

REAÇÕES DE LINHAGENS E CULTIVARES DE MILHO
(Zea mays L.) A Pseudomonas alboprecipitans Rosen

NILTON LUIZ DE SOUZA

Engenheiro Agrônomo

Orientador: **PROF. DR. CLÉLIO LIMA SALGADO**

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
Abril - 1980

À

memória de minha mãe IGNÊS.

À

minha avó MARIA JULIA (Mãe Julia)

e a meus irmãos e madrasta,

MINHA HOMENAGEM.

A

meu pai FRANCISCO,

DEDICO.

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

O autor expressa os mais sinceros agradecimentos às seguintes pessoas e entidades:

Ao Prof. Dr. CLÉLIO LIMA SALGADO, pela valiosa orientação, apoio e estímulo durante o desenvolvimento da presente pesquisa.

Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", que possibilitou a participação no Curso de Pós-Graduação e a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de Bolsa de Estudos durante o Curso de Pós-Graduação.

Ao Setor de Fitopatologia e -Microscopia Eletrônica- do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pela elaboração da eletrofotomicrografia.

Ao Prof. Dr. ERIC BALMER, pela inestimável e constante colaboração durante as fases de planejamento, execução e redação do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. HIROSHI KIMATI, pelo auxílio na

realização dos trabalhos serológicos e pela revisão dos originais.

Ao Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER, pela colaboração na versão do resumo para o inglês e pelas sugestões.

Ao Dr. LUIZ CANICIO LOCH e MS GILSON SOARES DA SILVA, pela dedicação na obtenção das fotografias.

À Enga. Agrônoma NILSE KASUE SHIMURA YOKOMIZO e MS ROSA MARIA VALDEBENITO SANHUEZA, pelo apoio, estímulo e amizade.

Aos Professores, Colegas do Curso de Pós-Graduação e Funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pela amizade e colaboração.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Aspectos gerais da doença	5
3.2. O patógeno	6
3.2.1. Caracterização	6
3.2.2. Isolamento	8
3.3. Interação patógeno x hospedeiro	9
3.3.1. Inoculação e avaliação	9
3.3.2. Sintomatologia	13
3.3.3. Comportamento do hospedeiro	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Meios de cultura	17
4.2. Isolamento e preservação do patógeno	18
4.3. Substrato para manutenção das plantas	19
4.4. Caracterização do patógeno	20
4.4.1. Caracteres morfológicos	20
4.4.2. Caracteres culturais	20
4.4.3. Caracteres bioquímicos	20
4.4.4. Serologia	21

4.4.4.1. Obtenção e conservação do an tissoro	21
4.4.4.2. Preparo dos antígenos	23
4.4.4.4. Teste usado para observar a reação serológica	24
4.5. Obtenção e padronização do inóculo	25
4.6. Testes de patogenicidade	26
4.6.1. Técnicas de inoculação	26
4.6.2. Efeito da idade do hospedeiro na mani festação dos sintomas	27
4.6.3. Tipos de reações e comportamento de linhagens e cultivares de milho a <i>P. alboprecipitans</i> , em condições de casa de vegetação	29
5. RESULTADOS	31
5.1. Caracterização do patógeno	31
5.1.1. Caracteres morfológicos	31
5.1.2. Caracteres culturais	33
5.1.3. Caracteres bioquímicos	33
5.1.4. Serologia	35
5.2. Testes de patogenicidade	37
5.2.1. Técnicas de inoculação	37
5.2.2. Efeito da idade dos hospedeiros na manifestação dos sintomas	37

5.2.3. Tipos de reações e comportamento de linhagens e cultivares de milho a <i>P. alboprecipitans</i> , em condições de casa de vegetação	40
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÕES	57
8. SUMMARY	59
9. LITERATURA CITADA	61

1. RESUMO

Estudou-se a bactéria agente causal da "queima bacteriana da folha" em milho. Os resultados foram obtidos através de observações de caracteres morfológicos, culturais e bioquímicos complementados por caracterização serológica através da técnica de dupla difusão em gel de agar. Concluiu-se que o patógeno em questão trata-se de *Pseudomonas alboprecipitans* Rosen.

Duas técnicas de inoculação foram testadas em uma linhagem e uma cultivar de milho, usando 18 isolados de bactéria do milho, em condições de casa de vegetação. Constituíram-se na deposição do inóculo, 10^8 células viáveis/ml, nos cartuchos das plantas, sendo que em um dos casos as plantas foram feridas e em outro não. Ambas as técnicas se mostraram igual

mente eficientes na reprodução dos sintomas da doença, o que permitiu detectar cepas com diferentes níveis de patogenicidade.

Hospedeiros com 12 e 18 dias de idade foram inoculados com 3 isolados da bactéria visando correlacionar a manifestação dos sintomas em função das idades das plantas. Constatou-se que é possível detectar resistência e suscetibilidade em linhagens e cultivares de milho, mesmo inoculadas com 12 dias de idade.

Variações nos tipos de reações de plantas de milho a *P. alboprecipitans* foram detectadas em condições de casa de vegetação. As reações de resistência foram caracterizadas por apresentarem pontos e riscas cloróticas ou manchas necróticas, estas localizadas e circundadas por halos de coloração avermelhada. Reações de resistência moderada se manifestaram na forma de riscas necróticas confinadas e ausência de clorose, enquanto que as reações de suscetibilidade revelaram um encharcamento intenso e áreas necrosadas ao longo da folha.

Vinte e cinco linhagens e cinco cultivares de milho foram testadas, em condições de casa de vegetação, visando o estudo das reações do hospedeiro a *P. alboprecipitans*. Os resultados revelaram a ocorrência de um alto grau de resistência tanto em linhagens como em plantas de certos cultivares. As reações ao patógeno variaram tanto entre como dentro dos diferentes materiais testados.

2. INTRODUÇÃO

Em decorrência da importância da cultura do milho para o Brasil e em vista da incidência de doenças ser um dos fatores condicionantes da baixa produtividade desta gramínea, em nosso país, vários estudos nos últimos anos tem sido conduzidos abordando aspectos Fitopatológicos, principalmente, no Estado de São Paulo.

As bacterioses, em milho, tem sido relegadas a segundo plano, quando comparadas com o volume de trabalhos dedicados as doenças fúngicas. Por exemplo, com relação à "queima bacteriana da folha" em milho, causada por *Pseudomonas alboprecipitans* Rosen, existe apenas um trabalho de constatação (FRENHANI et alii, 1969) e outro de reação varietal (FRENHANI

et alii, 1970).

A ocorrência dessa doença, em milho, já foi verificada, nos últimos anos, em diversas regiões produtoras ocasionando lesões nas folhas, afetando a sua capacidade fotossintética e causando danos em outras partes da planta.

Sendo o uso de variedades resistentes um dos métodos de maior eficiência no controle de doenças de plantas, a ocorrência desta bacteriose desperta interesse no que se refere a determinação de fontes de resistência, do hospedeiro, ao patógeno.

A constatação dessa doença incidindo com frequência sobre cultivares de milho, em diversos Estados da Federação, motivou o presente trabalho que teve por objetivos:

- caracterização morfológica, cultural, bioquímica e serológica da bactéria, isolada a partir de cultivar de milho;
- estudo de técnicas de inoculação;
- estudo da influência da idade do hospedeiro na manifestação da doença;
- determinação dos tipos de reações e suas frequências em linhagens e cultivares de milho, frente a bactéria, em condições de casa de vegetação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos gerais da doença

A "queima bacteriana da folha" em milho é referida por GITAITIS et alii (1978) como consequência do ataque da bactéria *Pseudomonas alboprecipitans* Rosen.

O patógeno, ocorrendo em condições naturais e causando necrose em folhas de *Setaria lutescens*, foi isolado e identificado por ROSEN (1922). Este autor realizou inoculações artificiais e constatou que *P. alboprecipitans* exibia potencial patogênico para diversas gramíneas cultivadas, tais como: centeio, cevada, aveia, capim Sudão, milho, sorgo e trigo.

A ocorrência natural da bactéria em milho foi

constatada por JOHNSON et alii (1929), no Estado do Alabama, que, além da queima bacteriana da folha, relataram também a podridão do colmo causada por *P. alboprecipitans*.

Posteriormente, JOHNSON et alii (1945) relataram a ocorrência da bacteriose em milho em 7 Estados do centro sul dos Estados Unidos, além de se referirem ao fato de que a bactéria afeta também o milho doce.

Na Austrália, a ocorrência da doença em milho foi relatada por Ludbrook em 1942 (JOHNSON et alii, 1949), o qual a descreve ocorrendo em reboleiras dentro de uma área, ou restrita a algumas plantas.

No Brasil a doença foi descrita por FRENHANI et alii (1969), ocorrendo em cultura comercial de milho, na região de Jarinópolis, SP. Após esta constatação, a queima bacteriana da folha foi verificada em diversas épocas e em várias localidades do Estado de São Paulo (FRENHANI et alii, 1970).

GITAITIS et alii (1976) relataram a ocorrência de *P. alboprecipitans* causando sintomas típicos da queima bacteriana da folha em plantas de capim Vasey (*Paspalum urvillei* Steud).

3.2. O patógeno

3.2.1. Caracterização

ROSEN (1922), quando caracterizou *Pseudomonas*

alboprecipitans, usou critérios de identificação, basicamente fundamentados em aspectos morfológicos, culturais, fisiológicos e patológicos.

Realizando estudos com *Pseudomonas alboprecipitans*, JOHNSON et alii (1949) e SCHAAD e SUMNER (1974) ratificaram as características citadas por ROSEN (1922) acrescentando, porém, os resultados de outras características culturais e bioquímicas. Aparentemente técnicas mais recentes como a eletrofotomicrografia e a serologia em dupla difusão em gel de agar não foram até agora empregadas na caracterização dessa bactéria. Estas técnicas são muito interessantes devido ao maior poder de resolução do microscópio eletrônico (HAGGIS, 1970) e a sensibilidade específica dos testes serológicos (SCHAAD, 1979).

