

ISOLAMENTO, INOCULAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE  
Xanthomonas albilineans E AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA  
À ESCALDADURA DAS FOLHAS EM CANA-DE-AÇÚCAR

FUJIO AKIBA

Orientador: HASIME TOKESHI

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

PIRACICABA  
Estado de São Paulo-Brasil  
março - 1978

À

minha primeira professora,  
minha esposa  
e aos  
meus pais,  
dedico.

## AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos.

ao Professor Dr. HASIME TOKESHI, pela valiosa orientação e estímulo;

ao Eng. Agro. M.S. ALVARO SANGUINO, pela contribuição em coleta de materiais, estímulo e importantes sugestões;

ã COPERSUCAR e ao IAA, pelas contribuições em variedades de cana-de-açúcar utilizadas e material bibliográfico;

aos Professores CHARLES FREDERICK ROBBS e OSAMU KIMURA, pela orientação e colaboração na determinação da bactéria;

ao Professor M.S. LAURO BOECHAT BATISTA, pela colaboração na análise estatística dos experimentos;

ao Eng. Agro. Dr. TOSHIHIKO HINO, pela contribuição em material bibliográfico japonês;

aos Professores do Departamento de Fitopatolo

gia da ESALQ, pelàs importantes sugestões;

aos funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pela colaboração nos trabalhos de laboratório e campo;

aos colegas do curso de pós-graduação, pelas importantes sugestões e estímulos;

ao professor OSWALDO DUARTE GONÇALVES, pela revisão dos originais;

aos funcionários do Departamento de Bibliografia e Documentação da UFRRJ, pelos trabalhos de fotografia e imprensa.



## Í N D I C E

	Página
1. RESUMO -----	01
2. INTRODUÇÃO -----	03
3. REVISÃO DA LITERATURA -----	05
4. MATERIAL E MÉTODOS -----	15
4.1. Isolamento, meio de cultura e caracterização dos isolados -----	15
4.1.1. Método de isolamento pela "Pipeta de Pás- teur" -----	15
4.1.2. Meio de cultura -----	16
4.1.3. Caracterização dos isolados -----	18
4.2. Testes de patogenicidade e métodos de inocula- ção para reprodução dos sintomas -----	18
4.3. Avaliação de resistência de variedades de cana de-açúcar a <u>X. albilineans</u> -----	20
4.3.1. Variedades utilizadas -----	20
4.3.2. Estudo da resistência varietal conforme concentrações de células bacterianas em suspensão -----	21
4.3.2.1. Inoculação de <u>X. albilineans</u> na concentração $8.10^8$ células/ml em 11 variedades de cana-de-açú- car -----	21

4.3.2.3. Inoculação de <u>X. albilineans</u> nas concentrações $8.10^8$ , $8.10^6$ e $8.10^4$ células/ml na variedade Co 419 -----	25
4.3.3. Avaliação de resistência varietal pelo número de feixes vasculares descoloridos com inoculação de cultura pura de <u>X. albilineans</u> -----	27
4.4. Estudo de sobrevivência de <u>X. albilineans</u> <u>in vitro</u> e <u>in vivo</u> -----	28
4.4.1. Sobrevivência de <u>X. albilineans</u> em suspensões em água estéril conservadas à temperatura de 15,0°C -----	28
4.4.2. Sobrevivência de <u>X. albilineans</u> em folhas de cana-de-açúcar com sintomas típicos da doença conservadas à temperatura de - 15,0°C -----	30
4.4.3. Sobrevivência de <u>X. albilineans</u> em folhas secas de cana-de-açúcar com sintomas típicos da doença, conservadas ao ambiente no laboratório -----	31
4.4.4. Sobrevivência de <u>X. albilineans</u> em terra seca à sombra e esterilizada, conservada à temperatura de 28,0°C -----	32

4.4.5. Sobrevivência de <u>X. albilineans</u> em cilindros de aço conservados à temperatura de 28,0°C -----	33
4.4.6. Sobrevivência de cinco isolados de <u>X. albilineans</u> em suspensões em água estéril, submetidas a diferentes temperaturas de inativação -----	34
5. RESULTADOS -----	36
5.1. Método de isolamento, meio de cultura e caracterização da bactéria <u>X. albilineans</u> -----	36
5.1.1. Métodos de isolamento da bactéria <u>X. albilineans</u> em cultura pura -----	36
5.1.2. Meio de cultura mais apropriado ao desenvolvimento da bactéria <u>X. albilineans</u>	37
5.1.3. Caracterização da bactéria como <u>X. albilineans</u> e isolados originais obtidos --	38
5.2. Método e escolha do local de inoculação de células bacterianas de cultura pura de <u>X. albilineans</u> -----	39
5.2.1. Comparação de métodos de inoculação ---	39
5.2.2. Escolha do local da inoculação de <u>X. albilineans</u> , por injeção no palmito foliar -----	44
5.3. Avaliação de resistência varietal pela inoculação de células bacterianas de cultura pura de <u>X. albilineans</u> pelo método da injeção no palmito	

to foliar (5 cm acima do meristema apical) -----	44
5.3.1. Inoculação de <u>X. albilineans</u> na concentração $8.10^8$ células/ml em 11 variedades de cana-de-açúcar -----	44
5.3.2. Inoculação de <u>X. albilineans</u> na concentração $8.10^4$ células/ml em 22 variedades de cana-de-açúcar -----	47
5.3.3. Inoculação de <u>X. albilineans</u> nas concentrações $8.10^8$ , $8.10^6$ e $8.10^4$ células/ml na variedade Co 419 -----	49
5.3.4. Avaliação de resistência varietal pelo número de feixes vasculares descoloridos com a inoculação de cultura pura de <u>X. albilineans</u> -----	52
5.3.4.1. Experimento 1 -----	52
5.3.4.2. Experimento 2 -----	54
5.4. Estudo de sobrevivência de <u>X. albilineans</u> <u>in vitro</u> e <u>in vivo</u> -----	54
5.4.1. Sobrevivência de <u>X. albilineans</u> em suspensões em água estéril conservadas à temperatura de $-15,00^{\circ}\text{C}$ -----	54
5.4.2. Sobrevivência de <u>X. albilineans</u> em folhas de cana-de-açúcar com sintomas típicos da doença conservados à temperatura de $-15,00^{\circ}\text{C}$ -----	56

5.4.3. Sobrevivência de <u>X. albilineans</u> em folhas secas de cana-de-açúcar com sintomas típicos da doença, conservadas ao ambiente no laboratório -----	56
5.4.4. Sobrevivência de <u>X. albilineans</u> em terra seca à sombra e esterilizada, conservada à temperatura de 28,0°C -----	59
5.4.5. Sobrevivência de <u>X. albilineans</u> em cilindros de aço, conservados à temperatura de 28,0°C -----	60
5.4.6. Sobrevivência de conco isolados de <u>X. albilineans</u> em suspensões em água estéril, submetidas a diferentes temperaturas de inativação -----	62
6. DISCUSSÃO -----	
6.1. Método de isolamento da bactéria <u>X. albilineans</u> em cultura pura -----	64
6.2. Meio de cultura mais apropriado ao desenvolvimento da bactéria <u>X. albilineans</u> -----	65
6.3. Método e local de inoculação de células bacterianas de cultura pura de <u>X. albilineans</u> ----	66
6.4. Local da inoculação de <u>X. albilineans</u> , por injeção no palmito foliar -----	68
6.5. Avaliação da resistência varietal pela inoculação de células bacterianas de cultura pura de <u>X. albilineans</u> pelo método da injeção no	

palmito foliar (5 cm acima do meristema apical	69
6.6. Estudos de sobrevivência de <u>X. albilineans</u> <u>in vitro</u> e <u>in vivo</u> -----	77
7. CONCLUSÕES -----	84
8. SUMMARY -----	87
9. LITERATURA CITADA -----	89
APÊNDICE -----	98

## 1. RESUMO

O agente patogênico da Escaldadura das folhas da cana-de-açúcar, Xanthomonas albilineans (Ashby) Dowson, foi isolado em cultura pura e inoculado em 24 variedades suscetíveis, tolerantes, intermediárias e resistentes à bactéria. Para o isolamento compararam-se três meios de cultura e três métodos de isolamento para determinar a eficiência dos mesmos. Foram selecionados o "Método pipeta" e o meio W-2, que é um meio Wilbrink modificado.

Nos testes de patogenicidade vários métodos de inoculação foram experimentados, selecionando-se o método de injeção de bactéria no palmito como o mais eficiente. Aperfeiçoou-se o método de injeção no palmito foliar determinando-se o melhor local de inoculação e o efeito das diferentes concentrações de bactéria no aparecimento dos sintomas externos nas folhas e descoloração vascular. Determinou-se que o aparecimento de sintomas externos é dependente da concentração de bactéria inoculada e que a descoloração vascular é sintoma mais constante e pode ser usada como método de seleção de variedades resis

tentes com maior rigor e permite a eliminação de variedades to  
lerantes à bactéria.

No estudo da sobrevivência da bactéria in vitro  
e in vivo determinou-se a conservação da viabilidade e da pató  
genicidade pela bactéria congelada a  $-15,0^{\circ}\text{C}$  por 182 dias, em  
água, e por 365 dias, em folhas doentes. A sobrevivência em fol  
ha seca por 20 dias, solo estéril por 15 dias e lâmina de faç  
ão por 6 dias foi determinada, bem como as suas implicações nas  
epifitias foi discutida.

