METODOLOGIA PARA TESTES DE RESISTÊNCIA VARIETAL
DE CANA-DE-AÇÚCAR A *Pseudomonas rubrilineans* (LEE et al)
STAPP EM CASA-DE-VEGETAÇÃO.

EDWARD REIS FERNANDES

Eng^o Agr^o - ESAM

Orientador: Dr. HASIME TOKESHI

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro, 1979

À

memória de minha mãe PERPÉTUA;
ao meu pai HONOR SOARES FERNANDES
e aos meus irmãos,

minha gratidão.

À

minha esposa LEOMAR
e aos meus filhos STANLEY e EDWARD,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos a todos que colaboraram na realização deste trabalho, especialmente:

Ao Prof. HASIME TOKESHI, pela valiosa e eficiente orientação, amizade e estímulo recebidos;

Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", por ter proporcionado condições durante o Curso de Pós-Graduação e na realização deste trabalho;

À Escola Superior de Agricultura de Mossoró pela oportunidade e condições oferecidas para o aperfeiçoamento de sua qualificação pessoal;

À PLANALSUCAR, COPERSUCAR e a Estação Experimental de Piraicaba, por terem fornecido as variedades de cana utilizadas neste trabalho;

Ao Setor de Microscopia Eletrônica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pelas eletrofotomicrografias;

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia, que colaboraram com os seus ensinamentos;

Ao colega HENRY EVEN BAJUNGU, pela versão do resumo para o Inglês;

Ao Sr. BENEDITO RODRIGUES DE MORAES, funcionário do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pela ajuda prestada durante os trabalhos experimentais;

Ao Sr. ALCIDIO ANDRIOLI, funcionário do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pela ajuda prestada durante os trabalhos de laboratório;

Ao colega FRANCISCO DAS CHAGAS ESTEVAN DA FONSECA, pela colaboração prestada nas análises estatísticas;

Ao Prof. TASSO LEO KRÜGNER, pela revisão dos originais.

ÍNDICE

Página

1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Histórico	4
3.2. Características morfológicas, culturais e bioquímicas de <i>P. rubrilineans</i> (Lee et al) Stapp.	4
3.3. Sintomatologia	5
3.4. Outras plantas hospedeiras	6
3.5. Controle	7
3.6. Métodos de inoculação, concentrações de inóculo e condições ambientes	7
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1. Isolamento e identificação do agente causal	10
4.1.1. Testes de patogenicidade	11
4.2. Preparo das plantas	11
4.3. Critério de avaliação	12
4.4. Determinação do número de células do inóculo	14
4.5. Comparações dos métodos de inoculação e concentrações de inóculo	14
4.6. Efeitos dos períodos de câmara úmida na expressão de sintomas	15
5. RESULTADOS	17
5.1. Identificação do agente causal	17
5.1.1. Testes de patogenicidade	17
5.1.2. Características morfológicas e culturais	17
5.2. Determinação do número de células	18
5.3. Comparações dos métodos de inoculação e concentrações de inóculo	19
5.4. Efeitos dos períodos de câmara úmida na expressão de sintomas	19
6. DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÃO	27
8. SUMMARY	28
9. BIBLIOGRAFIA	29

1. RESUMO

Procurou-se uma metodologia para testes de resistência varietal de cana-de-açúcar a *Pseudomonas rubrilineans* (Lee et al) Stapp em casa-de-vegetação.

As plantas foram inoculadas com a idade de 30 dias e as avaliações foram feitas 21 dias depois da inoculação. Os testes foram realizados com plantas resistentes e suscetíveis crescendo vigorosamente e os resultados analisados estatisticamente.

Em todos os experimentos, durante os dias de câmara úmida, a umidade relativa foi mantida no intervalo de 90 a 100%. Após este período, as plantas ficaram em condições normais de casa-de-vegetação. Em cada experimento foi mantido um controle parcial da temperatura.

Foram comparados três métodos de inoculação: injeção, pulverização e gotas no cartucho foliar. Foi selecionado o método de injeção como o mais eficiente, capaz de reproduzir todos os sintomas observados no campo.

Comparou-se três concentrações de inóculo: 3×10^4 ; 3×10^6 e 3×10^8 talos bacterianos/ml. A concentração de 3×10^6 apresentou os melhores resultados.

Observou-se os efeitos de três períodos de câmara úmida : três, cinco e sete dias. Constatou-se que o período de 5 dias foi suficiente para indução de todos os sintomas nas plantas inoculadas.

2. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de açúcar de cana. Apesar disso, a produtividade brasileira é inferior à de outros países, como a África do Sul, Austrália, Estados Unidos da América e principalmente o Hawai.

As causas desta baixa produtividade já foram identificadas como sendo: suscetibilidade varietal às doenças, o baixo potencial genético das variedades existentes, deficiência nas operações agrícolas e ataque de pragas (GRAÇA, 1976).

No mínimo 10 doenças são tidas como responsáveis pela baixa produtividade brasileira. A doença Estria Vermelha reveste-se de importância nos estados do Paraná e São Paulo, onde a ocorrência de solos férteis, períodos chuvosos e quentes propiciam as condições ideais para a ocorrência de epifitotias.

O controle mais efetivo e econômico desta doença é o uso de variedades resistentes. Sua severidade é devida a fatores tais como idade da planta, vigor vegetativo, umidade relativa, chuva, temperatura, estirpe da bactéria, concentração de inóculo e ação de antagonicos.

