

**RAQUITISMO-DA-SOQUEIRA DA CANA-DE-ACÚCAR:
DIAGNOSE DA MOLÉSTIA E ESTUDOS SOBRE O SEU
AGENTE CAUSAL**

**SIZUO MATSUOKA
ENGENHEIRO AGRÔNOMO
SEÇÃO DE VIROLOGIA
INSTITUTO AGRONÔMICO, CAMPINAS
BOLSISTA DO CNPq**

Tese de Doutorado apresentada à
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
da Universidade de São Paulo

**PIRACICABA, SP - BRASIL
1972**

AGRADECIMENTOS

Às seguintes pessoas ficam consignados os meus sinceros agradecimentos:

Dr. Álvaro Santos Costa, pelo constante incentivo, pelas valiosas críticas e sugestões quando do planejamento das pesquisas que fazem parte desta tese, durante toda a fase de desenvolvimento das mesmas e, ainda, durante a redação desta.

Dr. Paulo C.T. de Carvalho, orientador desta tese, pelas valiosas críticas e sugestões formuladas.

Eng^o Agr^o Francisco I. Pastana, saudoso colega, que gentilmente permitiu a utilização de sementes e estacas de gramíneas da coleção da Seção de Conservação do Solo do Instituto Agronômico.

Eng^o Agr^o Antônio L. Segalla e demais colegas da Seção de Cana-de-açúcar do Instituto Agronômico, pela colaboração prestada.

Eng^{OS} Agr^{OS} Nicolau V. Banzatto, Luiz E. Azzini, Luiz Torres de Miranda, Derly M. Souza e Dr. Ernesto Paterniani, pelo fornecimento de sementes.

Eng^o Agr^o Hermindo Antunes Filho e demais colegas da Cooperativa Central dos Produtores de Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo, pela colaboração prestada.

Eng^o Agr^o Franz O. Brieger, pelo incentivo e pela colaboração prestada.

Colegas da Seção, pelas críticas, sugestões e colaboração.

Eng^{OS} Agr^{OS} José A. Gentil C. Souza e Alonso K. Dodson, pela colaboração prestada.

Eng^o Agr^o Hermógenes de F. Leitão Filho e bióloga Condorcet Aranha, pela classificação de algumas gramíneas.

Sr. Raphael Pompeu de Camargo, pela execução dos desenhos.

Funcionários da Seção, especialmente Antônio Stelita de Lima, pelo auxílio prestado na execução dos trabalhos.

ÍNDICE

	<u>pág.</u>
I. <u>INTRODUÇÃO</u>	1
II. <u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	2
III. <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	9
IV. <u>APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS</u>	12
A. <u>INVESTIGAÇÕES SOBRE A DIAGNOSE DA MOLÉSTIA</u>	12
1. <u>Procura de hospedeiras indicadoras</u>	12
2. <u>Recuperação para a cana do VRS inoculado em capim-ele- lefante</u>	16
3. <u>Investigações sobre a metodologia para o uso do ca- pim-elefante como planta-teste do VRS</u>	20
a. <u>Suscetibilidade de cultivares de capim-elefante ao VRS</u>	20
b. <u>Comparação de métodos de inoculação</u>	20
c. <u>Comparação entre plantas-teste obtidas de semen- tes e de estacas</u>	22
d. <u>Comparação entre métodos de obtenção de plantas- teste por estacas</u>	25
e. <u>Determinação da melhor faixa etária das plantas- teste para fins de diagnose</u>	29
f. <u>Comparação entre plantas-teste mantidas em casa de vegetação e ao ar livre, e em combinações desses ambientes em períodos pré- e pós-inoculação</u>	29
B. <u>UTILIZAÇÃO DO TESTE DIAGNÓSTICO DO CAPIM-ELEFANTE</u>	31
1. <u>Estudo das propriedades físicas do VRS</u>	31
a. <u>Ponto final de diluição</u>	31
b. <u>Temperatura final de inativação</u>	35

	<u>pág.</u>
c. <u>Longevidade in vitro</u>	35
d. <u>Longevidade in vivo</u>	38
2. <u>Reestudo do círculo de hospedeiras do VRS</u>	41
3. <u>Determinação da persistência do VRS nas hospedeiras</u>	44
4. <u>Estudos quanto à distribuição do VRS na planta de cana</u>	46
5. <u>Realização de levantamentos de campo</u>	46
a. <u>Comparação entre a diagnose pela observação dos sintomas internos na cana e a diagnose por meio de teste em capim-elefante</u>	48
b. <u>Levantamentos em canaviais comerciais</u>	50
c. <u>Levantamentos em viveiros de cana para plantio</u> ..	50
6. <u>Eleição de plantas matrizes sadias</u>	53
V. <u>DISCUSSÃO</u>	54
VI. <u>CONCLUSÕES</u>	65
VII. <u>RESUMO</u>	67
VIII. <u>SUMMARY</u>	69
IX. <u>BIBLIOGRAFIA CITADA</u>	71
<u>APÊNDICE</u>	75

ÍNDICE DOS QUADROS

	<u>pág.</u>
Quadro 1. Gramíneas que manifestaram sintomas internos de descoloração vascular quando inoculadas com o VRS	14
Quadro 2. Resultados de testes de inoculação do VRS em capim-elefante	17
Quadro 3. Resultados de testes de recuperação do VRS de capim-elefante infetado, para a cana	19
Quadro 4. Resultados dos experimentos de inoculação do VRS em diferentes cultivares de capim-elefante.....	21
Quadro 5. Resultados dos experimentos de inoculação do VRS em plantas-teste de capim-elefante por diferentes métodos	23
Quadro 6. Resultados dos experimentos de comparação de plantas-teste de capim-elefante, quanto à reação ao VRS, quando obtidas de dois tipos de estacas	26
Quadro 7. Resultados dos experimentos de comparação da reação ao VRS de plantas-teste de capim-elefante obtidas de estacas de dois nós, plantadas de duas formas	27
Quadro 8. Resultados dos experimentos de determinação da melhor faixa etária de plantas-teste de capim-elefante para a diagnose do VRS	30
Quadro 9. Resultados totais de 4 experimentos de comparação entre plantas-teste mantidas em casa de vegetação e ao ar livre, e em combinações desses ambientes em períodos pré- e pós-inoculação, quanto à reação ao VRS	32
Quadro 10. Resultados dos testes para determinação da temperatura final de inativação do VRS, realizados em plantas-teste de capim-elefante	36
Quadro 11. Resultados de testes realizados em capim-elefante para determinar a longevidade <u>in vitro</u> do VRS em ambiente de laboratório, em refrigerador e em congelador	37

Quadro 12. Resultados de testes realizados em capim-elefante para determinar a longevidade <u>in vivo</u> do VRS em colmos inteiros de cana armazenados em ambiente de laboratório	39
Quadro 13. Resultados de testes realizados em capim-elefante visando verificar a longevidade <u>in vivo</u> do VRS em toletes de 2 gemas, tratados ou não com fungicida, e armazenados em três temperaturas	40
Quadro 14. Resultados obtidos no reestudo do círculo de hospedeiras do VRS com base em testes de recuperação do vírus para o capim-elefante	42
Quadro 15. Resultados de testes efetuados para verificar a distribuição do VRS nos diferentes tecidos da planta de cana .	47
Quadro 16. Diagnose do raquitismo-da-soqueira: comparação entre a diagnose pela observação dos sintomas internos na cana e a diagnose pelo teste no capim-elefante	49
Quadro 17. Resultados dos levantamentos para avaliação da incidência do VRS nos canaviais do Estado, realizados por meio de testes diagnósticos em capim-elefante	51
Quadro 18. Resultados dos levantamentos para avaliação da incidência do VRS em viveiros de cana de usinas e estações experimentais do Estado, realizados por meio de testes diagnósticos em capim-elefante	52

ÍNDICE DAS FIGURAS

	<u>pág.</u>
Figura 1. A - Extração do inóculo do VRS de colmos maduros de cana, com prensa manual, e apetrechos utilizados para essa operação e para a inoculação. B - Inoculação do VRS por corte do cartucho foliar, em planta-teste de capim-elefante obtida de estaca plantada por enterrio parcial	10
Figura 2. Sintomas internos de descoloração vascular causados pelo VRS em nós maduros de colmo de capim-elefante (controles à esquerda)	15
Figura 3. Comparação da suscetibilidade ao VRS de plantas-teste de capim-elefante obtidas de estacas e de sementes, quando inoculadas por corte do cartucho foliar	24
Figura 4. Porcentagens de plantas-teste de capim-elefante com sintomas do VRS em três intensidades, em relação ao total inoculado, 20 e 30 dias após a inoculação, em experimentos de comparação de tipos de estacas e forma de plantio das mesmas	28
Figura 5. Porcentagens de plantas-teste de capim-elefante com sintomas do VRS em três intensidades, em relação ao total inoculado, 20 e 30 dias após a inoculação, quando mantidas em casa de vegetação e ao ar livre, e em combinações desses ambientes em períodos pre- e pos-inoculação	33
Figura 6. Porcentagens de plantas-teste de capim-elefante infectadas pelo VRS quando inoculadas com inóculos diluídos em série	34

RAQUITISMO-DA-SOQUEIRA DA CANA-DE-AÇÚCAR: DIAGNOSE DA
MOLESTIA E ESTUDOS SOBRE O SEU AGENTE CAUSAL⁽¹⁾

I. INTRODUÇÃO

O raquitismo-da-soqueira é uma moléstia da cana-de-açúcar (Saccharum spp.) que a maioria dos autores considera como sendo de natureza virótica (STEINDL, 1950; HUGHES & STEINDL, 1955; FORBES et al., 1960; GILLASPIE, JR. et al., 1966; GILLASPIE, JR., 1970a). É de ocorrência generalizada nas principais áreas canavieiras do mundo (ANTOINE, 1965), inclusive no Brasil (VEIGA, 1956; ARRUDA, 1961; 1962).

STEINDL (1961) admite que esta moléstia provavelmente tem causa do perdas na produção maiores do que qualquer outra, nos países produtores de cana do mundo. No Estado de São Paulo, as variedades vinham sendo plantadas com alto nível de infecção, segundo ARRUDA (1961). Este mesmo pesquisador (ARRUDA, 1962), constatou que mudas sadias produziam 30 a 50% a mais do que mudas doentes. Pode-se inferir, conseqüentemente, que as perdas no Estado, naquela época, eram aproximadamente daquela ordem. Não existem dados atualizados quanto aos prejuízos reais que a moléstia está causando, anualmente, nos canaviais paulistas e brasileiros. Admite-se, porém, que a situação praticamente não se alterou, podendo ter havido apenas uma ligeira melhoria, como conseqüência do plantio de canas em melhor estado de sanidade, realizado em pequena proporção dos canaviais.

A diagnose da moléstia pelos métodos usuais foi sempre reconhecida como difícil e não suficientemente segura (STEINDL, 1950; HUGHES & STEINDL, 1955; SCHEXNAYDER, 1956; ANTOINE, 1957; FIFE & STOKES, 1959; STEINDL, 1961; FORBES & PERDOMO, 1966) e assim é reconhecida ainda nos dias atuais (JAMES, 1972; KHURANA, 1972; RICAUD, 1972; SANTOS, 1972). Esta dificuldade na diagnose tem se constituído num dos

⁽¹⁾ O presente trabalho foi parcialmente subvencionado pelas seguintes entidades: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Agron. 68/031 e 69/320), Cooperativa Central dos Produtores de Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo e Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico.

mais sérios entraves à realização de pesquisas relacionadas com a moléstia.

Considerando como de grande urgência e interesse, estudos sobre o raquitismo-da-soqueira em nosso Estado, foram realizadas pesquisas no sentido de desenvolver uma boa técnica de diagnose dessa moléstia. Esta técnica viria, não só facilitar aqueles estudos, como também permitir a obtenção de resultados mais bem fundamentados.

O presente trabalho aborda as pesquisas que levaram ao desenvolvimento de uma nova técnica de diagnose biológica do raquitismo-da-soqueira; aborda, também, estudos sobre o agente causal e sobre a sua relação com as hospedeiras, os quais foram realizados com o auxílio do novo teste diagnóstico.

Resultados preliminares sobre esta técnica de diagnose, por terem sido julgados de grande interesse para os pesquisadores ligados a estudos de patologia da cana-de-açúcar, já foram publicados (MATSUOKA, 1971; 1972).

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 1949, na Austrália (ANÔNIMO, 1949), surge o primeiro relato formal sobre a ocorrência de uma nova moléstia em cana-de-açúcar que, exceto redução no porte das plantas, não causava nenhum outro sintoma externo característico. Ela passou a ser conhecida como "ratoon stunting disease" (doença do raquitismo-da-soqueira) (MUNGOMERY, 1949). Contudo, segundo reconstituição histórica publicada posteriormente (STEIDL, 1950; HUGHES & STEIDL, 1955), essa moléstia vinha sendo observada desde fins de 1944, tendo sido vãs as primeiras tentativas realizadas para determinar a causa da anomalia. Em 1949 (ANÔNIMO), chegou-se à conclusão que uma moléstia transmissível, provavelmente de natureza virótica, era responsável pela anomalia. Esta conclusão se baseou em sintomas de redução no porte das plantas inoculadas com suco de canas afetadas pelo mal, fato não observado nas plantas dos controles não inoculados. Tal diferença de crescimento só veio a se manifestar nas socas.

Em 1950, STEINDL mencionou ter observado que, um tipo de descoloração vascular, ocorria em associação à moléstia. Observou ele que, em colmos maduros de plantas afetadas do cultivar Q. 28, ocorriam pontos ou traços de coloração alaranjada a avermelhada na parte inferior dos nós maduros, na região correspondente à inserção das folhas. Tais sintomas eram mais visíveis quando se cortavam os colmos, longitudinalmente. Como, porém, nessa época, a descoloração vascular também foi observada em alguns colmos que se supunham sadios, não se considerou que, sozinho, aquele sintoma serviria para a diagnose da moléstia. Posteriormente, HUGHES & STEINDL (1955), realizando experimentos com diversos cultivares de cana, verificaram que a ocorrência daquele tipo de descoloração vascular era uma indicação bastante acurada da moléstia, embora a não observação desse sintoma não significasse, necessariamente, que o patógeno estaria ausente.

Em trabalhos experimentais, para a diagnose baseada nesses sintomas de nós maduros, tem sido adotado o seguinte procedimento: inocula-se toletes, por simples imersão ou sob pressão (HUGHES & STEINDL, 1955), de cultivares que manifestam bem esse tipo de sintomas, e a leitura é realizada após um mínimo de 6 meses (HUGHES & STEINDL, 1955; ANTOINE, 1959; ADSUAR & LÓPEZ-ROSA, 1962; HUGHES et al., 1964; GILLAS PIE, Jr. 1970a). Uma possibilidade para reduzir este tempo, sugerida por BENDA (1969), é plantar toletes de 2 nós, em posição vertical, enterrando-se apenas o nó inferior, cuja gema foi retirada. No broto, desenvolvido a partir da gema do nó superior, os sintomas de nós maduros podem ser visualizados três meses e meio depois da inoculação.

HUGHES & STEINDL (1955), constataram um outro tipo de sintoma interno em cana, causado pelo raquitismo-da-soqueira: o aparecimento de uma coloração levemente rosada, ocorrendo na parte central de nós imaturos e estendendo-se um pouco para o parênquima da parte superior do internódio. Segundo esses autores, essa coloração mostra-se bem visível no nó bem próximo ao meristema apical e, às vezes, não suficientemente óbvia, a não ser que seções de material sadio da mesma variedade sejam examinadas ao mesmo tempo. Num caso, eles conseguiram observar esse tipo de sintoma no tempo recorde de 7 semanas, com resultados consistentes sendo obtidos apenas em brotos crescendo de tole-

12 semanas (STEIB & TANTERA, 1970).

Testes colorimétricos foram também desenvolvidos para a diagnose do raquitismo-da-soqueira. Os primeiros estudos no sentido de desenvolver tais testes foram realizados por HUGHES & STEINDL (1955) que, apesar de terem conseguido resultados preliminares algo promissores, nada mais relataram sobre o assunto.

FARRAR (1957b) conseguiu desenvolver um teste diferencial de canas afetadas e não afetadas pelo raquitismo-da-soqueira, tratando seções longitudinais, retiradas da periferia de nós maduros da parte basal do colmo da cana, com peróxido de hidrogênio e ácido clorídrico hidratado. Canas sadias manifestaram coloração verde-azulada no tecido parenquimatoso vizinho aos feixes fibro-vasculares, contrariamente às canas doentes que não manifestaram tal coloração.

ANTOINE (1957) desenvolveu uma técnica colorimétrica baseada no uso de 2, 3, 5 - cloreto de trifenil tetrazólio, um sal solúvel e incolor que se reduz a um pigmento vermelho insolúvel, trifenil formazan, em presença de tecido viável. A alteração na cor se mostrou mais rápida em tecidos de cana com o raquitismo-da-soqueira do que em tecidos sadios. Contudo, esse autor observou que o teste deve ser conduzido sob condições muito bem controladas, por ser uma reação fotoquímica; observou ainda que, precaução na amostragem é um fator essencial para a obtenção de resultados uniformes e que o teste é aplicável apenas em canas maduras. Posteriormente (ANTOINE, 1959), estudando a possibilidade de aplicação do método em diversos cultivares de cana observou reações duvidosas em muitas delas e reação negativa em outras.

ROTH & WHITEHEAD (1965) relataram o que eles consideraram um teste colorimétrico melhorado, o qual envolve a aplicação de uma solução de amônia e nitrato de prata, ou uma solução de 20% de hidróxido de potássio, numa porção periférica do colmo, retirada por meio de um corte longitudinal. Dez segundos após a aplicação daquelas substâncias, os tecidos sadios adquirem coloração amarelada, mas no local onde os feixes fibro-vasculares estão severamente afetados pelo raquitismo-da-soqueira, aparecem riscas avermelhadas no fundo amarelado. Essa mudança em coloração, segundo os autores do método, pode ser vista mais claramente nos nós basais de canas com mais de 10 meses de i-

dade.

HUGHES (1958) testou os métodos desenvolvidos por FARRAR (1957b) e por ANTOINE (1957). Verificou que o desenvolvimento das colorações diferenciais é apenas suficientemente distintiva quando o colmo afetado estiver mostrando descoloração vascular evidente, e que nenhum dos testes oferece resultados seguros em muitos casos em que a diagnose pe los sintomas de nós maduros é difícil. ROTH & WHITEHEAD (1965) reconheceram que o método por eles desenvolvido, embora melhorado, ainda era inconsistente.

HUGHES & STEINDL (1955) relataram que nos estudos iniciais sobre a moléstia, efetuados na Austrália, foram feitas análises cromatográficas, com resultados preliminares promissores. Contudo, não há menção posterior sobre novos resultados. FIFE & STOKES (1959) realizaram estudos cromatográficos, comparando extrato de folhas de plantas de cana com e sem o raquitismo-da-soqueira, tendo verificado que, em folhas de plantas infetadas, a concentração de diversos amino-ácidos era maior. Contudo, eles concluíram que haveria necessidade de estudos posteriores, para avaliar a eficiência de análises cromatográficas na identificação de plantas afetadas pelo raquitismo-da-soqueira.

HUTCHINSON et al. (1967) investigaram a possibilidade de se detectar aumento do nível de polifenoloxidase em folhas de cana inoculadas com suco de plantas com o raquitismo-da-soqueira, mecanicamente por fricção. Não conseguiram, contudo, resultados consistentes e concluíram que o método, na forma como eles estudaram, não é adequado para testes de rotina de diagnose do raquitismo-da-soqueira.