A existência de dois nomes, *P. avenae*, referido originalmente por Manns em 1905 (GITAITIS et alii, 1978) e *P. alboprecipitans* descrita por ROSEN (1922), para designar a mesma bactéria, é motivo de controvérsia entre os pesquisadores. SCHAAD e SUMNER (1974) recomendam o uso de *P. avenae* e GITAITIS et alii (1978) concordam com a denominação de *P. alboprecipitans*.

Manns em 1909 (GITAITIS et alii, 1978) descreveu, em seu trabalho original, a aparente presença de endosporos em culturas velhas de *P. avenae*. ROSEN (1922) descreve *P. alboprecipitans*, sendo que uma das características mencionadas é a não presença de endosporos.

ELLIOTT (1920) ressalva que na realidade Manns trabalhou com várias doenças bacterianas, uma das quais foi a queima aureolar da aveia causada por *P. coronafaciens* (Elliott) Stapp, 1928. ELLIOTT (1930) cita *P. avenae* como sinônimo de *P. coronafaciens*.

Estudando características bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e patológicas de 5 "strains" de *P. alboprecipitans* e *P. avenae* reunidos na literatura, SCHAAD e SUMNER (1974) objetivavam uma conclusão taxonômica. Os resultados mostraram muito pouca diferença entre os dois patógenos de cereais. Concluíram que não se justificam dois epítetos para um mesmo organismo e que em virtude de *P. avenae* ser o mais antigo, recomendaram que *P. avenae* fosse reconhecido como nome e que *P. alboprecipitans* fosse considerado o último sinônimo de *P. avenae*.

Alegando que não existe uma cultura-tipo autêntica para *P. avenae* e que em função da descrição original ter sido feita inadequadamente e não ser claro que Manns tenha trabalhado com cultura pura, GITAITIS et alii (1978) concordaram plenamente em usar *P. alboprecipitans* para a bactéria agente causal da queima bacteriana da folha e da podridão do colmo em milho.

3.2.2. Isolamento

O isolamento de *P. alboprecipitans* a partir de

lesões típicas em milho é descrita por ROSEN (1922) seguindo metodologia de se esterilizar a superfície dos fragmentos, macerando-os em água destilada e posteriormente fazendo o plaqueamento da suspensão em meio de cultura contendo nutriente-agar.

Procedimento análogo ao anterior foi empregado por JOHNSON et alii (1949), porém empregando o meio de cultura constituído de carne-peptona-agar.

Ratificando, ainda, a metodologia usada por ROSEN (1922), SUMNER e SCHAAD (1977) isolaram *P. alboprecipitans* a partir de folhas de milho com sintomas típicos da queima bacteriana da folha.

3.3. Interação patógeno x hospedeiro

3.3.1. Inoculação e avaliação

Realizando inoculações artificiais, ROSEN (1922) fez referência de que *P. alboprecipitans* penetra no hospedeiro através dos estômatos e dos hidatôdeos, afirmação esta ratificada por ELLIOTT (1930). No mesmo trabalho, Rosen inoculou plântulas de diversos cereais nos estágios de 15 a 30cm de altura, não mencionando, porém, a idade ou o número de folhas das plantas. A avaliação foi feita medindo o grau de suscetibilidade em função do número e tamanho das manchas produzidas. Nes

te trabalho a inoculação experimental de *P. alboprecipitans* se deu através de dois métodos: no primeiro, com uma alça de platina espalhou-se o inóculo sobre a folha e, em outro, usou-se a nebulização da suspensão bacteriana através de um pulverizador. O primeiro método revelou ter a vantagem de coincidir o local da inoculação com o de infecção, porém é muito moroso e inexequível em função da não padronização do inóculo. O outro processo usando-se um pulverizador revelou-se mais praticável. Com referência a temperatura Rosen, neste trabalho, determinou que o ótimo para infecção se situa entre 29 e 35°C.

A maior quantidade de infecção foi obtida por JOHNSON et alii (1945) quando a temperatura da casa de vegetação foi relativamente alta. É mencionado, ainda, que sementes de milho dentado e milho doce inoculadas com suspensão de *P. alboprecipitans* em água produzem "seedlings" com lesões primárias de onde o organismo pode ser reisolado. Ressaltam ainda que suspensões da bactéria em água podem também causar podridão no colmo, tanto em campo como em casa de vegetação.

Em condições de casa de vegetação, JOHNSON et alii (1949) determinaram que *P. alboprecipitans*, considerando diversos hospedeiros, causava maior quantidade de doença a temperaturas elevadas, ao redor de 29 e 35°C. Quando a temperatura esteve abaixo de 21°C não ocorreu infecção ou quando ocorreu foi muito insignificante, sendo somente moderada por volta de 24°C. A infecção foi obtida por aspensão de uma suspensão da bactéria nas folhas dos hospedeiros, mantendo-se, em

seguida, um período de incubação de 24 horas em câmara úmida. Os sintomas apareceram 48 horas após a inoculação. Neste experimento a avaliação foi feita em função da quantidade de infecção atribuindo notas de 0 (sem infecção) até 5 (altamente infectado).

Em condições de casa de vegetação, FRENHANI et alii (1969) realizaram testes com *P. alboprecipitans* em plantas de milho com 20 dias de idade e estágio de 5 a 6 folhas. O inóculo foi preparado com colônias de 4 dias de idade, produzidas em meio de batata-dextrose-agar (BDA) e a inoculação foi feita mediante aspersão bacteriana (10^6 talos/ml) nas folhas das plantas com e sem ferimentos. As plantas inoculadas foram mantidas durante 24 horas em câmara úmida, e os sintomas apareceram após 48 horas da inoculação tanto nas folhas com ferimentos como nas folhas não feridas. Neste mesmo trabalho constataram que temperaturas ótimas para a ocorrência da doença estão por volta de 29,5 a 35,5°C. Na avaliação, 6 dias após a inoculação, verificou-se que os sintomas eram constituídos por manchas aquosas (encharcamento), bem como por tecidos necrosados.

No ensaio sobre comportamento de variedades, FRENHANI et alii (1970) procederam ao preparo do inóculo fazendo-se uma suspensão bacteriana usando de 5 a 6ml de água para cada tubo de cultura. A inoculação foi realizada empregando-se algodão embebido na suspensão o qual foi colocado sobre as folhas com ferimentos e sem ferimentos. Um outro processo adotado pelos mesmos autores foi a atomização da suspensão sobre

as folhas. O mesmo trabalho objetivou avaliar, além do comportamento das variedades, os dois processos de inoculação envolvidos. O critério de avaliação, ao 7º dia da inoculação, compreendeu o estabelecimento de notas, desde 0 (ausência de lesões) até 5 (lesões com mais de 10mm). O processo de atomização revelou-se mais satisfatório. As plantas inoculadas tinham idades desde 11 até 26 dias da semeadura. Tal parâmetro não foi considerado quando da avaliação do experimento.

Estudando o comportamento de diferentes regimes de luz e temperatura SCHAAD e SUMNER (1976) inocularam *P. avenae* em plantas de milho, 14 dias após a semeadura, usando uma concentração de inóculo de 10^6 células viáveis/ml sendo que as avaliações foram feitas a 3, 5 e 7 dias da inoculação e o critério considerado na avaliação foi o tamanho em mm^2 das manchas. Concluíram que o regime de luz, para os períodos estudados, não influencia no desenvolvimento da doença, enquanto o regime de temperatura tem uma importância bastante pronunciada, sendo que a maior quantidade de sintomas foi observada em temperaturas de $30/26^\circ\text{C}$ (dia/noite).

SUMNER e SCHAAD (1977) inocularam *P. avenae* em plantas de milho com idade de 3 a 9 semanas no estágio de 5 a 9 folhas. A bactéria foi cultivada em caldo nutritivo e a concentração da suspensão ajustada para 10^7 a 10^8 cel/ml. A inoculação foi feita colocando-se a suspensão no interior do cartucho ou injetando, no palmito, através de uma seringa. Os sintomas foram mais severos quando as plantas foram submetidas

a injeção. Neste trabalho foi constatado que não existe diferença significativa quando as plantas foram submetidas ou não a regimes de câmara úmida. Também foi observado que temperaturas baixas como 18/14^oC (dia/noite) propiciaram uma severa incidência da doença. A avaliação constou de notas desde 1 (sem sintomas) até 10 (necroses severas nas folhas das plantas).

3.3.2. Sintomatologia

GITAITIS (1978) cita como sintomas mais comuns do ataque de *P. alboprecipitans* em milho a formação de longas lesões estreitas na folhagem e podridão na base das espigas sendo que lesões no colmo, "lodging" e podridão do pendão também podem aparecer.

Os sintomas da doença, segundo ROSEN (1922), variam um pouco em função do hospedeiro e consideravelmente em função do ambiente sob o qual a infecção se desenvolve. O autor cita temperaturas ao redor de 32^oC como ótimas para o desenvolvimento da doença que, sob condições de umidade elevada as manchas e riscas aparecem na forma de encharcamento. Estas se tornam marrom ou marrom acinzentado quando a umidade decresce consideravelmente. Ressalta, ainda, que o ataque de *P. alboprecipitans* em trigo, centeio, cevada e milho se traduz em sintomatologia bastante semelhante, caracterizada normalmente por manchas com tamanho e formas variadas e a predominância de

áreas com coloração verde acinzentado, amarelo claro ou marrom, sendo que em milho a presença de riscas amareladas e esbranquiçadas são comuns.

Referindo-se a *P. alboprecipitans* como agente causal da podridão do colmo e da queima bacteriana da folha do milho, JOHNSON et alii (1929) citam a podridão como ocorrendo logo acima da inserção das espigas causando uma podridão mole de coloração marrom escuro no internódio do colmo. Esta podridão, normalmente, mata o topo antes ou imediatamente após a emergência da panícula produzindo efeito semelhante ao nanismo nas plantas. Ainda segundo os autores, nas folhas, a queima ocorre no meio ou na parte superior das mesmas. As lesões são, normalmente, de comprimentos e larguras variáveis, algumas vezes coalescendo e necrosando grandes porções do limbo foliar. As lesões jovens são encharcadas e as lesões velhas são secas no centro com coloração de palha nas margens. O ataque intenso pode tornar a folha fragmentada. O exame, ao microscópio, de lesões jovens mostrou os tecidos extremamente invadidos pela bactéria.