Foi estudada a temperatura de inativação de cinco  
isolados da bactéria, em água aquecida. Verificou-se variaç  
ão entre  $52,0$  e  $56,0^{\circ}\text{C}$ , mostrando possibilidades da bactéria  
sobreviver ao tratamento térmico usado no controle do Raquitismo  
das soqueiras da cana-de-açúcar.



## 2. INTRODUÇÃO

O estudo em que ARRUDA constatou, em 1944, a presença da "Escaldadura das folhas", doença ocasionada por Xanthomonas albilineans (Ashby) Dowson, na cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, tem se constituído na única pesquisa relevante desta enfermidade no Brasil.

Nenhum outro trabalho relata, desde então, o isolamento desta bactéria em cultura pura e sua utilização em testes de resistência varietal.

O Instituto do Açúcar e do Alcool e a Cooperativa Central dos Produtores de Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo, bem como o Instituto Agronômico de Campinas, vêm desenvolvendo trabalhos de melhoramento genético da cana-de-açúcar visando, além da produção, a resistência às principais doenças que a afetam. Para testar a resistência genética à escaldadura das folhas é utilizado o clássico inóculo de caldo de plantas doentes e a avaliação do resultado é realizada pela leitura dos sintomas externos das folhas das plantas inoculadas.

Porém, este inóculo de caldo de plantas doentes de cana-de-açúcar leva, além da bactéria causadora da doença, inúmeros outros microrganismos que podem mascarar os sintomas. Neste tipo de inóculo desconhece-se a quantidade de células bacterianas inoculadas.

A manifestação dos sintomas pode variar de planta a planta, conforme seu estado vegetativo e nutricional. O meio ambiente é também um dos principais fatores na manifestação da doença.

Em decorrência, então, da necessidade de um método mais seguro de avaliação da resistência varietal, que restringisse ao mínimo estes fatores variáveis, foi efetuado o presente estudo.

Para desenvolvimento de um método de inoculação para avaliação da resistência varietal, o passo inicial era conseguir uma cultura pura da bactéria causadora da doença. A aplicação dos métodos da literatura consultada não ofereceu resultados positivos e por isto desenvolveu-se um método original, descrito neste trabalho.

Como consequência da aplicação deste novo método de isolamento da bactéria em cultura pura desenvolveram-se alguns estudos de sobrevivência in vitro e in vivo, que também estão aqui descritos.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

Segundo ARRUDA (1944), a Escaldadura das folhas da cana-de-açúcar foi inicialmente estudada por GROENEWEGE, que isolou em Java, em 1915, uma bactéria e confundiu a doença com a "gomose" causada por Bacterium vasculorum (Cobb), da Austrália. WILBRINK, em 1920, reestudando a doença de Java, concluiu, pelos sintomas e pelos caracteres morfológicos e culturais da Xanthomonas albilineans, que esta bactéria não é idêntica ao B. vasculorum e que também o que GROENEWEGE referiu como Bacterium sp não é o agente da Escaldadura das folhas.

Mais tarde, NORTH (1925), na Austrália, sem que conhecesse os trabalhos de WILBRINK, alcançou os mesmos resultados. Muitos dos dados obtidos por WILBRINK e NORTH são usados até os nossos dias como o "meio de cultura de WILBRINK" para o cultivo desta bactéria, porém MARTIN e ROBINSON (1961) citam que nem NORTH nem WILBRINK classificaram a bactéria devido ao insucesso na coloração do flagelo. Foi ASHBY (1929) quem o conseguiu e propôs o binômio Bacterium albilineans. MAGROU (1937), propondo

o gênero Phytomonas para bactérias que causam doenças em plantas, passou esta denominação para Phytomonas albilineans (ASHBY) MA GROU.

DOWSON (1943), propondo o gênero Xanthomonas para as bactérias que apresentam em cultivo colônias amarelas e bactérias com um único flagelo polar, incluiu-a neste gênero e classificou-a como Xanthomonas albilineans (ASHBY) DOWSON.

STARR (1946), usando a Asparagina em meio de cultura, concluiu que as Xanthomonas não conseguem desenvolver-se neste meio. BUKHOLDER e STARR (1948) incluíram esta característica na definição do gênero, confirmando-a neste gênero.

DYE (1962, 1966), fazendo reestudos do gênero Xanthomonas, classificou-a como uma espécie atípica deste gênero.

MÁRTIN e ROBINSON (1961) relatam que, após a primeira constatação da doença em Java por WILBRINK e na Austrália por NORTH, esta bacteriose vem sendo constatada em quase todos os países que cultivam a cana-de-açúcar. EGAN, em simpósio da ISSCT, em 1971, apresentou uma lista de países onde as mais recentes introduções haviam ocorrido.

Apesar de NORTH e LEE (1924) preconizarem o máximo de esforço para evitar a sua introdução no Hemisfério Ocidental, ela chegou ao Brasil por volta de 1930.

No Brasil, ARRUDA (1944) concluiu que a introdução da bactéria se deu com a importação da variedade Badila, da Austrália, em 1929. Foi primeiro constatada em Piracicaba, São

Paulo, e em localidades próximas a este município, também se confirmando sua presença em Campos, no Estado do Rio de Janeiro.

DANTAS (1958), fazendo um levantamento de doenças no Nordeste brasileiro, concluiu que esta bacteriose causa prejuízos da ordem de 20% na produção de cana-de-açúcar; segundo CARVALHO (1963) e CARVALHO et alii (1968), esta enfermidade é a mais importante bacteriose da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo.

No entanto, após os trabalhos de ARRUDA, somente os trabalhos desenvolvidos pela PLANALSUCAR (1972) no Nordeste e em S. Paulo dão certa importância à esta doença no Brasil.

A infreqüência das manifestações dos sintomas visíveis, ocasionada por fatores intrínsecos e/ou aliados às condições ambientes, faz com que, mesmo em variedades suscetíveis, os sintomas sejam imperceptíveis por longos períodos e tornam difíceis os serviços de quarentena (EGAN, 1971a).

Os sintomas da forma crônica manifestam-se nas folhas como estrias estreitas e brancas que se estendem por todo o limbo foliar, até mesmo na nervura principal, e muitas vezes prolongam-se por toda a bainha. Estas estrias, de bordos definidos, seguindo o curso dos feixes fibro vasculares invadidos pela bactéria, inicialmente cloróticas ou esbranquiçadas, necrosam-se e tornam-se amareladas, geralmente se estendendo lateralmente no limbo foliar, secando-o completamente. Dependendo da severidade, as folhas mostram-se inteiramente cloróticas e o completo albinismo do topo e brotos laterais precede a morte da planta. Nos colmos afetados há, geralmente, brotações prematuras das gemas

laterais e os sintomas podem aparecer nestas. Os entrenós são mais curtos e, abrindo-se longitudinalmente o colmo, podem-se notar descolorações nos feixes fibro-vasculares, variando de intensidade, mas sempre mais pronunciado na região dos nós. (ARRUDA, 1944).

BELL e CONTRELL-DORMER (1932) introduziram uma pequena modificação no meio de cultura de WILBRINK, e este meio tem sido o preferido por muitos pesquisadores. NORTH (1925), utilizando caldo de cana, desenvolveu um meio de cultura que foi muito usado por ARRUDA (1944) no seu método de isolamento indireto.

MARTIN e ROBINSON (1961) descrevem como simples o isolamento da X. albilineans; no entanto, ARRUDA (1944) teve de desenvolver um processo indireto, PERSLEY (1972), um meio de cultura seletivo, e recentemente, DEAN (1974), um método original de isolamento, circunstâncias que evidenciam as dificuldades de se isolar a bactéria em cultura pura.

Para os testes de patogenicidade da bactéria e reprodução dos sintomas da doença, NORTH (1925) afirma a necessidade de facilitar o acesso aos tecidos embrionários em estado ativo de crescimento. Assim, tanto NORTH como WILBRINK utilizaram, com grande sucesso, a injeção de suspensão de bactérias através de seringas hipodérmicas na extremidade de plantas em estado ativo de crescimento.

BELL (1935), MARTIN e CARPENTER (1935) e WIECHE (1951) desenvolveram técnicas especiais de inoculação para repro

dução do quadro sintomatológico com algum sucesso. A estes métodos somam-se outros mais recentes como os de ANTOINE e RICAUD (1961), KOIKE (1965), STEINDL (1965), EGAN (1969) e NORSE (1973).

KOIKE (1971), no congresso da ISSCT, fez um seminário sobre os métodos utilizados nos países que mais se preocupam com esta doença e concluiu que uma mesma variedade suscetível num país não deve ser rejeitada por outro, devido à ocorrência de "Strains" ou às diferenças das condições ambientes.

O inóculo constituído de caldo de cana-de-açúcar de plantas doentes, ou da mistura, neste caldo, de bactéria de cultura pura, diluída em água, tem sido a prática rotineira na avaliação de resistência varietal (KOIKE, 1971).

Após a inoculação, estabelecem-se, através dos sintomas externos desenvolvidos, ou da contagem do número de plantas doentes obtidas (BISESSAR, 1970), ou da qualificação, por notas, destes sintomas externos manifestados, como preconizado por HUTCHINSON (1968), os graus de suscetibilidade e resistência de uma variedade a X. albilineans.