Estudos de círculo de hospedeiras do agente causal do raquitismo-da-soqueira, visando principalmente a descoberta de hospedeiras indicadoras, foram realizados por diversos pesquisadores. Alguns tiveram insucesso total (SCHEXNAYDER, 1956; SHEFFIELD, 1959) e outros descobriram algumas hospedeiras que, no entanto, não manifestaram nenhum sintoma visível (STEINDL, 1955; 1957; STEIB & FORBES, 1957) ou manifestarem apenas redução no crescimento, como foi verificado por WEHLBURG (1956) em sorgo. As hospedeiras do raquitismo-da-soqueira, citadas na literatura estão relacionadas no apêndice 1.

HUGHES & STEINDL (1955) realizaram diversas tentativas para a i-

dentificação do agente causal do raquitismo-da-soqueira. Não conseguiram observar nenhuma diferença entre extratos de plantas doentes e sadias ao microscópio eletrônico; tampouco conseguiram associar à moléstia algum tipo de nucleoproteína. Contudo, em face à ausência de qualquer outro tipo de patógeno, fungo ou bactéria, associado à doença, concluíram que o agente causal seria um vírus.

FORBES & LING (1960) observaram partículas esféricas ao microscópio eletrônico, porém não relacionaram-na com a infectividade. LIU (1963) conseguiu isolar uma nucleoproteína de planta de cana infetada usando diálise, congelamento e centrifugação diferencial, mas essa nucleoproteína não provou ser infecciosa. GILLASPIE, JR. et al. (1966) conseguiram uma preparação parcialmente purificada, infecciosa, a partir de cana afetada pelo raquitismo-da-soqueira, cuja preparação continha partículas esféricas, possivelmente de natureza virótica. Contudo, como tal preparação purificada continha dois tipos de partículas, além de pequenos contaminantes, os autores concluíram que, para uma prova definitiva da identidade das partículas esféricas, haveria necessidade de purificação mais acurada. Postularam, contudo, que o agente causal do raquitismo-da-soqueira seria um vírus esférico de alto conteúdo em ácido nucleico.

Com a descoberta de que muitas doenças de plantas, antes consideradas como sendo de causa virótica, eram causadas por organismos do tipo micoplasma, GILLASPIE, JR. (1970a) procurou verificar se também no caso de raquitismo-da-soqueira um micoplasma não estaria envolvido. Pelos seus estudos concluiu que o agente causal do raquitismo-da-soqueira não seria um micoplasma, reforçando evidências anteriores de que seria um vírus.

KHURANA (1972) sugere, contudo, que o raquitismo-da-soqueira possa ser causado por um complexo de pelo menos dois patógenos, um vírus e um organismo do tipo micoplasma. PLAVSIC-BANJAC & MARAMOROSCH (1972), realizando exames ao microscópio eletrônico, observaram no xilema de plantas velhas de cana afetadas pelo raquitismo-da-soqueira, corpos pleomórficos assemelhando-se a minúsculas bactérias ou a organismos do tipo micoplasma. Tais corpúsculos não foram observados no floema daquelas plantas, e nem em plantas doentes, novas e nos contro

les sadios. Sugeriram, então, uma possível relação etiológica entre esses corpúsculos e o raquitismo-da-soqueira.

Em estudos sobre as propriedades físicas do agente causal do raquitismo-da-soqueira, HUGHES & STEINDL (1955) obtiveram infecção em plantas do cultivar Q. 28 quando inocularam sucos, de folhas e raízes de cana afetada pela moléstia, diluídos a 1:10.000 em tampão de fosfato a pH 5,6. Posteriormente, HUGHES (1957) relatou que a máxima diluição infectiva verificada foi de 1:25.000, tendo sido encontrada maior concentração do agente causal em folhas maduras, em bainhas e nos colmos de cana, e menos nas raízes e em tecidos imaturos. FARRAR (1957a) verificou que o agente causal permanecera infectivo em inóculo diluído em água destilada a 1:10.000. Não fez menção, contudo, se foram testadas diluições superiores àquela. EL-BANNA et al. (1967) obtiveram infecção com extrato de folhas e de colmos diluídos a 1:100.000 em tampão de fosfato 0,2M e a pH 6,7, tanto de sucos não filtrados como filtrados em filtro bacteriológico. Nos estudos destes autores, extrato de raiz não apresentou infectividade em diluições superiores a 1:100. SINGH & RAO (1968) obtiveram infecção em plantas de cana mesmo com inóculos diluídos a 1:1.000.000, em água destilada.

Em estudos de temperatura de inativação in vitro, FARRAR (1957a) verificou que o agente causal do raquitismo-da-soqueira é inativado quando aquecido a 50°C por 20 minutos, a 52°C por 15 minutos a 55°C por 10 minutos.

HUGHES & STEINDL (1955) constataram que suco de cana infetada pelo raquitismo-da-soqueira mantém a infectividade por 1 dia quando armazenado à temperatura de laboratório. FARRAR (1957a), por sua vez, constatou infeciosidade em suco armazenado por 2 dias à temperatura de 70°F (21°C). À temperatura de 40°F (4,5°C), obtida em refrigerador caseiro, a infectividade foi mantida por 4 dias (HUGHES & STEINDL, 1955) e à temperatura de -20°C, por 138 dias (HUGHES, 1957). HUGHES (1958) relatou que o agente patológico do raquitismo-da-soqueira permaneceu infectivo por 4 dias em suco de cana aderido a podões de corte guardados à sombra.

III. MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho o agente causal do raquitismo-da-soqueira será tratado como sendo um vírus e abreviadamente referido como VRS (vírus do raquitismo-da-soqueira), pois que assim é considerado pela maioria dos autores, como já foi referido anteriormente.

A seguir serão descritos os materiais e métodos gerais, reservando o relato dos específicos junto à descrição de cada experimento.

Exceto em testes específicos mencionados, os inóculos do VRS foram obtidos de colmos maduros de plantas infetadas do cultivar de cana CP 44/101. Pedacos descascados de colmo foram prensados em prensa manual, e o caldo obtido foi coletado num pequeno recipiente. Os canivetes utilizados no preparo das amostras foram empregados também na inoculação, quando esta envolveu o emprego deles. Por motivos práticos, foram sempre utilizados vários canivetes, em rodízio. Logo após a inoculação os canivetes foram limpos em papel toalha, embebido em álcool, e depois flambados em fogo direto. Na figura 1-A são mostrados os apetrechos utilizados nessas operações.

Plantas do grupo controle foram deixadas de inocular ou foram tratadas de forma semelhante ao grupo inoculado, porém utilizando-se, em vez do inóculo, ou alíquota deste fervida à ebulição por 10 a 15 minutos, ou água.

As plantas dos experimentos foram conduzidas, exceto nos casos específicos mencionados, em vasos de barro ou de alumínio (2 plantas/vaso), medindo 15cm de diâmetro na abertura e 17cm de altura, contendo uma mistura de terra e composto em proporções iguais. Os testes foram realizados em estufa, sem controle de temperatura, ou totalmente ao ar livre. Neste último caso, foram empregados vasos de alumínio.

Nas pesquisas iniciais, visando a descoberta de hospedeiras indicadoras, foram empregadas unicamente plantas (gramíneas) obtidas a partir de sementes. Na maioria dos casos, fez-se sementeiras, com transplante para vasos 15 a 20 dias depois. Nas pesquisas subsequentes empregou-se também a propagação vegetativa. As espécies de gramíneas utilizadas nos diversos estudos estão relacionadas no apêndice 2.

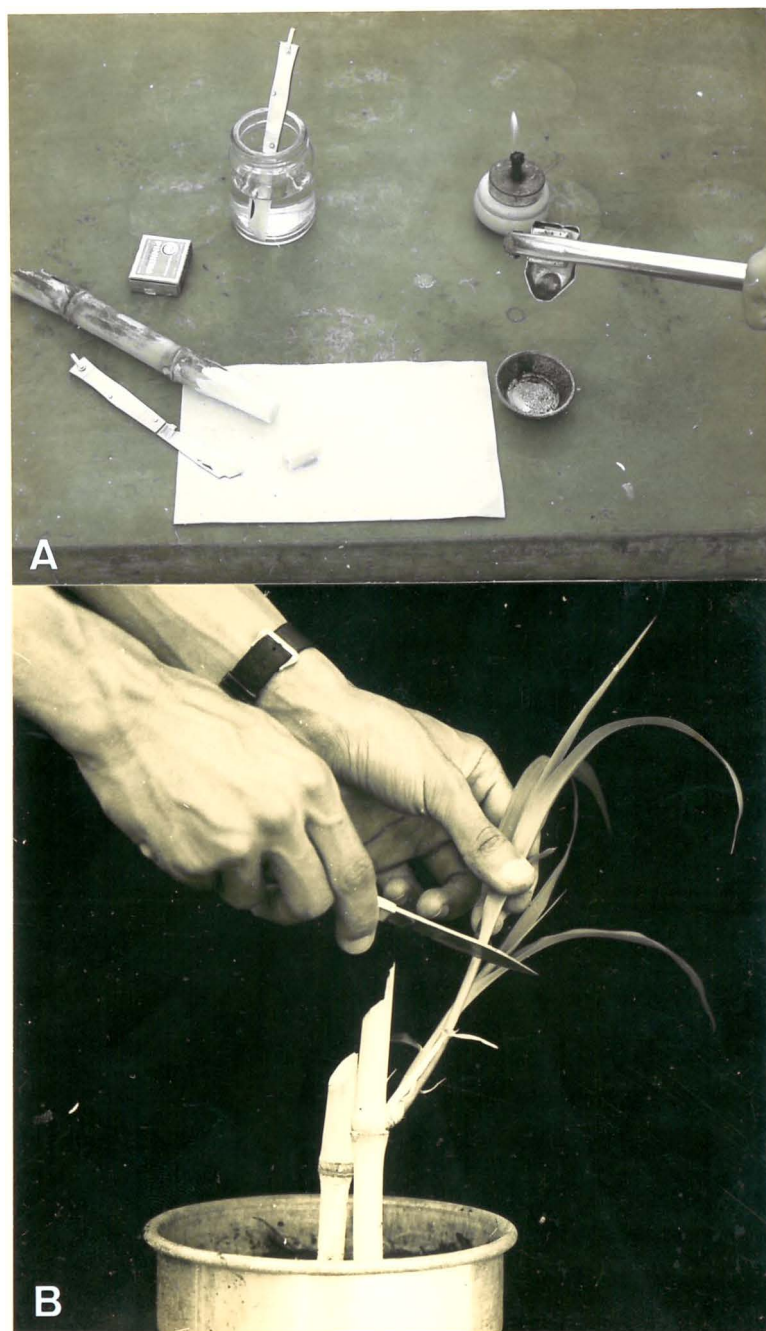


Figura 1. A - Extração do inóculo do VRS de colmos maduros de cana, com prensa manual, e apetrechos utilizados para essa operação e para a inoculação. B - Inoculação do VRS, por corte do cartucho foliar, em planta-teste de capim-elefante obtida de estaca plantada por enterrio parcial.

Em alguns experimentos, o cultivar de cana CP 44/101 foi utilizado como indicador. Colmos livres do VRS foram obtidos de plantas originárias de toletes tratados termicamente a 50,5°C por 2 horas (HUGHES & STEINDL, 1955) e com ausência de sintomas internos, tanto de nós maduros como de nós imaturos.

O plantio de estacas foi efetuado por duas técnicas: a usual, de enterrio total da estaca, e a denominada "upright" por BENDA (1969) e já utilizada em estudos com a cana por KAMERLING (1905) e por VENKATRAMAN & THOMAS (1929), segundo aquele mesmo autor. Sumariamente, essa técnica consiste em se plantar, em posição vertical, estacas de 2 nós, enterrando-se apenas o nó inferior, do qual a gema correspondente foi previamente retirada, para a obtenção apenas de enraizamento a partir desse nó; a planta é obtida, assim, pela brotação da gema do nó superior. (Fig. 1-B). No presente trabalho, as duas técnicas serão chamadas de plantio por enterrio total e parcial, respectivamente. Quando não houver referência ao tipo de plantio, subentenda-se que é pela técnica de enterrio total.

Os métodos de inoculação empregados nos diversos estudos são a seguir descritos em suas generalidades:

- (a) fricção: com o dedo molhado no inóculo, ao qual se adicionou um pouco de pó de carborundum malha 400, se friccionou as folhas, previamente polvilhadas com o abrasivo. Logo após a inoculação procedeu-se à lavagem com água das folhas inoculadas;
- (b) corte do cartucho: o cartucho foliar foi cortado com tesoura ou canivete, previamente molhados com o inóculo. Ao se inocular tomou-se cuidado de deixar escorrer o excesso de inóculo aderente ao objeto cortante, para a superfície exposta do corte (Fig. 1-B);
- (c) picadas de agulhas: com um feixe de agulhas, previamente molhado no inóculo, foram executadas várias picadas nas folhas e bainhas;
- (d) corte de raízes: raízes de plântulas com 10 a 25 dias de idade foram lavadas e depois as extremidades foram cortadas dentro do inóculo. Logo a seguir, procedeu-se ao transplante, podando-se as folhas para favorecer o pegamento e também para tentar favorecer a invasão da planta pelo vírus;

- (e) poda da planta: plantas com 40 a 60 dias de idade foram podadas a 2-3 cm acima do nível do solo e o inóculo foi colocado nas superfícies expostas pelo corte;
- (f) imersão de estacas: estas foram mergulhadas no inóculo e plantadas a seguir.

O método de inoculação por corte do cartucho foliar foi empregado em todos os experimentos em que não se menciona a técnica de inoculação.

Durante a fase de procura de hospedeiras indicadoras, as plantas foram constantemente observadas externamente até 40 a 90 dias após a inoculação, ocasião em que elas foram examinadas internamente. O exame interno foi realizado cortando-se os colmos longitudinalmente, em finas camadas.

IV. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho vão ser apresentados na seguinte sequência: (A) resultados que levaram ao desenvolvimento de uma técnica de diagnose do raquitismo-da-soqueira e (B) resultados de aplicações do método em estudos sobre o agente causal da moléstia.

A. INVESTIGAÇÕES SOBRE A DIAGNOSE DA MOLÉSTIA

As investigações sobre a diagnose da moléstia foram restringidas às pesquisas sobre hospedeiras indicadoras, pois que, pelo estudo da literatura, esta linha de pesquisa se apresentava como uma das poucas a oferecer possibilidade de sucesso.

1. Procura de hospedeiras indicadoras

Na triagem à procura de hospedeiras indicadoras do VRS inoculou-se 13 espécies de gramíneas, totalizando, porém, 78 tipos diferentes, levando-se em consideração as linhagens, os cultivares e os híbridos. Foi experimentado um número mínimo de 5 e um máximo de 40 de cada tipo, em alguns casos testando dois ou mais métodos de inoculação para cada um, em testes independentes, ou reinoculando-os uma a duas semanas após a primeira inoculação.

Em nenhuma das gramíneas testadas se observou algum tipo de sintoma externo que pudesse ser atribuído à inoculação efetuada. Quando

se cortou os colmos das plantas, notou-se, em algumas, a manifestação de sintomas internos, na forma de riscas de coloração marrom a alaranjada, na região nodal, com pequenas variações entre espécies. O quadro 1 resume os resultados positivos dos diferentes experimentos. Uma descrição detalhada do quadro sintomatológico para cada hospedeira é apresentada a seguir.

Em Echinochloa colonum foram observadas riscas de tonalidade marrom, na base de nós maduros, às vezes com aspecto de necrose e às vezes se estendendo para a região internodal inferior. Esses sintomas foram observados em exames efetuados 90 dias após a inoculação. Num outro grupo de plantas, examinado um mês antes, os sintomas foram pouco evidentes e ocorreram em apenas 3 plantas de 20 inoculadas.

Em 3 cultivares de Panicum maximum, cujas plantas foram examinadas 40 a 50 dias após a inoculação, puderam ser notados sintomas internos em forma de riscas marrom, um tanto opacas e pouco distintas, algo mais visível no cv. Sempre-verde. Essas riscas só puderam ser observadas na parte basal do colmo, na região de união de vários nós, situado abaixo do solo.

Em plantas de Pennisetum purpureum (capim-elefante), cvs. Merker e Napier, obtidas de sementes, examinadas 30 a 50 dias após a inoculação, puderam ser observadas riscas avermelhadas a alaranjadas, bem distintas. Tais riscas puderam ser notadas tanto naqueles nós agrupados da região basal do colmo (Fig. 2-A), como em nós situados mais acima. Nestes casos, as riscas ocorreram na parte inferior dos nós maduros (Fig. 2-B), assemelhando-se bastante aos sintomas internos de nós maduros que ocorrem na cana-de-açúcar, sendo, contudo, mais conspícuos. Em muitos casos, notou-se a formação de manchas de coloração marrom-avermelhadas, como resultado de coalescência de várias riscas. Nesses casos, as plantas em geral apresentaram um acentuado depauperamento. Em nós superiores aos basais, as riscas às vezes foram observadas estendendo-se para o internódio inferior e, frequentemente, envolvidas por um tecido anasarcado. Observou-se ainda, no caso de plantas inoculadas por corte do cartucho foliar, os sintomas aparecendo nos nós maduros nos quais estavam inseridas as folhas nas quais se efetuou a inoculação, porém não em nós maduros situados abaixo ou acima daquela re-

Quadro 1. Gramíneas que manifestaram sintomas internos de descoloração vascular quando inoculadas com o VRS

Gramíneas	Nº de plantas com descolorações vasculares internas sobre nº total de plantas examinadas, em grupos inoculados (inoc.) e controles (cont.) dos métodos de inoculação indicados, e no total							
	Corte de raízes		Corte do cartucho		Poda da planta		Total	
	Inoc.	Cont.	Inoc.	Cont.	Inoc.	Cont.	Inoc.	Cont.
<u>Echinochloa colonum</u> (L.) Link	-	-	12/20	1/20	-	-	12/20	1/20
<u>Panicum maximum</u> Jacq. 'Guiné'	0/10	0/10	-	-	2/10	0/10	2/10	0/10
<u>P. maximum</u> 'Privilégio'	3/10	0/10	-	-	-	-	3/10	0/10
<u>P. maximum</u> 'Sempre-verde'	2/10	0/10	12/20	0/20	16/63	0/60	30/93	0/90
<u>Pennisetum purpureum</u> Schum. 'Merker'	5/10	0/10	16/18	0/20	26/47	0/45	47/75	0/75
<u>P. purpureum</u> 'Napier'	6/10	0/10	16/19	0/20	19/38	0/40	41/67	0/70
<u>S. bicolor</u> Moench. 'Redbine'	-	-	7/10	0/10	-	-	7/10	0/10
<u>S. bicolor</u> 'Sart'	-	-	15/20	0/20	-	-	15/20	0/20

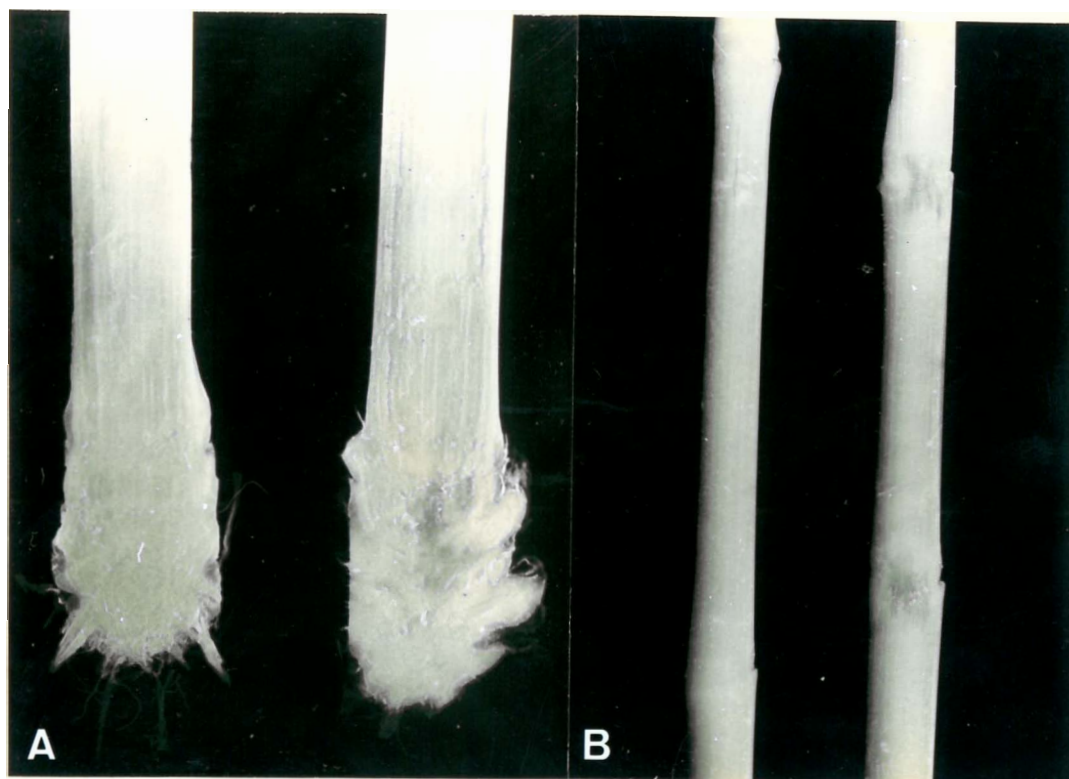


Figura 2. Sintomas internos de descoloração vascular causados pelo VRS em nós maduros de colmo de capim-elefante (controles à esquerda): A - No grupo de nós basais situados logo acima do ponto de união à estaca original; B - Em nós superiores aos basais.

gião. Além disso, os sintomas não puderam ser observados em perfilhos laterais não inoculados, apesar de muitos deles apresentarem maturidade aparentemente suficiente para tal.

