando-se com aquecimento, se necessário, durante os dois primeiros meses. Nas condições

do ambiente de Piracicaba, SP, com experimentos deste tipo, ter-se-ia a vantagem de obter, provavelmente, de forma simultânea, informações referentes à suscetibilidade e à "tolerância" das cultivares. Estes fatores foram indicados por RANDS e DOPP (1938) como necessários de serem conhecidos para a avaliação das cultivares, quanto ao efeito da podridão das raízes. Os autores sugeriram ainda que os testes desenvolvidos com esse fim, deveriam ser conduzidos, separadamente durante os meses do outono e da primavera, respectivamente, nas condições de Luisiana, EUA.

Na análise dos resultados obtidos para os experimentos de reação de cultivares à inoculação com *P. arhenomanes*, foi observada uma relação entre os resultados obtidos para o índice de sintomas no sistema radicular e o peso fresco da parte aérea e da raiz, dependendo, no entanto, do período de duração do experimento. A análise destes três parâmetros em função do tempo, permitiria a possibilidade de discriminação do nível de resistência dessas cultivares (Tabela 59, p.130).

Assim, no Experimento 3.7.1., com 30 dias de duração, o índice de sintomas nas raízes ( $\bar{x} = 2,16$ ) não diferenciou reações entre as cultivares ao inóculo, sendo que o peso fresco da parte aérea e do sistema radicular apresentaram variações que dependeram da cultivar. Situação similar ocorreu no Experimento 3.7.2., que teve uma duração de 42 dias, no qual o índice de sintomas foi maior que no teste anterior ( $\bar{x} = 2,66$ ).

Já nos Experimentos 3.7.3. e 3.7.4., com 70 e 120 dias de duração, respectivamente, o nível de discriminação obtido para este

experimento, aumentou notavelmente em relação aos anteriores, existindo maior relação entre os níveis de doença observados e as reduções no peso da parte aérea e radicular das cultivares.

Desta forma, utilizando-se conjuntamente, os parâmetros acima citados e com base principalmente no Experimento 3.7.4., foi possível observar três tipos de reações nas cultivares testadas:

- Cultivares Resistentes: Cultivares com índice de doença baixo ou médio no sistema radicular e sem efeito significativo da podridão de raízes no peso fresco da parte aérea ou da raiz (CB 49-260, NA 56-79, RB 705007 e RB 705146).
- Resistência Intermediária: Cultivares com níveis médio ou alto para o índice de sintomas no sistema radicular, com efeito significativo da podridão de raízes no peso da raiz e sem efeito no peso da parte aérea (CB 41-76 e CB 45-3).
- Suscetível: Cultivares com níveis médio ou alto para o índice de sintomas no sistema radicular e com efeito significativo da podridão no peso da raiz e da parte aérea (CB 47-89, CP 51-22 e RB 705051).

Nesta graduação proposta, é considerado que, à medida que a duração do experimento for aumentando, as plantas tem oportunidade de manifestar seu potencial de defesa e recuperação, a semelhança do que provavelmente ocorre em condições de campo; onde, a longo prazo,

com níveis elevados de sintomas nas raízes, ocorrerá uma redução do sistema radicular que se refletirá na parte aérea, especialmente naquelas cultivares mais precoces.

Níveis médios de sintomas no sistema radicular poderão ou não se refletir na parte aérea, dependendo da energia gasta na substituição do sistema radicular e da capacidade da cultivar de compensar os prejuízos causados pela ação do patógeno.

Estas três classes de resistência não são ainda enquadradas nas escalas de doença discutidas por RICAUD (1981) devido ao insuficiente conhecimento dos níveis possíveis de discriminar para este tipo de doença em condições de casa-de-vegetação.