Tentando uniformizar estes diferentes fatores e eliminar os inconvenientes das avaliações de campo, AKIBA et al. (1976) desenvolveram uma metodologia de testes de resistência varietal em condições de casa-de-vegetação. Na tentativa de aprimorar esta metodologia, foram relacionados e comparados diferentes métodos de inoculação para de-

terminar o método de inoculação mais eficiente, avaliar os efeitos de diferentes concentrações de inóculo e diferentes períodos de câmara úmida na intensidade de doença.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Histórico

A bactéria causadora de Estria Vermelha é de origem asiática e tem sua ocorrência registrada em várias regiões do mundo: Louisiana (CRISTOPHER e EDGERTON, 1930); China (CIFERRI, 1955); Moçambique (NORONHA, 1971); África (ROGERS e SIMBWA-BUNNYA, 1972). MARTIN e WISMER (1961) dão a distribuição desta doença em várias outras regiões.

No Brasil, esta moléstia foi constatada pela primeira vez na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Campos, Rio de Janeiro; hoje é endêmica em todas regiões canavieiras do país. Sua ocorrência assume importância nos estados de São Paulo e Paraná (GRANGIER, 1935; GALLI et al, 1968 e BRIEGER, 1970).

3.2. Características morfológicas, culturais e bioquímicas de *P. rubrilineans* (Lee et al) Stapp.

O agente causal da doença Estria Vermelha já recebeu várias denominações. DANGER e PAYAK (1973) relataram que Lee et al em 1925 classificaram este organismo como sendo *Phythomonas rubrilineans*. Em 1928, Stapp reclassificou-o como *Pseudomonas rubrilineans* e Starr e Burkholds, em 1942, incluíram-no no gênero *Xanthomonas*. Hayward (1962) após estudos morfológicos e culturais, achou mais correto incluí-lo no

gênero *Pseudomonas* e sugeriu a denominação de *P. rubrilineans* (Lee et al) Stapp. Dye (1962) comparou 12 espécies de *Xanthomonas* com este organismo e concordou com Hayward. Bradbury (1967) também adotou a denominação sugerida por Hayward.

Vários autores estudaram as características morfológicas, culturais e bioquímicas de *P. rubrilineans*. Este organismo é descrito como sendo célula isolada, raramente ocorrendo aos pares, medindo 0,6-0,8x1,5-1,9 μ , Gram negativa e não forma cápsula. São móveis com um flagelo polar (raramente mais). Sobre nutriente-água, forma colônias circulares translúcidas de coloração branca-creme, convexa baixa e com margens inteiras. Sobre extrato de levedura água, forma colônias circulares creme-escuro, lisas altas e com margens inteiras. Em caldo nutritivo a cultura produz turbidez, forma película e sedimenta. Produz ácido (não gás) de arabinose, xilose, galactose, frutose, glicerol, sorbitol e manitol. Não produz ácido de manose, maltose, sucrose, celobiose, rafinose, amido, alfa-metil-D-glucosídeo e meso-inositol. A cultura produz catalase, urease, lipase, H₂S e amônia. Não produz indol. Hidroliza levemente amido (mas não gelatina). Reduz nitrito a nitrato. Cresce em meio contendo asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, característica esta que a diferencia de *Xanthomonas* que não cresce nesta fonte de carbono. Cresce em pH de 5,4 a 7,3. Sobrevive em solo esterilizado durante 84 a 112 dias (Breed, Murray e Smith, 1957, citados por MARTIN e WISMER, 1961; RANGASWAMI e THIRUNAVUKARASU, 1964; BORNE, 1970 e DANGER e PAYAK, 1973).

3.3. Sintomatologia

Os sintomas da doença Estria Vermelha se manifestam na cana-de-açúcar sob as formas de estrias nas folhas e podridão do topo da planta. Nas folhas, os primeiros sintomas apresentam-se como estrias encharcadas que, gradualmente, tomam a coloração vermelha. Posteriormente, os sintomas estendem-se à região do meristema apical, a qual torna-se umedecida em consequência da morte dos tecidos. Finalmente, ocor

re a podridão do topo e morte da planta (CRISTOPHER e EDGERTON, 1930 ; GALLI et al. 1968; NORONHA, 1971). AKIBA et al. (1976) afirmaram que um canavial bastante afetado com Estria Vermelha apresenta um odor característico que pode ser sentido a 20 metros de distância.

Os sintomas foliares das doenças Estria Vermelha e Estria Mosqueada são muito semelhantes, o que dificulta o diagnóstico pela sintomatologia da planta quando o ataque é leve e a Estria Vermelha não evoluiu para podridão do topo.

Cottrell e Dormer, em 1932, citados por HAYWARD (1962), descreveram os sintomas de Estria Mosqueada como estrias nas folhas, apresentando coloração amarelo-pálida, marcadas em maior ou menor extensão com vermelho e não mostra marcas de exsudato. Podem apresentar-se totalmente amarelas e em alguns casos predomina a coloração vermelha. Baseado ainda em vários pesquisadores, HAYWARD (1962) enfatiza que a Estria Mosqueada não causa podridão do topo e que *P. rubrilineans* apresenta sempre um flagelo polar e *P. rubrisubalbicans* apresenta quatro (ocasionalmente cinco ou seis flagelos).