Em plantas de sorgo-granífero foram observadas riscas de tonalidade alaranjada a avermelhada, em diversos nós maduros do colmo, em exames internos efetuados 2 a 3 meses após a inoculação. Em algumas plantas-controle foram, porém, observadas riscas, em geral avermelhadas, nos nós basais dos colmos. Em todos os casos observados, a ocorrência desse sintoma em plantas-controle se restringiu àqueles nós basais, contrariamente ao caso das plantas inoculadas que manifestaram descolorações vasculares em nós da região mediana-superior do colmo, além daqueles de nós inferiores. As descolorações vasculares em nós da parte mediana-superior do colmo é que foram consideradas nos resultados apresentados no quadro 1.

Dentre todas as gramíneas que manifestaram sintomas do VRS, o capim-elefante foi aquele que apresentou-as em forma mais nítida e em maior porcentagem das plantas. Além disso, os sintomas foram bem específicos, sem possibilidade de serem confundidos com sintomas causados por outros fatores.

Em novos testes de inoculação (corte do cartucho foliar) do VRS em capim-elefante, obteve-se porcentagens de infecção em torno de 80 a 100%, conforme se pode ver pelos dados do quadro 2. Não foi possível notar diferença em suscetibilidade, nem tampouco em tipo e severidade dos sintomas, entre os cultivares Merker e Napier.

2. Recuperação para a cana do VRS inoculado em capim-elefante

Para se provar definitivamente que os sintomas observados no capim-elefante seriam realmente devidos ao VRS, foram feitos 3 testes, nos quais, extrato de capim-elefante infetado foi utilizado na inoculação de plantas sadias do cultivar indicador de cana. O inóculo do capim-elefante foi extraído, em prensa manual, da região madura do colmo (nós e internódios) onde ocorriam os sintomas nodais.

No teste 1, foram utilizados inóculos individuais de plantas de capim-elefante. Foram testados inóculos de 5 plantas infetadas, utilizando-se como controle suco de 5 plantas sadias, extraído da região

Quadro 2. Resultados de testes de inoculação do VRS em capim-elefante

Nº do teste	Nº de plantas com sintomas sobre nº total de plantas testadas, dos cultivares de capim-elefante indicados ⁽¹⁾	
	Merker	Napier
1	9/10	9/10
2	40/48	20/20
3	55/60	-
4	39/40	-
5	9/10	10/10
Total	152/168	39/40

⁽¹⁾ Nenhuma das plantas-controle dos dois cultivares manifestou sintomas.

madura do colmo. Cada preparação foi aplicada em 2 plantas de cana indicadora, por corte do cartucho foliar.

No teste 2, as extremidades de toletes de cana de uma gema foram molhadas momentaneamente em suco extraído de várias plantas de cacapim-elefante que tinham sido inoculadas com o VRS dois e meio meses antes. No teste 3, procedeu-se inicialmente da mesma forma que no teste anterior, mas realizou-se uma reinoculação das plantas de cana, por corte do cartucho foliar, 3 meses após a primeira inoculação. Para essa segunda inoculação o inóculo do capim-elefante foi extraído de plantas inoculadas na estaca três meses antes. Neste experimento, e no anterior, um grupo de toletes ou plantas de cana foi também tratado de maneira semelhante ao grupo inoculado, porém com suco de capim-elefante sadio, extraído da região madura do colmo, para servir como controle.

Nos três experimentos foram considerados mais dois controles adicionais: plantas de cana inoculada com inóculo infectivo de cana e plantas de cana deixadas de inocular.

A ocorrência de infecção nas plantas de cana foi estabelecida com base na observação dos sintomas internos de nós maduros e de nós imaturos, em exames internos efetuados 3, 6 e 9 meses após a inoculação, respectivamente para os três experimentos. No experimento 3 o tempo se refere à primeira inoculação.

Os resultados dos três experimentos estão reunidos no quadro 3. Verificou-se em plantas-teste de cana inoculadas, tanto com inóculo de capim-elefante infetado como de cana infetada, a ocorrência de sintomas internos típicos do VRS nessa variedade indicadora, exceto que, no grupo inoculado com suco infectivo de capim-elefante, houve menor número de plantas com sintomas e estes ainda foram mais fracos. Plantas-teste de cana que não receberam nenhum tratamento, e aquelas tratadas com suco de capim-elefante sadio, não manifestaram sintomas.

Em novas inoculações em capim-elefante, nas quais se utilizou suco de plantas individuais de canas infetadas com o VRS vindo do capim-elefante, dos três testes acima relatados, verificou-se a ocorrência de sintomas de descolorações vasculares semelhantes àqueles provocados por suco de canas infetadas com o VRS da própria cana. Em

Quadro 3. Resultados de testes de recuperação do VRS de capim-elefante infetado, para a cana

Fonte do inóculo	Nº de plantas-teste de cana com sintomas internos sobre nº total de plantas inoculadas, em 3 testes		
	1 ⁽¹⁾	2 ⁽²⁾	3 ⁽³⁾
Capim-elefante com sintomas	4/10 ⁽⁴⁾	3/8	6/10
Capim-elefante controle	0/10	0/8	0/10
Cana infetada	7/10	4/6	10/10
Controle (não inoculado)	0/10	0/9	0/9

(¹) Exame interno efetuado 3 meses após inoculação por corte do cartucho foliar.

(²) Exame interno efetuado 6 meses após inoculação no tolete.

(³) Exame interno efetuado 9 meses após inoculação no tolete, ou 6 meses após reinoculação por corte do cartucho foliar.

(⁴) De 5 grupos de 2 plantas cada, inoculados com inóculos individuais, em 4 deles uma das plantas manifestou sintomas.

capim-elefante nos quais se aplicou suco de plantas de cana dos controles sadios não se observou nenhum sintoma.

3. Investigações sobre a metodologia para o uso do capim-elefante como planta-teste do VRS

Visando determinar a metodologia para o uso do capim-elefante como planta-teste para a diagnose do raquitismo-da-soqueira, foram realizadas as investigações a seguir descritas.

a. Suscetibilidade de cultivares de capim-elefante ao VRS

A suscetibilidade ao VRS de diferentes tipos de capim-elefante, obtidos a partir de sementes e de estacas, foi comparada nos experimentos a seguir descritos.

Os tipos de capim-elefante testados foram: 2 cultivares (Merker e Napier); 1 híbrido intercultivar (Napier x Merker); 2 híbridos interespecíficos entre P. purpureum e P. typhoides (Porto Rico e 29722 x Millet 16) e 2 tipos não identificados. Todos eles serão referidos como cultivar, no presente trabalho.

Foram realizados 4 experimentos de inoculação em plantas obtidas a partir de sementes, e de 2 a 4 experimentos em plantas obtidas a partir de estacas, em épocas diferentes. O inóculo do VRS foi utilizado sem diluição e diluído a 1:125.000. Um total de 20 a 40 plantas de cada tipo foi inoculado com cada diluição do inóculo, no grupo de plantas obtidas de sementes; no grupo obtido de estacas foi inoculado um total de 10 a 20 plantas de cada tipo, com cada inóculo.

Os resultados obtidos, em termos de porcentagem, estão apresentados no quadro 4.

b. Comparação de métodos de inoculação

Nos estudos preliminares haviam sido notadas diferenças em eficiência dos métodos de inoculação empregados. Visando determinar os mais apropriados para uso na diagnose do VRS com o capim-elefante, foram comparados os seguintes: fricção das folhas, corte de raízes, imersão de estacas, picadas de agulha e corte do cartucho. Estes mé-

Quadro 4. Resultados dos experimentos de inoculação do VRS em diferentes cultivares de capim-elefante obtidos de sementes e de estacas

Formas de propagação e cultivares de capim-elefante	Porcentagens de plantas sem sintomas e com sintomas nas intensidades indicadas (¹), em grupos inoculados como indicado							
	Inóculo não diluído				Inóculo diluído a 1:125.000			
	A	Fr	M	Ft	A	Fr	M	Ft
Sementes								
Merker	6		20	66	76	22	2	0
Napier	7	10	17	66	64	33	3	0
Napier x Merker	22	1	38	27	64	26	7	3
Porto Rico	30		12	46	70	22	4	4
Não identificado I	82		12	0	100	0	0	0
Estacas (²)								
Merker	2	12	42	44	55	37	8	0
Napier	7	3	27	63	60	25	15	0
Napier x Merker	20	20	37	33	62	20	15	3
Porto Rico	29	21	9	41	46	45	9	0
29722 x Millet 16	17	38	40	5	72	23	5	0
Não identificado I	20	20	50	10	95	5	0	0
Não identificado II	5	62	33	0	80	20	0	0

(¹) A = ausência de sintomas; Fr = sintomas fracos; M = sintomas medianos; Ft = sintomas fortes.

(²) Estacas de dois nós, plantadas por enterrio parcial.

todos foram testados em três cultivares de capim-elefante, em um ou mais experimentos independentes.

O exame dos sintomas internos foi realizado de 30 a 40 dias após a inoculação nos grupos inoculados por fricção, picadas de agulha e corte do cartucho; nos experimentos de inoculação por corte de raízes e imersão de estacas o exame interno foi realizado de 60 a 90 dias após a inoculação. Os resultados obtidos nesses experimentos estão apresentados no quadro 5.

O método de fricção das folhas foi o único dentre os testados que não possibilitou a infecção do capim-elefante pelo VRS. Dentre os métodos que possibilitaram a infecção, o de corte do cartucho não só foi o mais eficiente, como também apresentou maior regularidade nos 3 cultivares inoculados.

O método do corte do cartucho, além de altamente eficiente, mostrou possuir outras características desejáveis, tais como: rápida e fácil execução, possibilidade de emprego mesmo quando se dispõe de porções diminutas de inóculo e possibilidade de realização de leitura mais rápida nas plantas.

c. Comparação entre plantas-teste obtidas de sementes e de estacas

Numa série de experimentos com o cv. Merker foram comparadas plantas-teste obtidas de sementes com outras obtidas de estacas, estas plantadas em enterrio parcial. Nessas plantas-teste foi inoculado o VRS, contido em suco de cana não diluído e em sucos diluídos a 1:5.000, 1:25.000, 1:125.000 e 1:625.000. Foram realizadas 4 repetições, em ocasiões diferentes, inoculando-se 10 plantas com cada inóculo, por repetição.

Realizando exame interno nas plantas, cerca de 40 dias após a inoculação, tempo considerado suficiente para a máxima manifestação de sintomas, mesmo daquelas originárias de sementes, obteve-se os resultados que permitiram a representação gráfica apresentada na figura 3. Observa-se que as plantas-teste obtidas de estacas foram mais suscetíveis do que aquelas obtidas de sementes, considerando os inóculos

Quadro 5. Resultados dos experimentos de inoculação do VRS em plantas-teste de capim-elefante por diferentes métodos

Métodos de inoculação	Nº de plantas com sintomas internos sobre nº total de plantas inoculadas, dos tipos de capim-elefante indicados, e no total ⁽¹⁾				% de infec.
	Napier	Merker	P. Rico	Total	
Fricção de folhas	0/20	0/35	0/5	0/60	0
Corte de raízes	10/30	12/40	19/40	41/110	37
Imersão de estacas	15/15	20/29	24/85	59/129	46
Picadas de agulha	-	10/15	3/4	13/19	68
Corte de cartucho	47/50	39/40	36/40	122/130	94

⁽¹⁾ Nenhuma das plantas-controle dos três cultivares manifestou sintomas.

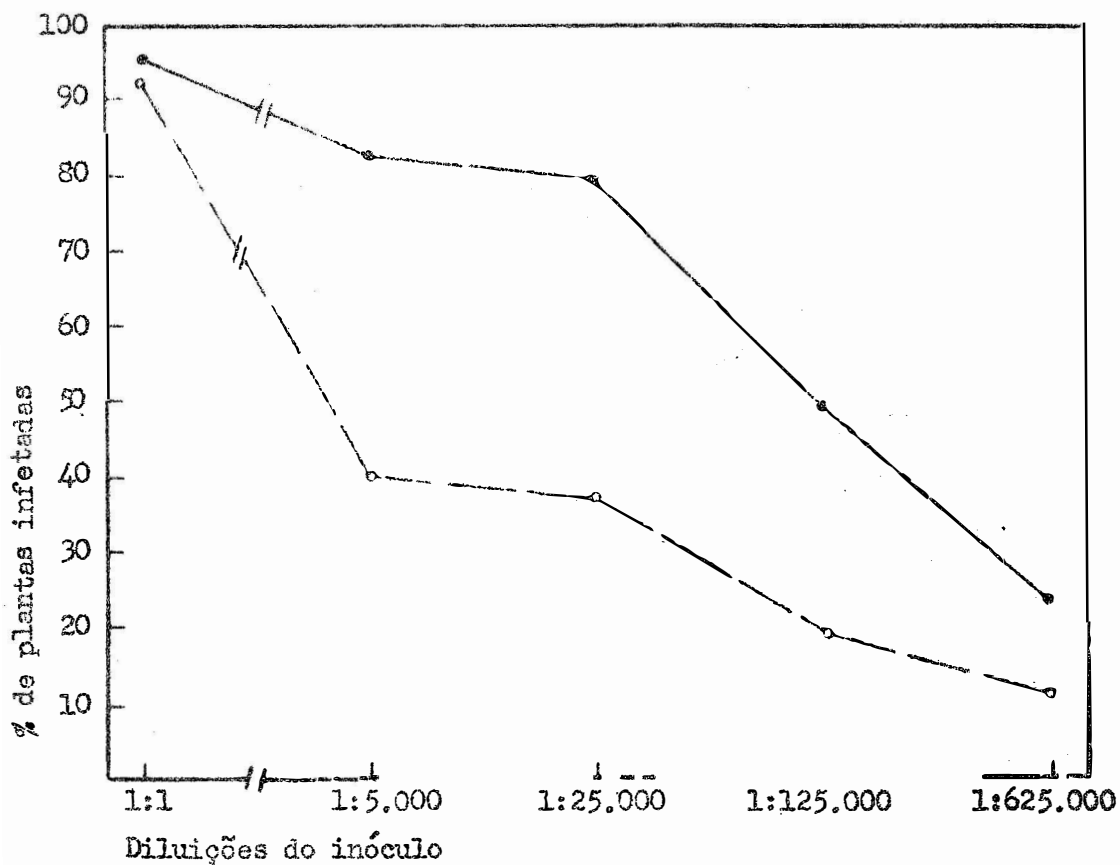


Figura 3. Comparação da suscetibilidade ao VRS de plantas-teste de capim-elefante obtidas de estacas (●—●) e de sementes (○—○), quando inoculadas por corte do cartucho foliar.

diluidos.

d. Comparação entre métodos de obtenção de plantas-teste por estacas

Duas formas de plantio de estacas foram comparadas: plantio por enterrio total e por enterrio parcial. O plantio por enterrio total foi ainda considerado em duas variações: estacas de um nó e estacas de dois nós.

As estacas para os dois grupos em comparação foram obtidas de um mesmo lote de colmos, preparando-se as amostras com quantidades aproximadamente equivalentes de estacas das porções basal e apical do colmo.

Em dois experimentos em que se compararam plantas-teste obtidas de estacas em enterrio parcial com outras obtidas de estacas de um nó, obteve-se diferença em número de plantas com sintomas, maior no primeiro grupo, em exames efetuados 20 e 30 dias após a inoculação. No primeiro exame, além disso, houve diferença em severidade de sintomas entre os dois grupos: algumas plantas do primeiro grupo manifestaram sintomas fortes, contra nenhuma do outro. Esses resultados podem ser vistos no quadro 6 e na representação gráfica, em forma porcentual, da figura 4.

A comparação do plantio em enterrio parcial com o plantio em enterrio total, de estacas de 2 nós, foi realizada entre 75 plantas de cada grupo. Os resultados obtidos estão apresentados no quadro 7 e representados graficamente na mesma figura 4, anteriormente mencionada. Pode-se observar que apenas no exame efetuado 20 dias após a inoculação se notou tendência para mais rápida manifestação de sintomas no grupo de estacas em enterrio parcial.

A realização do exame interno em plantas obtidas de estacas em enterrio total foi mais difícil do que no caso de plantas obtidas de estacas em enterrio parcial. Isto porque, naquele caso, a região do colmo a ser examinada internamente se achava enterrada no solo, sendo, em consequência, mais difícil a retirada do colmo que, além disso, necessitou lavagem.

Quadro 6. Resultados dos experimentos de comparação de plantas-teste de capim-elefante, quanto à reação ao VRS, quando obtidas de dois tipos de estacas

Sintomas	Nº de plantas correspondentes a cada um dos graus de sintomas, de um total de 45 de cada tipo de estaca, em exames internos efetuados nos dias indicados após a inoculação			
	20		30	
	Estacas de 2 nós ⁽¹⁾	Estacas de 1 nó	Estacas de 2 nós ⁽¹⁾	Estacas de 1 nó
Fraco	20	5	17	7
Mediano	4	2	10	5
Forte	2	0	6	2
Total com sintomas	26	7	33	14

⁽¹⁾ Plantio em enterrio parcial.