Como resultado da experiência acumulada ao longo deste trabalho, pode-se inferir que, para condições de campo, fatores tais como: a provável distribuição generalizada do inóculo em solos da região de Campos, RJ e a dificuldade para se dispor de cultivares com alto nível de resistência à podridão de raízes, torna necessário o desenvolvimento de testes para a procura de cultivares com grande vigor quanto ao crescimento do sistema radicular, com níveis de suscetibilidade médio a baixo e com características de tolerância à doença.

O conhecimento prévio das reações das cultivares produzidas, para as diferentes regiões, aos agentes causadores da podridão de raízes, evitará seu declínio rápido e o desenvolvimento de surtos imprevistos em anos nos quais as condições do ambiente favoreçam a ocorrência da doença.

## 6. CONCLUSÕES

1. Espécies dos gêneros *Curvularia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Trichoderma* foram as mais frequentemente isoladas a partir de lesões em raízes de cultivares de cana-de-açúcar, plantados na região de Campos, RJ, apresentando podridões no sistema radicular.

2. As espécies de *Pythium* associadas à podridões de raízes em cana-de-açúcar foram: *P. arhenomanes* Drechsler, complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*, sensu Watanabe, *P. mamillatum* Meurs, *P. periplocum* Drechsler e *P. nagaii*(?) Ito e Tokunaga.

3. Foi desenvolvida uma metodologia para testar a patogenicidade dos fungos associados ao sistema radicular de cana-de-açúcar, em condições de casa-de-vegetação. Este sistema consistiu, essencialmente, na manutenção das plantas submetidas aos tratamentos, em sacos de polietileno (450 x 100 x 0,05mm) perfurados no terço inferior, com areia esterilizada e contidos em tubos de policloreto de vinila opaco de cor marrom (40 x 10 x 0,5cm).

4. Os melhores tipos de inóculo testados foram o meio de cultura de V-8-água e a areia-quirera de milho, pelas vantagens quanto

ã padronização do potencial de inóculo e facilidade no preparo.

5. *P. arrhenomanes* foi o organismo que revelou maior patogenicidade e reproduziu a maioria dos sintomas detectados nas raízes das plantas colhidas em condições de Campos, RJ. Outros organismos inoculados foram *F. oxysporum*, complexo *P. acanthicum* - *P. oligandrum*, *P. mamillatum*, *P. periplocum* e *P. nagaii*(?)

6. Foi detectada variação quanto à suscetibilidade de cultivares de cana-de-açúcar, dependendo, no entanto, da espécie de *Pythium* inoculada.

7. Quando comparada a patogenicidade de isolados de *P. arrhenomanes* no desenvolvimento das plantas, foi detectada uma tendência para a variação deste caracter, sendo sugeridos maiores estudos para o esclarecimento das características de variação.

8. Foi possível discriminar diferentes tipos de reações das cultivares à inoculação com *P. arrhenomanes*, nos testes instalados com a metodologia de inoculação utilizada e com duração de 4 meses. Estes foram fundamentados, principalmente, nas características do índice de sintomas no sistema radicular e na redução do peso fresco da parte aérea e das raízes, quando confrontadas as plantas inoculadas com as respectivas testemunhas.

9. Com base nos resultados obtidos, são sugeridas linhas de pesquisa, visando um melhor conhecimento dos problemas relacionados aos seguintes tópicos: o efeito de outros microorganismos na severidade da podridão das raízes de cana-de-açúcar; o melhor conhecimento

do sistema radicular das cultivares e sua influência na doença induzida por *P. arhenomanes*; a variabilidade do patógeno quanto a fisiologia, morfologia e patogenicidade, nas condições do Brasil; os fatores fisiológicos ou estruturais relacionados com a resistência de cana-de-açúcar a *P. arhenomanes*; e, a influência do ambiente no desenvolvimento da doença.