Os graus estabelecidos por HUTCHINSON variam de 1, alta resistência, a 9, extrema suscetibilidade. PERSLEY (1973a) estabeleceu as gradações sintomatológicas que deveriam ser atribuídas às reações das variedades, suplementando uma gradação estabelecida por STEINDL (1965). PERSLEY ainda adotou dois quadros para avaliação dos sintomas: um utilizado aos 3 meses e outro para 6 a 11 meses após a inoculação das plantas.

Esta avaliação pelos sintomas externos com peque

nas variações vem sendo hoje adotada por todos os estudiosos de resistência varietal em todo o mundo, e, no Brasil, a PLANALSUCAR tem também adotado esta mesma notação para a avaliação de resistência varietal a esta doença.

O sintoma interno de descoloração dos feixes vasculares pela colonização da bactéria é um sintoma que não tem sido considerado nos testes de patogenicidade, nem de avaliação da resistência varietal. KOIKE (1971) cita que no Havai tais observações são realizadas quando as variedades não manifestam sintomas externos, pois a bactéria pode estar viável internamente.

Os estudos referentes à variabilidade de X. albilineans têm merecido atenção de muitos após a constatação por BISESSAR (1965), na Guyana Britânica, de "strains" mais virulentos que ocasionavam diferentes reações numa mesma variedade de cana-de-açúcar.

CONTREL-DORMER (1935) já constataria variações nesta bactéria, observando que setores morfológicos diferentes eram produzidos por uma mesma colônia em meio de cultura.

KOIKE e ROGERS (1967) e PERSLEY (1972) contribuíram com ótimos trabalhos neste assunto, baseando ambos na agressividade de diferentes isolados da bactéria em algumas variedades diferenciais de cana-de-açúcar.

RICAUD e PAULO (1970) constataram diferenças culturais de alguns isolados, em meio de cultura, porém não obtiveram sucesso na comprovação destas diferenças em inoculações na



cana-de-açúcar.

EGAN (1969) concitava então todos os estudiosos deste assunto a uma cooperação mundial na localização dos diferentes "strains" e de uma seleção de variedades de cana-de-açúcar para a determinação das variações da bactéria X. albilineans.

O controle desta bacteriose através do uso da resistência genética é indicado por muitos, mas ainda parece bastante carente de estudos definitivos neste assunto. EGAN (1971b) cita que somente alguns clones de Saccharum spontaneum carregam genes de resistência e que todos os clones de S. robustum e S. officinarum são altamente suscetíveis, embora alguns sejam altamente tolerantes.

CONTREL-DORMER (1925) já preconizava a utilização de sementes limpas, considerando esta uma doença incurável quando adquirida.

MARTIN e ROBINSON (1961) citam que o tratamento térmico dos colmos, em água quente a 50°C durante 2 a 3 horas, pode produzir 95% de erradicação da doença. No entanto, MONGOMERY e HUGHES (1960) dizem que o tratamento acima não é suficiente para eliminar a bactéria totalmente do colmo.

HUGHES et alii (1967) e STEINDL (1971) inventaram outros processos de tratamento de colmo semente; no entanto, em nenhum destes métodos a erradicação total parece ocorrer.

O conhecimento das reações varietais à doença, a certificação de sementes, a prática de "roguing", o tratamento

térmico, a prática de desinfestação dos instrumentos utilizados e o conhecimento do comportamento do agente patogênico são de importância fundamental para o controle (ROBINSON, 1962).

EGAN (1971c) relata que a utilização de variedades de cana-de-açúcar mais resistentes em consequência de seleções e estudos ininterruptos da doença tem contribuído decisivamente para o declínio da doença como uma das mais prejudiciais no Norte de Queensland. Afirma, contudo, que a importância da doença varia conforme as condições ambientes de um ano para outro.

PERSLEY (1973b), em estudo das condições necessárias para epifitotias da Escaldadura das folhas na forma aguda, em Queensland, conclui que são devidas principalmente a: sementes contaminadas, implementos agrícolas contaminados, fator desconhecido associado com alta pluviosidade, ventos fortes, a água em si, e um vetor que depende de alta umidade. Afirma ainda que as condições que favorecem a expressão dos sintomas externos são estresse condicionado pela temperatura e regime de água, e que o outono seco e o frio antecipado do inverno favorecem tal manifestação durante o inverno e a primavera.

No Brasil, ARRUDA (1944) afirma que estas epifitotias ocorrem quando, após um período chuvoso, sobrevém a seca, principalmente do inverno, e que é a multiplicação bacteriana nesses meses chuvosos que propicia estas manifestações devido à paralização do desenvolvimento vegetativo pela deficiência de água.

Desde que NORTH e WILBRINK (in: MARTIN e ROBIN

SON, 1961) provaram a fácil transmissão da bactéria pelo facão de corte, todos são unânimes em apontá-lo como um dos principais meios de transmissão em campo de produção. Para desinfestação deste instrumento é indicado o uso constante de Lysol ou formol (MARTIN e ROBINSON, 1961) e Iodine (RICAUD, 1965).

Estudos referentes à sobrevivência da bactéria X. albilineans em condições naturais, têm sido pouco relatados.

PERSLEY (1973c) relata a ocorrência natural de várias gramíneas hospedeiras da bactéria. ORIAN (1962) observou em Paspalum dilatatum a ocorrência de X. albilineans e através de inoculações artificiais o mesmo ORIAN (in: MARTIN & ROBINSON 1961) obteve uma lista de hospedeiros suscetíveis.

No entanto, nenhum meio da possível disseminação natural planta a planta tem sido esclarecido. WIELHE (1951) e MARTIN e ROBINSON (1961) têm apontado o rato (Halochilos sciureus berbidensis) e alguns insetos como Ligyris ebenus, Dyscinetus geminatus e Dyscinetus bidentatus, como possíveis transmissores.

HUGHES (1969) admitiu que a água de lixiviação pode carregar e transmitir a bactéria, mas falhou na comprovação.

PERSLEY (1971) admite a sobrevivência da bactéria no solo por dois dias, concordando com HUCHINSON e ROBERTSON (1953) que justificaram a impossibilidade da sobrevivência desta bactéria no solo por longo tempo.

PERSLEY (1973b) concita os pesquisadores a investigarem o verdadeiro papel da água nesta doença e, também augu

ra melhor sucesso nos estudos de sobrevivência da bactéria *X. albilineans*, pois são isto poderão elucidar resultados por vezes contraditórios e inexplicáveis desta importante doença da cana-de-açúcar.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolamento, meio de cultura e caracterização dos isolados.

##### 4.1.1. Método de isolamento pela "Pipeta de Pasteur"

Após exame ao microscópio de partes do colmo ou de folhas de plantas de cana-de-açúcar exibindo sintomas típicos da doença, e constatada a presença de exsudação de bactérias, estas foram imediatamente isoladas em meio de cultura. O isolamento da bactéria foi realizado segundo a técnica descrita a seguir: pequenos pedaços de 0,50 cm<sup>2</sup> de folhas de cana-de-açúcar com sintomas típicos (listras brancas), preferindo-se as mais estreitas do limbo foliar, e pequenos pedaços de feixes vasculares descoloridos do colmo, colhidos na região dos nós (vírgulas), foram colocados imersos em gotas de água estéril na superfície de lâminas de vidro para microscopia, previamente esterilizadas por flambagem em bico de gás. Cada lâmina foi levada ao microscópio para localização da exsudação. No

microscópio, a quantidade de luz diminuída pelo fechamento do diafragma, ou a utilização do contraste de fases, facilitou esta localização. (Figura 1)

Baixando o condensador de luz do microscópio, podia-se conseguir a localização exata, a olho nu, do ponto de esxudação, pois nesta posição a luz que chegava aos bordos do material focalizado restringia-se a um pequeno ponto.

Com uma pipeta de Pasteur, de 10 cm de comprimento, obtida pelo esticamento de tubos de vidro, fazia-se a coleta, por capilaridade, diretamente do local indicado pelo feixe de luz. O líquido colhido em cada lâmina, em pequena quantidade, porém com uma suspensão considerável de bactérias, era deposita do em uma placa de cultura e espalhado suavemente com uma espátula de Drigawski. As placas de cultura foram conservadas em câmara de incubação a 28,0°C durante 3 a 4 dias. Então, apareceram pequeníssimas colônias, são visíveis ao microscópio estereoscópico. Após este exame, elas foram repicadas para outras placas de cultura, que também foram mantidas em câmara de incubação a 28,0°C e após 5 a 7 dias obtiveram-se cultivos puros da bactéria.

#### 4.1.2. Meio de cultura

Foram inicialmente experimentados, no isolamento da bactéria de material doente, segundo o método pipeta, o meio original de WILBRINK (W), descrito pelo autor, e o WILBRINK modificado 1 (W-1), descrito por MARTIN e ROBINSON (1961).