Quadro 7. Resultados dos experimentos de comparação da reação ao VRS de plantas-teste de capim-elefante obtidas de estacas de dois nós, plantadas de duas formas

Sintomas	Nº de plantas correspondentes a cada um dos graus de sintomas em grupos obtidos de estacas plantadas de duas formas, em exames internos efetuados nos dias indicados após a inoculação			
	20		30	
	Enterrio parcial	Enterrio total	Enterrio parcial	Enterrio total
Fraco	15	21	10	12
Mediano	7	10	13	10
Forte	17	6	12	10
Total com sintomas ⁽¹⁾	39	37	35	32

(¹) De um total de 40 plantas examinadas aos 20 dias e de 35 examinadas aos 30 dias.

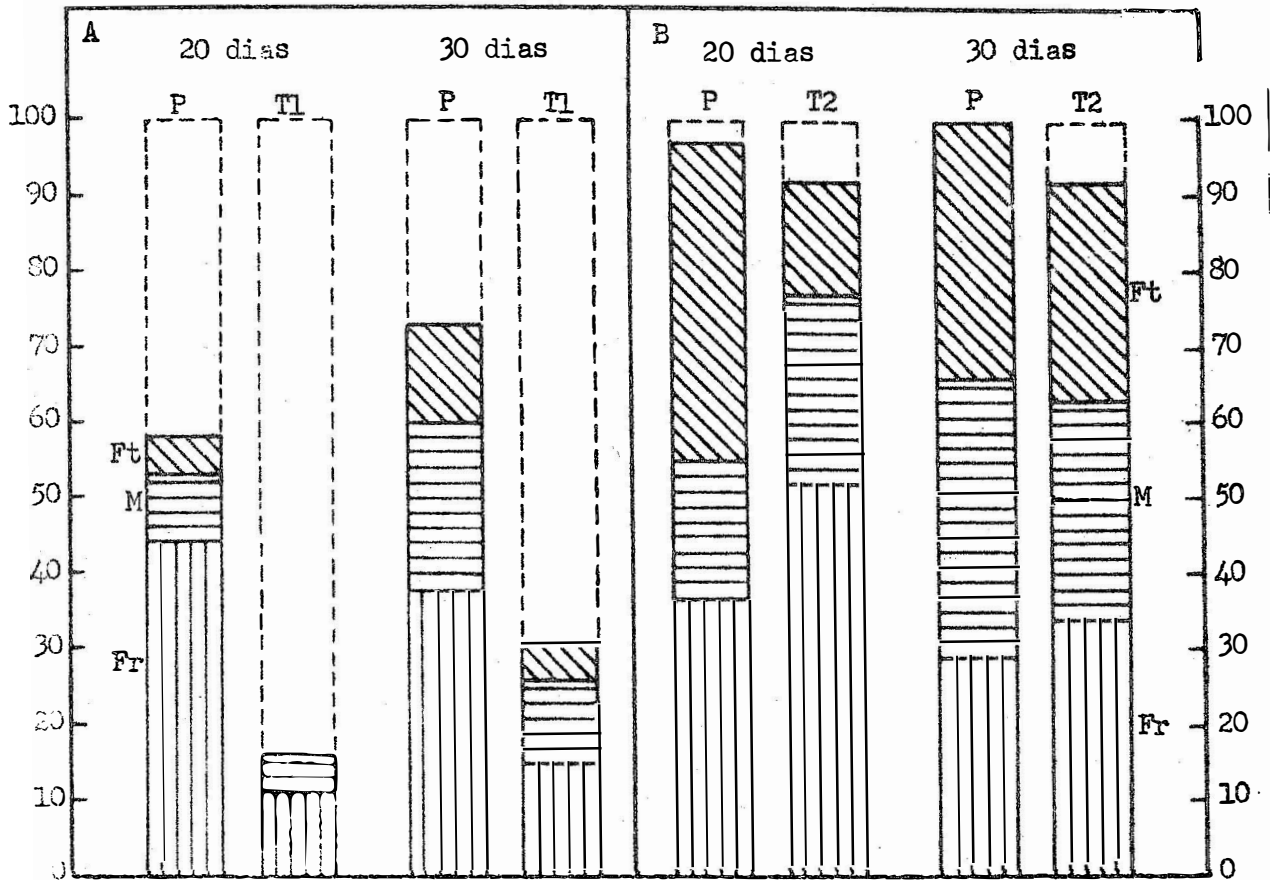


Figura 4. Porcentagens de plantas-teste de capim-elefante com sintomas do VRS em três intensidades, em relação ao total inoculado, 20 e 30 dias após a inoculação, em experimentos de comparação de tipos de estacas e forma de plantio das mesmas. A - Plantas obtidas de estacas de dois nós parcialmente enterradas (P) versus plantas obtidas de estacas de um nó, totalmente enterradas (T1). B - Plantas obtidas de estacas de dois nós: plantio em enterrio parcial versus plantio em enterrio total (T2). Fr = sintomas fracos; M = sintomas medianos; Ft = sintomas fortes.

e. Determinação da melhor faixa etária das plantas-teste para fins de diagnose

Em experimentos com plantas dos cultivares de capim-elefante Merker, Napier e Porto Rico, obtidos a partir de estacas plantadas por enterrio parcial, procurou-se averiguar qual a melhor faixa de idade para uso em testes diagnósticos. As estacas foram plantadas a intervalos de 10 dias e, as plantas obtidas, inoculadas simultaneamente. Essa inoculação foi realizada quando o lote plantado em último lugar tinha 20 dias de idade nos experimentos com os cultivares Merker e Napier, e 15 dias de idade no experimento com o cv. Porto Rico. Um exame interno foi realizado 20 dias após a inoculação e o outro, em outras plantas do mesmo lote, 10 dias mais tarde. Em cada um, examinaram-se 20 plantas.

Os resultados obtidos, em forma porcentual, estão apresentados no quadro 8. As plantas mais novas foram sempre as mais suscetíveis.

Nos cultivares Merker e Napier, as plantas de 50 dias de idade na inoculação apresentaram baixíssima suscetibilidade; na primeira variedade, também as plantas de 40 dias de idade foram pouco suscetíveis. No cv. Porto Rico as plantas das 4 idades consideradas apresentaram boa suscetibilidade. No exame efetuado aos 20 dias após a inoculação, as plantas de meia idade foram as que apresentaram maior porcentagem de plantas com sintomas; aos 30 dias houve praticamente um nivelamento de plantas com sintomas entre todos os grupos.

f. Comparação entre plantas-teste mantidas em casa de vegetação e ao ar livre, e em combinações desses ambientes em períodos pré- e pós-inoculação

Com a finalidade de se compararem plantas de capim-elefante, quanto às reações ao VRS, mantidas em casa de vegetação com outras mantidas ao ar livre, e plantas mantidas em combinações desses dois ambientes, nas fases anterior e posterior à inoculação, foram realizados 4 experimentos. As plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: períodos pré- e pós-inoculação em casa de vegetação (VV); período pré-inoculação em casa de vegetação e pós-inoculação ao ar livre (VA);

Quadro 8. Resultados dos experimentos de determinação da melhor faixa etária de plantas-teste de capim-elefante para a diagnose do VRS

Cultivares da planta-teste e idades (dias)	Porcentagem de plantas com sintomas nas intensidades indicadas ⁽¹⁾ e porcentagem total de plantas com sintomas, em exames efetuados nos dias indicados após a inoculação							
	20				30			
	Fr	M	Ft	Total	Fr	M	Ft	Total
Merker								
50	5	0	0	5	0	0	0	0
40	25	20	0	45	5	25	10	40
30	10	0	0	10	15	45	10	70
20	40	20	10	70	25	50	10	85
Napier								
50	5	25	5	35	10	5	0	15
40	20	30	25	75	25	20	25	70
30	20	10	25	55	15	40	25	80
20	10	5	15	30	25	35	15	75
Porto Rico								
45	35	0	0	35	10	40	25	75
35	55	20	0	75	15	45	10	70
25	25	50	10	85	0	40	30	70
15	25	5	0	30	20	65	5	90

⁽¹⁾ Fr = sintomas fracos; M = sintomas medianos; Ft = sintomas fortes.

período pré-inoculação ao ar livre e pós-inoculação em casa de vegetação (AV); e períodos pré-e pós-inoculação ao ar livre (AA).

Examinando-se as plantas em duas ocasiões, metade das plantas 20 dias após a inoculação e a outra metade 10 dias depois, foram obtidos os resultados apresentados no quadro 9 e representados graficamente, em forma porcentual, na figura 5. Observa-se que as plantas submetidas aos tratamentos AV e AA foram mais suscetíveis e manifestaram sintomas mais nítidos nos dois exames efetuados.

B. UTILIZAÇÃO DO TESTE DIAGNÓSTICO DO CAPIM-ELEFANTE

Estudos sobre o vírus do raquitismo-da-soqueira e sua relação com a cana-de-açúcar e outras hospedeiras, foram realizados com o auxílio do teste diagnóstico do capim-elefante. Tais estudos e os resultados obtidos são relatados a seguir.

1. Estudo das propriedades físicas do VRS

Foram estudadas as seguintes propriedades físicas do VRS; ponto final de diluição, temperatura final de inativação, longevidade in vitro e longevidade in vivo em tecidos de cana. Em cada um desses estudos, foram inoculadas 4 a 6 plantas-teste, com cada um dos inóculos a serem testados; em cada série, a ordem de inoculação seguida foi sempre do inóculo suposto menos infectivo para o mais infectivo.

a. Ponto final de diluição

Extratos de colmos maduros de cana foram diluídos a 1:5.000, a 1:25.000, a 1:125.000 e a 1:625.000, em água destilada, e foram utilizados na inoculação, juntamente com o extrato não diluído, de plantas dos cultivares Merker (3 testes), Napier (1 teste) e Porto Rico (1 teste). O número de plantas inoculadas com cada inóculo, em cada teste, foi de 10.

Os resultados obtidos, quanto à porcentagem média de plantas infectadas com os diferentes inóculos, estão representados graficamente na figura 6.

Quadro 9. Resultados totais de 4 experimentos de comparação entre plantas-teste mantidas em casa de vegetação e ao ar livre, e em combinações desses ambientes em períodos pré- e pós-inoculação, quanto à reação ao VRS

Sintomas	Nº de plantas correspondentes a cada um dos graus de sintomas, em grupos mantidos nos ambientes indicados ⁽¹⁾ , em exames efetuados nos dias indicados após a inoculação							
	20				30			
	VV	VA	AV	AA	VV	VA	AV	AA
Fraco	10	15	7	7	8	5	1	9
Mediano	17	8	18	24	7	9	6	19
Forte	2	1	16	12	9	4	26	6
Plantas com sintomas/total	29/45	24/30	41/45	43/45	24/35	18/20	33/35	34/35

VV = períodos pré- e pós-inoculação em casa de vegetação; VA = período pré-inoculação em casa de vegetação e pós-inoculação ao ar livre; AV = período pré-inoculação ao ar livre e pós-inoculação em casa de vegetação; AA = períodos pré- e pós-inoculação ao ar livre.

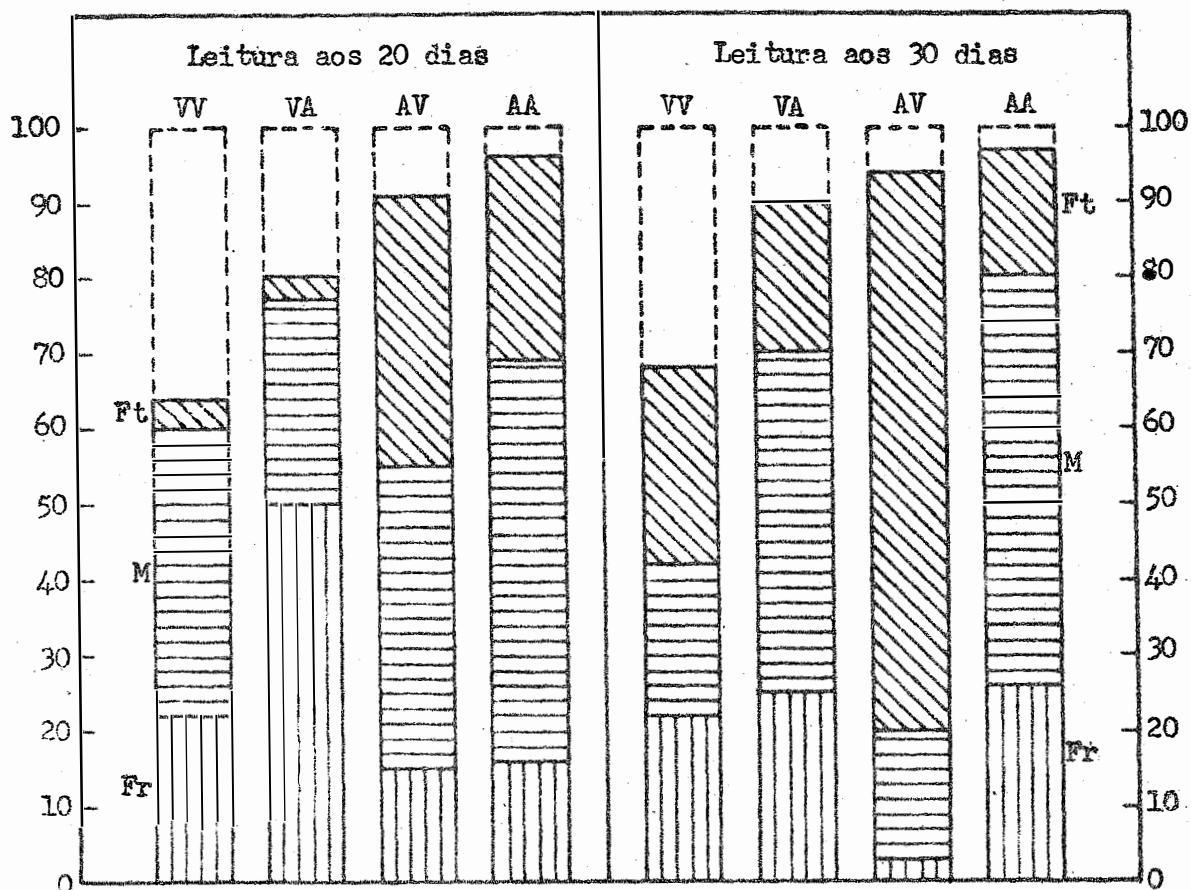


Figura 5. Porcentagens de plantas-teste de capim-elefante com sintomas do VRS em três intensidades, em relação ao total inoculado, 20 e 30 dias após a inoculação, quando mantidas em casa de vegetação e ao ar livre, e em combinações destes ambientes em períodos pré- e pós-inoculação. VV = períodos pré- e pós-inoculação em casa de vegetação; VA = período pré-inoculação em casa de vegetação e pós-inoculação ao ar livre; AV = período pré-inoculação ao ar livre e pós-inoculação em casa de vegetação; AA = períodos pré- e pós-inoculação ao ar livre; Fr = sintomas fracos; M = sintomas medianos; Ft = sintomas fortes.

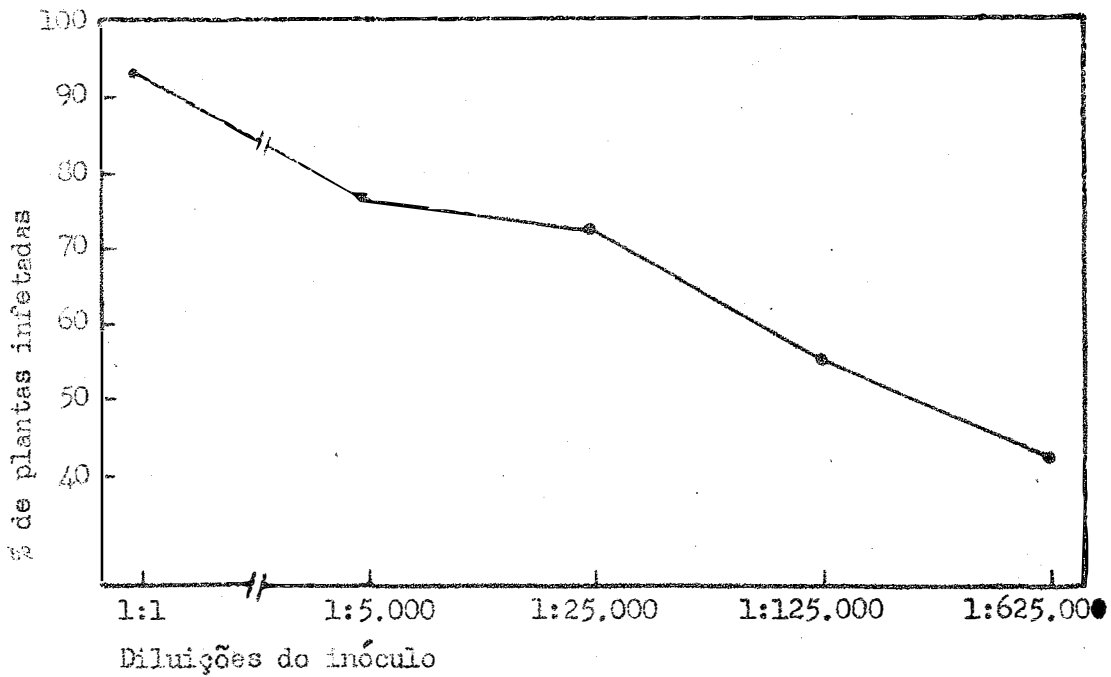


Figura 6. Porcentagens de plantas-teste de capim-elefante infetadas pelo VRS quando inoculadas com inóculos diluídos em série.

b. Temperatura final de inativação

Para o estudo da temperatura final de inativação do VRS foram consideradas duas fontes de inóculo (colmos maduros): cv. CP 44/101, mantida na Seção de Virologia, e cv. IAC 50/134, de um canavial da região de São Simão, SP. Tubinhos de vidro, com parede de espessura aproximada de 1 mm, hermeticamente fechados, comportando 1 ml de inóculo cada, foram mergulhados em água aquecida a 50, 55, 60 e 65°C. Decorridos 10 minutos, eles foram retirados e esfriados em água corrente. Procedeu-se, então, à inoculação de 6 plantas-teste com cada inóculo, incluindo o controle não aquecido, de cada variedade.

Conforme se pode ver nos dados apresentados no quadro 10, numa das preparações ainda houve alguma infectividade no inóculo tratado a 60°C, mas não no tratado a 65°C.

c. Longevidade in vitro

Colmos de cana foram colhidos em Araraquara, SP. (cvs. IAC 48/65 e IAC 51/205), São Simão, SP. (cv. IAC 50/134) e em Campinas, SP. (cv. CP 44/101) e deles extraiu-se garapas que foram armazenadas à temperatura de laboratório (18 a 29°C), à temperatura de aproximadamente 5°C, obtida em refrigerador caseiro, e à temperatura de -15°C, obtida em congelador. Após períodos de armazenamento de 3, 9, 27 e 81 dias, as garapas foram testadas quanto à infectividade, em plantas-teste de capim-elefante.