3.4. Outras plantas hospedeiras

Além da cana-de-açúcar, *P. rubrilineans* é patogênica a outras plantas. Lee et al. (1925) inocularam artificialmente 10 gramíneas com este organismo no distrito de Kohala, Hawaii. Os resultados foram negativos, exceto em capim massambarã (*Sorghum halapense*) e milho (*Zea mays* L.) que apresentaram sintomas. Lottrell e Dormer inocularam 23 gramíneas e obtiveram resultados positivos em *Sorghum vulgare*, *Sorghum plumosum*, *Sorghum verticilliiflorum*, *Sorghum sudanensis* e *Zea mays* (MARTIN e WISMER, 1961).

BORNE (1970), na Flórida, inoculou o agente causal de Estria Vermelha em sorgo e *Erianthus arudinaceus* e obteve resultados positivos.

HALE e WILKIE (1972) relatam que na Índia duas *Pseudomonas* isoladas do milho foram identificadas como *P. rubrilineans*.

DANGER e PAYAK (1973) afirmaram que isolados de *P. rubri-lineans* foram patogênicos ao milho e teosinto.

3.5. Controle

Assim como na maioria das doenças de plantas, o controle mais efetivo e econômico da Estria Vermelha da cana-de-açúcar é o uso de variedades resistentes.

HUGHES (1962) afirmou que o controle da doença Estria Vermelha em Queensland, Austrália, é feito através do uso de variedades resistentes como: Q-57, Pindar e Trojan.

No Brasil, relatos de resistência varietal devido à infecção natural e provocada por inoculações artificiais em condições de campo são descritos por BRIEGER (1970) e SANGUINO e CARVALHO (1971).

A PLANALSUCAR (1978), em trabalho realizado pelas Secções de Fitopatologia, avaliou as reações de 285 variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil a nove principais doenças, entre elas, Estria Vermelha.

3.6. Métodos de inoculação, concentrações de inóculo e condições ambientais

BORNE (1970), na Flórida, testou dois métodos de inoculação com o agente causal de Estria Vermelha da cana-de-açúcar: picada de agulha na base do vértice foliar e pulverização sob pressão de 130-140 p.s.i. com e sem o uso de carburundo como abrasivo.

Sob condições de casa-de-vegetação, foi aplicado o método de picada de agulha. Desenvolveram-se os sintomas de estrias nas folhas, mas não ocorreu a podridão do topo.

Em condições de clima controlado por câmara de crescimento (Percival Plant Laboratory), foi empregado o método de pulverização com

abrasivo. Este método foi bastante satisfatório para indução de es-trias nas folhas. Não ocorreu a podridão do topo.

CHINEA et al. (1977) relataram em trabalho realizado so-bre métodos de inoculação artificial, que testaram os métodos de alfine-te, pulverização e injeção com seringa hipodérmica. Os testes foram conduzidos em condições de campo. Aplicaram a concentração de 5×10^6 talos bacterianos/ml na variedade altamente suscetível B 4362.

As inoculações foram feitas 90 dias após o plantio e foram mantidas observações durante 45 dias. A temperatura foi mantida em torno de 27°C, a umidade relativa de 85% e oito dias de chuva consecuti-vos depois da inoculação. Estas condições mostram ser favoráveis ao de-senvolvimento da doença.

Os resultados indicaram que as plantas inoculadas pelos três métodos exibiram a sintomatologia típica nas folhas, com exsudato abundante, mas a podridão do topo não ocorreu.

Os autores concluíram que para teste de resistência varie-tal da cana-de-açúcar o melhor método é pulverização.

Usando a metodologia descrita por EIRA (1972) com *Fusarium moniliiforme*, AKIBA et al. (1976) testaram a reação de 18 variedades de cana-de-açúcar a *P. rubrivineans*. Os testes foram conduzidos em casa-de-vegetação. As plantas foram inoculadas com a idade de 60 dias pelo método de seringa hipodérmica e a concentração do inóculo de 3×10^6 talos bacterianos/ml. Após a inoculação, as plantas foram submetidas a condi-ções de câmara úmida por sete dias, nas condições descritas por SANGUINO (1976). Os resultados obtidos foram comparados aos resultados de Brie-ger In Anônimo (1970) em condições de campo. De dez variedades compará-veis, nove apresentaram resultados semelhantes inclusive com produção de podridão do topo.

Os autores concluíram que testes de resistência varietal podem ser conduzidos em casa-de-vegetação sem os inconvenientes das ava-liações existentes nos testes em condições de campo.

É evidente que a produção dos sintomas de podridão do topo está relacionada com o período de câmara úmida e local de inoculação. SANGUINO (1976) obteve condições de câmara úmida em casa-de-vegetação revestindo o piso com raspas de madeira e molhando-o continuamente. Instalou nebulizadores do tipo pulverizador de água para manter o ambiente inteiramente saturado e baixar a temperatura. Ventiladores entravam em funcionamento logo que a temperatura excedesse o limite desejado. O superaquecimento foi evitado com aspersores instalados no teto da casa-de-vegetação.

EIRA (1972) usou o esquema do palmito da cana-de-açúcar descrito em Dillewijn (1952) e fez a padronização dos diferentes locais de inoculação através de seringa hipodérmica. Os locais são: 10 e 20 cm abaixo do vértice foliar, 5 cm acima do meristema apical e 25 cm abaixo do meristema apical.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolamento e identificação do agente causal

A bactéria *Pseudomonas rubrilineans* (Lee et al) Stapp foi isolada da variedade IAC 51-205, coletada em Barra Bonita, S.P.