JOHNSON et alii (1949) relatam que em folhas de milho o sintoma da infecção por *P. alboprecipitans* se apresenta na forma de lesões, manchas ou riscas, espalhadas e pouco delimitadas. As manchas, normalmente, são elípticas ou alongadas, medindo de 1 a 2cm de comprimento; as riscas são necróticas com cerca de 2 a 5cm de largura e 10 a 40cm de comprimento. As lesões podem-se coalescer, formando extensas áreas

necróticas, envolvendo toda extensão da folha ou considerável parte dela. Secções das lesões, observadas ao microscópio, mostram abundante fluxo de bactérias com intensa motilidade.

Quando constataram a doença no Brasil, FRENHANI et alii (1969) citam como características das manchas foliares a presença de lesões alongadas, de coloração palha na região central e marrom avermelhada nos bordos com grande variação de dimensões. Observou também a frequente coalescência de lesões de pequeno tamanho, de modo a serem invadidas extensas áreas das folhas, bem como a presença de estrias de coloração semelhante a das manchas. No mesmo trabalho, em condições de casa de vegetação, é relatado que a bacteriose, quando a inoculação foi feita aspergindo a suspensão sobre as folhas, se manifestou pela formação de manchas aquosas (encharcamento e estrias).

3.3.3. Comportamento do hospedeiro

Testando diversas variedades de milho, ROSEN (1922) não conseguiu determinar níveis de resistência dos hospedeiros uma vez que as condições ambiente não foram adequadamente controladas.

O milho híbrido dentado mostrou-se relativamente mais resistente que duas variedades de milho doce, segundo JOHNSON et alii (1949), quando testados em condições de casa de vegetação.

Além de fatores climáticos tais como temperatura e umidade, FRENHANI et alii (1970) ressaltaram outro fator que tem contribuído de forma destacada para a ocorrência de variações nos sintomas e na gravidade da doença que é o plntio intensivo e desuniforme, em São Paulo, de variedades e linhagens de milho. Neste trabalho, os pesquisadores testaram o comportamento, em condições de casa de vegetação, de variedades de milho frente a *P. alboprecipitans*. Foram empregados duas variedades do tipo dentado (Maya III e IAC-1 II), uma variedade do tipo semi-dentado (Hmd 7974), uma variedade pipoca e uma linhagem. Concluíram que a variedade pipoca foi a que apresentou maior nível de resistência sendo seguida pelo Hmd 7974. O Maya III apresentou o menor nível de resistência sendo que o IAC-1 II e a linhagem comportaram-se intermediariamente. O critério empregado na avaliação constou de observações da frequência e do tamanho das lesões.

JOHNSON et alii (1949) e GITAITIS et alii (1978) fazem referência da alta suscetibilidade de milho doce, *Zea mays saccharata* (STURTVANT) Bailey, a *P. alboprecipitans*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Meios de cultura

Para os isolamentos, manutenção de culturas e obtenção de populações bacterianas foram utilizados meios sólido e líquido de nutriente-agar, Na e CN, respectivamente, referidos por LOURES e GUIMARÃES (1975) cuja composição do meio sólido é a seguinte:

Extrato de carne	3,0g
Peptona	10,0g
Na ₂ HPO ₄	1,0g
NaCl	5,0g
Agar	15,0g
Água destilada	1.000ml

O meio líquido tem a mesma composição excetuando-se o agar.

4.2. Isolamento e preservação do patógeno

As bactérias foram isoladas a partir de folhas de plantas de milho que apresentavam lesões relativamente novas, caracterizadas por riscas encharcadas, típicas da "queima bacteriana da folha". Com auxílio de uma tesoura recortaram-se fragmentos de aproximadamente 10mm² os quais foram submetidos ao seguinte tratamento: imersão em álcool 95% durante 1 minuto, transferência posterior para solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5% durante 1 minuto e, finalmente, duas lavagens rápidas em água destilada estéril. Após esta operação foram usados os seguintes métodos de isolamento:

MÉTODO I - fragmentos foram transferidos para tubos de ensaio contendo cerca de 1ml de água destilada esterilizada. Com auxílio de um bastão de vidro, previamente flambado, foi feito um macerado dos tecidos. Utilizando-se uma alça de platina procedeu-se a passagem para placas de Petri, contendo meio de NA, sob a forma de riscas (SUMNER e SCHAAD, 1977).

MÉTODO II - baseado em AKIBA (1978), consiste na utilização de uma micro pipeta de Pasteur para captar o fluxo bacteriano oriundo do vaso da região lesionada quando focalizado ao microscópio

ótico e a posterior transferência para placas de Petri contendo meio de cultura.

Para ambos os métodos a incubação se deu a 28°C durante 48 horas, quando então puderam ser evidenciadas colônias isoladas do patógeno as quais foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio sólido de NA.

Secções de folhas exibindo lesões típicas da bacteriose foram herborizadas e em seguida acondicionadas em sacos de papel as quais foram armazenadas em câmara fria a 10 - 15°C para posterior isolamento.

Culturas puras da bactéria foram preservadas em meio sólido de NA sob óleo mineral e em meio líquido de CN, sendo também mantidas em câmara fria com temperatura em torno de 15°C.

4.3. Substrato para manutenção das plantas

As plantas utilizadas para o reisolamento da bactéria, como também em testes de patogenicidade, foram cultivadas em vasos de alumínio com 14,5cm de diâmetro, contendo substrato constituído de uma mistura de esterco de curral, areia e solo argiloso na proporção de 1,5 : 1,0 : 3,0 .

4.4. Caracterização do patógeno

4.4.1. Caracteres morfológicos

Para o estudo morfológico foram feitas as seguintes observações: coloração negativa; coloração de Gram; prova de motilidade em gota pendente; medição das dimensões celulares em microscópio ótico e obtenção de eletrofotomicrografia. Para todos os testes foram empregadas culturas com idades entre 24 e 48 horas de incubação a temperatura de 28°C.

4.4.2. Caracteres culturais

Foram realizadas constatações sobre tipos de crescimento: em placas de Petri contendo nutriente-agar (NA): em tubos inclinados contendo NA e em tubos contendo caldo-nutritivo (CN). As incubações se deram sempre a 28°C.

4.4.3. Caracteres bioquímicos

Estas provas foram desenvolvidas seguindo as metodologias descritas pela SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS (1957) e ROMEIRO (1976).

Os testes realizados foram: exigência de oxigê

nio; produção de amônia; redução de nitrato; produção de H₂S; produção de indol; hidrólise do amido; fermentação de carboidratos (maltose, sacarose, lactose, dextrose, levulose, arabinose, xilose, rafinose, manose e glicose), objetivando verificar a formação de ácidos orgânicos e gases; oxidase (KOVAKS, 1956); liquefação da gelatina; fluorescência em meio de King "B" (TUIITE, 1969) e hipersensibilidade (KLEMENT, 1963 e KLEMENT et alii, 1964).

O inóculo inicial utilizado para a realização das provas bioquímicas foi obtido a partir de culturas em meio sólido de NA com 24 horas de incubação a 28°C.

As avaliações para os diferentes testes foram feitas dentro do período determinado para cada um deles, segundo a sua especificidade.

As caracterizações mencionadas fornecem o acervo de informações necessárias para a especificação da bactéria agente causal da "queima bacteriana da folha" em milho.

4.4.4. Serologia

4.4.4.1. Obtenção e conservação do antissoro

A bactéria em estudo, utilizada para a obtenção do antígeno, foi cultivada a 28°C por um período de 48 horas em

placas de Petri contendo meio de NA. Após o desenvolvimento, as colônias foram removidas do substrato, por raspagem, mediante o uso de uma alça de Drigalsky, sendo as bactérias lavadas por duas vezes em água estéril através de centrifugação (Centrífuga Sorvall - SS-4) a 3.000 gravidades por 5 minutos. Após a lavagem as bactérias foram transferidas para uma solução salina (NaCl 0,85%) previamente esterilizada. A suspensão cuja concentração foi ajustada de forma a conter aproximadamente 10^9 cel/ml foi mantida em congelador (NAMEKATA, 1971).

Para a formação do antissoro específico foi empregado um coelho da raça Nova Zelândia pesando cerca de 3kg.

O antígeno emulsionado (v/v) em adjuvante incompleto de Freund (Difco) foi injetado por via sub-cutânea. Cada aplicação envolvia um volume de 1cm^3 da emulsão. Um total de 11 aplicações foram feitas, sendo de 3 dias o intervalo entre duas delas. Antes da primeira injeção do antígeno, fez-se uma sangria e o soro normal (SN) obtido foi mantido em congelador para, posteriormente, ser utilizado como controle nas reações serológicas (NAMEKATA, 1971).

A partir da sétima aplicação foram realizadas 9 sangrias, também com intervalos de 3 dias e os soros preparados receberam os códigos AS_1 , AS_2 ,, AS_9 , sendo acondicionados em vidros e ao volume contido, normalmente 5ml, foi adicionado 1 gota de Merthiolate 1:1000 para evitar contaminações. Os frascos contendo os antissoros foram mantidos em congelador.

4.4.4.2. Preparo dos antígenos

O cultivo e remoção da bactéria seguiu a mesma técnica descrita no ítem anterior.

O volume de 10ml da suspensão bacteriana com cerca de 10^9 cel/ml em solução salina 0,85% foi centrifugada a 12.000 gravidades durante 10 minutos. Tal procedimento visou eliminar parcialmente a substância mucilagínosa presente nas células bacterianas. O sobrenadante foi eliminado e a fração decantada novamente suspensa em cerca de 5ml da solução salina 0,85% esterilizada.

Esta suspensão foi colocada em um almofariz de porcelana contendo cerca de 1ml de areia (peneira 40 mesh) levando-se em seguida ao congelador. Após a solidificação procedeu-se a ruptura das células, usando-se para isto um bastão de porcelana com o qual se fazia a compressão até obter-se a liquefação; tal operação de solidificação - maceração - liquefação foi repetida 4 vezes e ao final a suspensão foi centrifugada a 3.000 gravidades durante 5 minutos. A parte decantada foi eliminada e o sobrenadante coletado em vidros, sendo que uma gota de Merthiolate 1:1000 foi adicionada para evitar contaminações. Os antígenos preparados receberam as seguintes codificações:

AG_r = *Pseudomonas rubrilineans* isolada de folhas de cana-de-açúcar com sintoma típico de estria vermelha - cedida pe

lo Dr. Álvaro Sanguino - Estação Experimental da Coopersucar.