Conforme é mostrado no quadro 11, nos quatro períodos testados os inóculos armazenados à temperatura de laboratório e em refrigerador foram aproximadamente iguais em infectividade e um pouco inferior àqueles armazenados em congelador. Aos 81 dias, dos 4 inóculos testados apenas 2 inóculos e 1 inóculo, respectivamente dos grupos armazenados à temperatura de laboratório e em refrigerador, ainda mantinham a infectividade e, assim mesmo, numa forma fraca. Dos 4 inóculos armazenados em congelador, 3 mantiveram a infectividade após 81 dias de armazenamento, com um deles mantendo infectividade praticamente igual à original.

Quadro 10. Resultados dos testes para determinação da temperatura final de inativação do VRS, realizados em plantas-teste de capim-elefante

Temperatura (°C)	Nº de plantas com sintomas e intensidades médias correspondentes ⁽¹⁾ , num total de 6 inoculadas com inóculos dos cultivares de cana indicados			
	CP 44/101 ⁽²⁾		IAC 50/134 ⁽³⁾	
	Nº	I	Nº	I
Controle	6	Ft	6	Ft
50	3	M	3	M
55	1	M	3	M
60	0	-	2	Fr
65	0	-	0	-

⁽¹⁾ Ft = sintoma forte; M = sintoma mediano; Fr = sintoma fraco.

⁽²⁾ Planta mantida na Seção de Virologia.

⁽³⁾ Planta de canavial da região de São Simão, SP.

Quadro 11. Resultados dos testes realizados em capim-elefante para determinar a longevidade in vitro do VRS em ambiente de laboratório, em refrigerador e em congelador.

Locais de armazenamento e fontes de inóculo	Nº de plantas-teste com sintomas <u>in</u> <u>ternos</u> em cada 4 inoculadas com inó- culos armazenados pelos períodos <u>in</u> <u>dicados</u> (dias)			
	3	9	27	81
Laboratório (18-29°C)				
IAC 48/65	2	2	1	2
IAC 50/134	1	3	4	0
IAC 51/205	4	2	1	0
CP 44/101	1	0	3	1
Refrigerador (5°C)				
IAC 48/65	1	1	3	2
IAC 50/134	1	4	1	0
IAC 51/205	4	3	1	0
CP 44/101	1	0	0	0
Congelador (-15°C)				
IAC 48/65	1	1	1	0
IAC 50/134	2	4	3	2
IAC 51/205	4	4	3	4
CP 44/101	2	3	2	1

d. Longevidade in vivo

A longevidade in vivo do VRS em colmos de cana foi estudada armazenando-se colmos inteiros ou pedaços.

Colmos de cana colhidos em Piracicaba, SP. (cvs. CB 49/260 e IAC 50/134) e em São Simão, SP. (cvc. CB 41/76 e CB 49/260) foram testados no dia seguinte, extraíndo-se garapa de um pequeno pedaço, e depois guardados à temperatura ambiente de laboratório. Decorridos 15 e 25 dias, os mesmos colmos foram testados, também extraíndo-se garapa de um pequeno pedaço.

Os resultados obtidos estão apresentados no quadro 12. Observa-se que, colmos infetados mantiveram a infectividade praticamente inalterada por 25 dias, exceto naqueles em que houve o estabelecimento de podridões, os quais, ou perderam o vírus totalmente, ou a infectividade foi bastante diminuída.

Em outro experimento, colmos de cana dos cultivares CP 36/105, e CP 44/101 (origem: Campinas, SP.), IAC 50/134 (origem: São Simão, SP.) e IAC 51/205 (origem: Araraquara, SP.), selecionados com base nos sintomas internos, foram divididos em pedaços de um internódio, sem eliminar os dois nós laterais. Parte dos toletes de cada colmo foi tratada com aretan (6% de Hg metálico) a 2,5%. Tanto os toletes tratados como os não tratados, contidos em sacos plásticos, foram armazenados em ambiente de laboratório (18 a 29°C) e em refrigerador (5°C); em congelador (-15°C) armazenou-se apenas toletes não tratados com aretan (¹). Após períodos de armazenamento de 25 e 125 dias, as amostras foram testadas quanto à infectividade, tendo sido obtidos os resultados apresentados no quadro 13.

Considerando o número de plantas-teste infetadas e a severidade dos sintomas, cuja característica não consta no quadro, o armazenamento de toletes por 25 dias, em qualquer dos três ambientes, não acarretou perda da infectividade, exceto em um ou outro tolete, armazena-

(¹) O congelamento de toletes é tratado neste capítulo, apesar de tal tratamento não constituir realmente um armazenamento in vivo.

Quadro 12. Resultados de testes realizados em capim-elefante para determinar a longevidade in vivo do VRS, em colmos inteiros de cana armazenados em ambiente de laboratório

Cultivares de cana e número do colmo	Nº de plantas com sintomas internos em cada 4 inoculadas com suco de colmos armazenados pelos períodos indicados (dias)		
	0	15	25
CB 41/76			
1	4	4	0 ⁽¹⁾
2	4	4	0 ⁽¹⁾
3	4	4	1 ⁽¹⁾
CB 49/260			
1	3	4	2 ⁽²⁾
2	4	4	3
3	2	4	4
4	3	4	1 ⁽²⁾
5	3	4	1 ⁽²⁾
IAC 50/134			
1	2	4	4
2	3	4	4
3	4	4	3

(¹) Colmo totalmente apodrecido.

(²) Colmo com pequenas partes não apodrecidas, de onde se extraiu o inóculo.

Quadro 13. Resultados de testes realizados em capim-elefante visando verificar a longevidade in vivo do VRS em toletes de 2 gemas, tratados ou não com fungicida, e armazenados em três temperaturas

Cultivares de cana e tratamentos	Nº de plantas-teste com sintomas internos em cada 4 inoculadas com suco de toletes armazenados nas três temperaturas e pelos períodos (dias) indicados					
	25			125		
	18 a 29°C	5°C	-15°C	18 a 29°C	5°C	-15°C
CP 36/105						
com aretan	3	2	-	3	1 ⁽¹⁾	-
sem aretan	2	4	4	0 ⁽¹⁾	2 ⁽²⁾	4
CP 44/101						
com aretan	4	4	-	3	2	-
sem aretan	3	4	4	0 ⁽¹⁾	1 ⁽²⁾	4
IAC 50/134						
com aretan	1	4	-	2 ⁽²⁾	0 ⁽¹⁾	-
sem aretan	3	3	4	2 ⁽²⁾	4 ⁽²⁾	4
IAC 51/205						
sem aretan	4	2	3	3	2 ⁽¹⁾	4

(¹) Tolete totalmente apodrecido.

(²) Tolete apenas com pequena parte não apodrecida, de onde se extraiu o inóculo.

do à temperatura de laboratório, em alguns dos quais houve ligeira redução na atividade do vírus, justamente em toletes com início de podridão. Toletes armazenados por 125 dias, tanto à temperatura de laboratório, como em refrigerador, apresentaram perda acentuada da infectividade, havendo indicação de que esta seria melhor mantida em toletes tratados com aretan. Toletes armazenados em congelador, por esse período, mantiveram a infectividade num nível comparável àquele inicial.

Em outro experimento, verificou-se que também as bainhas das fôlhas podem ser guardadas em congelador por 125 dias, sem prejuízo na atividade do vírus nelas presente.

2. Reestudo do círculo de hospedeiras do VRS

Um reestudo, embora limitado, do círculo de hospedeiras do VRS, foi realizado com base em testes de recuperação do vírus para o cacapim-elefante. Essa investigação teve a finalidade de descobrir novas hospedeiras do VRS, preferivelmente que manifestassem sintomas, bem como de verificar se, das hospedeiras conhecidas, se conseguiria recuperar o vírus para o capim-elefante. Os resultados desses experimentos estão reunidos no quadro 14, e serão a seguir descritos com maiores detalhes.

Os resultados com relação a Echinochloa colonum se referem a dois testes. Plantas com 50 dias, inoculadas por corte do cartucho foliar, foram examinadas 2 meses depois, ocasião em que se fez os testes de recuperação do vírus. Todos os inóculos individuais de plantas infetadas (5 plantas com sintomas internos do tipo já descrito neste trabalho e 3 sem sintomas) mostraram-se altamente infecciosos.

Plantas de Panicum antidotale Retz., inoculadas com 2 meses de idade, contados a partir da sementeira, e examinadas 2 meses depois, apresentaram (5 em 10) certas descolorações vasculares de tonalidade marrom-avermelhada, em nós maduros. Nada se observou nas plantas-controle. Em exame efetuado, em outras plantas, 1 mês mais tarde, 9 plantas em 10 (quadro 14) apresentaram sintomas severos de descoloração vascular em nós maduros de colmos inoculados e, inclusive, de per

Quadro 14. Resultados obtidos no reestudo do círculo de hospedeiras do VRS com base em testes de recuperação do vírus para o capim-elefante

Gramíneas	Relação de plantas com sintomas internos/total de plantas, e recuperação do vírus	
	Sintomas ⁽¹⁾	Recuperação ⁽²⁾
<u>Echinochloa colonum</u> (L.) Link	13/40	+++
<u>Panicum antidotale</u> Retz.	9/10	+++
<u>P. maximum</u> Jacq. 'Sempre-verde'	10/20	+
<u>Paspalum conspersum</u> Schrad.	0/20	-
<u>P. fasciculatum</u> Willd.	0/20	-
<u>Sorghum bicolor</u> Moench.		
'A.Red.Amber'	0/6	+
'Atlas'	8/20	+++
'B. Leoti'	15/20	+++
'Dwarf Shallu'	0/10	++
'Formosa'	16/20	+++
'Jau'	0/10	+
'Mac Lean'	0/6	+
'Redbine'	14/20	++
'Sart'	23/38	+++
'Straightneck'	0/10	+
'Sumac'	0/6	+
<u>S. halepense</u> (L.) Pers.	20/40	+++
<u>Zea mays</u> L. '94-962'	0/17	+++

(¹) Nas plantas-controle não ocorreram sintomas, exceto um tipo de descoloração vascular que ocorreu em algumas plantas de S. bicolor e S. halepense mas não relacionado com o VRS, segundo o teste de recuperação.

(²) +++ = extrato altamente infeccioso; ++ = extrato medianamente infeccioso; + = extrato pouco infeccioso; - = extrato não infeccioso.

filhos laterais. Testes de recuperação do vírus realizado na ocasião desse exame deram altamente positivos para os 5 inóculos individuais de colmos de plantas inoculadas, incluindo um caso de inóculo de perfilho lateral, ainda sem sintomas.

De P. antidotale inoculado o vírus foi também recuperado para a cana. De 3 inóculos individuais, inoculados em brotos de cana crescendo a partir de toletes de 2 nós, plantados por enterrio parcial, 2 levaram à manifestação de sintomas internos de descoloração vascular, enquanto que com 2 inóculos testados de plantas-controle não houve manifestação desses sintomas. O resultado dessa leitura foi confirmado com novo teste de recuperação para o capim-elefante, a partir dessas plantas de cana.

De 20 plantas de Panicum maximum 'Sempre-verde' examinadas 50 dias após a inoculação, em 10 foram observados sintomas internos do tipo anteriormente já observado nesse capim. O vírus foi recuperado de 3 em 5 plantas testadas no capim-elefante; contudo, os inóculos se mostraram pouco infecciosos.

Em exames internos efetuados 4 a 5 meses após a inoculação não se observou nenhum sintoma interno em Paspalum conspersum Schrad., obtido a partir de sementes, e em P. fasciculatum Willd., obtido a partir de toletes. Desses dois capins não se conseguiu recuperar o vírus.

Na série de cultivares de sorgo inoculados com o VRS, confirmou-se a observação anterior deste trabalho, de que alguns deles ('Atlas', 'B. Leoti', 'Formosa', 'Jaú', 'Redbine' e 'Sart') manifestam sintomas internos do VRS em nós maduros, em forma de riscas alaranjadas a avermelhadas. Confirmou-se também que é comum observar, em plantas não infetadas com o VRS, a manifestação de sintomas de descoloração vascular semelhante àquela causada pelo VRS, porém ocorrendo apenas em nós mais basais do colmo, enquanto aquelas causadas pelo VRS ocorrem na região mediana-superior do colmo. Às vezes se notou que infecção por outros patógenos também levam à manifestação de sintomas internos confundíveis com aqueles causados pelo VRS.

Os sintomas internos do VRS em sorgo variaram de tipos poucos claros até bastante distintos, como no cv. Formosa, cujas plantas, 70 dias após a inoculação, apresentaram a região basal de nós maduros completamente tomada por uma coloração marrom.

Nos testes de recuperação do vírus para o capim-elefante, obtiveram-se resultados positivos com 30 inóculos individuais de sorgos infetados, de um total de 44 testados (2 a 5 por cultivar), embora fracamente positivos no caso de alguns cultivares (quadro 14).

Foram feitos três testes de recuperação do VRS de plantas de S. halepense, 40, 60 e 90 dias após inoculação dessas plantas por corte do cartucho nos dois primeiros, e por mergulho momentâneo de rizomas no terceiro teste. Todos os inóculos individuais de 5, 3 e 3 plantas do grupo inoculado, respectivamente dos três testes, se mostraram altamente infecciosos.

Em milho, cv. 94-962, não se conseguiu observar nenhum sintoma interno em exame efetuado 2 meses após a inoculação, esta efetuada em plantas com cerca de 40 dias de idade. Contudo, succs de plantas inoculadas provaram conter alta concentração do VRS no teste de recuperação efetuado. De 5 inóculos individuais do grupo inoculado, todos deram resultados positivos.

3. Determinação da persistência do VRS nas hospedeiras

Plantas de capim-elefante cvs. Merker e Napier foram inoculadas nas estacas e, 5 meses depois, colmos manifestando sintomas foram divididos em toletes de 1 gema e plantados. De maneira semelhante propagaram-se também as plantas-controle. Dois meses depois, efetuando-se exame interno nas novas plantas, não se conseguiu visualizar nenhum sintoma interno, tanto nas plantas do grupo anteriormente infetado como nas plantas do grupo controle. No teste de recuperação do vírus, testando-se 2 plantas de cada cultivar, ambas deram teste positivo fraco, enquanto deram negativo igual número de plantas-controle testadas. Em novo teste de recuperação, efetuado 2 meses mais tarde, em outras plantas do mesmo lote, não se conseguiu teste positivo com nenhum inóculo. As plantas de capim-elefante foram novamente propaga

das de forma igual à primeira propagação. Examinando internamente as novas plantas, 10 meses mais tarde, não se notou nelas nenhum sintoma interno. O teste de recuperação do vírus também foi negativo.

Em outro experimento, plantas dos mesmos dois cultivares foram inoculadas por corte do cartucho foliar. Um mês depois, ao se examinar os colmos inoculados, foram observados sintomas internos. Contudo, de 27 brotos laterais dessas plantas, examinadas 8 meses mais tarde, nenhum manifestou sintomas.

Em nova experiência, 3 plantas do cv. Merker, obtidas por propagação vegetativa de plantas originalmente infetadas, ao serem examinadas três e meio meses após a propagação, não manifestaram sintomas. Tampouco manifestaram sintomas as soqueiras das plantas originais, examinadas nessa ocasião.

Plantas de P. antidotale inoculadas inicialmente por corte do cartucho foliar e manifestando sintomas internos, foram multiplicadas por estacas, ensoqueiradas e novamente multiplicadas por estacas. Foram realizados exames internos e teste de recuperação do vírus nas duas fases intermediárias, e no final, tendo sempre sido observados sintomas em plantas do grupo inoculado, comprovado com testes de recuperação fortemente positivos. Entre a inoculação inicial e esse teste final decorreram 33 meses. Observou-se ainda, nas soqueiras de algumas plantas inoculadas, brotação exageradamente anormal, com brotos finos e de tamanho reduzidos, em contraposição a poucos brotos, grossos e bem desenvolvidos de plantas controles, não infetadas.

Em plantas de P. maximum 'Sempre-verde', inoculadas por corte do cartucho foliar, o VRS persistiu pelo menos até a 3ª soca. Em teste de recuperação do vírus realizado 34 meses depois da inoculação original, conseguiu-se a recuperação do vírus de 3 plantas entre 6 testadas. Testes de recuperação do vírus, realizados nas duas socas anteriores, também deram positivo. Contudo, em todos esses testes os sintomas na planta-teste foram fracos. A visualização de sintomas internos nas soqueiras de P. maximum também se mostrou difícil, ocorrendo uma ou outra com alguma descoloração vascular, não conspícua. Em nenhum caso se conseguiu recuperar o vírus das plantas-controle.

Testes de persistência do VRS realizados em S. bicolor, cvs. Atlas, B. Leoti e Formosa, demonstraram que o vírus persiste nessas plantas pelo menos até a ressoca, 10 meses após inoculação na planta original, e também persiste nos clones de plantas inoculadas, obtidas por multiplicação vegetativa. No experimento que conduziu a esse resultado, os sorgos foram inoculados por corte do cartucho foliar; 2,5 meses depois, o colmo inoculado foi dividido em estacas de uma gema, as quais foram plantadas. Três meses e meio mais tarde, fez-se o teste de recuperação do vírus das novas plantas e também das socas das plantas originais. De ambos os tipos de plantas conseguiu-se a recuperação do vírus. Examinando as plantas internamente, antes do teste de recuperação do vírus, verificou-se a ocorrência dos sintomas internos característicos de cada variedade, observados nas inoculações anteriores.

4. Estudos quanto à distribuição do VRS na planta de cana

Foram realizados 3 experimentos visando verificar a distribuição do VRS na planta de cana. Sucos de folha (sem a nervura principal), de bainha, do tecido apical do colmo, do nó maduro, do internódio e das raízes, foram extraídos em água destilada, na proporção de 1 g de tecido para 5 ml de água (diluição 1:5). Em seguida, foi feita uma diluição a 1:25.000 com cada um destes inóculos, após o que, foram feitas as inoculações em plantas-teste de capim-elefante.

O VRS foi encontrado em elevadas concentrações nas diferentes partes da planta, embora nos dois primeiros testes não tenha sido conseguido resultado positivo com inóculos da folha e da região apical do colmo, conforme se pode ver no quadro 15.

5. Realização de levantamentos de campo

Colmos maduros de cana, colhidos ao acaso, em viveiros e canaviais de algumas propriedades canavieiras do Estado, foram utilizados para estudos de comparação da diagnose, pela observação dos sintomas internos na própria cana, com a diagnose pelo teste do capim-elefante. Consequentemente, foi feita determinação do nível de incidência do

Quadro 15. Resultados de testes efetuados para verificar a distribuição do VRS nos diferentes tecidos de planta de cana.

Inóculos extraídos dos tecidos indicados	Nº de plantas-teste com sintomas internos sobre nº total de plantas inoculadas, em três testes, com os inóculos nas concentrações indicadas					
	1:5			1:25.000		
	1	2	3	1	2	3
Lâmina foliar	0/6	0/10	5/10	0/6	0/10	5/10
Bainha	4/6	-	5/5	1/6	-	6/9
Região apical do colmo	0/6	0/10	6/8	0/6	0/10	5/6
Nó maduro	3/6	7/10	-	2/6	0/10	-
Internódio maduro	5/6	5/10	5/5	1/6	1/10	3/5
Raízes	-	4/10	8/10	-	3/10	7/10

VRS nos lotes amostrados.