Após os primeiros isolamentos procurou-se uma com

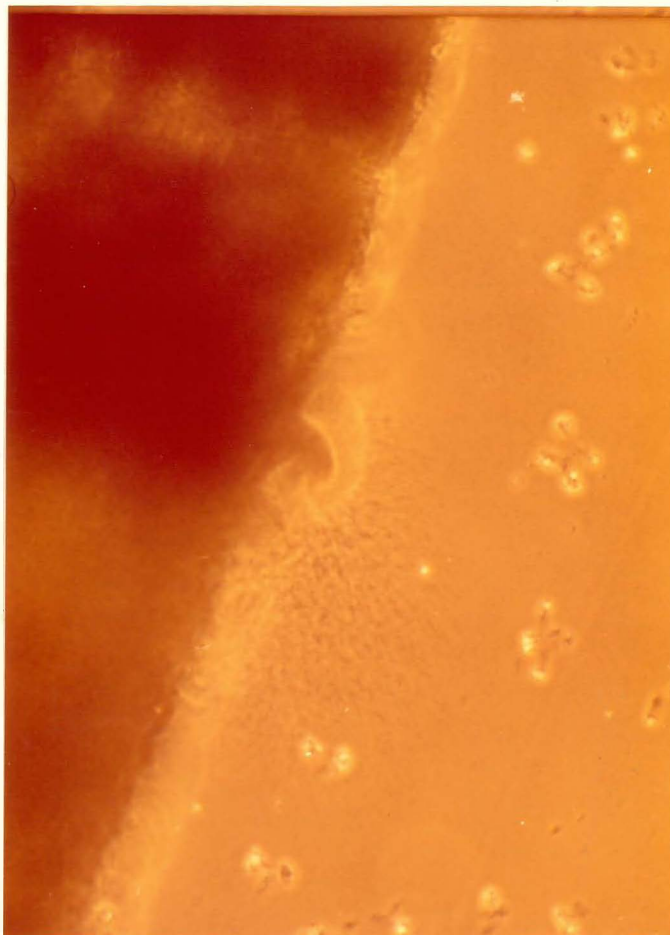


Fig. 1 Localização da esxudação da bactéria X. albilineans, de material doente de cana-de-açúcar, ao microscópio com contraste de fases. (X 562,5)

posição de nutrientes que diminuísse o tempo de incubação e favorecesse o desenvolvimento da bactéria. Foram experimentadas várias fontes de aminoácidos e vitaminas, disso resultando a elaboração de um novo meio, que foi identificado como meio de WILBRINK modificado 2 (W-2) e que passou a ser utilizado em todos os ensaios posteriores.

#### 4.1.3. Caracterização dos isolados

Os cultivos purificados dos isolados obtidos foram todos caracterizados segundo os meios de cultura diferenciais descritos por DYE (1962, 1966) PANAGOPOULOS (1969) e HUGH e LEIFSON (1953). A coloração de flagelô foi obtida pelo método LEIFSON (1960).

Estes isolados receberam denominações representados por códigos de registro em que X. de Xanthomonas era seguido da referência numérica da variedade de cana-de-açúcar da qual se conseguiu o isolado.

#### 4.2. Testes de patogenicidade e métodos de inoculação para reprodução dos sintomas.

Após pesquisa bibliográfica de métodos de inoculação, foram testados os seguintes métodos em milho doce e cana-de-açúcar, variedade Co 419: corte de folhas no vértice foliar com tesoura infestada da bactéria (ROBBS, 1962); palito de madeira infestado de bactéria e introduzido no palmito foliar (WINSTEAD & KELMAN, 1952); capa de alumínio (KOIKE, 1965) e in



jeção sob pressão (MARTIN & ROBINSON, 1961). O método de injeção na região pouco acima do meristema apical, que apresentou os melhores resultados, foi adotado em todos os estudos.

A adoção desse método aos seguintes procedimentos: suspensões de bactérias, obtidas de culturas puras em água estéril, foram calibradas pela escala de MCFARLAND (in GOODMAN, 1967) nº 3, que no espectrofotômetro de Bauch-Lomb a 625 nm apresenta 60% de transmitância e equivale aproximadamente a  $8 \times 10^8$  células/mili litro para a bactéria X. albilineans. Estas suspensões foram então injetadas em milho doce (Zea mays, cultivar Agrocere-Doce) como preconizado por PERSLEY (1972), ou em cana-de-açúcar de preferência em variedades reconhecidamente suscetíveis ou na mesma em que se isolou a bactéria. Para a injeção sob pressão foram utilizadas seringas hipodérmicas com agulhas obliteradas na extremidade, com abertura lateral, e para cada planta usou-se cerca de 1,0 ml da suspensão. Injetando-se a 5 cm acima do meristema apical da cana-de-açúcar e do milho doce, o inóculo extravasou na região do vértice foliar, onde as folhas foram cortadas. As plantas utilizadas nestas inoculações contavam cerca de 30 dias de idade após a germinação e mediam aproximadamente 40 cm de altura. Elas foram sempre cultivadas em vasos de barro com 25 cm de altura e igual diâmetro, com solo esterilizado em autoclave e de composição adequada para o ótimo desenvolvimento da planta.

Os toletes (sementes) de cana-de-açúcar foram individualizados quanto às gemas e sempre tratados com água quen

te a 50,5°C durante 2 horas e com fungicida Benomyl a 0,05%, antes do plantio. Cada vaso continha, no máximo, três plantas de cana-de-açúcar ou cinco plantas de milho.

Durante todo o estudo, os vasos foram conservados em casa de vegetação onde a temperatura era sempre controlada de maneira a que nunca fosse inferior a 23,0°C. Tanto o milho como a cana-de-açúcar, quando inoculados, previamente sofriam desbaste das folhas na região do vértice foliar com tesoura desinfestada.

Os reisolamentos foram comprovados e somente após os testes de patogenicidade as culturas das bactérias foram consideradas e especificadas como X. albilineans.

#### 4.3. Avaliação de resistência de variedades de cana-de-açúcar e X. albilineans.

##### 4.3.1. Variedades utilizadas

Foram utilizadas variedades selecionadas entre as mais cultivadas na época nas principais regiões canavieiras do país, segundo PLANALSUCAR (1972), SANGUINO (1973, comunicação pessoal) e outras referências bibliográficas locais e estrangeiras.

Para os estudos preliminares de avaliação de resistência, tendo como base essas informações, foram selecionadas variedades suscetíveis, intermediárias e outras consideradas resistentes à escaldadura das folhas para servirem como padrões de resistência nos testes.

A tabela 1 apresenta o rol das variedades selecionadas com as devidas referências de comportamento quanto à resistência a X. albilineans; todas as sementes foram fornecidas pela COOPERSUCAR, Estação Experimental de Piracicaba, São Paulo e IAA, Estação Experimental de Araras, São Paulo.

#### 4.3.2. Estudo da resistência varietal conforme concentrações de células bacterianas em suspensão.

##### 4.3.2.1. Inoculação de X. albilineans na concentração $8.10^8$ células/ml em 11 variedades de cana-de-açúcar.

Neste ensaio inoculou-se, conforme a metodologia descrita, uma suspensão de três isolados ( X 45, X 419 e X 419 reisolado) que, suspensos em água estéril, separadamente, até a conc. nº 3 da escala de McFarland; foram após misturados em porções iguais. Deste inóculo cada planta recebeu 1 ml, exceto a planta testemunha que foi inoculada com água estéril.

As variedades testadas foram: CB 40-69, CB 45-15, CB 49-260, CB 56-126, CB 56-171, Co 331, Co 419, Co 775, CP 29-116, H50-7209 e P0J 28-78.

O ensaio foi composto de nove plantas por variedade, e cada vaso continha três plantas sadias, uniformes e de igual tamanho. Destas, seis plantas foram inoculadas com a suspensão bacteriana e três com água estéril.

Os cuidados tomados na preparação da cana (tole

Tabela 1. Variedade de cana-de-açúcar utilizadas nos diversos testes de inoculação da X. albilineans.

Variedades	Reações <sup>a/</sup>	Referências
Akbar	S	PLANALSUCAR (1977)
Bo 14	R	PLANALSUCAR (1977)
CB 40-13	S	BRIEGER (1970)
	R	PLANALSUCAR (1972 e 1977)
CB 40-69	S	PLANALSUCAR (1972)
	I	PLANALSUCAR (1977)
CB 40-77	S	PLANALSUCAR (1972)
CB 41-76	S	PLANALSUCAR (1972)
CB 45-155	S	PLANALSUCAR (1972)
	I	PLANALSUCAR (1977)
CB 49-260	S	BRIEGER (1970)
	I	PLANALSUCAR (1977)
CB 56-126	S	BRIEGER (1970)
CB 56-171	I	PLANALSUCAR (1977)
Co 313	R	PLANALSUCAR (1977)
Co 331	R	DANTAS (1970)
	I	PLANALSUCAR (1972 e 1977)

Tabela 1. (continuação)

Variedades	Reações	Referências
Co 419	S	BAUDIN (1963)
	I	PLANALSUCAR (1977)
Co 421	R	DANTAS (1970)
	R	PLANALSUCAR (1972 e 1977)
Co 775	S	PLANALSUCAR (1972)
	I	PLANALSUCAR (1977)
CoK 30	-	-
CP 29-116	I	PLANALSUCAR (1977)
CP 44-150	-	-
EROS	R	PLANALSUCAR (1977)
F 140	I	PLANALSUCAR (1971)
H 50-7209	R	KOIKE (1965)
	I	PLANALSUCAR (1977)
POJ 2878	R	ARRUDA (1944)
	R	DANTAS (1970)
	R	EGAN (1971b)
	I	PLANALSUCAR (1977)
Q 73	S	PLANALSUCAR (1977)
TROJAN	T	EGAN (1958)
	T	BAUDIN (1963)
	S	EGAN (1968)

a/ R = resistente, S = suscetível, T = tolerante, I = intermediária;  
 - = reação e referência desconhecidas.

te) semente foram os já mencionados, também mantidas as condições da casa de vegetação.