AG_m = Bactéria isolada de planta de milho apresentando sintoma típico da "queima bacteriana da folha".

AG_a = *Pseudomonas alboprecipitans* (tipo) proveniente da National collection of Plant Pathogenic Bacteria - Harpenden, Inglaterra.

4.4.4.3. Teste usado para observar a reação serológica

O teste empregado foi o de dupla difusão em gel de agar, feito segundo as técnicas recomendadas por OLIVEIRA (1967) e KIMATI (1975).

O procedimento obedeceu a seguinte marcha: 5ml de meio gel (constituído de 1% de agar; K_2HPO_4 - KH_2PO_4 0,01 M a pH 7,2 e 0,01% de Merthiolate) foram colocadas, ainda fundente, sobre lâminas de vidro (75 x 25cm) e deixados em temperatura ambiente para solidificar. Posteriormente foram feitos os orifícios, sendo que o diâmetro, número e disposição dos mesmos são padrão do aparelho furador (Furagar) (LEITE, 1975). A distribuição dos antígenos (AG) e dos antissoros nos orifícios se deu com o auxílio de micro pipeta de Pasteur. As lâminas, assim preparadas, foram colocadas em placas de Petri, juntamente

te com um pedaço de algodão embebido em água a fim de manter a umidade e mantidas em temperatura ambiente até o aparecimento das linhas de precipitação, quando então foram conservadas em geladeira.

O teste foi repetido, sendo sempre incluídos controles, usando soro normal, para melhor interpretação dos resultados.

A titulação do antissoro foi feita empregando-se, também, a técnica de dupla difusão em agar, procedendo-se a diluição em solução de salina tamponada ($K_2HPO_4 - KH_2PO_4$ 0,01 M; NaCl 0,85%; pH 7,2), por fatores de (2^{-n}) , n variando de 1 a 4).

4.5. Obtenção e padronização do inóculo

O inóculo foi preparado, cultivando-se as bactérias em meio sólido de NA durante 48 horas a temperatura de $28^{\circ}C$. A concentração, padronizada para todos os ensaios deste trabalho foi ajustada para 10^8 células bacterianas por ml de água destilada, determinando-se a transmitância da suspensão em um espectrofotômetro "Espectronic 20", com filtro de 580mm, correlacionando-se a leitura a uma curva obtida para a relação: nº de células viáveis por ml x transmitância. Para cada 100ml de água foi adicionado 1 gota do agente molhante Tween 80, a fim de se obter uma suspensão homogênea (SUMNER e SCHAAD, 1977).

4.6. Testes de patogenicidade

4.6.1. Técnicas de inoculação

Os hospedeiros neste teste constituíram-se de uma linhagem (929-B-3) e uma cultivar (milho doce de Cuba).

Foram utilizados um total de 18 isolados de diferentes bactérias obtidas a partir de plantas de milho, de várias procedências, apresentando sintomas típicos da "queima bacteriana da folha".

O teste foi conduzido em condições de casa de vegetação. Foram considerados tratamentos: plantas com ferimentos e plantas sem ferimentos. O delineamento constou de parcelas de 1 planta repetidas 3 vezes, para cada tratamento.

As inoculações tiveram o seguinte procedimento: 1ml do inóculo foi depositado no interior do cartucho de cada planta. Posteriormente, utilizando-se uma agulha odontológica, flambada, furou-se ao redor do cartucho, de forma a umedecer o ferimento sem, contudo, permitir o extravasamento do inóculo. As plantas não feridas, somente receberam o inóculo no cartucho na mesma quantidade. Plantas que receberam 1ml de água destilada nos cartuchos, com ferimentos e sem ferimentos, foram considerados testemunhas.

Após a inoculação, as plantas foram acondicionadas em câmara úmida por um período de 24 horas. Cinco dias

antes da inoculação as plantas receberam adubação química com Nutrite (15 - 30 - 15) na dosagem aproximada de 0,7g por vaso.

A avaliação final foi feita 7 dias após a inoculação e obedeceu ao seguinte critério de notas:

- 0 = ausência de sintomas
- 1 = pontos e riscas cloróticas
- 2 = riscas encharcadas confinadas
- 3 = encharcamento intenso

4.6.2. Efeito da idade do hospedeiro na manifestação dos sintomas

Para o presente experimento, foram empregados os seguintes hospedeiros: linhagem 929-B-3 e cultivares milho doce de Cuba, Central-Mex e M-102 da Agrocereis.

Os 3 isolados da bactéria, testados, foram os que manifestaram maior patogenicidade quando de inoculações experimentais previamente realizadas, os quais receberam os códigos 4, 6 e 10.

O teste foi conduzido em condições de casa de vegetação. Os tratamentos constituíram-se de inoculações aos 12 e 18 dias após a sementeira. No delineamento, em blocos ao acaso, foi considerado como parcela 1 vaso contendo 7 sementes, repetidos 4 vezes.

As inoculações foram feitas seguindo a técnica de deposição de 1ml do inóculo no cartucho de cada planta. As testemunhas receberam 1ml de água destilada.

Após a inoculação as plantas foram acondicionadas em câmara úmida por um período de 24 horas. Cinco dias antes de cada inoculação as plantas receberam adubação química com Nutrite (15 - 30 - 15) na dosagem aproximada de 0,7g por vaso.

As avaliações foram feitas 8 dias após cada inoculação e o critério adotado consistiu na separação das plantas em 3 grupos:

R = Resistentes. Presença de pontos e riscas cloróticas ou halos de inibição circundando manchas necróticas;

MR = Moderadamente Resistentes. Presença de riscas necrosadas e/ou encharcadas, porém confinadas, ausência de clorose;

S = Suscetíveis. Presença de áreas necrosadas e/ou encharcadas.

4.6.3. Tipos de reações e comportamento de linhagens e cultivares de milho a *P. alboprecipitans*, em condições de casa de vegetação

Neste ensaio, foram empregadas as cultivares Piranão, x-307-C2 (Pioner), M-102 (Agroceres), Central-Mex e milho doce de Cuba e linhagens obtidas dos compostos A e B do Instituto de Genética.

Todas as linhagens dos compostos A e B tem, respectivamente, os prefixos CA e CB que antecede os números das linhagens mencionadas constantes nas tabelas 4, 5 e 6.

Cada tratamento era constituído por uma parcela de 1 vaso com 6 sementes repetidas 4 vezes. O delineamento foi em blocos ao acaso.

O isolado de número 10 foi o escolhido em função da patogenicidade que apresentou em inoculações anteriores.

As inoculações foram feitas 12 dias após a semeadura pelo sistema de deposição do inóculo no cartucho da planta. Os controles receberam água destilada. Após inoculadas, as plantas foram submetidas a um regime de câmara úmida por um período de 24 horas.

As plantas receberam, 5 dias antes de inoculação, adubação com Nutrite (15 - 30 - 15) na dosagem de 0,7g por vaso.

Este mesmo ensaio foi conduzido em duas épocas diferentes, janeiro e abril de 1978.

Tipos de reações

Este teste teve por finalidade detectar variações nos tipos de reações dos hospedeiros, caracterizando através de sua manifestação, plantas Resistentes, Moderadamente Resistentes e Suscetíveis a *P. alboprecipitans*. As determinações foram feitas 8 dias após as inoculações através de descrição dos sintomas e de fotografias.

Comportamento de linhagens e cultivares

O presente teste objetivou determinar a frequência dos tipos de reações em cultivares e em linhagens dos compostos A e B. As avaliações foram feitas 8 dias após as inoculações e o parâmetro empregado foram as descrições dos sintomas de Resistência, Resistência Moderada e Suscetibilidade que se constituíram nos resultados do teste anterior.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização do patógeno

5.1.1. Caracteres morfológicos

A bactéria apresentou-se sob a forma de bastonetes, quando observadas em coloração negativa, com extremidades arredondadas, normalmente isoladas ou, excepcionalmente, em cadeias. O Teste de Gram, apresentou reação negativa (-).

A bactéria revelou alta motilidade, sendo que o número de flagelos foi observado através de eletrofotomicrografia obtida da bactéria cultivada em meio de NA. Constatou-se que possui um flagelo polar (fig. 1). As dimensões da bacté-

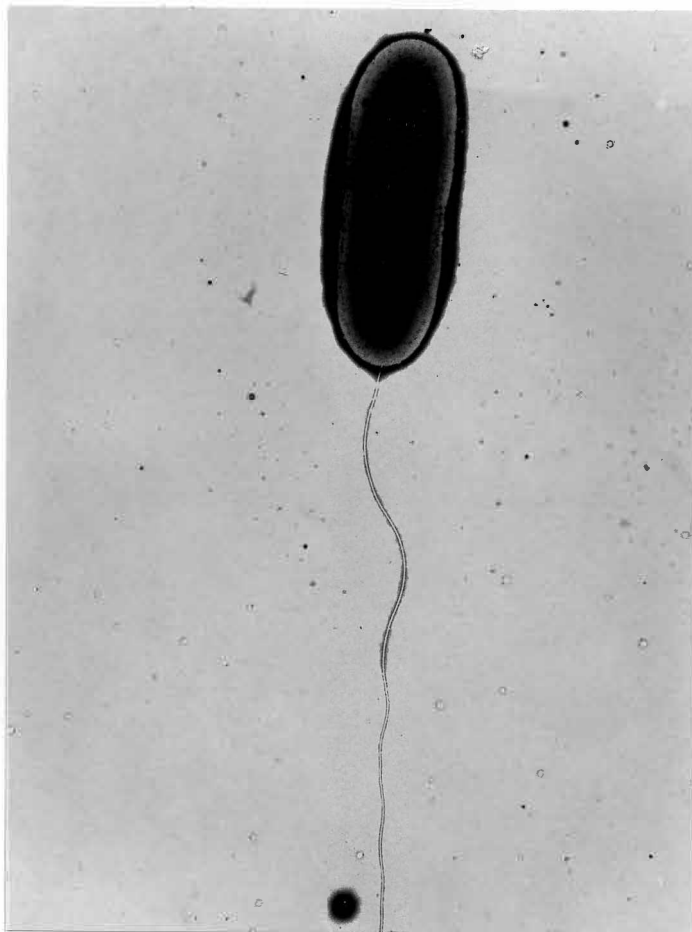


Fig. 1. Eletrofotomicrografia de *Pseudomonas alboprecipitans*, obtida pela técnica de coloração negativa, usando o ácido fosfotungstico (PTA). (x 15.277).

ria quando tomadas ao microscópio ótico, considerando 100 células, apresentaram médias de $2,81 \times 1,16\mu\text{m}$, enquanto cálculo baseado na figura 1 fornece dimensões de $2,90 \times 0,90\mu\text{m}$.