Em todos esses estudos, os colmos coletados como amostras, cada um representando uma planta, foram utilizados para testes individuais em capim-elefante. A garapa de cada colmo foi testada num mínimo de 4 plantas-teste.

a. Comparação entre a diagnose pela observação dos sintomas internos na cana e a diagnose por meio de teste em capim-elefante

Foi realizado uma investigação visando estudar comparativamente, para fins de levantamento de campo, a diagnose do raquitismo-da-soqueira pela observação direta dos sintomas, com a diagnose por meio de teste em capim-elefante. Nesse estudo foram considerados os cultivares de cana CB 41/76, CB 46/47, CB 49/260, IAC 48/65 e IAC 50/134. As amostras foram colhidas de canaviais e de viveiros, estes compreendendo os primários, os secundários, os terciários e os de ordem superiores, assim chamados conforme formados com toletes tratados termicamente (primários) ou pela multiplicação sucessiva desse viveiro inicial.

Observa-se no quadro 16, onde estão os resultados obtidos nesses estudos, que: (a) a visualização de sintomas internos, em canas infetadas de lotes recém tratados termicamente, foi praticamente impossível nos diversos cultivares, havendo relativamente grande número de casos em que as canas apresentaram descolorações vasculares, embora em forma não muito conspícua, e que o teste diagnóstico não acusou a presença do vírus (cv. CB 49/260 e IAC 50/134); (b) em lotes de cana tratada há mais tempo houve a possibilidade de visualização de sintomas em maior porcentagem dos colmos infetados, tendo sido maior essa porcentagem no cv. IAC 50/134, menor cvs. CB 49/260 e IAC 48/65 (nos quais houve também grande proporção de ocorrência de sintomas na cana não confirmadas pelo teste) e nulo no cv. CB 41/76; (c) em canas de canaviais, na maioria dos colmos infetados puderam ser notados sintomas internos bem conspícuos, exceto no cv. CB 46/47, ou seja: 70% de colmos infetados do cv. CB 41/76, 67% do cv. CB 49/260 e 97% do cv.

Quadro 16. Diagnóse do raquitismo-da-soqueira: comparação entre a diagnóse pela observação dos sintomas internos na cana e a diagnóse pelo teste no capim-elefante

Cultivares de cana	Total de colmos examinados, nº destes nos quais se observaram sintomas internos do VRS, e nº de colmos que deram teste positivo, em três grupos de amostras								
	Viveiros primários e secundários ⁽¹⁾			Viveiros terciários ou ordens superiores ⁽²⁾			Canaviais		
	Total de colmos	Colmos com sint ⁽³⁾	Teste posit.	Total de colmos	Colmos com sint.	Teste posit.	Total de colmos	Colmos com sint.	Teste posit.
CB 41/76	40	0	11	25	0	14	69	17(2)	30
CB 46/47	15	0	4	-	-	-	64	4(3)	27
CB 49/260	45	(3)	7	39	9(3)	21	68	35	53
IAC 48/65	25	0	11	34	6(5)	15	-	-	-
IAC 50/134	40	5(8)	15	32	25(1)	31	64	56	58

- ⁽¹⁾ Viveiros formados com toletes tratados termicamente ou com canas destes viveiros.
- ⁽²⁾ Viveiros formados com canas de segunda ou ordens superiores de multiplicação de cana inicialmente tratada termicamente.
- ⁽³⁾ Os números entre parêntesis se referem a colmos tidos como apresentando sintomas mas que no teste diagnóstico deram resultados negativos; os outros colmos com sintomas deram todos resultados diagnósticos positivos.

IAC 50/134.

Com relação aos sintomas em capim-elefante foi possível notar os seguintes fatos: (a) canas com sintomas conspícuos sempre causaram sintomas fortes em capim-elefante; (b) canas infetadas de canaviais, porém sem sintomas, causaram sintomas mais fortes do que canas semelhantes, de viveiros, principalmente daqueles recém tratados termicamente, cujas canas, em geral provocaram sintomas bastante fracos.

b. Levantamentos em canaviais comerciais

Os resultados dos testes diagnósticos realizados, com amostras de canaviais de Jaú, Lençóis Paulista, Piracicaba, São Simão e Sorocaba, estão apresentados no quadro 17. Observa-se pelos dados expostos neste quadro, que o grau de infecção pelo vírus nos canaviais amostrados foi sempre superior a 30%, a maior parte caindo na faixa de 50 a 100% de infecção.

Considerando os cultivares amostrados em maior número de propriedades, o CB 49/260 e o IAC 50/134 em geral apresentaram níveis bastante altos de infecção, enquanto o cv. CB 41/76 e o cv. CB 46/47 apresentaram níveis relativamente mais baixos.

c. Levantamentos em viveiros de cana para plantio

Os resultados dos testes diagnósticos realizados com amostras colhidas em viveiros de 3 usinas (Barra Grande de Lençóis, Lençóis Paulista; São Geraldo, Sertãozinho; e Tamoio, Araraquara) e em viveiros de 3 estações experimentais distribuidoras de mudas (Cooperativa Central dos Produtores de Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo, Dumont e Sertãozinho; Instituto do Açúcar e do Álcool, Araras; Instituto Agrônomo, Piracicaba), estão apresentados no quadro 18.

Os dados foram reunidos por tipos de viveiros, a saber: (a) viveiro formado com toletes tratados termicamente com água quente (primário); (b) viveiro de primeira multiplicação de cana originária de toletes tratados termicamente (secundário); e (c) viveiro de segunda ou ordem superior de multiplicação de cana originária de toletes tratados termicamente (terciário ou superiores). Os dados desses três

Quadro 17. Resultados dos levantamentos para avaliação da incidência do VRS nos canaviais do Estado, realizados por meio de testes diagnósticos em capim-elefante

Cultivares de cana	Nº total de canas testadas e porcentagem de infecção em amostras de cana coletadas nas localidades indicadas									
	Jauí		Lençóis Paulista		Piraicaba		São Simão		Serrana	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
GB 38/22	10	30	-	-	-	-	-	-	-	-
40/69	15	33	-	-	-	-	-	-	5	100
40/77	10	50	-	-	-	-	-	-	-	-
41/76	20	30	24	50	10	60	15	33	-	-
45/155	-	-	34	30	-	-	-	-	-	-
46/47	-	-	42	38	-	-	-	-	20	50
49/260	10	70	18	72	15	100	20	70	-	-
56/20	-	-	20	60	-	-	-	-	-	-
IAC 50/134	-	-	23	87	15	100	20	90	-	-
Ignorado	-	-	20	100	-	-	-	-	-	-

Quadro 18. Resultados dos levantamentos para avaliação da incidência do VRS em viveiros de cana de usinas e estações experimentais do Estado, realizados por meio de testes diagnósticos em capim-elefante

Cultivares de cana	Nº total de canas testadas e porcentagens de infecção em amostras de três tipos de viveiros					
	Primário ⁽¹⁾		Secundário ⁽²⁾		Terciário ou superior ⁽³⁾	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
CB 36/24	-	-	-	-	5	80
40/13	-	-	10	30	-	-
40/69	-	-	5	20	5	80
41/14	10	10	-	-	25	32
41/76	30	26	10	30	35	74
45/155	20	45	-	-	-	-
46/47	-	-	15	27	-	-
49/260	40	17	25	28	45	58
56/20	20	20	-	-	-	-
Co 740	10	70	-	-	-	-
IAC 48/65	10	80	15	20	30	50
50/134	40	30	20	30	45	98
51/201	-	-	10	30	-	-
51/205	10	60	-	-	15	73
52/326	-	-	-	-	15	40
NA 56/62	-	-	10	30	25	12

(¹) Viveiros formados com toletes tratados termicamente.

(²) Viveiros de primeira multiplicação de cana obtida em viveiros primários.

(³) Viveiros de segunda ou ordem superiores de multiplicação de cana obtida em viveiros primários.

tipos de viveiros não são, contudo, comparativos, visto que não representam multiplicações em série de um mesmo material original.

Conforme se pode ver no quadro citado, os viveiros formados com toletes tratados termicamente apresentaram infecção pelo VRS em nível relativamente elevado, se bem que, nos testes, a infectividade das canas infetadas em geral tenha sido baixa. Considerando as amostras isoladamente, a amplitude de variação do nível de infecção foi de 10 a 80%. De um total de 14 viveiros amostrados, 7 apresentaram nível de infecção inferior a 25%, 4 de 25 a 50% e 3 acima de 50%.

De viveiros de primeira multiplicação de material originalmente tratado foram coletadas 13 amostras, sendo que 7 apresentaram nível de infecção inferior a 25% e 6 de 25 a 50% de infecção.

De viveiros terciários ou superiores, foram coletadas 23 amostras. A amplitude de variação do nível de infecção encontrada foi de 5 a 100%. Quatro viveiros apresentaram nível de infecção inferior a 25%, outros quatro apresentaram de 25 a 50% de infecção e 15 apresentaram infecção superior a 50%.

6. Eleição de plantas matrizes sadias

A possibilidade da indexação de plantas de cana com o auxílio do teste diagnóstico do capim-elefante, para se dispor de plantas matrizes comprovadamente isentas do VRS, as quais são, obviamente, de enorme interesse, vem sendo estudada.

Em viveiros de clones de cana tratada termicamente foram colhidos 5 colmos dos cultivares CB 41/14, IAC 48/65, IAC 51/205, IAC 52/326 e NA 56/62 e 10 colmos dos cultivares CB 41/76 e CB 49/260. De um pequeno pedaço de cada um extraiu-se o suco que foi testado individualmente em capim-elefante. Logo após a inoculação das plantas-teste, os colmos foram divididos em toletes de 2 gemas, os quais foram plantados no campo, individualizando-se cada um. Para se dividir o colmo em toletes, o podão foi cuidadosamente desinfestado após o corte de cada colmo.

Um mês mais tarde, quando se fez a leitura do teste diagnóstico, todas as plantas originárias de colmos que deram teste positivo

foram eliminadas. Restaram então: 2 clones do cv. CB 41/14, 2 do cv. IAC 48/65, nenhum do cv. IAC 51/205, 2 do cv. IAC 52/326, 3 do cv. NA 56/62, 2 do cv. CB 41/76 e 1 do cv. CB 49/260.

Decorrido um ano, das plantas restantes coletou-se amostras (colmo) de uma touceira representativa de cada clone, e fez-se novo teste diagnóstico em capim-elefante. Esse teste indicou que, 1 clone do cv. CB 41/14, 2 do IAC 48/65, 1 do IAC 52/326, 1 do NA 56/62 e 1 do CB 41/76, estavam infetados pelo VRS.

Novo teste diagnóstico foi realizado 3 meses depois, coletando-se amostras (1 colmo e respectivas bainhas foliares) de outras touceiras, que não aquelas anteriormente testadas, dos clones que se mostraram infetadas no teste anterior. Extratos do colmo e das bainhas correspondentes foram testados isoladamente. Tanto os inóculos dos colmos como das bainhas se mostraram infectivos, exceto do colmo do cv. NA 56/62 que deu teste negativo, apesar do extrato da bainha correspondente ter dado positivo. Portanto, restaram finalmente: 1 clone do cv. CB 41/14 (5 touceiras), 1 do cv. IAC 52/326 (4 touceiras), 2 do cv. NA 56/62 (10 touceiras), 2 do cv. CB 41/76 (5 touceiras), e 1 do cv. CB 49/260 (3 touceiras). Essas canas serão utilizadas em experimentos e multiplicadas para eventual distribuição a interessados.

V. DISCUSSÃO

Os resultados dos estudos de hospedeiras vieram confirmar a hipótese inicial de trabalho de que haveria possibilidade de serem encontradas hospedeiras do VRS que manifestam sintomas. Dentre as encontradas, o Pennisetum purpureum (capim-elefante) foi aquele no qual os sintomas foram os mais nítidos e apareceram em tempo mais curto. Embora não excluindo a possibilidade de se encontrarem outras gramíneas melhores indicadoras do VRS do que esse capim, e embora prosseguindo com os estudos neste sentido, o capim-elefante foi mais demoradamente estudado. Verificou-se, então, que ele realmente é bastante adequado como planta-indicadora do VRS.

Não há dúvida de que os sintomas internos observados no capim-elefante estão associados ao VRS, como provaram os testes de recuperação efetuados. A menor intensidade dos sintomas em plantas-teste de cana infetadas com o vírus vindo do capim-elefante, em relação aos sintomas de plantas-teste de cana infetadas com o vírus vindo da própria cana, parece não se relacionar com seleção de estirpes no capim-elefante, mas sim com diminuição na concentração do vírus. Verificou-se que, após multiplicação em cana, do vírus vindo do capim-elefante, os sintomas voltaram a níveis comparáveis em novo teste realizado. Outros fatos vieram a dar evidências de que o VRS tem dificuldades em se multiplicar e se manter no capim-elefante. Inoculando-o por corte do cartucho foliar, os sintomas apareceram apenas nos nós do ponto inoculado e não em nós mais velhos ou mais novos e tampouco em perfilhos laterais não inoculados. Além disso, constatou-se que o vírus tende a desaparecer da planta inoculada, raramente persistindo em clones de planta originalmente infetada.

Em estudos comparativos de cultivares de capim-elefante quanto à suscetibilidade ao VRS, constatou-se a ocorrência de variação em suscetibilidade à infecção e na conspicuidade dos sintomas. Dentre os estudados, os cultivares Merker, Napier e Porto Rico foram considerados satisfatórios como plantas indicadoras do VRS, por apresentarem alta suscetibilidade e manifestação de sintomas bem conspícuos. Não se pode excluir a possibilidade da existência de cultivares melhores do que estas ou, por outro lado, cultivares imunes ou que apresentem o vírus em forma latente, dado o grande número de cultivares existentes.

Os diferentes cultivares ou clones de capim-elefante em cultivo comercial são em geral conhecidos pela denominação comum de Napier, apesar de não serem especificamente o cv. Napier estudado no presente trabalho. Esse fato, aliado à existência de cultivares inadequados como indicadores do VRS, torna necessária a recomendação para que, quando se pretender a realização de testes diagnósticos do raquitismo-da-soqueira com o capim-elefante, sejam feitos testes preliminares para verificar se, dentre os cultivares existentes no local, algum é

bom indicador; ou, então, pode-se introduzir cultivares já testados e aprovados.

Dentre os diversos métodos de inoculação do VRS, estudados em capim-elefante, apenas o de fricção das folhas se mostrou totalmente ineficiente. Este método coloca o vírus apenas nas células superficiais, enquanto os outros testados colocam o vírus em contáto com tecidos internos da planta e, possivelmente, em contáto com o sistema vascular, por onde deve ocorrer a infecção. Em estudos anteriores realizados em cana e outras gramíneas, os resultados foram semelhantes (STEINDL, 1950; 1955; HUGHES & STEINDL, 1955; WEHLBURG, 1956; STEIB & FORBES, 1957; ANÔNIMO, 1962; STEIB, 1965). Tais fatos, aliados à sintomatologia, sugerem uma associação íntima do VRS com os tecidos vasculares da planta.

Dos métodos de inoculação que possibilitaram infecção, o que provou ser mais apropriado para testes diagnósticos do VRS foi o de corte do cartucho foliar, cujo método foi desenvolvido no presente estudo. Este método mostrou ser altamente eficiente, simples e prático. Além disso, para a sua aplicação não há necessidade de muito inóculo (aproximadamente 0,5 ml é suficiente para a inoculação de 4 a 6 plantas) e a leitura dos sintomas pode ser feita em tempo relativamente curto (20 a 30 dias).

Os métodos que colocaram o VRS em contacto com tecidos internos das plantas hospedeiras proporcionaram alta porcentagem de infecção. Esse fato sugere que a reinvestigação do círculo de hospedeiras desse vírus, empregando-se tais métodos, talvez possa indicar a existência de outras hospedeiras, com ou sem manifestação de sintomas, inclusive entre as dicotiledôneas. Os resultados negativos de trabalhos anteriores (HUGHES & STEINDL, 1955; SCHEXNAYDER, 1956; SHEFFIELD, 1959) podem terem sido devidos à falha na inoculação.

Nos experimentos realizados com o capim-elefante verificou-se grande diferença, quanto à rapidez na manifestação de sintomas, entre plantas-teste obtidas de estacas de um nó e plantas-teste obtidas de estacas de dois nós, quando estas foram plantadas por enterrio parcial. Nestas, os sintomas apareceram mais rapidamente. Quando pelas

duas técnicas de plantio se plantou estacas semelhantes, de dois nós, essa diferença foi observada apenas no grupo de plantas examinadas 20 dias após a inoculação e, assim mesmo, em menor grau. Talvez, se fosse realizado um exame interno mais cedo, pudesse ser notado maior diferencial; todavia, não teria interesse prático, visto que a manifestação de sintomas não seria plena, o que só ocorre de 20 a 30 dias após a inoculação.

Notou-se que os colmos das plantas de estacas de enterrio parcial apresentaram os tecidos internos mais amadurecidos que os de plantas de estacas em enterrio total, como foi verificado por BENDA (1969) para a cana-de-açúcar. Portanto, o aparecimento mais rápido de sintomas do VRS no capim-elefante, deve também ter relação com o amadurecimento da planta. A grande diferença observada no teste em que se comparou plantas obtidas de estacas de dois nós com outras obtidas de estacas de um nó apenas, provavelmente foi devido ao favorecimento adicional do amadurecimento pelo crescimento mais rápido do broto na estaca de dois nós.

O plantio em enterrio total, além de ser inferior quanto à rapidez na manifestação de sintomas, ainda apresenta outros inconvenientes. Quando a planta é inoculada no melhor estágio para a manifestação de sintomas, há necessidade de se realizar o exame na parte mais inferior do broto inoculado, no ponto próximo à união com a estaca de plantio. No caso de estacas totalmente enterradas essa região fica enterrada; devido a isso, há dificuldade em se destacar o broto da estaca original e ele vem sujo de terra, havendo necessidade de lavagem antes do exame interno.

Plantas-teste obtidas de estacas parcialmente enterradas também se mostraram mais apropriadas do que aquelas obtidas de sementes. Elas se formam mais rapidamente, há disponibilidade de estacas praticamente o ano todo, as plantas são mais suscetíveis e permitem exame interno mais fácil.

Verificou-se que o envelhecimento das plantas-teste de capim-elefante tornam-as pouco suscetíveis ao VRS. Para se obter bons resultados diagnósticos, portanto, a inoculação deve ser realizada em plan

tas novas. Observou-se que existe uma relação entre a maturidade das plantas no momento da inoculação e a rapidez na manifestação dos sintomas: as plantas inoculadas com meia idade apresentaram alta porcentagem de plantas com sintomas 20 dias mais tarde, enquanto que as plantas mais novas vieram a apresentar porcentagens equivalentes somente 30 dias após a inoculação.

Testes diagnósticos do VRS em capim-elefante podem ser realizados ao ar livre, com resultados comparáveis ou até melhores do que quando realizados em casa de vegetação, nas condições de Campinas. Como se admite que não existem vetores aéreos do VRS (STEINDL, 1961), a realização de testes diagnósticos em ambiente aberto, sem nenhuma proteção é perfeitamente admissível, desde, naturalmente, que não haja limitação de ordem meteorológica.

As plantas conduzidas em casa de vegetação são, obviamente, mais tenras do que aquelas conduzidas ao ar livre, as quais se tornam lenhosas rapidamente. O fato de que os sintomas manifestaram tendência de aparecerem mais rapidamente em plantas conduzidas fora da casa de vegetação, vem reforçar a hipótese acima postulada de que o aparecimento dos sintomas tem relação com o amadurecimento da planta.