O isolamento foi feito com base nos métodos descritos por TUIITE (1969) e BRADBURY (1970). Pedacos de folhas apresentando estrias e anasarca foram cortados, desinfestados em álcool e sublimado corrosivo 1:1000 por 1 minuto, lavados em água estéril três vezes, colocados em tubo com 2 ml de água estéril, macerados e deixados em repouso por 20 minutos. Transferiu-se 0,1 ml da suspensão bacteriana e de suas diluições para caixas de Petri contendo BDA, as quais foram incubadas a 28°C por 24 horas. Fez-se repicagens a intervalos de 24 horas até a obtenção de colônias puras.

A preservação da bactéria foi feita em óleo mineral, segundo FENNELL (1960), MARTIN (1964) e TUIITE (1969). O óleo foi autoclavado a 121°C por duas horas e submetido a secagem em estufa a 170°C durante duas horas. Após a adição do óleo, os tubos de cultura foram estocados em geladeira a 4°C.

4.1.1. Testes de patogenicidade

Testou-se a patogenicidade na variedade CB40-13, a qual, segundo SANGUINO e CARVALHO (1971) e AKIBA et al. (1976), é suscetível a *P. rubrilineans*. As plantas foram inoculadas com a idade de 45 dias, injetando-se uma suspensão de 3×10^6 talos bacterianos/ml $\cdot$ 10 cm abaixo do vértice foliar. Após a inoculação, as plantas foram submetidas a câmara úmida por sete dias.

Foram determinadas algumas características morfológicas e culturais da bactéria após o isolamento, de acordo com os métodos descritos e recomendados pela SOCIETATY AMERICAN OF BACTERIOLOGISTS (1957).

Sabendo-se que os sintomas das doenças Estria Vermelha e Estria Mosqueada são bastante parecidos e que as características das colônias e dos talos bacterianos são morfolologicamente semelhantes, diferindo porém quanto ao número de flagelos (HAYWARD, 1962), foram feitas eletrofotomicrografias para confirmar a identificação da espécie bacteriana pelos flagelos.

4.2. Preparo das plantas

No preparo das plantas fez-se seleções das gemas, utilizando-se apenas gemas da ponta do colmo. Gemas individuais foram tratadas com Benomil (Benlate 1 g/litro) e plantadas em vasos de alumínio com capacidade de 1,5 litros, com solo autoclavado. Cada vaso continha três plantas. Após 14 dias do plantio, fez-se uniformização das plantas, eliminando-se as plantas que não germinaram vigorosamente, substituindo-as por outras vigorosas. Iniciou-se adubações com adubo solúvel completo com N(15%), P (30%), K (15%) e cinco micronutrientes (Nutite 15-30-15) em intervalos de sete dias, empregando-se 3 g/litro na proporção de 200 ml por vaso.

4.3. Critério de avaliação

O critério de avaliação utilizado foi baseado no tamanho das estrias e no crescimento das folhas das plantas após a inoculação. A medida do crescimento das folhas da planta foi feita medindo-se a distância entre o local de inoculação e a perfuração da agulha apresentada na folha-2 de acordo com nomenclatura de Kuijper, citado por DILLEWIJN (1952). O crescimento de cada planta inoculada foi comparado ao crescimento médio das plantas testemunhas, dentro de cada tratamento. A Figura 1 ilustra como foram feitas as medidas.

Tabela 1. Critério de avaliação do índice de doença e do crescimento da folha-2.

Classe	Sintomas	Nota Média
0	Sem riscas necróticas e crescimento da planta normal	0
1	Riscas de 5 cm de comprimento a partir do ponto de inoculação e crescimento da planta normal	0,1-1,0
2	Riscas de 5 a 20 cm de comprimento a partir do ponto de inoculação e crescimento da planta normal	1,1-2,0
3	Riscas de 20 a 40 cm de comprimento a partir do ponto de inoculação e crescimento da planta de 41 a 60 cm	2,1-3,0
4	Riscas por toda a extensão das folhas inoculadas e crescimento das plantas de 21 a 40 cm	3,1-4,0
5	Riscas em todas as folhas inoculadas, podridão do topo e crescimento da planta de 0,0 a 20 cm	4,1-5,0

Figura 1. Representação esquemática de uma planta de cana-de-açúcar ilustrando os pontos utilizados para medida do crescimento da folha -2 e mostrando a nomenclatura de Kuijper (DIL LEWIJW, 1952).

4.4. Determinação do número de células do inóculo

A determinação do número de talos bacterianos do inóculo foi feita através de espectrofotometria e plaqueamento de diluições em série, segundo KIRÁLI et al (1970).

O espectrofotômetro utilizado foi o "Spectronic 20", empregando-se o comprimento de onda 580 nm. A calibração do aparelho e a suspensão da bactéria foram feitos em água destilada estéril.

Os dados foram submetidos a análise de regressão.

4.5. Comparações dos métodos de inoculação e concentrações de inóculo.

Neste experimento, foram testados os métodos de inoculação com injeção, pulverização e gotas no cartucho foliar. Em todos os métodos foram usadas três concentrações de inóculo: 3×10^4 ; 3×10^6 e 3×10^8 talos bacterianos/ml.

O método de injeção empregado foi o mesmo utilizado por EIRA (1972). As plantas foram inoculadas com 1 ml do inóculo. As injeções foram aplicadas 10 cm abaixo do vértice foliar, empregando-se agulhas de 0,55x19 mm.