## LITERATURA CITADA

- ABBOTT, E.V.; N.ZUMMO e R.L.TIPPETT, 1958. Methods of testing sugarcane varieties for disease resistance at the U.S. sugarcane field station, Houma, Louisiana. In: *Proceeding of the 12<sup>th</sup> Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists*. San Juan, p. 1138-1143.
- ADAIR, C., 1968. A rapid method for assaying cane varieties against *Pythium*. *Annual Report. Hawaiian Sugar Planters Association. Experiment Station, Honolulu*, p. 38.
- ALEXOPOULOS, C.J., 1966. *Introductory Mycology*. New York, John Wiley, 613 p.
- APT, W.P. e H.KOIKE, 1962. Pathogenicity of *Helicotylenchus nannus* and its relation with *Pythium graminicola* on sugarcane in Hawaii. *Phytopathology*, Saint Paul, 52:798-802.

- ARRUDA, S.C., 1946. As doenças da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. *O Biológico*, São Paulo, 12:63-69.
- ARX, J.A.von, 1974. *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*. Vaduz, J. Cramer, 315 p.
- ASHER, M.J.C., 1973. Effect of *Ophiobolus graminis* infection of the growth of wheat and barley. *Annals of Applied Biology*, Cambridge, 70:215-223.
- BAKER, K.F. e R.J. COOK, 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*. San Francisco, W.H. Freeman, 418 p.
- BARNETT, H.L. e B.B.HUNTER, 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 3a. ed. Minneapolis, Burgess Publishing Company, 241 p.
- BATEMAN, D.F. e A.W.DIMOCK, 1959. The influence of temperature on roots rots of *Poinsettia* caused by *Thielaviopsis basicola*, *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, St.Paul, 49:461-647.
- BÖHM, W., 1979. *Methods of Studying Root Systems*. New York Springer-Verlag, 188 p.
- BRUEHL, G.W., 1953. *Pythium* root rot of barley and wheat. *Technical Bulletin. United States Department of Agriculture*, Washington, 1084, 24 p.
- CARPENTER, C.W., 1919. Preliminary report on root rot in Hawaii. *Bulletin Hawaiian Experiment Station*, Honolulu, 54:1-8.
- CARPENTER, C.W. 1928. Notes on *Pythium* root rot of sugar cane. *Hawaiian Planters Record*, Honolulu, 32:107-117.

- CARVALHO, P. de C.T. e G.M.AZZI, 1964. Distribuição geográfica de *Pythium* spp. nos canaviais do Estado de São Paulo. In: Anais do XIV Congresso da Sociedade Botânica do Brasil, Manaus. p.53-61.
- CHU, H.T.; S.C.HSU e Y.T.LIU, 1966. Study on the pathological causes of poor ratoon standing of sugarcane. *Report of the Taiwan Sugar Experiment Station*, 43:1-9.
- DANTAS, B., 1970. Moíestias de cana-de-açúcar no Nordeste. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 22:392-399.
- DEACON, J.W. e C.H.M.HENRY, 1978. Studies on virulence of the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* with reference to methodology. *Annals of Applied Biology*, Cambridge, 89:401-409.
- DRECHSLER, C.H., 1928. *Pythium arrhenomanes* n. sp. a parasite causing maize root rot. *Phytopathology*. St. Paul, 18:873-875.
- DRECHSLER, C.H., 1936 *Pythium graminicola* e *P. arrhenomanes*. *Phytopathology*, Saint Paul. 26:676-684.
- EDGERTON, C.W.; E.C.TIMS e P.J.MILLS, 1929. Relation of species of *Pythium* to the root rot disease of sugar cane. *Phytopathology*, Saint Paul, 19:549-564.
- ENDO, R.M. e W.M.COLT, 1974. Anatomy, cytology and physiology of infection by *Pythium*. In: Proceedings of the 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Phytopathological Society, Saint Paul, p.215-223.
- FIGUEIREDO, M.B., 1967. Aplicação do método de Castellani para conservação de fungos fitopatogênicos. *O Biológico*, São Paulo, 33:9-13.