Era fato estabelecido que a máxima diluição infectiva do VRS seria em torno de 1:25.000, determinação esta feita por HUGHES (1957). Posteriormente, contudo, EL-BANNA *et al.* (1967) relataram terem conseguido infetar plantas de cana com inóculo diluído a 1:100.000 e SINGH & RAO (1968) com inóculo diluído a 1:1.000.000. No presente trabalho, verificou-se que o ponto final de diluição do VRS se situa acima de 1:625.000, e provavelmente acima de 1:1.000.000, confirmando-se portanto, os resultados dos últimos autores. Nas altas diluições, além de menor número de plantas infetadas, ainda os sintomas foram comparativamente bem fracos.

A tolerância a altas diluições e a facilidade na transmissão mecânica, características do agente causal do raquitismo-da-soqueira já conhecidas e confirmadas no presente estudo, permitem indiretamente supor que o agente patológico da doença considerada seja realmente um vírus, como supõem a maioria dos autores (STEINDL, 1950; HUGHES &

STEINDL, 1955; FORBES et al., 1960; GILLASPIE, Jr. et al.; 1966; GILLASPIE, Jr. 1970a), e não um organismo do tipo micoplasma, conforme a suposição de KHURANA (1972) e de PLAVSIC-BANJAC & MARAMOROSCH (1972). Segundo revisão feita por HULL (1971), os organismos do tipo micoplasma conhecidos como causadores de doenças em plantas não apresentam aquelas características; nos poucos casos relatados de transmissão mecânica (HAMPTON et al., 1969; LIN et al., 1970; PEREIRA & OLIVEIRA Jr., 1971), esta transmissão foi feita a partir de culturas do organismo crescendo em meios artificiais e não diretamente a partir de suco de plantas infetadas. Por outro lado, na maioria dos casos estudados, segundo a mesma revisão de HULL (1971), aqueles organismos são sensíveis a antibióticos do grupo das tetraciclina. GILLASPIE, Jr. (1970a) e STEIB & TANTERA (1970) verificaram que o raquitismo-da-soqueira não é sensível a tais antibióticos. Além disso, em todos os casos conhecidos (HULL, 1971) os organismos do tipo micoplasma foram observados ocorrendo no floema e não no xilema, enquanto que PLAVSIC-BANJAC & MARAMOROSCH (1972) observaram os corpúsculos, que eles consideraram como do tipo micoplasma, ocorrendo apenas no xilema.

A temperatura final de inativação do VRS, determinada em plantas-teste de capim-elefante, foi superior àquela verificada por FARRAR (1957a), nos dois testes realizados. Nestes testes, por sua vez, um valor foi superior ao outro. Talvez essas diferenças não sejam significativas. Porém, é admissível que diferentes isolados possam diferir quanto à suscetibilidade ao calor, conforme já foi observado por SCHEXNAYDER (1956).

A longevidade in vitro do VRS, à temperatura ambiente e em refrigerador (5°C), verificada no presente estudo, é bem maior do que aquela determinada por FARRAR (1957a) e por HUGHES (1957). Essa diferença pode ser devida às condições de armazenamento, à sensibilidade da planta-teste, ou à flora microbiana presente no caldo. O segundo autor relatou que o vírus pode sobreviver pelo menos por 138 dias a aproximadamente -20°C, embora decrescendo acentuadamente a infectividade após 80-97 dias de armazenamento. No presente estudo, verificou-se que pelo menos 81 dias a -15°C o vírus mantém a infectividade num ní-

vel comparável ao inicial; portanto, também nesta temperatura a longevidade in vitro do VRS pode ser considerada maior do que anteriormente se relatou.

In vivo, o VRS permanece com alta infectividade enquanto o tecido se mantém em bom estado de conservação. O armazenamento de toletes em congelador possibilita uma ótima conservação, pelo menos por 125 dias, e possivelmente por mais tempo, para fins de teste diagnóstico.

Com base em testes de recuperação do VRS para plantas-teste de capim-elefante, comprovou-se resultados de outros pesquisadores, que determinaram como sendo hospedeiras do VRS os capins Echinochloa colonum, Panicum maximum, Sorghum bicolor, S. halepense e Zea mays (STEINDL, 1955; 1957; WEHLBURG, 1956; STEIB & FORBES, 1957). Contudo, se estes investigadores não conseguiram observar nenhum sintoma nessas hospedeiras, exceto WEHLBURG que notou redução no crescimento de sorgos inoculados, na presente investigação puderam ser notados sintomas internos nas hospedeiras acima citadas, exceto no milho.

Em S. bicolor e em S. halepense é preciso cuidado no reconhecimento dos sintomas internos causados pelo VRS, pois que só têm valor diagnóstico aqueles ocorrendo nos nós da parte mediana-superior do colmo. Descolorações em nós basais podem ocorrer normalmente em plantas não infetadas.

Além do capim-elefante, mais uma outra hospedeira do VRS foi descoberta: o Panicum antidotale. Esta hospedeira também manifesta sintomas internos de descoloração vascular quando infetada pelo VRS, porém são sintomas menos conspícuos do que no capim-elefante. O vírus foi recuperado desse Panicum com bastante facilidade para o capim-elefante, e também para a cana, indicando que apresenta suco altamente infeccioso.

Em capim-elefante verificou-se que o VRS tem pouco poder invasivo, tendo dificuldade de nele se estabelecer sistemicamente. O vírus tende a desaparecer da planta infetada, raramente persistindo por mais de um ciclo vegetativo. Em P. antidotale, P. maximum e S. bicolor, contudo, o VRS persistiu por dois ou mais ciclos vegetativos, tanto nas socas como nos clones propagados por meio de estacas. Segundo a

literatura, Imperata cylindrica (L.) Beauv. e Sporobolus capensis (Willd.) Kunth., foram as duas únicas hospedeiras nas quais se constatou que o VRS persiste pelo menos por dois anos (HUGHES, 1958).

Verificou-se que o VRS ocorre aproximadamente na mesma concentração em qualquer parte da planta de cana, em um dos testes. Contudo, em dois deles, os extratos de folhas e da parte apical do colmo não foram infecciosos. Mesmo na literatura os resultados apresentados não são muito concordantes. Assim, HUGHES (1957) verificou que a concentração do VRS era baixa nos tecidos imaturos e nas raízes. EL-BANNA et al. (1967) chegaram a resultado semelhante no que diz respeito às raízes. GILLASPIE, JR. (1970b), contudo, verificou que o extrato de raízes não era infeccioso. Talvez as diferenças observadas sejam devidas ao modo de extração do inóculo ou à condição de maturidade dos tecidos.

O conhecimento de que o VRS se distribui praticamente na mesma concentração em todos os tecidos da planta, pelo menos naqueles maduros, permite que se conclua que, em testes diagnósticos, uma pequena amostra de qualquer tecido seja bastante representativa de toda a touceira. Levantamentos de campo em canaviais e em viveiros de mudas, e indexação de plantas matrizes sadias, ambos por meio de testes diagnósticos no capim-elefante, vêm sendo realizados partindo-se daquela premissa, com bons resultados.

Os resultados dos levantamentos para determinação da incidência do VRS nos canaviais do Estado estão confirmando a suposição de que esse vírus está largamente disseminado e deve, portanto, ser responsável por elevadas perdas anuais na produção. Em viveiros de muda verificou-se que, mesmo naqueles formados com toletes tratados termicamente, o grau de infecção pelo VRS é relativamente alto, e mais alto ainda no viveiros de segunda ou ordens superiores de multiplicação do material originalmente tratado termicamente. Como consequência, os canaviais só podem mesmo apresentar as elevadas incidências do VRS que vêm sendo constatadas.

Realização de tratamento térmico sem o devido cuidado em seguir as exatas condições recomendadas ou tanques de más condições técnicas

podem ser os fatores responsáveis pela baixa eficiência na eliminação do vírus. A eliminação dessas falhas e a adoção de um programa de re-tratamento anual de cana tratada no ano anterior (STEINDL, 1961; CHU et al., 1959) são medidas que talvez conduzam a um melhor controle da moléstia. Contudo, é de se supor que a completa eliminação do vírus desses materiais de plantio dificilmente seria conseguida, visto que, está constatado que o tratamento térmico, mesmo executado nas melhores condições possíveis, não é de total eficiência (STEINDL, 1955; 1961; HUGHES et al., 1964; LÓPEZ-ROSA & ADSUAR, 1970). Em consequência, após algumas multiplicações clonais de cana tratada, a incidência do vírus volta a níveis mais altos, devido à disseminação mecânica que ocorre, nas fases de multiplicação, a partir das plantas que restaram doentes.

Uma medida de controle que merece investigação é a indexação anual de plantas sadias e multiplicação cuidadosa das mesmas, formando, assim, viveiros de cana total e comprovadamente sadia. Um programa como esse poderia ser conduzido no âmbito de uma estação distribuidora de mudas que então poderia realmente assegurar a boa sanidade das mesmas. O tratamento térmico seria, então, restringido para uso esporádico e em pequena escala, quando por alguma razão se fizer necessário.

As canas infetadas dos viveiros de cana recém tratada termicamente, ou dos primeiros clones destas, apresentaram sucos pouco infectivos, em comparação com sucos de canas infetadas de canaviais, as quais, ou nunca sofreram tratamento térmico, ou tinham sido tratadas há muito tempo. Além disso, em lotes recém tratados termicamente, foi praticamente impossível a visualização de sintomas internos em colmos infetados. Tais fatos são sugestivos de que as canas que restam doentes após o tratamento térmico apresentam baixa concentração do vírus, ou nelas persistem estirpes menos infectivas e que provocam sintomas mais fracos, tanto na cana como no capim-elefante. A possibilidade da ocorrência de estirpes com base em evidências sintomatológicas foi aventada por HUGHES & STEINDL (1955) pela primeira vez. SCHEXNAYDER (1956) afirmou que haveria a possibilidade da existência de variantes

do agente causal do raquitismo-da-soqueira, diferindo em habilidade na produção de sintomas e na tolerância ao tratamento térmico. WANG (1968) selecionando e estudando tipos que provocaram sintomas de colorações diferentes concluiu que em Taiwan ocorrem três estirpes do VRS.

Nos estudos quanto à realização de levantamentos de campo em canaviais, verificou-se que, dentre os diversos cultivares estudados, apenas o IAC 50/134 apresentou alta correlação entre ausência de sintomas internos de nós maduros e negatividade no teste do capim-elefante. Os cultivares CB 41/76 e CB 49/260, apesar de terem apresentado correlação entre presença de sintomas internos na cana e positividade do teste no capim-elefante, não apresentaram dados coincidentes entre os dois tipos de diagnose, no caso dos colmos sem sintomas. Portanto, para a realização de levantamentos em canaviais, após estudos prévios como estes que foram realizados, pode-se basear-se apenas na visualização dos sintomas na cana quando o cultivar tiver comportamento semelhante ao IAC 50/134. Em cultivares que se comportarem como os outros dois citados, há necessidade de teste diagnóstico adicional com os colmos que não manifestarem sintomas. O mesmo se aplica para os casos de colmos com infecção por outros patógenos, pois, nestes casos, as descolorações vasculares podem não estar relacionadas com o VRS. Obviamente, em variedades nas quais fôr difícil a visualização de sintomas, exige-se a realização de testes diagnósticos em todos os colmos.

Em levantamentos de viveiros oriundos de toletes tratados termicamente, ou nos obtidos por multiplicação sucessiva daqueles, por outro lado, exige-se a realização do teste diagnóstico em qualquer cultivar. Verificou-se que, mesmo em cultivares que normalmente manifestam sintomas nítidos, a visualização de sintomas em colmos de plantas infetadas desses viveiros é quase sempre impossível, talvez devido às razões discutidas anteriormente.

Visando a obtenção de plantas matrizes sadias dos principais cultivares, vem sendo realizado um trabalho de indexação de plantas, pois que, no caso do raquitismo-da-soqueira, não é possível identificar, por simples observação visual, as plantas sadias ou doentes, con

forme já foi dito. Alguns testes realizados indicam que a indexação pode ser realizada eficientemente com extratos de bainhas foliares. Esse conhecimento é útil pois que, na indexação, quando se pretender testar a mesma planta duas a 3 vezes subsequentemente a intervalos, as amostras poderão ser as bainhas, em vez dos colmos. A retirada de uma amostra de colmo em geral implica numa operação de corte, a qual constituiria uma possibilidade de contaminação da planta em indexação, além de ocasionar a eliminação de alguns colmos de extremo valor. Além disso, há possibilidade de se compor as amostras com bainhas de vários colmos da mesma touceira, o que proporciona uma melhor amostragem da planta em indexação.

VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem as conclusões abaixo expostas.

1. As gramíneas Echinochloa colonum, Panicum antidotale, P. maximum, Pennisetum purpureum, Sorghum bicolor e S. halepense são hospedeiras do VRS que manifestam sintomas internos. P. antidotale e P. purpureum são duas novas hospedeiras. O VRS persiste em P. maximum e em S. bicolor pelo menos por 3 ciclos vegetativos, apesar de em baixa concentração no primeiro, e persiste em P. antidotale pelo menos por 4 ciclos, em alta concentração.
2. O capim-elefante (P. purpureum) foi a planta mais apropriada para uso como indicadora, pelas seguintes características: alta susceptibilidade ao VRS, facilidade de manejo, rapidez na manifestação de sintomas e conspicuidade destes. Foram notadas as seguintes vantagens do capim-elefante como planta indicadora do VRS, em relação às indicadoras de cana usuais: (a) manifestação de sintomas mais conspícuos, mais rapidamente; (b) possibilidade de realização de maior número de testes num determinado período; (c) planta de mais fácil manejo; (d) planta de fácil obtenção por sementes, sendo fácil, portanto, a obtenção de clones livres de vírus para os testes.
3. Para o uso do capim-elefante como planta-indicadora a seguinte metodologia se mostrou apropriada: (a) emprego dos cultivares Merker, Napier e Porto Rico como indicadores; (b) obtenção das plantas-teste por meio de estacas de dois nós, plantadas em enterrio parcial; (c) formação das plantas-teste e realização dos testes tanto em casa de vegetação como ao ar livre; (d) inoculação das plantas-teste cortando-se o cartucho foliar e aplicando simultaneamente o inóculo na superfície do corte, 15 a 40 dias após o plantio das estacas (mínimo de 2 a 4 plantas por inóculo); (e) exame interno das plantas-teste de 20 a 30 dias após a inoculação.
4. Inóculos do VRS diluídos a aproximadamente 1:625.000 ainda são infecciosos. A temperatura final de inativação do VRS se situa entre 60 a 65°C. A longevidade in vitro do VRS, presente em garapa de

colmos maduros de cana é de no mínimo 81 dias. À temperatura ambiente (18 a 29°C) e a 5°C houve queda da atividade nesse período, isto não ocorrendo a -15°C. In vivo, em colmos maduros de cana, o VRS mantém a infecciosidade enquanto esses colmos estiverem com bom estado de conservação: à temperatura ambiente e a 5°C esse tempo é de aproximadamente 30 dias; em congelador, os colmos se mantêm em boas condições para testes diagnósticos por mais de 125 dias.

5. Para determinar a incidência do VRS em lotes de cana obtidos de toletes tratados termicamente, ou nos primeiros clones deles, é indispensável a realização de testes diagnósticos como o do capim-elefante, pois que, foi verificado que é bastante difícil a observação de sintomas internos nas canas infetadas desses lotes. Em canaviais, por outro lado, a realização de testes diagnósticos podem ser reservados apenas para amostras (colmos maduros) nas quais não se conseguiu visualizar os sintomas internos, desde que estes estejam devidamente caracterizados no cultivar em questão.
6. Em viveiros obtidos de toletes tratados termicamente, de propriedades canavieiras, foram constatados níveis de incidência do VRS de 10 a 80%, mostrando que os tratamentos térmicos não apresentaram a eficiência desejada.
7. O VRS está largamente disseminado nos canaviais do Estado, com níveis de incidência da ordem de 50 a 100% na maioria deles.
8. Na indexação de plantas de cana, para eleição de plantas matrizes isentas do VRS, é recomendável o teste diagnóstico do capim-elefante.

VII. RESUMO

Foi desenvolvida uma técnica de diagnose do raquitismo-da-soqueira de cana-de-açúcar utilizando o capim-elefante (Pennisetum purpureum Schum.) como planta-indicadora. Subsequentemente, com o auxílio desta técnica de diagnose, foram realizados alguns estudos sobre as propriedades físicas do vírus do raquitismo-da-soqueira (VRS), sobre a relação vírus-hospedeiras e sobre a incidência da doença em viveiros e plantações de cana do Estado.

Em relação aos cultivares de cana utilizados como indicadores, o capim-elefante apresentou as seguintes vantagens: manifestação de sintomas mais conspícuos, em tempo relativamente curto (20 a 30 dias), possibilitando, conseqüentemente, realização de maior número de testes num determinado período; é de manejo mais fácil; é facilmente obtido a partir de sementes, sendo, portanto, fácil a obtenção de plantas livres do vírus para os testes.

Realizando-se testes comparativos entre diferentes cultivares de capim-elefante, métodos de inoculação, tipo de plantas, etc., resultou no seguinte procedimento, em uso neste departamento para a diagnose do raquitismo-da-soqueira: (a) utilização dos cultivares Merker, Napier e Porto Rico; (b) obtenção das plantas-teste por meio de estacas de dois nós, enterrando-as apenas na parte do nó inferior, cuja gema foi retirada previamente; (c) condução das plantas-teste tanto em casa de vegetação como ao ar livre; (d) realização da inoculação cortando-se o cartucho foliar e aplicando simultaneamente o inóculo nesse corte, 15 a 40 dias após o plantio da estaca, utilizando-se um mínimo de 2 a 4 plantas por inóculo; (e) exame interno das plantas-teste 20 a 30 dias após a inoculação.

Echinochloa colonum (L.) Link, Panicum antidolale Retz., P. maximum Jacq., Sorghum bicolor Moench. e S. halepense (L.) Pers. são outras plantas que manifestaram sintomas internos quando infetadas pelo vírus do raquitismo-da-soqueira; porém não se mostraram tão boas indicadoras como o capim-elefante. Em P. purpureum o vírus raramente persistiu por mais de um ciclo vegetativo; persistiu por três ciclos

vegetativos em P. maximum e em S. bicolor, apesar de em baixa concentração na primeira; persistiu por 4 ciclos em P. antidotale, em alta concentração, com os sintomas também sendo nela mantidos.

Em plantas-teste de capim-elefante foram estudadas algumas propriedades físicas do VRS, obtendo-se os seguintes resultados: (a) o ponto final de diluição se situou acima de 1:625.000; (b) a temperatura final de inativação se situou entre 60 a 65°C; (c) a longevidade in vitro, à temperatura ambiente de laboratório (18 a 29°C) e a 5°C foi superior a 81 dias, embora com decréscimo da infectividade. A -15°C a infectividade se manteve praticamente inalterada por esse período; (d) a longevidade em estacas dependeu do estado de conservação das mesmas, a infectividade do vírus se mantendo enquanto se mantiveram em bom estado, ou pelo menos por 125 dias em congelador.

Verificou-se que a diagnose em campo do VRS, pelos sintomas internos de nós maduros em cana, é bastante falha, principalmente em lotes obtidos de toletes tratados termicamente, ou em lotes clonais destes; realizando-se testes diagnósticos em capim-elefante, grande porcentagem de colmos sem sintomas provaram estar infetados.