No método de pulverização foi utilizada uma pistola de pressão a 100 lb por polegadas quadradas. As pulverizações foram feitas uniformemente em todas as folhas, sempre utilizando uma mistura de inóculo e pó de carburundo de 150 malhas por polegadas quadradas.

O método de gotas no cartucho foliar foi aplicado pipetando-se aproximadamente 1 ml do inóculo no cartucho foliar.

Cada parcela continha 1 vaso com três plantas e cada tratamento sete repetições. A variedade empregada foi CB47-89 que, segundo AKIBA et al (1976) é suscetível a *P. rubrilineans*. As plantas foram inoculadas com a idade de 30 dias e as testemunhas receberam água em lugar do inóculo. Após as inoculações, as plantas foram submetidas por

sete dias às condições de câmara úmida, descritas por SANGUINO (1976). Terminado o período de câmara úmida, as plantas foram colocadas em condições normais de casa-de-vegetação.

As condições ambientes da casa-de-vegetação durante o experimento foram as seguintes: Umidade relativa durante o período de câmara úmida 90 a 100%; umidade relativa em condições normais de 46 a 78% e as temperaturas variaram de uma mínima de 24°C até a máxima de 32°C.

Usou-se nas avaliações o critério da Tabela 1, 21 dias após as inoculações, e o delineamento estatístico foi inteiramente casualizado.

O experimento A foi realizado durante o mês de novembro de 1977 e repetido no mês seguinte com a mesma metodologia descrita (Experimento B).

As condições ambientes da casa-de-vegetação no experimento B foram as seguintes: durante os dias de câmara úmida, U.R. 90 a 100%; em condições normais, U.R. 40 a 75% e a temperatura mínima de 25,8°C e a máxima de 29,2°C.

4.6. Efeitos dos períodos de câmara úmida na expressão de sintomas

Neste experimento, verificou-se os efeitos dos períodos de três, cinco e sete dias de câmara úmida na intensidade de doença. As plantas foram inoculadas com injeção de 1 ml de suspensão com 3×10^6 talos bacterianos/ml e com a idade de 30 dias. A variedade de cana-de-açúcar utilizada e as condições de câmara úmida foram as mesmas descritas no item 4.4.

Cada parcela constou de um vaso com três plantas e cada tratamento sete repetições. Após três dias de câmara úmida, transferiu-se um tratamento, juntamente com a sua testemunha para as condições normais de casa-de-vegetação. Procedeu-se do mesmo modo após cinco e sete dias para os outros tratamentos.

Durante o experimento, as condições ambientes da casa-de-vegetação foram as seguintes: durante os dias de câmara úmida U.R. 90

a 100%; em condições normais, U.R. 46 a 82% e a temperatura mínima de 20,5°C e a máxima de 31,1°C. As avaliações foram feitas 21 dias após as inoculações, usando o critério da Tabela 1. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado e o experimento foi realizado durante o mês de março de 1978 (Experimento A).

Repetiu-se o experimento no mês de abril (Experimento B), aumentando-se para 15 o número de repetições. Neste experimento as condições ambientes da casa-de-vegetação foram as seguintes: durante os dias de câmara úmida, U.R. de 90 a 100%; em condições normais, U.R. de 48 a 85% e a temperatura mínima de 21,5°C e a máxima de 32,2°C.

Nos dois experimentos, além da variedade suscetível CB47-89, foi utilizada a variedade resistente CB47-355 como controle.

5. RESULTADOS

5.1. Identificação do agente causal

5.1.1. Testes de patogenicidade

Nos testes de patogenicidade foram reproduzidos todos os sintomas de Estria Vermelha. No final do terceiro dia após a inoculação, apareceram estrias com anasarca. No quarto dia, as estrias apresentavam uma coloração vermelho escuro e com o comprimento de 5 a 10 cm. No sétimo dia, o meristema apical já se mostrava afetado, caracterizando a podridão do topo e comprovando a patogenicidade do isolado.

5.1.2. Características morfológicas e culturais

A eletrofotomicrografia mostrou bastonete reto, com um flagelo polar e dimensões de $2,0 \times 0,7$ u. Em ágar nutritivo, forma colônias lisas, brilhantes e de coloração creme. Em caldo nutritivo, forma película. Hidroliza levemente amido, não produz H_2S , utiliza amônia, reduz nitrato, não produz indol, é aeróbio e Gram negativo.

5.2. Determinação do número de células

Na Figura 2 temos o resultado da análise de regressão que possibilita pela transmitância da suspensão bacteriana estimar a concentração dos talos bacterianos do inóculo.

Figura 2. Curva de calibração de uma suspensão de *Pseudomonas rubrili-neans*.

5.3. Comparações dos métodos de inoculação e concentrações de inóculo

Nas comparações dos três métodos de inoculação e três concentrações de inóculo, verificou-se que nos métodos de pulverização e gotas no cartucho foliar as plantas inoculadas comportaram-se como as plantas testemunhas. Quando aplicou-se a maior concentração (3×10^8 talos / ml), algumas plantas apresentaram pequenas estrias, sem contudo afetar o crescimento das plantas. Portanto, as avaliações, dentro do critério adotado, tornaram-se dispensáveis para os referidos métodos face as suas ineficiências e incapacidades de induzirem podridão do topo.

O método de inoculação por injeção apresentou resultados satisfatórios, permitindo a avaliação dos efeitos das três concentrações bacterianas aplicadas (Tabela 2).