- FLENTJE, N.T., 1970. Pathogenesis by soil fungi. In: BAKER, K.F. e W. C.SNYDER (Ed.). *Ecology of Soil-Borne Plants Pathogens, prelude to the Biological Control*. California, California University Press, p. 255-268.
- FREZZI, M.J., 1956. Especies de *Pythium* fitopatōgenas identificadas en la Republica Argentina. *Revista de Investigaciones Agrícolas*, Buenos Aires, 10:113-241.
- GARRETT, S.D., 1948. Soil conditions and take-all disease of wheat. IX Interaction between host plant nutrition upon disease resistance. *Annals of Applied Biology*, Cambridge, 28:14-18.
- GARRETT, S.D., 1970. *Pathogenic Root-Infecting Fungi*. Cambridge, Cambridge University Press, 294 p.
- GLOVER, J., 1967. The simultaneous growth of sugarcane roots and tops in relation to soil and climate. In: *Proceedings of the 1972 meeting of the South African Sugar Technologists Association*. Mount Edgecombe. p.143-159.
- GRIFFIN, D.M., 1969. Soil water in the ecology of soil fungi. *Annual Review of Phytopathology*, California, 7:289-310.
- HALPIN, J.E.; E.W.HANSON e J.G.DICKSON, 1952. Studies on the pathogenicity of seven species of *Pythium* on red clover seedlings. *Phytopathology*. Saint Paul, Minnesota, 42:245-249.
- HAVAI, 1963. Reactions of additional varieties to *Pythium*. *Annual Report. Experiment Station Hawaii, Sugar Planters Association*, p.31.
- HAVAI, 1969. Plant protection and diseases. *Annual Report. Experiment Station Sugar Planters Association*, p. 72-87.

- HENDRIX, F.F. e W.A.CAMPBELL, 1974. *Pythium* as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, California, 11:77-98.
- HENDRIX, F.F. e W.A.CAMPBELL, 1974a. Taxonomic value of reproductive cell size in the genus *Pythium*. *Mycologia*, Lancaster, 66:681-684.
- HENDRIX, F.F. e W.A.CAMPBELL, 1974b. Taxonomy of *Pythium sylvaticum* and related fungi. *Mycologia*, Lancaster, 66:1049-1053.
- HENDRIX, F.F. Jr. e K.E.PAPA, 1974. Taxonomy and genetics of *Pythium*. In: *Proceeding of the 66<sup>th</sup> Annual meeting of the American Phytopathological Society*, Saint Paul, p.200-207.
- HINE, R.B., 1962. Effect of streptomycin sulfate on growth and respiration of *Pythium* spp. *Phytopathology*, Saint Paul, 52:736.
- HOITINK, H.A.J. e A.F.SCHMITTHENNER, 1969. Rhododendron wilt caused by *Phytophthora citricola*. *Phytopathology*, Saint Paul, 59:708-809.
- HSU, S.C., 1965. A root rot of sugarcane caused by *Pythium catenulatum* in Taiwan. *Phytopathology*, Saint Paul, 55:705-706.
- HSU, S.C. e H.T.CHU, 1962. Studies on fungal disease of sugarcane root in Taiwan. *Report Taiwan Sugar Experiment Station*, Taiwan, 28:1-14.
- HSU, S.C. e Y.O.LIU, 1966. Comparison of *Pythium* spp. causing sugarcane root rot. *Report Taiwan Sugar Experiment Station*, Taiwan, 42:41-46.
- HUMPHRIES, E.C., 1958. Effect of removal of a part of the root system on the subsequent growth of the root and shoot. *Annals of Botany*. Oxford, 22(86):251-257.
- JOHNSON, L.F. e E.A.CURL, 1972. *Methods for Research on the Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens*. Minnesota, Burgess Publishing Company, 247 p.