A avaliação do resultado, baseada nos sintomas externos, foi realizada cerca de 20 dias após a inoculação. Ainda foi realizado um exame dos feixes vasculares descoloridos, observando-se possíveis diferenças, e a constatação da presença de bactérias nestes feixes vasculares foi feita ao microscópio.

A qualificação dos sintomas externos foi feita por notas e a dos feixes vasculares descoloridos pela contagem destes no n.º rente ao solo, na região da cicatriz da bainha foliar. As notas variaram de 0 a 3, representando: 0 (zero), ausência de sintomas; 1, estrias brancas finas; 2 estrias largas amareladas; e 3 estrias largas amareladas e necrosadas.

#### 4.3.2.2. Inoculação de X. albilineans na concentração $8.10^4$ células/ml em 22 variedades de cana-de-açúcar.

Este ensaio realizado com a inoculação da conc.  $8.10^4$  cels/ml, em conformidade com a metodologia descrita no ensaio com conc.  $8.10^8$  cels/ml, foi motivado pelo fato de a concentração de células anteriormente testada ter tido efeito bastante drástico, pois a leitura dos sintomas externos qualificados não possibilitou diferenciar as variedades suscetíveis das resistentes.

Uma suspensão de cinco isolados ( X 45, X 419, X 419 reisolado, X 421 e X 980) preparados em condições idênticas

e misturados em quantidades iguais, foi inoculada em 22 variedades de cana-de-açúcar: AKBAR, Bo 14, CB 40-69, CB 40-77, CB 45-155, CB 49-260, CB 56-126, CB 56-171, Co 313, Co 331, Co 419, Co 421, Co 775, CoK 30, CP 29-116, CP 44-150, EROS, F.140, H50-7209, POJ 28-78, Q.73 e TROJAN.

Apenas a diluição foi alterada: cada isolado foi suspenso a concentração nº 3 da escala de McFarland e depois diluído a  $10^{-4}$ ; misturando-se as suspensões, obteve-se o inóculo. Desta suspensão, 1 ml foi inoculado nas plantas testes; nas plantas testemunhas inoculou-se água estéril.

O número de plantas de cada variedade foi de nove, sendo seis destas inoculadas e três testemunhas. Estas plantas foram cultivadas em caixas de madeira de 30 x 40 x 10 cm e cada caixa continha uma variedade.

As avaliações foram realizadas 20 dias após a data da inoculação e constou da leitura da presença dos sintomas internos (quantidade numérica de feixes vasculares descoloridos) e também de exame da presença de bactérias nestes feixes descoloridos. As notas atribuídas, conforme a quantidade numérica de feixes vasculares descoloridos variaram de 0 a 4, representando: 0 (zero), ausência; 1, um a dois; 2, três a cinco; 3, seis a dez; e 4, mais de dez.

4.3.2.3. Inoculação de X. albilineans nas concentrações  $8.10^8$ ,  $8.10^6$  e  $8.10^4$  células/ml na variedade Co 419.

Este ensaio foi realizado para se estabelecer o melhor ponto de leitura dos feixes vasculares descoloridos nos colmos inoculados assim como a concentração ideal da bactéria para tal fim.

Foi experimentada, em condições semelhantes aos ensaios anteriores, a inoculação de três níveis de concentração de células bacterianas de um único isolado X 419 numa única variedade de cana-de-açúcar, a Co 419.

Estas concentrações foram obtidas suspendendo-se células bacterianas de X. albilineans conforme a concentração nº 3 da escala de McFarland e diluindo-as a  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$  obtiveram-se com a original os três níveis de suspensões.

As plantas foram cultivadas em caixas de madeira de 30 x 40 x 10 cm que continham 10 plantas de porte semelhante; cada tratamento contou com 5 repetições, representando cada planta uma repetição. O ensaio comportou então cinco plantas para cada concentração de suspensão bacteriana e mais cinco plantas testemunhas que receberam água estéril.

As avaliações dos sintomas externos (folhas) assim como a contagem do número de feixes vasculares descoloridos em duas alturas diferentes (3 e 10 cm acima do solo) no colmo das plantas inoculadas, e mais a medição do comprimento total do colmo produzido desde o nível do solo até o vértice foliar, foram realizadas 90 dias após a data da inoculação.



4.3.3. Avaliação de resistência varietal pelo número de feixes vasculares descoloridos com inoculação de cultura pura de X. albilineans.

Visando comprovar a viabilidade do método de avaliação da resistência varietal pela descoloração vascular e inoculação com culturas puras de bactéria, instalaram-se dois ensaios (experimentos 1 e 2) na mesma época, em condições ambientais idênticas, diferindo apenas na metodologia de obtenção das mudas.

As plantas das variedades CB 45-155, Co 421, Co 331 e H 507209, que compuseram o Experimento 1, foram obtidas de gemas destacadas pelo método de SILVA (1974). As plantas do Experimento 2, efetuado com as variedades CB 40-13, CB 40-69, CB 40-77, CB 41-76 e Co 331, foram obtidas de gemas individualizadas em toletes. As sementes foram pré-germinadas em caixas de areia e as plantas foram repicadas para vasos de barro, uniformizando-se as plantas quanto ao porte e desenvolvimento.

Tanto as gemas destacadas como as gemas em toletes individualizados foram submetidas ao tratamento térmico via úmida a 50,5°C durante 2 horas e tratadas com fungicida Benomyl a 0,05%.

Cada parcela foi composta de seis plantas e cada variedade, de seis repetições, sendo uma delas considerada testemunha biológica, não entrando na computação da análise estatística.

O inóculo utilizado nestes experimentos foi uma mistura de cinco isolados, X 419, X 45, X 980, X 421 e X 41, e a concentração da suspensão bacteriana foi a de  $8.10^5$  células/ml.

Cada isolado, cultivado em tubo de cultura, foi suspenso em água estéril e misturando-se as suspensões em quantidades iguais obteve-se o inóculo utilizado. Cada planta teste recebeu 1 ml desta mistura e as testemunhas, 1 ml de água estéril.

O delineamento experimental utilizado em ambos os experimentos foi o inteiramente casualizado e a avaliação do nº de feixes vasculares descoloridos foi realizada 45 dias após a data da inoculação. Para a contagem destes, utilizou-se microscópio estereoscópico. O local escolhido no colmo foi o nó à altura de 5 cm acima do solo. Este nó foi cortado transversalmente na altura da cicatriz da bainha, fazendo-se imediatamente a contagem (figura 2 e 3). Os dados originais de nº de feixes vasculares descoloridos foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$  para efeito de análise estatística.

#### 4.4. Estudos de sobrevivência de X. albilineans in vitro e in vivo.

##### 4.4.1. Sobrevivência de X. albilineans em suspensões em água estéril conservadas à temperatura de -15,00C

Uma suspensão em água esterilizada, de concentra



Fig. 2 Feixes vasculares descoloridos na região da cicatriz da bainha foliar, no colmo de cana-de-açúcar, de plantas inoculadas com cultura pura de X. albilineans.

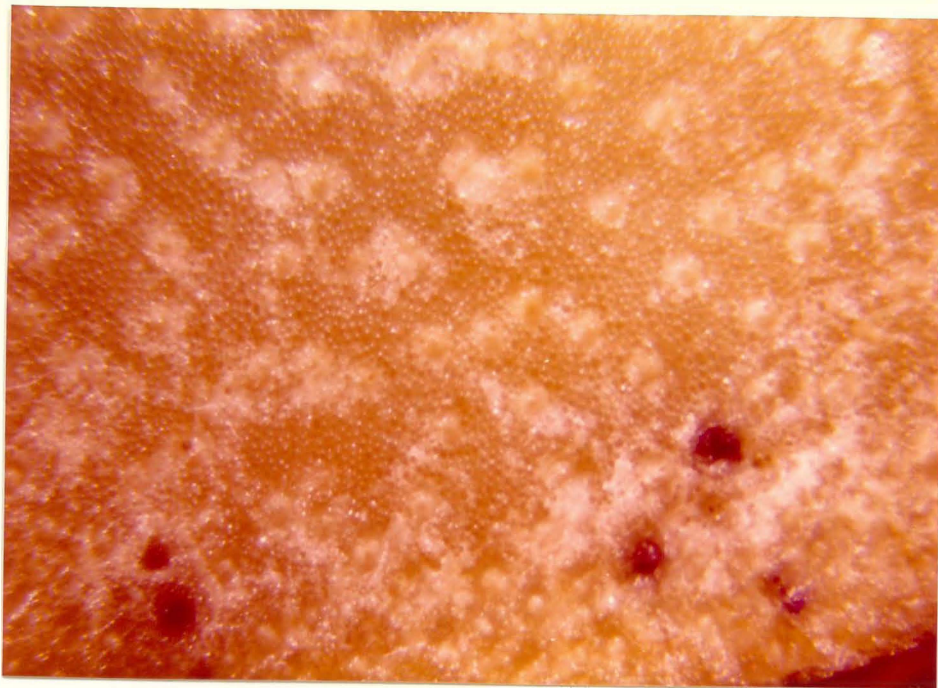


Fig. 3 Feixes vasculares descoloridos na região da cicatriz da bainha foliar, no colmo de cana-de-açúcar, de plantas inoculadas com cultura pura de X. albilineans, (ao microscópio estereoscópico 60 X)

ção conhecida de células bacterianas, foi conservada a  $-15,00^{\circ}\text{C}$ , em congelador de refrigerador doméstico durante o tempo que se transcorreu a experiência.