5.4. Efeitos dos períodos de câmara úmida na expressão de sintomas

Os resultados do efeito do período de câmara úmida nos índices de doença são apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 2. Efeitos das concentrações de inóculo através da inoculação de *P. rubrilineans* em cana-de-açúcar CB47-89.

Vasos	Índice de doença* nos tratamentos indicados					
	Talos bacterianos por ml			Talos bacterianos por ml		
	Experimento A			Experimento B		
	3×10^4	3×10^6	3×10^8	3×10^4	3×10^6	3×10^8
1	2,83	4,33	5,00	3,33	4,00	5,00
2	2,50	3,83	4,67	2,83	4,00	5,00
3	2,67	3,83	5,00	2,67	3,83	4,00
4	2,00	4,00	4,50	2,17	3,67	5,00
5	3,50	2,83	5,00	2,83	3,00	4,67
6	3,17	4,00	4,50	3,17	3,83	5,00
7	2,33	3,83	3,33	2,67	4,17	5,00
Médias**	2,71c	3,80b	4,5a	2,80c	3,78b	4,80a
	C.V. = 14,20%			C.V. = 9,96%		
	DMS _(5%) = 0,71			DMS _(5%) = 0,51		

* Média de 3 plantas; índice de doença baseado em notas variáveis de 0 = ausência de sintomas a 5 = podridão do topo.

** Médias não seguidas pela mesma letra diferem significativamente ao nível de 5% (Tukey).

Tabela 3. Efeitos de dias de câmara úmida na intensidade de doença na variedade CB47-89 inoculada por injeção, com 3×10^6 talos/ml de *P. rubrilineans*. Experimento A.

Vasos	Índice de doença* nos tratamentos indicados		
	Dias de câmara úmida		
	3	5	7
1	4,00	3,67	4,17
2	3,83	3,83	4,33
3	4,50	3,50	3,17
4	3,83	4,17	4,50
5	4,33	4,00	4,33
6	3,83	3,67	4,33
7	3,83	4,33	4,17
Médias	4,02	3,88	4,14
C.V. = 8,7%			

* Média de 3 plantas; índice de doença baseado em notas variáveis de 0 = ausência de sintomas a 5 = podridão do topo

Tabela 4. Efeitos de dias de câmara úmida na intensidade de doença na variedade suscetível CB47-89 inoculada por injeção com 3×10^6 talos/ml de *P. rubrilineans*. Experimento B.

Vasos	Índice de doença* nos tratamentos indicados		
	Dias de câmara úmida		
	3	5	7
1	3,17	3,83	4,00
2	3,17	4,00	4,17
3	3,83	3,83	3,83
4	3,17	3,17	4,33
5	4,17	4,33	3,67
6	3,83	4,17	4,67
7	4,33	3,83	4,00
8	2,83	4,67	4,83
9	3,83	4,00	4,33
10	3,17	3,83	4,17
11	4,17	3,83	4,00
12	3,83	3,50	3,83
13	3,83	4,17	4,83
14	3,50	4,33	4,33
15	3,67	3,00	3,33
Médias**	3,63b	3,90ab	4,15a

C.V. = 11,1%, $DMS_{(5\%)} = 0,41$

* Média de 3 plantas; índice de doença baseado em notas variáveis de 0 = ausência de sintomas; 5 = podridão do topo.

** Médias não seguidas pela mesma letra diferem significativamente, ao nível de 5% (Tukey).

Tabela 5. Efeitos de dias de câmara úmida na intensidade de doença na variedade resistente CB47-355 inoculada por injeção com 3×10^6 talos/ml de *P. rubrilineans*.

Vasos	Índice de doença* nos tratamentos indicados					
	Experimento A			Experimento B		
	Dias de câmara úmida			Dias de câmara úmida		
	3	5	7	3	5	7
1	1,67	1,50	1,67	1,67	1,50	1,83
2	1,50	1,00	0,67	1,50	0,83	1,67
3	1,17	1,33	0,67	1,17	1,83	1,67
4	1,33	1,00	2,17	0,67	2,00	2,50
5	1,33	1,33	1,00	2,33	2,50	1,83
6	1,33	0,83	0,83	1,17	1,17	1,67
7	1,33	1,17	1,33	1,00	0,83	1,33
Médias	1,38	1,16	1,19	2,74	2,69	2,89
C.V. = 29,3%	C.V. = 33,4%					

* Média de 3 plantas; Índice de doença baseado em notas variáveis de 0 = ausência de sintomas a 5 = podridão do topo.

6. DISCUSSÃO

As características morfológicas, culturais, sintomas exibidos pelas plantas inoculadas e eletrofotomicrografias não deixam dúvidas de que o organismo usado na execução do trabalho era *P. rubrilineans*. As características morfológicas e culturais determinadas foram semelhantes às descritas por DANGER e PAYAK (1973) e Breed, Murray e Smith, citados por MARTIN e WISMER (1961). Os sintomas apresentados pelas plantas inoculadas foram idênticos aos descritos por CRISTOPHER e EDGERTON (1930) ; GALLI et al. (1968) e outros autores. As eletrofotomicrografias mostraram bastonetes com um flagelo polar, característica esta descrita por HAYWARD (1962) e que a diferencia de *P. rubrisubalbicans* que possui quatro ou mais flagelos.

As avaliações baseadas no crescimento da folha -2 mostraram falhas em virtude da grande variação de crescimento ocorrida. Este critério só deve ser utilizado como método auxiliar e nunca como critério básico.