- KLISIEWICZ, J.M., 1968. Relation of *Pythium* spp to root rot and damping-off of safflower. *Phytopathology*, Saint Paul, 58:1384-1386.
- KNAUSS, J., 1978. Test procedures for fungicides and bactericides used to control foliar and soil borne pathogens of ornamental tropical plants. In: THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY. *Methods for Evaluating Plant Fungicides, Nematicides and Bactericides*. Saint Paul, 1978. 141 p.
- KOIKE, H., 1965. Methods for testing sugarcane for resistance to *Pythium* root rot. In: *Proceeding of the 12<sup>th</sup> Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists*. San Juan, p.1183-1187.
- KOIKE, H., 1969. Fungi associated with sugar cane roots and soils in Puerto Rico. *Phytopathology*, Saint Paul, 59:1348.
- KOIKE, H., 1971. Individual and combined effects of *Pythium tardicrescens* and *Pythium graminicola* on sugarcane: a first report. *Plant Disease Report*, Washington, 55:766-770.
- KOIKE, H. e J.ROMAN, 1970. Pathogenicity of *Pratylenchus brachyurus* *Pythium graminicola* to sugarcane. *Phytopathology*, Saint Paul, 60:1562-1565.
- KOIKE, H. e J.N.WARNER, 1965. Tests again suggest soil pathogen as a factor in yield decline. *Annual Report Experiment Station Planters Association*, Honolulu, p. 29.
- KOIKE, H. e S.YANG, 1971. Influence of Sugarcane Mosaic virus strain H and *Pythium graminicola* on growth of sugarcane. *Phytopathology*, Saint Paul, 61:1090-1092.
- LEACH, L.D., 1947. Growth rates of hosts and pathogen as factors determining the severity of preemergence damping-off. *Journal of Agricultural Research*, Washington, 75:161-179.

- LE BEAU, F.J., 1938. The relation of environmental factors and antagonistic organisms to root rot of sugarcane and corn. In: Proceedings of the 6<sup>th</sup> Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Baton Rouge, p.342-347.
- LITTRELL, R.H. e S.M.McCARTER, 1970. Effect of soil temperatura on virulence of *Pythium aphanidermatum* and *Pythium myriotylum* to rye and tomato. *Phytopathology*, Saint Paul, 60:704-707.
- MARTIN, J.P., 1965. The commercial sugarcane varieties of the world and their resistance and susceptibility to the major diseases. In: Proceedings of the 12<sup>th</sup> Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, San Juan, p.1213-1225.
- MARTIN, J.P.; C.A.WISTIER; H.KOIKE e W.J.APT, 1959. Some biological factors associated with yield decline of sugar cane varieties in Hawaii. In: Proceedings of the 10<sup>th</sup> Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Honolulu, p.77-85.
- MELLANO, H.M.; D.E.MUNNECKE e J.J.SIMS, 1970. Relationships of seedling age to development of *Pythium ultimum* on roots of *Anthriscum mayus*. *Phytopathology*, Saint Paul, 60:943-950.
- MIDDLETON, J.T., 1943. A taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club*, London, 20:1-171.
- MILDENHALL, J.P.; R.G.PRATT; P.H.WILLIAMS e J.E.MITCHELL, 1971. *Pythium* brown root and forking of much-grown carrots. *Plant Disease Reporter*, Washington, 55:536-540.
- NAPI-ACEDO, G. e O.R.EXCONDE, 1965. Penetration and infection of corn roots by *Pythium arrhenomanes*. *Phillippine Agriculture*, Los Baños, 49:279-293.