Em levantamentos efetuados em canaviais de diferentes áreas do Estado, com base em teste diagnóstico no capim-elefante, constatou-se, na maioria deles, nível de infecção pelo VRS entre 50 a 100%. Em viveiros obtidos de toletes tratados termicamente o nível de infecção foi em geral de 10 a 30%, mas alguns apresentaram de 30 a 80% de infecção; a maioria dos viveiros prontos para plantio de canaviais apresentou nível de infecção superior a 50%.

A indexação de plantas de cana, para seleção de matrizes sadias, por meio do teste diagnóstico do capim-elefante, mostrou-se eficiente e relativamente de fácil emprego.

VIII. SUMMARY

RATOON STUNTING DISEASE OF SUGARCANE: ITS DIAGNOSIS AND STUDIES ON THE CAUSAL AGENT

A technique to diagnose the ratoon stunting disease of sugarcane using elephant-grass (Pennisetum purpureum Schum.) as indicator plant was developed. Subsequently, with the aid of this technique, some studies on the properties of the ratoon stunting virus (RSV), virus-host relationships, and incidence of the disease in nurseries and sugarcane plantations were carried out.

Elephant-grass presented as an indicator plant for RSV, the following advantages over former test plants (sugarcane cultivars): development of very conspicuous symptoms within short period (20 to 30 days after inoculation); plants of a smaller size, easy to handle; facility to obtain seedlings.

Comparative tests using different elephant-grass cultivars, methods of inoculation, type of plants, etc., resulted in the following procedure, which has been routinely used in this laboratory for diagnosis of ratoon stunting disease: (a) use of the cultivars Merker, Napier, and Puerto Rico of elephant-grass, as indicator plants; (b) raising the test plants from cuttings, potted as two-eye uprights; (c) growing test plants either in greenhouse or outdoors; (d) inoculation of each inoculum on 2-4 plants, 15-40 days after potting; (e) inoculation made with a blade, previously dipped into the inoculum, by cutting the spindle leaves; (f) reading of internal symptoms 20-30 days after inoculation.

Although less suitable as indicator plants when compared with elephant-grass, Echinochloa colonum (L.) Link, Panicum antidotale Retz., P. maximum Jacq., Sorghum bicolor Moench. and S. halepense (L.) Pers. also showed internal symptoms following inoculation with RSV.

In P. purpureum, RSV rarely persisted for more than one vegetative cycle, while in P. maximum and in S. bicolor, it persisted for at least three cycles. In P. antidotale RSV persisted in high concenu

tration at least for 4 cycles, always inducing symptoms.

Physical properties of RSV as determined on elephant-grass test plant, were as follows: (a) virus was still infective after diluting the juice of infected sugarcane cuttings to 1:625,000, with distilled water; (b) some infectivity of RSV was retained in juice heated for 10 min. at 60°C, but none at 65°C; (c) longevity in vitro was up to 81 days either storing the infective juice at 5°C or at room temperature; when stored at -15°C, the inoculum did not lose the initial infectivity while the test lasted (81 days); (d) in cuttings, infectivity of the virus was correlated with their preservation; in cuttings stored in a freezer (-15°C), virus infectivity was still present after 125 days.

Field diagnosis of ratoon stunting disease based on the observation of the discoloration in mature nodes of sugarcane failed in many instances, specially in nurseries of hot water treated cuttings, or in nurseries from the first multiplication of those canes. The diagnostic test of elephant-grass revealed that many stalks without symptoms, from such nurseries, were indeed infected with RSV.

Surveys undertaken in commercial sugarcane plantations in several different areas of S. Paulo State, with the aid of the elephant-grass as indicator plant, indicated that the level of RSV infection was 50-100% in most of them. In nurseries formed with hot water treated cuttings, or in nurseries of their first progeny, infection were generally lower - 10-30%, but in some cases it could reach 80%. In most nurseries ready to be used in commercial plantations, up to 50% of the plants were already infected with RSV.

Indexation of sugarcane plants, to select healthy stocks, by the use of elephant-grass as an indicator plant, is relatively simple and efficient.

IX. BIBLIOGRAFIA CITADA

- ADSUAR, J. & J.H. LÓPEZ-ROSA, 1962. Failure to transmit the causal agent of ratoon-stunting disease of sugarcane through the soil. *J. Agric. Univ. P. Rico* 46:87-90.
- ANÓNIMO, 1949. New cane disease in Queensland. *Circ. Qd Cane Grs' Coun. "C"* 23. (Rev. appl. Mycol. 29:173)
- ANÓNIMO, 1962. *Rep. Hawaii. Sug. Plant. Ass. Exp. Sta.*, 1962:49.
- ANTOINE, R., 1957. A histo-chemical test for diagnosing ratoon stunting disease of sugarcane. 3^e Congrès de la P.I.O.S.A., Tananarive, Section D, 1957:155-160.
- ANTOINE, R., 1959. Note on the tetrazolium test for detecting ratoon stunting disease in sugarcane. *int. Soc. Sug. Cane Tech., Proc.* 10:1042-1045.
- ANTOINE, R., 1965. Sugarcane diseases and their world distribution. *int. Soc. Sug. Cane Tech., Proc.* 12(1967):1245-1269.
- ARRUDA, S.C., 1961. El mejoramiento de la caña de azúcar y la fitopatología. V Reunión Latinoamericana de Fitotecnia. Tomo II. pp. 342-343.
- ARRUDA, S.C., 1962. Doenças da cana-de-açúcar, pp. 46-52. In III Semana da Fermentação Alcoólica. Fermentação do Caldo de Cana. Vol. I. Instituto Zimotécnico, Piracicaba. 236pp. (mimeografado)
- BENDA, G.T.A., 1969. The upright: an experimental form of sugarcane. *Sug. Path. News.* 2:34-37.
- CHU, H.T., K.C. LING & S.M. LEE, 1959. Ratoon stunting disease control in Taiwan. *int. Soc. Sug. Cane Tech., Proc.* 10:1072-1077.
- EL-BANNA, M.T., M.A. MOURSI & F. NOUR-EL-DIN, 1967. Studies on sugarcane ratoon stunting virus disease. (A) Properties of the causal virus and control of the disease. *Agr. Res. Rev.* 45:74-92.
- FARRAR, L.L., 1957a. Studies on the ratoon stunting disease of sugarcane in Louisiana. *Diss. Abstr.* 17:474-475. (Rev. appl. Mycol. 37:309).
- FARRAR, L.L., 1957b. A chemical test for ratoon stunting disease of sugarcane. *Phytopathology* 47:10 (Abstr.)
- FIFE, J.M. & I.E. STOKES, 1959. Amino acid changes identify ratoon stunting disease. *Sugar y Azúcar* 54(11):27-28.
- FORBES, I.L. & K.C. LING, 1960. Particles associated with the ratoon stunting disease of sugarcane. *Sug. J., New OrL.* 23(2):15.
- FORBES, I.L. & R. PERDOMO, 1966. Ratoon stunting disease not seed transmitted. *Sug. Bull., New OrL.* 44:194,196.
- FORBES, I.L., R.J. STEIB & S.J.P. CHILTON, 1960. Ratoon stunting disease of sugarcane. *La. State Univ., Bull. no. 532.* 23pp.

- GILLASPIE, Jr., A.G., 1970a. Evidence that ratoon stunting disease of sugarcane is caused by virus and not mycoplasma. *Phytopathology* 60:1448-1450.
- GILLASPIE, Jr., A.G., 1970b. Ratoon stunting disease virus: distribution in the sugarcane plant. *Sug. Bull.*, New OrL. 48:200-201.
- GILLASPIE, Jr., A.G., J.E. IRVINE & R.L. STEERE, 1966. Ratoon stunting disease virus. Assay technique and partial purification. *Phytopathology* 56:1426-1427.
- HAMPTON, R.O., J.O. STEVENS & T.C. ALLEN, 1969. Mechanically transmissible mycoplasma from naturally infected peas. *Pl. Dis. Reprtr.* 53:499-503.
- HUGHES, C.G., 1957. Disease investigations. *Annu. Rep., Bur. Sug. Exp. Stas Qd* 57:79-88. (Rev. appl. Mycol. 37:308)
- HUGHES, C.G., 1958. Disease investigations. *Annu. Rep., Bur. Sug. Exp. Stas Qd* 58:88-95.
- HUGHES, C.G. & D.R.L. STEINDL, 1955. Ratoon stunting disease of sugarcane, *Tech. Commun. Bur. Sug. Exp. Stas Qd no. 2.* 54pp.
- HUGHES, C.G., D.R.L. STEINDL, O.W. STURGESS & B.T. EGAN, 1964. Division of Pathology. *Annu. Rep., Bur. Sug. Exp. Stas Qd* 64:66-82. (Rev. appl. Mycol. 44:1664)
- HULL, R., 1971. Mycoplasma-like organisms in plants. *Rev. Plant Path.* 50:121-130.
- HUTCHINSON, P.E., P.G. STANLEY & D.R. STRONG, 1967. Early detection of infection of sugarcane by ratoon stunting disease (RSD). *Experientia* 23:41.
- JAMES, G., 1972. Ratoon stunting diagnosis. *Sug. Path. News.* 8:26.
- KAMERLING, Z., 1905. Over het verband tusschen de ontwikkeling van Stengels en Wortels bij de Rietplant. *Archief voor de Java-Suikindustrie* 13:399-416.
- KHURANA, S.M.P., 1972. Causal organisms of RSD. *Sug. Path. News.* 8:15.
- LIN, S.C., C.S. LEE & R.J. CHIU, 1970. Isolation and cultivation of, and inoculation with, a mycoplasma causing white leaf disease of sugarcane. *Phytopathology* 60:795-797.
- LIU, H.P., 1963. Studies on the ratoon stunting disease of sugarcane. Purification of a protein associated with diseased cane. *Taiwan Sugar* 10(4):1-3.
- LÓPEZ-ROSA, J.H. & J. ADSUAR, 1970. Effect of stunting disease on yield of some sugarcane varieties in Puerto Rico. *J. Agric. Univ. P. Rico* 54:149-169.
- MATSUOKA, S., 1971. Elephant grass, and indicator plant for ratoon stunting virus of sugarcane. *FAO Plant Prot. Bull.* 19:110:115.

- MATSUOKA, S., 1972. Ratoon stunting disease diagnosis with elephant grass as an indicator plant. *Sug. Path. News.* 8:10-11.
- MUNGOMERY, R.W., 1949. Division of Entomology and Pathology. *Annu. Rep., Bur. Sug. Exp. Stas Qd* 49:36-45. (Rev. appl. Mycol. 29: 331)
- PEREIRA, A.L.G. & B.S. OLIVEIRA Jr. 1971. Isolamento e transmissão direta do agente causal do enfezamento do milho (Corn stunt) cultivado em meio artificial de cultura. *Arq. Inst. Biol., S. Paulo* 38:191-200.
- PLAVSIC-BANJAC, B. & K. MARAMOROSCH, 1972. Eletron microscopy of the xylem of ratoon stunted sugarcane. *Phytopathology* 62:498. (Abstr.)
- RICAUD, C., 1972. Ratoon stunting diagnosis. *Sug. Path. News.* 8:26.
- ROTH, G. & C. WHITEHEAD, 1965. Virus diseases and sugarcane. *S. Afr. Sug. J.* 49:675-683.
- SANTOS, M., 1972. Sugarcane diseases in Mozambique. *Sug. Path. News.* 8:15.
- SCHEXNAYDER, C.A., 1956. The ratoon stunting disease of sugarcane in Louisiana with notes on its control. *int. Soc. Sug. Cane Tech., Proc.* 9:1058-1065.
- SCHEXNAYDER, C.A., 1959. The use of a sugarcane "test plant" as a means of detecting the presence of ratoon stunting disease in sugarcane. *int. Soc. Sug. Cane Tech., Proc.* 10:1068-1072.
- SHEFFIELD, F.M.L., 1959. *Annu. Rep., E. Afr. Agric. For. Res. Org.,* 1959:40-55. (Rev. appl. Mycol. 40:148)
- SINGH, G.R., 1969. An indicator variety for ratoon stunting disease. *Curr. Sci.* 38:221-222.
- SINGH, G.R. & M.M. RAO, 1968. *Plant Pathology. Annu. Rep., Sug. Cane Breed. Inst., Coimbatore* 1967-68:52-60.
- STEIB, R.J., 1965. Comunicação expressa em debate do trabalho: BOURNE, B.A., 1965. The failure of a species of rabbit to transmit the ratoon stunting virus of sugarcane. *int. Soc. Sug. Cane Tech., Proc.* 12(1967):1071-1077.
- STEIB, R.J. & S.J.P. CHILTON, 1959. Control and rate of increase of the ratoon stunting in hot air treated sugarcane in Louisiana. *int. Soc. Sug. Cane Tech., Proc.* 10:1061-1068.
- STEIB, R.J. & I.L. FORBES, 1957. Johnson grass and corn as carriers of the virus of ratoon stunting disease of sugarcane. *Sug. Bull., New OrL.* 35:375.
- STEIB, R.J. & D.M. TANTERA, 1970. Studies to determine the effect of tetracycline antibiotic on the ratoon stunting disease (RSD) of sugarcane. *Sug. Bull., New OrL.* 48:217-219.

- STEIB, R.J., L.L. FARRAR, I.L. FORBES & S.J.P. CHILTON, 1956.
Occurrence of the ratoon stunting disease in Louisiana and its control by the use of hot-air treatments. Sug. Bull., New OrL. 34:302-306.
- STEINDL, D.R.L., 1950. Ratoon stunting disease. int. Soc. Sug. Cane Tech., Proc. 7:457-465.
- STEINDL, D.R.L., 1955. Disease investigations. Annu. Rep., Bur. Sug. Exp. Stas Qd 55:72-80.
- STEINDL, D.R.L., 1957. Host range of the sugar cane ratoon stunting disease virus. J. aust. Inst. Agr. Sci. 23:238.
- STEINDL, D.R.L., 1961. Ratoon stunting disease, pp. 431-459. In Sugarcane diseases of the world. Martin, J.P., E.V. Abbott and C.G. Hughes (eds.) Elsevier, Amsterdam. 542pp.
- TANTERA, D.M. & R.J.STEIB, 1971. Temperatures and treatments durations with hot air for control of ratoon stunting disease in Louisiana. int. Soc. Sug. Cane Tech., Proc. 14. (preprint)
- VEIGA, F.M., 1956. Notas sôbre o raquitismo das socas em Campos. Brasil açúcar. 47:81.
- VENKATRAMAN, T.S. & R. THOMAS, 1929. Studies of sugarcane roots at different stages of growth. Mem. Dept. Agric. India, bot. ser. 16:145-157.
- WANG, C.S., 1968. Preliminary studies on the strain of ratoon stunting disease virus of sugarcane. Taiwan Sugar 15(6):18-20.
- WEHLBURG, C., 1956. Ratoon stunting disease in Cuba. Sugar 51:27-29.

Apêndice 1. Lista das gramíneas hospedeiras do VRS citadas na literatura

Gramíneas	Referência
<u>Brachiaria miliiformis</u> (Presl.) Chase	Steindl, 1957.
<u>B. mutica</u> (Forsk.) Stapf.	id.
<u>Chloris gayana</u> Kunth.	id.
<u>Cynodon dactylon</u> (L.) Pers.	id.
<u>Echinochloa colomum</u> (L.) Pers.	id.
<u>Imperata cylindrica</u> (L.) Beauv.	id.
<u>Panicum maximum</u> Jacq.	id.
<u>Rhynchelistrum repens</u> (Willd.) Hubb.	id.
<u>Sorghum halepense</u> (L.) Pers.	Steib & Forbes, 1957.
Sorgo (¹)	Steindl, 1955; Wehlburg, 1956.
Sorgo sudanense (²)	Steindl, 1955.
<u>S. verticilliflorum</u> Stapf.	Steindl, 1957.
<u>Sporobolus capensis</u> (Willd.) Kunth.	id.
<u>Zea mays</u> L.	Steindl, 1955; Steib & Forbes, 1957.

(¹) Citado como sorgo, simplesmente, e como Sorghum vulgare, respectivamente, pelos dois autores.

(²) Citado como "sweet sudan grass".

Apêndice 2. Lista das gramíneas, com as respectivas origens, utilizadas nos estudos relatados no presente trabalho

Espécies, cultivares, linhagens	Origem ⁽¹⁾
<u>Cenchrus echinatus</u> L.	C.E.C.
<u>Chloris gayana</u> Kunth. var. <u>Alego</u>	IAC, SCS
<u>Echinochloa colonum</u> (L.) Link	C.E.C.
<u>Melinis minutiflora</u> Beauv.	C.E.C.
<u>Oryza sativa</u> L. cvs. Berlin, Pandhori, Taiwan nº 721, Jujutla, B. G. nº 79	U.S.D.A.
IAC 120, IAC 435, IAC 1246, IAC 5032, IAC 5100, IAC 5544, Batatais	IAC, SC
<u>Panicum antidotale</u> Retz.	IAC, SCS
<u>P. maximum</u> Jacq. cvs. Capim de búfalo, Capim guiné, Capim privilégio, Capim sempre-verde	IAC, SCS
Ignorado	C.E.C.
	C.E.C.
<u>P. fasciculatum</u> Willd.	IAC, SCS
<u>Pennisetum purpureum</u> Schum. cvs. Merker, Napier, Napier x Merker, 29722 x Millet 16	IAC, SCS
Porto Rico, Ignorado I	C.E.C.
Ignorado II	Copersúcar
<u>Rynchelytrum roseum</u> (Nees.) Stapf. et Hubb.	C.E.C.
<u>Sorghum bicolor</u> Moench. cvs. Catanduva, Dex Dwarf, Jaú, Redbine, Sart	IAC, SV
A. Red Amber(91), Atlas(34), B. Leoti(47), Dwarf Shallu(154), Formosa(30481), Mac Lean(95), Straightneck(107), Sumac(76)	IAC, SG
<u>S. hapelense</u> (L.) Pers.	C.E.C.

(continua)

(continuação)

<u>Zea mays</u> L. cvs. Bolita 4557, Caigang Paraná III, Carnário, Cateto, Cateto Arg. Urug., Chapalote, Cristal Comp., Dente Paulista, Entrelaçado, G. Francesa, Hickory King, Lenha, Moroti Parag., Nal-Tel, Olotillo, Pipoca Pontuda, Pipoca Redonda, Reventador, Tabloncillo, Tehua, Tepecintle, Urug. III, Zapalote Grande	ESALQ, IG
cvs. Asteca e 94-962	IAC, SC
Linhagens Ip 291, Ip 400, Ip 661, Ip 701, Ip 714, Ip 723, Ip 735, Ip 785, Ip 965, Ip 1184, Ip 1268, IA 606 B, IA 2051, IA 2725, IA 2779, Porto Rico 3D, Porto Rico 19D, Cuba, 11-J. Cuba 312-219, M 318-3i, Trindade 3D	IAC, SC

(¹) C.E.C. = Centro Experimental de Campinas, Instituto Agrônomo, Campinas; IAC, SCS = Instituto Agrônomo, Seção de Conservação do Solo; U.S.D.A. = Departamento de Agricultura dos Estados Unidos; IAC, SC = Instituto Agrônomo, Seção de Cereais; Coper súcar = Estação Experimental de Cana da Cooperativa Central dos Produtores de Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo, Sertãozinho, SP; IAC, SV = Instituto Agrônomo, Seção de Virologia; IAC, SG = Instituto Agrônomo, Seção de Genética; ESALQ, IG = Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Instituto de Genética.