O método de pulverização com uma suspensão bacteriana de 3×10^8 talos/ml induziu apenas o sintoma de estrias nas folhas, resultado este que se coaduna com os resultados obtidos por CHINEA et al. (1977) e BORNE (1970).

O melhor método de inoculação para testes de resistência varietal foi o método de injeção e não pulverização (Tabelas 2, 3, 4 e 5) como concluíram CHINEA et al. (1977), já que por pulverização a sintomatologia completa da doença não é exibida. O método de injeção

de 1 ml de 3×10^6 e 3×10^8 talos bacterianos/ml induziu com constância os sintomas de estrias nas folhas e podridão no topo, reproduzindo toda gama de sintomas observados em condições de campo e permitiu diferenciar variedades resistentes de suscetível.

Os melhores resultados foram obtidos com a concentração de 3×10^6 talos bacterianos/ml (Tabela 2). Estes resultados estão de acordo com AKIBA et al. (1976) que com metodologia idêntica conseguiu induzir os sintomas de estria nas folhas e podridão do topo.

Empregando, aproximadamente, a mesma concentração, através do mesmo método, CHINEA et al. (1977) conseguiram induzir apenas o sintoma de estria nas folhas. Isto talvez seja explicado pelo fato de que os testes destes autores foram conduzidos em condições de campo com algum fator, envolvido no processo da doença, atuando negativamente. Há a possibilidade de que o organismo utilizado nos testes tenha sido *P. rubrisubalbicans*, a qual não induz o sintoma de podridão do topo. Pode ser ainda que a quantidade de inóculo tenha sido insuficiente ou a estirpe da bactéria não tenha sido suficientemente patogênica.

Nas avaliações dos efeitos dos períodos de câmara úmida na doença, não se obteve diferença significativa nos intervalos de três, cinco e sete dias. Quando o experimento foi repetido com maior precisão devido ao aumento no número de repetições, pode-se detectar diferença entre os períodos de três e sete dias. Estatisticamente, pode-se afirmar que o intervalo de cinco a sete dias de câmara úmida deu os melhores resultados. AKIBA et al. (1976) obtiveram resultados semelhantes utilizando um período de sete dias de câmara úmida.

Durante a execução dos experimentos, foi observado que quando as plantas, exibindo sintomas de estrias em desenvolvimento, eram retiradas da câmara úmida, as estrias, praticamente, não aumentavam em comprimento, havendo uma paralização dos sintomas externos. Isto prova a alta influência das condições de umidade no processo de desenvolvimento da mo-léstia.

A variedade resistente CB47-355 no teste de períodos de câmara úmida (Tabela 5) demonstrou resistência maior no experimento do mês

de março (Experimento A) e resistência menor no experimento do mês de abril (Experimento B). Isto talvez seja explicado pelo fato de que a resistência desta variedade só foi observada através de epifítia em condições de campo (PLANALSUCAR, 1978).

Com o estabelecimento de condições ideais para indução de Estria Vermelha, é possível testar-se a reação varietal, eliminando-se a necessidade de aproveitamento de epifítias ocasionais que não permitem reprodução de dados e comparações de reação varietal situada em áreas com microclimas diferentes.

7. CONCLUSÃO

Dos resultados do presente trabalho, pode-se tirar as seguintes conclusões:

1) O método de inoculação por injeção reproduziu todos os sintomas de Estria Vermelha e Podridão do Topo permitindo o seu emprego em testes de resistência varietal.

2) Quando se mantém a temperatura em torno de 27°C, a bactéria *P. rubrilineans* pode causar epifitias se ocorrer períodos de cinco dias de U.R. de 90 a 100% e inóculo inicial acima de 3×10^6 talos/ml.

3) O método de inoculação por injeção de 1 ml de 3×10^6 talos bacterianos/ml aplicado a 10 cm do vértice foliar e o intervalo de cinco a sete dias de câmara úmida pode ser usado em testes de resistência varietal a *P. rubrilineans*.

4) A avaliação de resistência varietal baseada no crescimento da folha -2 pode ser usado apenas como método auxiliar de avaliação. Não é aconselhável como único critério devido a sua variabilidade.

8. SUMMARY

In this work, the establishment of a method for testing varietal resistance to *Pseudomonas rubrilineans* (Lee et al) Stapp in sugar cane growing in a green house was tried.

Plants were inoculated when they were 30 days old and evaluations were realised 21 days later. Tests were done on resistant and susceptible plants which were in their vigorous growing phase and the results obtained were analysed statistically.

In all the experiments, when the plants were growing in a humid chamber the relative humidity was maintained at 90-100%; afterwards the plants were left in the prevailing conditions of the greenhouse.

In each experiment there was a control maintained under partially controlled temperatures.

Three methods of inoculating were compared: injection, spraying and putting drops of the inoculum in the whorl. The injecting method was found to be the most efficient for the reproduction of all the symptoms commonly observed in the field.

Three concentrations of the inoculum were compared: 3×10^4 , 3×10^6 and 3×10^8 bacterial cells/ml. A concentration of 3×10^6 gave the best results of all the 3.

As for the effects of keeping the plants in a humid chamber for 3, 5 and 7 days on the inducing symptoms in the host, a period of 5 days was found to be sufficient for the purpose.