5.1.2. Caracteres culturais

Placas com nutriente-agar - As colônias da bactéria, observadas 24 horas após o plaqueamento, mediante o emprego de um microscópio estereoscópico, se apresentaram com formato circular, brilhantes, bordos inteiros, coloração creme, poucos convexas, tornando-se visíveis a olho nu após 48 horas de incubação e possuindo consistência viscosa. Colônias em fase estacionária de crescimento, apresentaram coloração esbranquiçada.

Agar-inclinado - O crescimento foi bastante visível, pouco translúcido, não confundindo-se com o meio, sendo filiforme.

Caldo-Nutritivo - Observou-se que ocorre a formação de membrana, superficialmente, após 24 horas de cultivo. O restante do meio apresentou leve turvação.

5.1.3. Caracteres bioquímicos

Exigência de oxigênio - A bactéria se comportou

como aeróbia estrita após 4 dias de crescimento em placas com meio de NA tendo na superfície deste, lamínulas esterilizadas.

Produção de amônia - Produziu amônia após 5 dias de crescimento, empregando água peptonada.

Redução de nitratos - Houve redução de nitratos verificada após 2 dias de crescimento a 28°C em meio de CN + NO₃ (Reativo de Griess-Ilosva).

Produção de gás sulfídrico (H₂S) - Não houve formação do gás após duas semanas de observações.

Produção de indol - Não houve produção de indol após 48 horas de crescimento a 28°C (Reativo de Ehrlich-Bohme).

Hidrólise do amido - Foi observada ação hidrolítica bastante pronunciada, evidenciada por halos claros ao redor das riscas após a adição da solução de Lugol. A incubação foi feita por 7 dias a 28°C e o meio utilizado foi o NA.

Fermentação de carboidratos - Após 7 dias de incubação a 28°C não foi observado a formação de gás, porém, constatou-se a formação de ácidos, após a adição do Reativo de Andrade, nos meios contendo os seguintes carboidratos: levulose, arabinose, manose e dextrose.

Reação de oxidase - A reação mostrou-se negativa (-), evidenciando, portanto, a ausência da referida enzima.

Liquefação da gelatina - A liquefação foi lenta,

porém evidenciada após 14 dias de incubação, sendo mais perceptível na superfície dos tubos.

Fluorescência - A reação mostrou-se negativa (-), o que dá indicação de ausência de pigmentos fluorescentes.

Hipersensibilidade - As reações de hipersensibilidade, em folhas de fumo, foram caracterizadas como positivas após 24 horas da inoculação.

5.1.4. Serologia

Testes de dupla difusão em agar, realizados com soros obtidos na primeira sangria (SN) e nas 5 subseqüentes (AS₁ a AS₅) contra antígenos AG_a, AG_r e AG_m, mostraram os resultados expressos na Tabela 1.

O antissoro apresentou um baixo título, evidenciando reação somente até a diluição 1/2.

Tabela 1. Reações serológicas entre os antissoros SN, AS₁, AS₂, e AS₅ obtidos em coelho, imunizado com o isolado AG_m, contra os antígenos AG_a, AG_r e AG_m.

Período de imunização (em dias)	Código do soro	Reação ⁽¹⁾ com antígenos ⁽²⁾		
		AG _a	AG _r	AG _m
0	SN	-	-	-
34	AS ₁	+	-	+
37	AS ₂	+	-	+
41	AS ₃	+	-	+
44	AS ₄	++	-	++
48	AS ₅	+	-	+

(1) (-) ausência de linha de precipitação; (+) presença de linha de precipitação; (++) linha de precipitação mais nítida.

(2) antígenos AG_a, de *P. alboprecipitans* (tipo); AG_r, de *P. rubrilineans* e AG_m, da bactéria isolada do milho.

5.2. Testes de patogenicidade

5.2.1. Técnicas de inoculação

Confrontando as duas metodologias de inoculação (com ferimentos e sem ferimentos) foram constatados os resultados apresentados na Tabela 2.

5.2.2. Efeito da idade dos hospedeiros na manifestação dos sintomas

A Tabela 3 nos apresenta os dados obtidos quando os hospedeiros foram inoculados aos 12 e aos 18 dias de se-meadura.

Tabela 2. Patogenicidade de isolados de bactérias obtidas do milho, por 2 métodos de inoculação, frente a uma linhagem e uma cultivar do hospedeiro.

Isolados	Índice de doença ^(a)			
	Linhagem 929-B-3		Milho doce de Cuba	
	Inoculação (b)		Inoculação	
	CF	SF	CF	SF
11	1(c)	0	3	3
12	0	0	3	3
2	1	1	3	3
3	1	1	1	1
41	1	1	3	3
42	1	1	1	1
51	1	1	1	1
52	1	1	1	1
61	1	1	1	1
62	1	1	3	3
71	1	1	2	2
72	1	1	1	1
73	0	0	1	1
81	1	2	1	1
82	1	1	1	1
9	3	3	3	3
10	3	3	3	3
111	1	1	1	1
Testemunha	0	0	0	0

(a) Índice de doença: 0 - Ausência de sintomas; 1 - Pontos e riscas cloróticas; 2 - Riscas encharcadas confinadas e 3 - Encharcamento intenso.

(b) Inoculação: CF (com ferimentos) e SF (sem ferimentos).

(c) Considerando o índice mais elevado das 3 repetições.

Tabela 3. Reação de 1 linhagem e 3 cultivares a 3 isolados de bactérias obtidos do milho quando inoculados aos 12 e 18 dias da semeadura.

Idade das plantas na inoculação	Isolados	Nº de plantas, Resistentes (R), Moderadamente Resistentes (MR) e Suscetíveis (S) dos hospedeiros											
		929-B-3 (linhagem)			M.D. Cuba			Central Mex			M-102		
		R	MR	S	R	MR	S	R	MR	S	R	MR	S
<u>12 dias</u>	4	4	7	9	8	6	3	15	2	6	2	4	11
	6	1	6	11	15	3	2	10	4	8	4	6	11
	10	2	9	7	12	1	4	18	2	1	2	7	11
<u>18 dias</u>	4	3	7	12	10	4	8	16	5	2	2	9	11
	6	3	5	12	5	5	12	15	4	4	8	3	14
	10	3	7	10	11	5	7	16	6	1	9	7	12

5.2.3. Tipos de reações e comportamento de linhagens e cultivares de milho a *P. alboprecipitans*, em condições de casa de vegetação

Os diferentes tipos de reações observadas são apresentados a seguir:

Reação de resistência

- a) Plantas com sintomas visíveis por ocasião da avaliação, representados por pontos e riscas cloróticas, ausência de necrose (fig. 2 A).
- b) Plantas com sintomas visíveis por ocasião da avaliação, representados por manchas necróticas confinadas e circundadas por bordos de coloração avermelhada. (fig. 2 B).

Reação de resistência moderada

Plantas com sintomas representados por riscas cloróticas e necróticas, confinadas, com comprimentos variáveis ao longo das folhas (fig. 3).

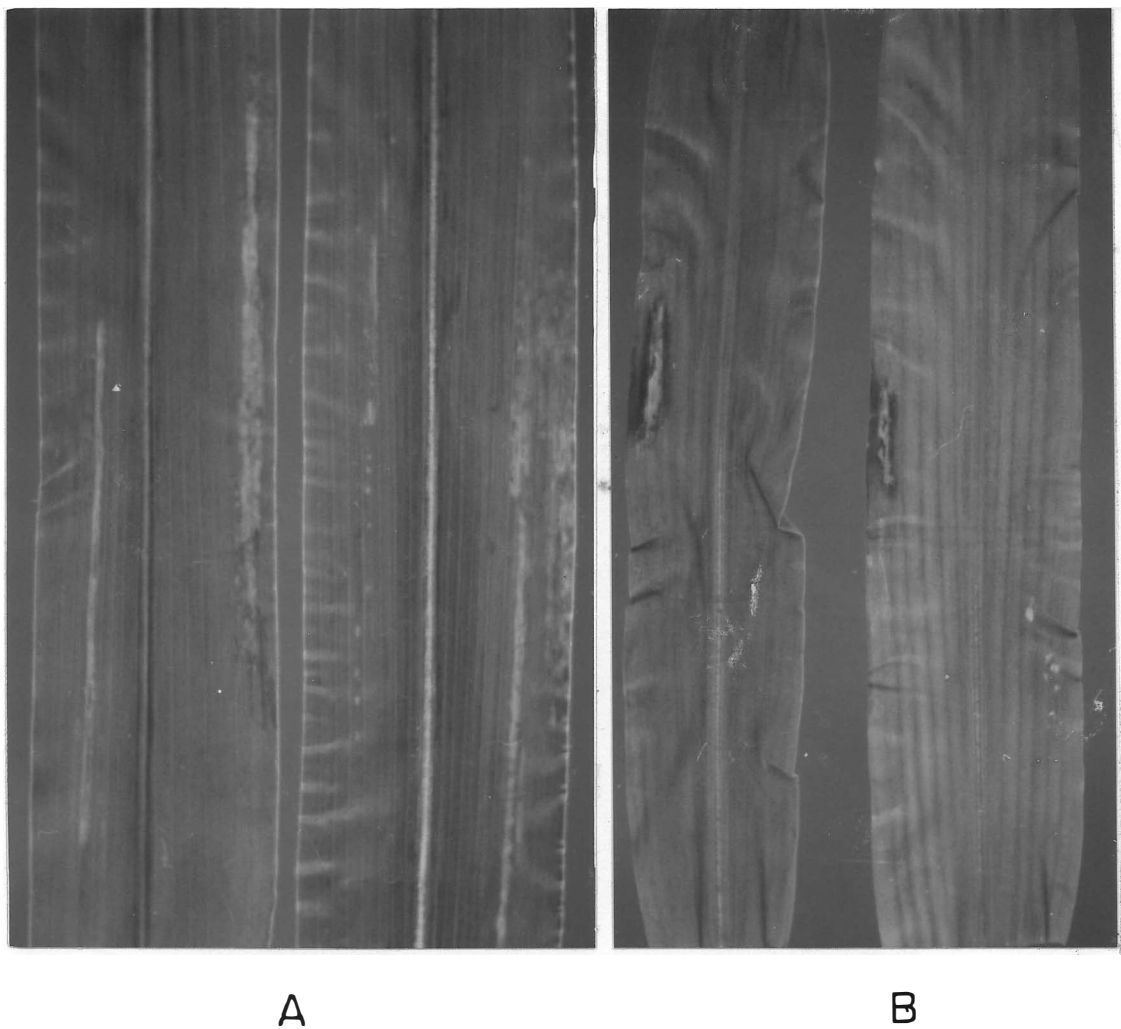


Fig. 2. Reação de resistência, em milho, à *P. alboprecipitans*, em condições de casa de vegetação.
Linhagens: CA-35-2 (A) e CB-18-3 (B).