A suspensão bacteriana foi preparada do isolado X 419 e a escala nº 3 de McFarland foi a que serviu na preparação da concentração de células.

Esta suspensão foi distribuída em tubos de ensaio esterilizados de 10 cm de altura e 16 mm de diâmetro e vedados com tampa de baquelite, recebendo cada um a quantidade exata de 5 ml; os tubos foram depositados no congelador.

A intervalos médios de 30 dias, uma das repetições era retirada do congelador e colocada ao ambiente para o descongelamento. Após alguns minutos e observada a total liquefação da suspensão bacteriana, era retirada uma alíquota para plaqueamento em meio de cultura e outra para exame direto ao microscópio a fim de verificar a movimentação das células bacterianas. A experiência durou enquanto foram positivos os plaqueamentos da bactéria, indicando a existência de células vivas de X. albilineans, e ainda enquanto foi confirmada sua patogenicidade através da inoculação das células dessas colônias em plantas sadias.

#### 4.4.2. Sobrevivência de X. albilineans em folhas de cana-de-açúcar com sintomas típicos da doença conservadas à temperatura de $-15,00^{\circ}\text{C}$ .

Folhas de cana-de-açúcar com sintomas típicos da doença, de plantas previamente inoculadas, foram coletadas e após

exame e constatação da presença abundante de exsudação do pus bacteriano pelos feixes vasculares, foram imediatamente seccionadas em pedaços de 30 cm de comprimento e depositadas no interior de sacos de polietileno, devidamente vedados. Estes foram depositados no interior do congelador de refrigerador doméstico.

A intervalos médios de 30 dias, uma das repetições foi retirada do congelador e colocada ao ambiente para o descongelamento.

Pequenos pedaços foram retirados e assepticamente examinados ao microscópio e as células bacterianas (pus bacteriano), plaqueadas pelo método de isolamento por pipeta; após a obtenção da cultura pura, foram inoculadas em suscetíveis saudáveis. A experiência teve prosseguimento enquanto os isolamentos foram positivados e a patogenicidade foi confirmada com a reprodução dos sintomas da doença nos suscetíveis inoculados.

#### 4.4.3. Sobrevivência de X. albilineans em folhas secas de cana-de-açúcar com sintomas típicos da doença, conservadas ao ambiente no laboratório.

Folhas de cana-de-açúcar com sintomas típicos da doença, de plantas previamente inoculadas, foram coletadas e, após exame e constatação da presença abundante de exsudação bacteriana pelos feixes vasculares, foram seccionadas em pedaços de 15 cm de comprimento, depositadas no interior de sacos de papel e conservadas à temperatura ambiente e com umidade relativa do ar em torno de 70%.

Após cada 5 dias, de uma das repetições era retirado um pequeno pedaço. Este, asséptica e cuidadosamente, era examinado ao microscópio e as células bacterianas eram plaqueadas pelo método de isolamento por pipeta; após obtenção das culturas puras, eram inoculadas num suscetível sadio. A experiência prosseguiu enquanto os isolamentos foram possíveis e ainda enquanto foram positivas as inoculações de suspensões de macerados destas folhas conservadas, em água esterilizada.

#### 4.4.4. Sobrevivência de X. albilineans em terra seca à sombra e esterilizada, conservada à temperatura de 28,0°C.

Pequenas quantidades de terra, de solo de ótima constituição para o cultivo da cana-de-açúcar, foram coletadas e, após secagem à sombra à temperatura ambiente, peneiradas e distribuídas em tubos de ensaio de 10 cm de altura por 16 mm de diâmetro, até à altura de 4 cm a partir do fundo.

Estes tubos foram esterilizados por tindalização durante 3 dias consecutivos em autoclave a 1,0 atmosfera de pressão durante 40 minutos. A cada tubo com terra, assim preparado, foi distribuído 1,0 ml de uma suspensão de células bacterianas do isolado X 419, de concentração nº 3 da escala da McFarland. Estes tubos foram conservados em câmara de incubação à temperatura de 28,0°C e após, a cada cinco dias, uma repetição era testada. Desta, uma pequena alíquota era retirada, colocada na superfície do meio de cultura em placas de cultura

e espalhada levemente com espátula de Drigawski.

Esta experiência foi continuada enquanto os plaqueamentos não deram colônias de X. albilineans.

#### 4.4.5. Sobrevivência de X. albilineans em cilindros de aço conservados à temperatura de 28,0°C.

Cilindros de aço com 40 mm de diâmetro e 1,0 cm de comprimento foram utilizados nesta experiência. Eles foram lavados e esterilizados em forno de Pasteur à 150,0°C durante 3 horas e infestados com células bacterianas de cultura pura de X. albilineans (X 419).

A contaminação foi obtida rolando-se estes cilindros em culturas da bactéria em placas, com 4 dias de incubação. A introdução de 10 cilindros, em cada placa de cultura condicionou a adesão, neles, de fina película de células bacterianas.

Estes cilindros foram, logo em seguida, distribuídos em placas de Petri esterilizadas, com papel de filtro na tampa. Cada placa recebeu 4 cilindros, constituindo cada placa uma repetição. Estas placas foram conservadas em câmara de incubação à temperatura de 28,0°C.

Após cada 24 horas, no início, e a cada 12 horas, depois do 4º dia, uma das placas, ao acaso, era retirada da câmara de incubação e os cilindros "rolados" na superfície de meio de cultura, em placas de Petri. Após alguns minutos de agitação de cada cilindro nestas placas de cultura, estas foram incubadas à temperatura de 28,0°C. A experiência teve continuidade

de até que os plaqueamentos dos cilindros contaminados não mais originassem colônias de bactérias.

4.4.6. Sobrevivência de cinco isolados de X. albilineans em suspensões em água estéril, submetidas a diferentes temperaturas de inativação.

Suspensões de células bacterianas em água esterilizada, obtidas de culturas puras de cinco isolados, X 419, X 45, X 980, X RSD e X 421, de X. albilineans, foram preparadas separadamente na concentração nº 3 da escala de McFarland e submetidas a diferentes temperaturas em banho-maria.

Os isolados utilizados eram todos caracterizados previamente como sendo X. albilineans e devidamente testados quanto a sua patogenicidade. Estes isolados foram multiplicados de modo semelhante em tubos de cultura e incubados durante 4 dias à temperatura de 28,0°C.

Para produzir a concentração necessária de células foram utilizados alguns tubos de cada isolado e após preparados separadamente foram distribuídos em tubos de cultura idênticos, de marca Pirex de 10 cm de comprimento, 16 mm de diâmetro, 1 mm de espessura, previamente esterilizados em autoclave durante 20 minutos. Cada tubo recebeu 5 ml da suspensão bacteriana e de cada isolado foram preparados 10 tubos.

As temperaturas de inativação experimentadas foram: 48,0°C, 50,0°C, 52,0°C, 54,0°C e 56,0°C; o tempo de duração de cada tratamento foi de 15 minutos. Estas temperaturas foram ob



tidas em um banho-maria de resistência elétrica imersa na água, com agitador acoplado e com precisão de termostato de  $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ , de marca Precision Cientific.

Após o banho-maria ter atingido a temperatura desejada, os tubos contendo a bactéria foram submersos e o tempo contado a partir do equilíbrio alcançado. Para isto, um tubo com igual quantidade de água, submerso juntamente com os outros com o bulbo de um termômetro no seu interior, dava a indicação do equilíbrio alcançado.

Dois tubos de cada isolado eram igualmente submetidos às condições de cada temperatura e, após o tratamento eram conservados à temperatura ambiente, retirando-se, posteriormente, de cada tubo, uma alíquota de 0,5 ml com a qual foi realizada o plaqueamento em meio de cultura.

A testemunha constou, da mesma maneira, do plaqueamento de uma repetição com suspensão que não sofreu efeitos da temperatura, mas que acompanhou todo o processo da experiência.

Após o plaqueamento foram as placas conservadas em câmara de incubação à temperatura de  $28,0^{\circ}\text{C}$  e a leitura do experimento se realizou cinco dias após.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Método de isolamento, meio de cultura e caracterização da bactéria X. albilineans.

#### 5.1.1. Método de isolamento da bactéria X. albilineans em cultura pura.

Os resultados obtidos no ensaio de três métodos de isolamento da bactéria X. albilineans constam da tabela 2.

O método pipeta foi o único com que se conseguiu isolar em cultura pura a bactéria.

Este método assemelha-se ao descrito por DEAN (1974); entretanto, este último não foi nem testado devido a não ter sido encontrado o material vedante.

Nem o método de ARRUDA nem o de PERSLEY deram resultados positivos. No primeiro houve desenvolvimento prematuro e total de organismos contaminantes. No último, que foi previamente bastante testado, também não houve isolamento positivo algum e em muitas placas nem os contaminantes se desenvolveram.