9. BIBLIOGRAFIA

- AKIBA, F. et al., 1976. Reação de 18 variedades de cana-de-açúcar a *Pseudomonas rubrilineans*. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 2 (4):275-279.
- ANÔNIMO. 1970. Disease and varieties. Sugarcane Pathologist's Newsletter, Australia, 5:46-48.
- BORNE, B.A. 1970. Studies on the bacterial red stripe disease of sugar cane in Florida. Sugarcane Pathologist's Newsletter, Australia, 4:27-33.
- BORNE, B.A. 1970. Supplemental notes on the causal bacterium of cane red stripe disease in Florida. Sugarcane pathologist's Newsletter, Australia, 5:40-42.
- BRADBURY, J.F. 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Review Plant Pathology, England, 49(5):213-217.
- BRIEGER, F.O. 1970. Studies on red stripe and eye spot in São Paulo, Brasil. Sugarcane pathologist's Newsletter, Australia, 5:31.
- CHINEA, A. et al., 1977. Methods for artificial inoculation of the causal organism of red stripe in sugar cane. In: International Society Sugar Cane Technologists, 16º, São Paulo. Proceedings, v. 1, p. 337-345.
- CIFERRI, R. 1955. Preliminary list noteworthy disease of cultivated plant in continental eastern China. Plant Disease Report, Washington, 39(10):785-792.
- CRISTOPHER, W.N. e C.W. EDGERTON. 1930. Bacterial stripe diseases of sugar cane in Louisiana. Journal of Agriculture Research Washington, 41. 259-267.

- DANGER, S.R.S. e M.M. PAYAK. 1973. The taxonomic position of the pathogen of red stripe of sugar cane. Sugarcane pathologist's Newsletter Australia, 10:25-28.
- DILLEWIJN, C.V. 1952. Botany of sugarcane. The Chronica Botanica Co. Massachusetts, USA, p. 98-123.
- EIRA, A.F. 1972. Fatores que influenciam na triagem das variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) ao *Fusarium moniliforme* SHELTON, agente causal do POKAH BOENG. Botucatu, Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas. 66 p. (Tese de Doutorado).
- FENNELL, D.I. 1960. Conservation of fungous cultures. Botanical Review, New York, 26:79-141.
- GALLI, F. et al. 1968. Manual de Fitopatologia, doenças das plantas e seu controle. São Paulo, Agronômica Ceres, 640 p.
- GRAÇA, L.R. 1976. Estimativa econômica dos prejuízos causados pelo complexo broca-podridão na cana-de-açúcar no Brasil. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 88(1):12-34.
- GRANGIER, A. 1935. Boletim anual da Estação Experimental de Cana de Assucar de Campos, Rio de Janeiro: 1932-1933. 68 p.
- HALE, C.H. e J.P. WILKIE. 1972. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. N.Z. Journal Agricultural Research, New Zealand, 15:448-456.
- HAYWARD, A.C. 1962. Studies on bacterial pathogens of Sugar Cane. I. Differentiation of isolates of *Xanthomonas* sp, from Sugar Cane in Natal and Trinidad. II. Differentiation, taxonomy and nomenclature of the bacteria causing red stripe and mottled stripe disease. Mauritius Sugar Industry Research Institute, Occasional Paper, Reduit, nº 13. 30 p.
- HUGHES, C.G. 1962. The use of varieties in the control and eradication of Sugar Cane disease in Queensland. Sugar Journal, New Orleans, 25 (6):31-32, 36.
- KIRÁLY, Z. et al. 1970. Methods in plant pathology with special reference to breeding for disease resistance. Budapest, Akadémiai Kiadó. p. 161-166.
- MARTIN, J.P. e C.A. WISMER. 1961. Red stripe. In: MARTIN, J.P. et al. 1961. Sugar cane diseases of the world. Amsterdam, Elsevier. p. 109-125.
- MARTIN, S.M. 1964. Conservation of microorganisms. Annual Review Microbiology, Palo Alto, California. 18:1-16.

- NORONHA, A.R. 1971. Doenças da cana sacarina (*Saccharum officinarum* L.) em Moçambique. Agronomia Moçambicana, 5(4):295-303.
- PLANALSUCAR. 1978. Reação de variedades de cana-de-açúcar às principais doenças no Brasil. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 92(2):55-62.
- RANGASWAMI, G. e V. THIRUNAVUKARASU. 1964. Studies on the survival of plant pathogens added to the soil. On four phytopathogenic bacterial species. Indian Phytopathology, New Delhi, 17(3):202-207.
- ROGERS, P.F. e M.N. SIMBWA-BUNNYA. 1972. A survey of sugar cane diseases and pests in East Africa. East African Agricultural and Forestry Journal, Nairobi, 38(2):162-169.
- SANGUINO, A. e P.C.T. CARVALHO. 1971. Teste de resistência de variedades de cana-de-açúcar a: Mancha Ocular (*Helminthosporium sacchari* (Van Breda de Haan) Butler), Estrias Vermelhas (*Xanthomonas rubrilineans* (Lee et al) Starr et Burkhe, Podridão Abacaxi (*Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Moreau). Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, São Paulo, 4:124-126.
- SANGUINO, A. 1976. Patologia e controle dos fungos de sementes de cana-de-açúcar e resistência de progênies a *Helminthosporium sacchari*. Piracicaba, ESALQ/USP, 77 p. (Tese de Mestrado).
- SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. 1957. Manual of microbiological methods. New York, McGraw-Hill, 315 p.
- TUITE, J. 1969. Plant pathological methods. Fungi and bacteria. Burgess Publish. 239 p.