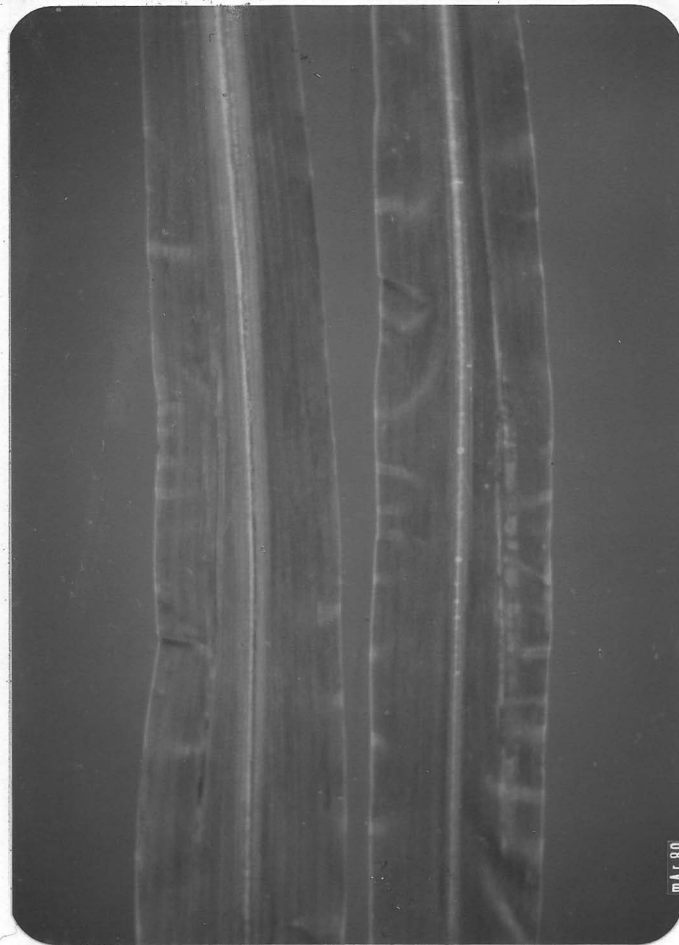


Fig. 3. Reação de resistência moderada, em milho, à *P. alboprecipitans*, em condições de casa de vegetação. Linhagem: CB-14-1.

Reação de suscetibilidade

Constatação de áreas necrosadas e riscas com encharcamento ao longo de toda extensão da folha (fig. 4).

A Tabela 4 apresenta o resultado da avaliação do comportamento de linhagens e cultivares de milho frente a *P. alboprecipitans* em condições de casa de vegetação.

A Tabela 5 expressa, em parte, resultados referentes a repetição do ensaio constante na tabela 4.

A Tabela 6 apresenta dados que são as médias das duas tabelas anteriores (4 - em parte - e 5).

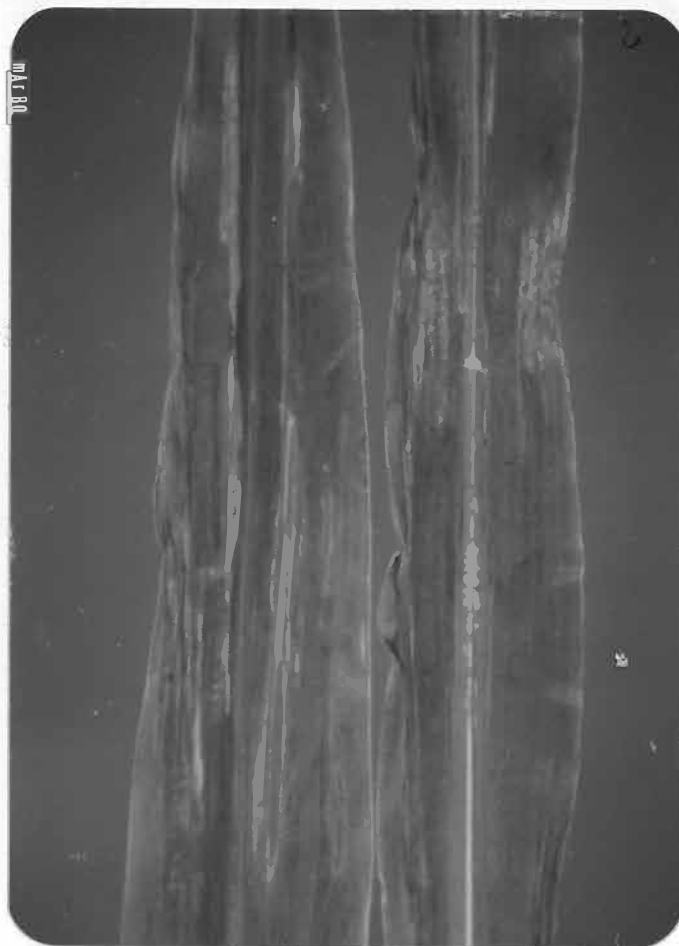


Fig. 4. Reação de suscetibilidade, em milho, à *P. alboprecipitans*, em condições de casa de vegetação. Linhagem: CB-13-1.

Tabela 4. Frequência dos tipos de reações em plantas de milho, em condições de casa de vegetação, frente à *P. alboprecipitans* (1º ensaio - janeiro).

Hospedeiros	Nº de plantas testadas	% de plantas com tipos de reações		
		R ^(a)	MR	S
CA-10-1	13	30,8	38,4	30,8
CA-11-1	9	11,9	0,0	88,1
CA-11-2	4	0,0	50,0	50,0
CA-16-2	16	12,5	81,2	6,3
CA-17-1	13	46,1	46,1	7,8
CA-23-2	7	0,0	71,4	28,6
CA-24-3	8	0,0	25,0	75,0
CA-24-4	12	41,6	16,8	41,6
CA-26-2	1	0,0	100,0	0,0
CA-26-3	13	92,3	7,7	0,0
CA-35-2	20	100,0	0,0	0,0
CB-11-5	17	11,7	41,1	47,2
CB-13-1	14	0,0	7,7	92,3
CB-13-3	20	0,0	20,0	80,0
CB-14-1	14	7,1	64,3	28,6
CB-16-1	20	90,0	5,0	5,0
CB-17-1	11	54,5	45,5	0,0
CB-18-1	16	93,8	6,2	0,0
CB-18-2	19	100,0	0,0	0,0
CB-18-3	18	100,0	0,0	0,0
CB-22-4	21	47,6	42,9	9,5
CB-24-3	14	0,0	0,0	100,0
CB-24-4	18	11,1	38,9	50,0
A-1-S-1	19	36,8	36,8	26,4
Piranão	16	81,3	0,0	18,7
x-307-C2	6	66,7	33,3	0,0
M-102	6	0,0	66,7	33,3
Central-Mex	20	70,0	20,0	10,0
Doce-Cuba	12	16,7	33,3	50,0
929-B-3	13	7,7	84,6	7,7

(a) Resistente (R); Moderadamente Resistente (MR) e Suscetível (S).

Tabela 5. Frequência dos tipos de reações em plantas de milho, em condições de casa de vegetação, frente a *P. alboprecipitans* (2º ensaio - abril).

Hospedeiros	Nº de plantas testadas	% de plantas com tipos de reações		
		R ^(a)	MR	S
CA-10-1	10	20,0	60,0	20,0
CA-11-1	12	0,0	100,0	0,0
CA-17-1	15	93,3	6,7	0,0
CA-24-4	18	55,5	11,1	33,4
CA-26-3	18	72,2	22,2	5,6
CA-35-2	19	100,0	0,0	0,0
CB-11-5	16	6,3	37,5	56,2
CB-13-1	11	9,1	36,4	54,5
CB-13-3	16	6,3	43,7	50,0
CB-14-1	18	11,1	77,8	11,1
CB-16-1	17	82,4	17,6	0,0
CB-17-1	13	69,2	7,7	23,1
CB-18-1	10	90,0	0,0	10,0
CB-18-2	11	100,0	0,0	0,0
CB-18-3	17	94,0	0,0	6,0
CB-22-4	21	28,6	57,1	14,3
CB-24-3	14	21,4	50,0	28,6
CB-24-4	15	6,6	6,6	86,8
A-1-S-1	19	15,8	42,1	42,1
929-B-3	18	61,1	38,9	0,0

(a) Resistente (R); Moderadamente Resistente (MR) e Suscetível (S).

Tabela 6. Frequência dos tipos de reações em plantas de milho, em condições de casa de vegetação, frente a *P. alboprecipitans*. Médias dos 2 ensaios (Tabela 4 em parte, e Tabela 5).