Tabela 2. Comparação de métodos de isolamento de X. albilineans

Métodos	Resultados			
	Positivos		Negativos	
	Tubos	Placas	Tubos	Placas
ARRUDA (1944)	0		50	
PERSLEY (1971)		0		10
Método pipeta		5		5

#### 5.1.2. Meio de cultura mais apropriado ao desenvolvimento da bactéria X. albilineans.

O meio de cultura de WILBRINK modificado 2 (W-2), que foi elaborado e utilizado neste estudo, tinha a seguinte composição:

Componentes	Quantidades
Neopeptone (DIFCO),	5,0 g;
$K_2HPO_4$ ,	0,5 g;
$MgSO_4$ ,	0,25 g;
Sacarose,	10,0 g;
Ágar-ágar,	15,0 g;
Água,	1,0 litro.

Para a elaboração desse meio todos os nutrientes

foram levados à fusão em fogo brando, e após, o pH foi ajustado com NaOH para 6,8 - 7,0. A esterilização foi feita em autoclave a 1,0 atmosfera durante 20 minutos.

Em todos os meios de cultura testados, os resultados foram positivos; no entanto, o meio W-2 possibilitou maior número de placas de cultura com isolados da bactéria X. albilineans, como se observa na Tabela 3, e multiplicação mais rápida da mesma, diminuindo consideravelmente o tempo de incubação.

Tabela 3. Eficiência de diferentes meios de cultura no isolamento e desenvolvimento da bactéria X. albilineans.

Meios de cultura	Nº de placas de cultura	Nº de placas de cultura positivas <sup>a/</sup>
WILBRINK (W)	10	5
WILBRINK modificado 1(W-1)	10	4
WILBRINK modificado 2(W-2)	10	9

<sup>a/</sup> Avaliações feitas 6 dias após o isolamento.

### 5.1.3. Caracterização da bactéria como X. albilineans e isolados originais obtidos.

Após 3 a 5 dias do isolamento em placas de cultura com meio de WILBRINK modificado (W-2), distinguem-se ao mi

croscópio estereoscópico pequeníssimas colônias brilhantes. Após 10 dias estas colônias chegam a 0,3 mm de diâmetro; inicialmente de cor amarelo-pálida, gradativamente mudam de coloração passando a amarelo, chegando algumas delas a se apresentarem castanho-escuras aos 20 dias de idade.

As bactérias apresentam intenso movimento na água, um flagelo polar (Figura 4) e são Gram negativas. (Figura 5).

As bactérias de colônias com cerca de 10 dias de idade, ou de exsudatos condensados, apresentam-se acopladas formando pequenas cadeias de 5 a 10 bactérias, dando a impressão visual de serem filamentosas. (Figura 5)

Os resultados dos testes culturais bioquímicos que possibilitaram afirmar como sendo de Xanthomonas albilineans (Ashby) Dowson, causadora da Escaldadura das folhas da cana-de-açúcar, os isolados obtidos, são apresentados na Tabela 4.

Na Tabela 5 são apresentados todos os isolados obtidos, com a denominação código e a procedência de cada um.

Todos estes isolados encontram-se guardados na Coleção de Bactérias da cana-de-açúcar, no Departamento de Fitopatologia da ESALQ.

## 5.2. Método e escolha do local de inoculação de células bacterianas de cultura pura de X. albilineans.

### 5.2.1. Comparação de métodos de inoculação.

Os dados do ensaio em que se testaram alguns métodos

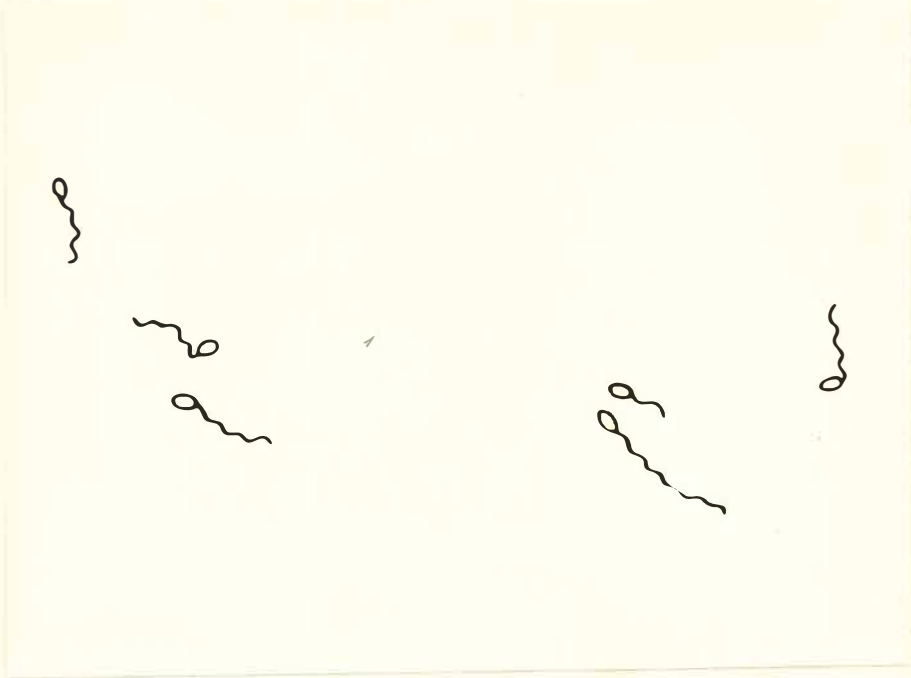


Fig. 4 Células bacterianas de X.  
albilineans, com flagelo  
monotriquia polar (X 1250)

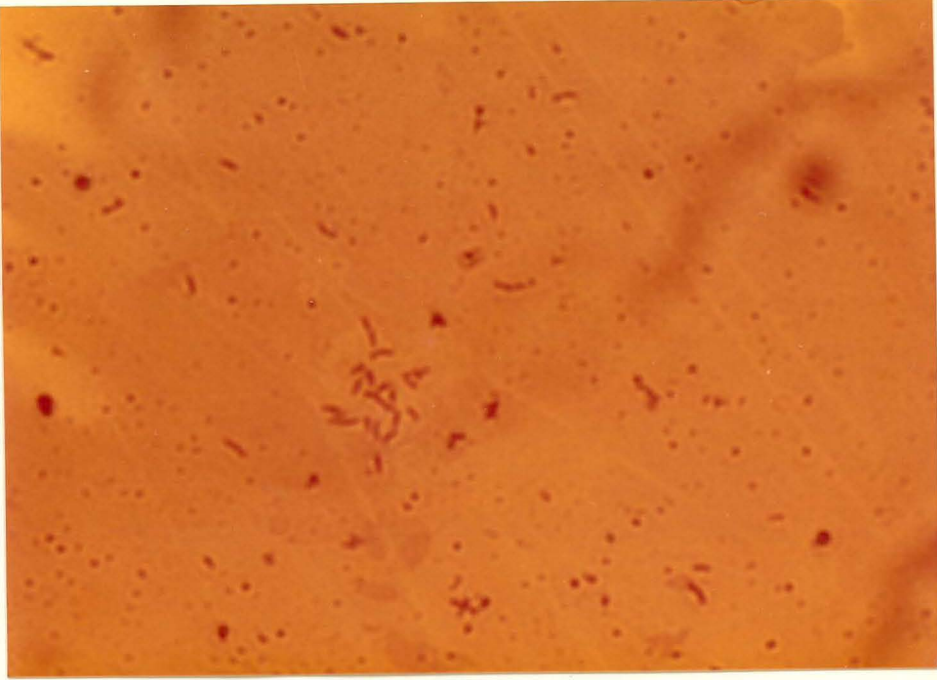


Fig. 5 Células bacterianas de X.  
albilineans em cadeia, Gram  
negativas (X 1250)

Tabela 4. Caracteres culturais bioquímicos diferenciais dos isolados obtidos de Xanthomonas albilineans (Ashby) Dowson

Caracteres culturais e bioquímicos	Autor do teste realizado	Resultado
Flagelo	LEIFSON (1960)	Monotriquia polar, ondulação de pequena amplitude.
Gram	REED (in ROBBS 1966)	Negativa
Temperatura	-	Ótima - 28,0°C
Requerimento oxigênio	DYE (1962)	Aeróbica
Utilização da glucose	HUGH e LEIFSON (1953)	Oxidativa
Tolerância e NaCl	DYE (1962)	Máximo 2%
Produção de ácido de:		
Arabinose	DYE (1962)	-
Glucose	DYE (1962)	+
Salicina	DYE (1962)	-
Utilização da asparagina	DYE (1962)	-
Hidrólise da gelatina	DYE (1962)	-
Ação no leite	DYE (1962)	-
Produção de urease	DYE (1962)	-
Nitrito de Nitrate	DYE (1962)	-

Requerimento de ac. glutâmico(DYE, LELLIOT 1974) e metionina (PANAGOPOULOS 1969).

Tabela 5. Isolados obtidos de X. albilineans (Ashby) Dowson da cana-de-açúcar.