- NEMEC, S., 1972. Histopathology of *Pythium* infected strawberry roots. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 50:1091-1096.
- OWENS, J.C.; D.C.PETERS e A.R.HALLAUER, 1974. Corn rootworm tolerance in maize. *Environmental Entomology*, College Park, 3:767-772.
- PLAATS-NITERINK, A.H. van der, 1975. Species of *Pythium* in the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, Wageningen, 81:22-27.
- PLAATS-NITERINK, A.H. van der, 1981. Monograph of the Genus *Pythium*. Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn. Studies in Mycology n. 21, 242 p.
- QUIMIO, T.H. e L.E.ABILAY, 1977. *Pythium* from Philippine soils. \* *Philippine Phytopathology*, Los Baños, 13:54-73.
- RAHINIAN, M.K. e Z.BANIHASTEMI, 1979. A method for obtaining zoospores on *Pythium aphanidermatum* and their use in determining cucurbit seedlings resistance to damping-off. *Plant Disease Reporter*, Washington, 63:658-661.
- RANDS, R.D., 1930. Fungi associated with root rots of sugarcane in the Southern United States. In: *Proceedings of the 3<sup>th</sup> Congress of the International Society of Sugarcane Technologists*, Soerabaia, p.119-131.
- RANDS, R.D., 1938. Influence of certain harmful soil constituents on severity of *Pythium* root rot of sugarcane. *Journal of Agricultural Research*, Washington, 56:53-67.
- RANDS, R.D., 1939. *Pythium* root rot of sugarcane. In: *Proceedings of the 6<sup>th</sup> InternacionaI Society Sugarcane Technologists Congress*, Baton Rouge, p.680-681.



- RANDS, R.D., 1961. Root rot. In: MARTIN, J.P.; E.V.ABBOTT e C. G. HUGHES. *Sugar cane Diseases of the World*. New York, Elsevier Publication Company, v.1. p.189-304.
- RANDS, R.D. e E.DOPP, 1934. Variability on *Pythium arrhenomanes* in relation to root rot of sugarcane and corn. *Journal of Agricultural Research*, Washington, 49:189-221.
- RANDS, R.D. e E.DOPP, 1938. *Pythium* root rot of sugarcane. *Technical Bulletin, United States Department of Agriculture*, Washington, n. 666, 96 p.
- RIBEIRO, O.K., 1978. *A Source Book of the Genus Phytophthora*. Vaduz, J. Cramer, 417 p.
- RICAUD, C., 1981. Proposal for improving the use of the ISSCT disease resistance ratings. *Sugarcane Pathologists Newsletter*, Queensland 27:40-44.
- ROBERTSON, G.E., 1980. The genus *Pythium* in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, Wellington, 18:73-102.
- RUSSELL, R.S., 1977. *Plant Root System: Their Function and Interaction with the Soil*. Berkshire, McGraw Hill, 298 p.
- SALT, G.A., 1979. The increasing interest in "minor pathogens". In: SCHIPPERS, B. e W.GAMS (Ed.) *Soil-Borne Plant Pathogens*. New York, Academic Press, p.289-312.
- SCHAFFER, J.F., 1971. Tolerance to plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, California, 9:235-252.

- SILVA, W.M., 1974. Hot water treatment of single buds for ratoon stunting disease control. *Sugarcane Pathologists' Newsletter*, Queensland, 11/12:32-33.
- SLEETH, B., 1945. Agar medium and technique for isolating *Pythium* free of bacteria. *Phytopathology*, Saint Paul, 35:1030-1031.
- SRINIVASAN, K.V., 1958. A *Pythium* root rot and chlorosis complex of sugarcane. *Madras Agricultural Journal*, Madras, 45:89-98.
- SRINIVASAN, K.V., 1968. The role of the rhizosphere microflora in the resistance of sugarcane *Pythium* root rot. In: *Proceedings 13<sup>th</sup> Congress International Society Sugarcane Technologists*, Taipei, p. 1224-1236.
- TSAO, P.H., 1970. Selective media for isolation of pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, California, 8:157-186.
- TZEAN, S.S.; L.S.LEU e H.T.CHU, 1974. Fungal flora of roots and rhizosphere from ratoon cane in Taiwan. *Report. Taiwan Sugar Research Institute*, Taiwan, 63:68-117.
- VALLE-LAMBOY, S. e A.AYALA, 1980. Pathogenicity of *Meloydogyne incognita* and *Pratylenchus zae* and their association with *Pythium graminicola* on roots of sugarcane in Puerto Rico. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, Puerto Rico, 64:338-347.
- WALLACE, H.R., 1978. The diagnose of plant diseases of complex etiology. *Annual Review of Phytopathology*, California, 16:379-409.
- WARCUP, J.H., 1959. Distribution and detection of root disease. In: HOLTON, C.S., G.W.FISHER, R.W.FULTON e H.HART (Ed.) *Plant Pathology Problems and Progress*. Wisconsin, University of Wisconsin Press. p. 312-317.