Hospedeiros	Nº médio de plantas testadas	% de plantas com tipos de reações		
		R ^(a)	MR	S
CA-10-1	11	25,4	49,2	25,4
CA-11-1	10	5,9	50,0	44,1
CA-17-1	14	69,7	26,4	3,9
CA-24-4	15	48,5	13,9	37,6
CA-26-3	15	82,2	15,0	2,8
CA-35-2	19	100,0	0,0	0,0
CB-11-5	16	9,0	39,3	51,7
CB-13-1	12	4,5	22,0	73,5
CB-13-3	18	3,1	31,9	65,0
CB-14-1	16	9,1	71,0	19,9
CB-16-1	18	86,2	11,3	2,5
CB-17-1	12	61,9	26,6	11,5
CB-18-1	13	91,9	3,1	5,0
CB-18-2	15	100,0	0,0	0,0
CB-18-3	17	97,0	0,0	3,0
CB-24-4	21	38,1	50,0	11,9
CB-24-3	14	10,7	25,0	64,3
CB-24-4	16	8,8	22,7	68,5
A-1-S-1	19	26,3	39,4	34,3
929-B-3	15	34,4	61,7	3,9

(a) Resistente (R); Moderadamente Resistente (MR) e Suscetível (S).

6. DISCUSSÃO

Caracteres do patógeno

O agente causal da "queima bacteriana da folha" em milho, *Pseudomonas alboprecipitans*, quando analisado morfológicamente, apresentou dimensões de 2,90 x 0,90µm obtidas a partir da eletrofotomicrografia. Estas medidas são significativamente diferentes das relatadas por ROSEN (1922), ELLIOTT (1930) e SCHAAD e SUMNER (1974) que mencionaram dimensões de 1,8 x 0,6µm. Tal diferença pode ser atribuída, principalmente, aos limitados recursos disponíveis na época da descrição da bactéria, quando não existia o concurso da microscopia eletrônica, técnica esta utilizada no presente estudo. Outros caracteres morfológicos considerados neste trabalho, estão de

acordo com os dados obtidos por ROSEN (1922), ELLIOTT (1930) e SCHAAD e SUMNER (1974). Comparando as dimensões da largura do talo bacteriano, quando as medidas foram tomadas ao microscópio eletrônico, percebe-se uma defasagem considerável; tal fato deve-se, provavelmente, a uma menor sensibilidade e precisão do método na medição ao microscópio ótico.

Quando cultivada em placas contendo meio de nutriente-agar (NA), as colônias apresentaram uma coloração creme quando jovens, tornando-se esbranquiçadas à medida que envelhecem. ROSEN (1922) descreve as colônias como brancas quando cultivadas em NA, não fazendo, no entanto, qualquer menção sobre a idade das mesmas. GITAITIS et alii (1976) também fazem referências à colônias brancas, entretanto o meio de cultura foi diferente daquele utilizado por ROSEN (1922). O crescimento de *P. alboprecipitans* em agar-inclinado, não referido na literatura, mostrou um desenvolvimento bastante visível, pouco translúcido, não confundindo-se com o meio e filiforme. Em caldo-nutritivo, também não referido na literatura, observou-se a formação de membrana, superficialmente, após 24 horas de cultivo a 28°C, apresentando o restante do meio ligeira turvação.

As provas bioquímicas realizadas com *P. alboprecipitans* apresentaram como único ponto discordante dos resultados obtidos por ROSEN (1922) o teste para fermentação de carboidratos. Os resultados obtidos indicaram a formação de ácido nos meios contendo os seguintes açúcares: levulose, arabinose,

manose e dextrose, sendo que o indicador utilizado foi o Reativo de Andrade (ROMEIRO, 1976). ROSEN (1922), trabalhando com 7 açúcares, inclusive dextrose e levulose testados no presente estudo, não detectou a formação de ácido em nenhum deles, já a citação feita por ELLIOTT (1930) menciona *P. alboprecipitans* como formadora de ácido na presença de diversos açúcares inclusive levulose, manose e dextrose, sendo que a arabinose não é referida no trabalho. Os mesmos autores citam ainda uma série de outras provas bioquímicas para caracterização de *P. alboprecipitans*, todas ratificadas no presente estudo. O teste da reação de oxidase (KOVACS, 1956 e TUIE, 1969), ainda não referido para a bactéria em questão, foi realizado e revelou um resultado negativo, contribuindo assim com uma informação a mais para a sua caracterização.

A identidade do patógeno foi testada serologicamente, empregando-se uma "espécie tipo" de *P. alboprecipitans* como antígeno e o antissoro preparado a partir da bactéria em estudo. O teste, conduzido pelo sistema de dupla difusão em lâminas com gel de agar (NAMEKATA, 1970) mostrou resultados bastante claros, revelando total regularidade entre as linhas de precipitação dos antígenos tipo e do homólogo, quando comparados na mesma lâmina. Na literatura pesquisada, não foi encontrada qualquer referência sobre estudos serológicos envolvendo *P. alboprecipitans*.

P. alboprecipitans, agente causal da "queima bacteriana da folha" em milho, e *P. rubrilineans*, causadora da

"estria vermelha" em cana-de-açúcar, apresentam características comuns quanto a vários aspectos culturais, bioquímicos e morfológicos (ELLIOTT, 1930). Quando comparadas serologicamente, pelo processo da dupla difusão em gel de agar, empregando-se o antissoro preparado a partir da bactéria do milho, foi detectada uma linha nítida de precipitação para o antígeno homólogo, sendo que para o antígeno representado pela bactéria da cana-de-açúcar, não foi constatada qualquer linha de precipitação. Desta forma, os isolados de *P. alboprecipitans* e *P. rubrilineans*, utilizados no presente estudo, ficaram caracterizados como sendo serologicamente diferentes.

Técnicas de inoculação

Quanto as técnicas de inoculação, não foram constatadas diferenças que pudessem determinar a vantagem de um método sobre o outro, uma vez que os dados obtidos foram semelhantes tanto para a linhagem como para a cultivar utilizadas. Entretanto o sistema de inoculação caracterizado pela deposição da suspensão do inóculo no cartucho da planta, sem ferimento, constituiu-se no método adotado para todos os testes seguintes, visto tratar-se de uma técnica bastante simples, além disso, oferece boa padronização e bom rendimento quando da inoculação e condiciona a penetração ativa do patógeno, para o interior dos tecidos do hospedeiro, simulando, portanto, as condições naturais. O processo já havia sido empregado, com óti

mos resultados, em condições de casa de vegetação, por HARTMAN e KELMAN (1972), que inocularam espécies de *Erwinia* em milho, e por SUMNER e SCHAAD (1977), que trabalharam com *P. avenae*, inoculando plântulas do mesmo hospedeiro. Tal método de inoculação, empregando *P. alboprecipitans*, revelou-se satisfatório, quando adotado em condições de casa de vegetação visando o estudo da patogenicidade de diferentes isolados, obtidos de folhas de milho, através da caracterização dos sintomas nas folhas.

Com referência a patogenicidade dos diferentes isolados utilizados, por ocasião dos testes para métodos de inoculação, a maioria destes revelou-se como sendo não patogênicos às plantas de milho. Embora todos tenham sido isolados de lesões de plantas de milho apresentando sintomas típicos da "queima bacteriana da folha", muitos, provavelmente, são saprófitas que frequentemente estão associados aos tecidos necrosados. O referido teste que teve como objetivo verificar a patogenicidade de isolados de bactérias, associadas à lesões em folhas de milho, possibilitou a escolha de 3 isolados (41, 62 e 10) que se revelaram como sendo os mais patogênicos. Estes isolados foram utilizados no estudo do efeito da idade da planta hospedeira na manifestação dos sintomas, onde aparecem codificados como isolados 4, 6 e 10, respectivamente. O isolado de número 10 apresentou alta patogenicidade e foi eleito para a realização dos experimentos visando o estudo da reação do hospedeiro ao patógeno, contido nas Tabelas 4, 5 e 6, como também para a elaboração dos testes de caracterização taxonômica

do patógeno. O isolado número 9 não foi utilizado em testes subsequentes, embora tenha apresentado inicialmente alta patogenicidade, pelo fato de nos testes seguintes revelar-se como não patogênico.

Efeito da idade do hospedeiro na manifestação
dos sintomas

Quanto ao efeito da idade do hospedeiro na manifestação dos sintomas, as plântulas de milho para as duas idades testadas, expressaram resultados análogos, quando inoculadas com *P. alboprecipitans*, em condições de casa de vegetação. A idade das plantas, tomadas como referencial para se determinar a época de inoculação, não é determinada como regra geral para os diferentes pesquisadores que trabalham com bactériose em milho. A medida da altura das plantas (ROSEN, 1922) e o número de folhas (JOHNSON et alii, 1949; e FRENHANI et alii, 1969) são parâmetros, também considerados. Mais recentemente, o número de dias a partir da semeadura passou a ser considerado como referencial para se proceder a inoculação. FRENHANI et alii (1970) inocularam *P. alboprecipitans* em plântulas de milho em períodos que variaram entre 11 e 26 dias da semeadura. HARTMAN e KELMAN (1972) e SUMNER e SCHAAD (1977) inocularam, em condições de casa de vegetação, plântulas com idades variando entre 3 e 9 semanas da semeadura. O trabalho de FRENHANI et alii (1970) não tece qualquer comentário a res-

peito do comportamento das plântulas testadas em função da ida de por ocasião da inoculação, que variou de 11 a 26 dias.

O presente estudo revela que diferentes tipos de reação no cultivar Central-Mex e reação de suscetibilidade no cultivar M-102 podem, perfeitamente, ser determinados em plântulas, inoculadas aos 12 dias contados a partir da semeadura, mantidas em condições de casa de vegetação. A técnica de inoculação empregada, ou seja, a simples deposição da suspensão bacteriana no cartucho da plântula, revelou-se satisfatória, podendo, então, ser empregada nos testes análogos.

Reações do hospedeiro

Com relação à metodologia empregada, foi possível detectar diferentes tipos de reação em plantas jovens de milho, com 12 dias contados a partir da semeadura, quando inoculadas com uma suspensão de bactérias na concentração de 10^8 células viáveis por ml, depositada no cartucho, em condições de casa de vegetação. Essa metodologia, de fácil utilização, permite uma rápida avaliação da reação de diferentes materiais ao patógeno.

Os diferentes tipos de reação observadas, em plantas no estágio jovem, variaram de reações na forma de pontos e riscas cloróticas, reação de resistência, à lesões necróticas, podendo ocorrer simultaneamente um encharcamento, rea-

ção de suscetibilidade. Os diferentes tipos de reações são relativamente fáceis de serem distinguidos, podendo assim serem utilizados num critério de avaliação no qual é considerado o aspecto qualitativo.

A possibilidade de utilização de um critério qualitativo é de grande valia pois permite detectar diferenças que não seriam observadas quando da utilização de um critério quantitativo, por exemplo a porcentagem de área foliar atacada e o comprimento de lesões. FRENHANI (1970), no estudo sobre o comportamento de diferentes materiais, utilizou como método de avaliação o comprimento de lesões, não fazendo, no entanto, qualquer referência a diferentes tipos de lesão das plantas ao patógeno.

Nos diferentes materiais testados, foi observada uma variação nos tipos de reação das plantas tanto entre como dentro das linhagens ou cultivares.

Foram encontradas duas linhagens, oriundas dos compostos A e B, com alto grau de resistência ao patógeno que se caracterizou por apresentar pontos e riscas cloróticas. Este fato revela que existem boas fontes de resistência ao patógeno em materiais adaptado às nossas condições, sugerindo a possibilidade de se utilizar estas fontes de resistência em programas de melhoramento.

A variabilidade nas reações dentro de linhagens possibilita uma seleção, para resistência ao patógeno, dentro

de materiais altamente promissores na formação de híbridos.

Quanto à variação nas reações observadas em diferentes materiais testados em diferentes condições, é importante frisar que as condições do ambiente em estufa podem influir consideravelmente na manifestação das reações. Este fato revela a necessidade de se levar em conta a influência que os fatores do ambiente podem ter na manifestação da doença, como foi relatado por SCHAAD e SUMNER (1976). Estes autores observaram que a temperatura influencia a manifestação dos sintomas.

A detecção de reação de resistência no estado jovem é muito vantajosa, sendo, no entanto, importante um estudo complementar para o comportamento das plantas no estado adulto.

Nos materiais testados foi observado que o cultivar Central-Mex apresentou um nível de resistência consideravelmente maior que aquele apresentado pelo milho doce de Cuba. Os dados obtidos sugerem, no entanto, a possibilidade de se elevar o nível de resistência no milho doce de Cuba, uma vez que este cultivar apresentou uma certa frequência de plantas com alto grau de resistência.

7. CONCLUSÕES

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

1) O agente causal isolado de lesões em folhas de milho, utilizado no presente estudo, foi a bactéria *Pseudomonas alboprecipitans* Rosen.

2) A metodologia utilizada, inoculação de uma suspensão bacteriana na concentração de 10^8 células viáveis por ml e depositada no cartucho de plantas jovens, permite detectar diferentes tipos de reação ao patógeno em condições de casa de vegetação.

3) Plântulas de milho inoculadas com *P. alboprecipitans* aos 12 dias da sementeira, em condições de casa de vegetação, permitem a detecção de diferentes tipos de reação do hospedeiro.

4) Linhagens e cultivares de milho quando inoculadas com *P. alboprecipitans*, em condições de casa de vegetação, exibem diferentes tipos de reação que variam de altamente resistentes a suscetíveis.

5) As reações de resistência se caracterizam pela formação de pontos e riscas cloróticas ou manchas necróticas, estas localizadas e circundadas por halos de coloração avermelhada. Reações de resistência moderada se manifestam na formação de riscas necróticas confinadas e ausência de clorose, enquanto que as reações de suscetibilidade apresentam um inchamento intenso e áreas necrosadas ao longo da folha.

8. SUMMARY

The causal agent of the corn bacterial blight was studied. Results were obtained by observation of morphological, cultural and biochemical characters, complemented by serological characterization through the double diffusion technique in agar gel. It was concluded that the pathogen studied is *Pseudomonas alboprecipitans* Rosen.

Two inoculation techniques were tested using one line and one cultivar of corn and 18 bacterial isolates from corn, under greenhouse conditions. Inoculum, at the concentration of 10^8 propagules/ml, was applied in the whorl of the plants, which were previously wounded or not. Both techniques were equally efficient in reproducing the symptoms of the disease,

and different strains with different levels of pathogenecity were detected.

Corn seedlings with 12 an 18 days of age were inoculated with 3 isolates of the bacterium to correlate symptom manifestation with age of the plants. It was possible to detect resistance and susceptibility in different lines and cultivars of corn, even in seedlings 12-day-old.

Variations in the types of reactions of the corn plants to *P. alboprecipitans* were detected under greenhouse conditions. The reactions for resistance consisted of clorotic dots and clorotic streaks or necrotic spots. The necrotic spots were localized and were surrounded by a red halo. The reactions for moderate resistance were manifested by confined necrotic streaks and absence of clorosis, whereas the reactions for susceptibility showed a intense water-soaking and necrotic areas along the leaf.

Twenty five lines and 5 cultivars of corn were tested under greenhouse conditions for evaluation of resistance reactions to *P. alboprecipitans*. The results showed the occurrence of a high level of resistance in certain lines and certain cultivars. The reactions to the pathogen varied between and within the different materials tested.

9. LITERATURA CITADA

AKIBA, F., 1978. Isolamento, inoculação e sobrevivência de *Xanthomonas albilineans* e avaliação de resistência à escaladadura das folhas em cana-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP. 97 p. (Dissertação de Mestrado).

ELLIOTT, C., 1920. Halo-Blight of oats. Journal of Agricultural Research, 19(4):139-172.

ELLIOTT, C., 1930. Manual of Bacterial Plant Pathogens. Waverly Press, Inc., Baltimore, 349 p.

FRENHANI, A.A.; A.P. da SILVEIRA e B.P. BASTOS CRUZ, 1969.

Queima bacteriana da folha, nova doença do milho no Brasil.
O Biológico, 35:85-87.

FRENHANI, A.A.; B.P. BASTOS CRUZ; A.P. da SILVEIRA e S.G.P.
da SILVEIRA, 1970. Comportamento de algumas variedades de
milho (*Zea mays* L.) em relação à queima bacteriana (*Pseudo-*
monas alboprecipitans Rosen) da folha. O Biológico, 36:
301-306.

GITAITIS, R.D.; R.E. STALL e J.O. STRANDBERG, 1976. Overseasoning
of *Pseudomonas alboprecipitans* Rosen, causal agent of bacterial
leaf blight of corn. Proc. Am. Phytopath. Soc., 3:257-
(Abstract).

GITAITIS, R.D.; R.E. STALL e J.O. STRANDBERG, 1978. Dissemination
and survival of *Pseudomonas alboprecipitans* ascertained by
disease distribution. Phytopathology, 68:227-231.

HAGGIS, G.H., 1970. The Electron Microscope in Molecular
Biology. John Wiley Inc., New York. 84 p.

HARTMAN, J.R. e A. KELMAN, 1973. An improved method for the
inoculation of corn with *Erwinia* spp. Phytopathology, 63:
658-663.

JOHNSON, A.G.; L. CASH e W.A. GARDNER, 1929. Preliminary Report
on a bacterial disease of corn. Phytopathology, 19:81-82.

- JOHNSON, A.G.; A.L. ROBERT e L. CASH, 1945. Further studies on bacterial leaf blight and stalk rot of corn. Phytopathology, 35:486-487 (Abstract).
- JOHNSON, A.G.; A.L. ROBERT e L. CASH, 1949. Bacterial leaf blight and stalk rot of corn. Journal of Agriculture Research, 78:719-733.
- KIMATI, H., 1975. Taxonomia, Esporulação e Patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. [sensu Arx, 1957], Piracicaba, ESALQ/USP. 103 p. (Tese de Livre-Docência).
- KLEMENT, Z., 1963. Rapid detection of pathogenicity of phytopathogenic Pseudomonads. Nature, 199:299-300.
- KLEMENT, Z.; G.L. FARKAS e L. LOVREKOVICH, 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology, 54:747-477.
- KOVACS, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, 178:703 (Abstract).
- LEITE, A.F. e A.R. OLIVEIRA, 1975. Furagar. Summa Phytopathologica, 1(2):143-146.

- LOURES, E.G. e W.V. GUIMARÃES, 1975. Microbiologia. Principais provas empregadas para identificação de bactérias. Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 43 p.
- NAMEKATA, T., 1971. Estudos comparativos entre *Xanthomonas citri* [Hasse] Dow., agente causal do "cancro cítrico" e *Xanthomonas citri* [Hasse] Dow. N.F. S.P. *aurantifolia*, agente causal da "cancrose do limoeiro galego". Tese de Doutorado, ESALQ/USP. 65 p.
- OLIVEIRA, A.R., 1967. Serologia aplicada ao estudo do vírus do anel do pimentão. Tese de Doutorado, ESALQ/USP. 40 p.
- ROMEIRO, R.S., 1976. Identificação de Bactérias Fitopatogênicas. Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 91 p.
- ROSEN, H.R., 1922. A bacterial disease of foxtail (*Chaetochloa lutescens*). Annals of the Missouri Botanical Garden, 9: 333-388.
- SCHAAD, N.W. e D.R. SUMNER, 1974. A taxonomic study of *Pseudomonas alboprecipitans* and *Pseudomonas avenae*. Proc. Am. Phytopath. Soc., 1:118 (Abstract).

SCHAAD, N.W. e D.R. SUMNER, 1976. Effects of temperature and light on development of bacterial blight of corn caused by *Pseudomonas avenae*. Proc. Am. Phytopath. Soc., 3:257 (Abstract).

SCHAAD, N.W., 1979. Serological identification of plant pathogenic bacteria. Ann. Rev. Phytopathol., 17:123-147.

SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS, 1957. Committee on Bacteriological Technic. Manual of Microbiological Methods. McGraw-Hill, New York. 315 p.

SUMNER, D.R. e N.W. SCHAAD, 1977. Epidemiology and control of bacterial leaf blight of corn. Phytopathology, 67:1113-1118.

TUITE, J., 1969. Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria. Minn. USA. Burgess Publ. Co. 239 p.