- WATANABE, T. 1974. Fungi isolated from the underground parts of sugar cane in relation to the poor ratooning in Taiwan (2) *Pythium* and *Pythiogenon*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, Tokio, 15:343-357.
- WATANABE, T., 1975. Fungi isolated from the underground parts of sugar cane in relation to the poor ratooning in Taiwan (3) *Mucorales*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, Tokio, 16:18-27.
- WATANABE, T., 1975a. Fungi isolated from the underground parts of sugar cane in relation to the poor ratooning in Taiwan (4) *Coelomycetes*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, Tokio, 16:28-35.
- WATANABE, T., 1975b. Fungi isolated from the underground parts of wugar cane in relation to the poor ratooning in Taiwan (5) *Hyphomycetes*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, Tokio, 16:149-182.
- WATANABE, T., 1975c. Fungi isolated from the underground parts of sugar cane in relation to the poor ratooning in Taiwan (6) *Papulaspora*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, Tokio, 16:264-267.
- WATANABE, T. e M.SHIYOMI, 1975. Hyphal morphology of *Rhizoctonia solani* Kühn and related fungi isolated from sugar cane in Taiwan. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, Tokio, 16:253-263.
- WATANABE, T.; S.S.TZEAN e L.S.LEU, 1974. Fungi isolated from the underground parts of sugar cane in relation to the poor ratooning in Taiwan. *Transactions of Mycology Society of Japan*, Tokio, 15:30-41.

- WATANABE, T.; K.HASHIMOTO e M.SATO, 1977. *Pythium* species associated with strawberry roots in Japan and their role in the strawberry stunt disease. *Phytopathology*, Saint Paul, 67:1324-1332.
- WATERHOUSE, G.M., 1967. Key to *Pythium* Pringsheim. Commonwealth Mycological Institute. Mycological Papers, n. 109
- WATERHOUSE, G.M., 1968. The genus *Pythium* Pringsheim. Commonwealth Mycological Institute. Mycological Papers, n. 110.
- YANG, S.H., 1972. Growth of sugarcane: effects of two soil fungi. In: *Proceedings of 1972 Meeting of American Society of Sugar cane*. Florida, p.89-92.
- ZWETT, T. van der, 1958. The effect of flooding on *Pythium* root rot in nonsterile soil. *Phytopathology*, Saint Paul, 48:345.

## APÊNDICE

## G L O S S Á R I O

- aplerótico - oosporo que não ocupa totalmente a cavidade do oogônio.
- contíguo - uma estrutura globosa em contacto com outra, ou próximas inter-comunicadas por um segmento filamentoso
- diclino - oogônio e anterídio que se originam de hifas diferentes; o anterídio não é originado do pedúnculo oogonial
- equinulado - com estruturas em forma de espinhos
- inspissada - grossa, espessa
- intercalar - desenvolvimento que não é apical, ocorrendo entre o ápice e a base
- menoclino - oogônio e anterídio que se originam da mesma hifa, sendo que o anterídio pode se desenvolver a partir do pedúnculo do oogônio
- plerótico - oosporo que ocupa totalmente a cavidade do oogônio.

MIDDLETON, J.T. 1943. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club*, London, 20:1-171.