Variedades	Procedência	Isolados
CB 45-155	MG	X 45
Co 419	MG	X 419
Co 421	MG	X 421
CP50-1	Assis, SP	X 50
CP 44-101	Piracicaba, SP	X 44
CP 44-101	Piracicaba, SP	X RSD <sup>a/</sup>
Pr 980	Assis, SP	X 980
CB 41-76	Porecatu, PR	X 41

<sup>a/</sup> Isolado de plantas com sintomas atípicos da escaldadura porêm de "vírgulas" dos feixes vasculares da região dos nós.



todos de inoculação da bactéria em plantas e também os utilizados na inoculação específica de X. albilineans em cana-de-açúcar, constam da Tabela 6.

Tanto no milho doce como em cana-de-açúcar, variedade Co 419, os resultados positivos de reprodução dos sintomas foram obtidos nos métodos de inoculação da capa de alumínio e injeção sob pressão. As testemunhas inoculadas com água estéril não acusaram presença de contaminantes no material empregado.

Tabela 6. Testes comparativos de métodos de inoculação de cultura pura<sup>a/</sup> de X. albilineans (X 419) em suscetíveis sadios.

Métodos	Milho Doce		Cana-de-açúcar, variedade Co 419.	
	Plantas inoculadas	Plantas c/sintomas	Plantas inoculadas	Plantas c/sintomas
Corte de folhas	10	0	10	0
Palito de madeira	10	0	10	0
Capa de alumínio	10	1	10	3
Injeção	10	8	10	6
Testemunha	10	0	10	0

<sup>a/</sup> A suspensão bacteriana foi a de  $8.10^8$  células/ml e a testemunha foi inoculada com água estéril. A avaliação dos sintomas em milho doce foi efetuada 10 dias após a inoculação e na cana-de-açúcar, 20 dias após.

5.2.2. Escolha do local de inoculação de X. albilineans, por injeção no palmito foliar.

Os dados deste ensaio constam da Tabela 7 onde se pode verificar tanto maior eficiência quanto mais perto do meristema apical da planta é feita a inoculação da bactéria, tanto no milho doce como na cana-de-açúcar suscetível.

O experimento transcorreu normalmente não se observando anormalidade alguma e as testemunhas inoculadas com a água estéril não acusaram presença de contaminantes.

5.3. Avaliação de resistência varietal pela inoculação de células bacterianas de cultura pura de X. albilineans pelo método de injeção no palmito foliar (5 cm acima do meristema apical).

5.3.1. Inoculação de X. albilineans na concentração  $8 \cdot 10^8$  células/ml em 11 variedades de cana-de-açúcar.

Na Tabela 8 pode-se observar que pelos sintomas externos houve diferenças graduais e que houve possibilidade de separar em grupos as variedades mais, ou menos, suscetíveis; no entanto, estas diferenças foram obtidas através da visualização destes sintomas e muitas vezes eram difíceis de se estabelecer os limites entre um grau e outro. Ainda as variações dos sintomas de planta a planta dentro da mesma variedade é muito nítida.

Os sintomas internos também foram uniformemente

Tabela 7. Determinação do melhor ponto de inoculação de X. albilineans (X 419) no palmito foliar para reprodução dos sintomas<sup>a/</sup>

Local de inoculação no palmito foliar	Milho doce		cana-de-açúcar var. Co 419	
	plantas inoculadas	plantas c/sintomas	plantas inoculadas	plantas c/sintomas
Vértice foliar	10	4	10	2
5 cm abaixo do vértice foliar	10	6	10	5
5 cm acima do meristema apical	10	10	10	9
Testemunha	5	0	5	0

<sup>a/</sup> A concentração testada foi de  $8.10^8$  células/ml. A avaliação foi efetuada 20 dias após a inoculação. Na testemunha foi injetada água estéril.

Tabela 8. Reações de 11 variedades de cana-de-açúcar à inoculação de  $8.10^8$  células/ml de X. albilineans, avaliadas 20 dias após a inoculação no primeiro nó rente ao solo.

Variedades	Reações em condições de campo <sup>a/</sup>	Sintomas nas plantas inoculadas (média de 3 plantas.		Presença de bactérias nos colmos das plantas inoculadas <sup>c/</sup>	Sintomas nas plantas inoculadas com água estéril	
		Externos <sup>b/</sup>	Internos <sup>c/</sup>		Externos <sup>b/</sup>	Internos <sup>c/</sup>
CB 40-69	S e I	2	+	+	0	-
CB 45-155	S e I	1	+	+	0	-
CB 49-260	S e I	3	+	+	0	-
CB 56-126	S	1	+	+	0	-
CB 56-171	I	3	+	+	0	-
Co 331	R e I	2	+	+	0	-
Co 419	S e I	3	+	+	0	-
Co 775	S e I	2	+	+	0	-
CP 29-116	I	2	+	+	0	-
H 50-7209	R e I	1	+	+	0	-
POJ 28-78	R e I	3	+	+	0	-

<sup>a/</sup> R = resistente, S = suscetível, I = intermediária.

<sup>b/</sup> As notas variaram de 0 a 3, conforme escala adotada.

<sup>c/</sup> + = presença, - = ausência de feixes vasculares descoloridos ou células bacterianas.

positivados em todas as variedades, assim como a presença da bactéria nas plantas inoculadas.

As variedades CB 49-260, CB 56-171, Co 419 e POJ 2878 mostraram sintomas externos mais avançados da doença enquanto as variedades CB 45-155, CB 56-126 e H50-7209 os mostraram mais incipientes.

Nas variedades CB 40-69, Co 331, Co 775 e CP 29-116 os sintomas externos também foram bastante pronunciados mas ocupando uma posição intermediária em relação aos outros dois grupos.

A testemunha inoculada com água estéril não apresentou sintomas externos ou internos, indicando ausência de contaminantes que pudessem interferir nos resultados.

#### 5.3.2. Inoculação de X. albilineans na concentração $8 \cdot 10^4$ células/ml em 22 variedades de cana-de-açúcar

Os resultados deste teste constam da Tabela 9.

Os sintomas externos pela expressão de estrias nas folhas das plantas inoculadas foram observados em nove variedades: Bo 14, CB 49-260, CB 56-126, Co 331, CoK 30, CP 44-150, F-140, Q 73 e TROJAN.

Pela média do número de feixes vasculares descoloridos, as variedades puderam ser separadas em dois grupos:

1º grupo: CB 40-69, CB 40-77, CO 313, Co 331 e H 50-7209, com 1 a 2 feixes vasculares descoloridos;

2º grupo: BO-14, CB 49-260, CB 56-126, CoK 30, CP 44-150, EROS,

Tabela 9. Reações de 22 variedades de cana-de-açúcar à inoculação de  $8.10^4$  células/ml de X. albilineans, avaliadas 20 dias após a inoculação no primeiro nó rente ao solo.

Variedades	Reações em condições de campo <sup>a/</sup>	Sintomas nas plantas inoculadas (média de 3 plantas.		Presença de bactérias nos colmos das plantas inoculadas <sup>c/</sup>	Sintomas nas plantas inoculadas com água estéril	
		Externos <sup>b/</sup>	Internos <sup>c/</sup>		Externos <sup>b/</sup>	Internos <sup>c/</sup>
AKBAR	S	-	2	+	-	0
Bo 14	R	+	3	+	-	0
CB 40-69	S e I	-	1	+	-	0
CB 40-77	S	-	1	+	-	0
CB 45-155	S e I	-	2	+	-	0
CB 49-260	S e I	+	3	+	-	0
CB 56-126	S	+	3	+	-	0
CB 56-171	I	-	2	+	-	0
Co 313	R	-	1	+	-	0
CO 331	R e I	+	1	+	-	0
CO 419	S e I	-	2	+	-	0
CO 421	R	-	2	+	-	0
Co 775	S e I	-	2	+	-	0
Cok 30	-	+	3	+	-	0
CP 29-116	I	-	2	+	-	0
CP 44-150	-	+	4	+	-	0
EROS	R	-	3	+	-	0
F 140	I	+	3	+	-	0
H 50-7209	R e I	-	1	-	-	0
POJ 28-78	R e I	-	3	+	-	0
Q 73	S	+	3	+	-	0
TROJAN	T e S	+	3	+	-	0

<sup>a/</sup> R = resistente, S = suscetível, I = intermediária, T = tolerante.

<sup>b/</sup> + = presença, - = ausência de sintomas nas folhas ou células bacterianas.

<sup>c/</sup> As notas variaram de 0 a 4, conforme escala adotada.

F 140, POJ 2878, Q 73 e TROJAN com mais de 6 feixes vasculares descoloridos.

As variedades que apresentaram quantidade alta de feixes vasculares descoloridos apresentaram também em sua maioria, sintomas externos.

A variedade Co 331 apresentou poucos feixes vasculares descoloridos, mas deixou manifestar sintomas nítidos de estrias nas folhas.

Na variedade H 50-7209, ainda que alguns feixes vasculares estivessem descoloridos, não houve possibilidade de observar presença de células bacterianas em movimento nos feixes vasculares.

5.3.3. Inoculação de X. albilineans nas concentrações  $8.10^8$ ,  $8.10^6$  e  $8.10^4$  células/ml na variedade Co 419.

Todas as plantas inoculadas com concentração  $8.10^8$  cels/ml apresentaram sintomas externos; das que receberam inóculo de  $8.10^6$  cels/ml, apenas duas os apresentaram; não se observaram esses sintomas nas plantas em que foi aplicado inóculo de  $8.10^4$  cels/ml. Os demais resultados do ensaio constam das Tabelas 10 e 11.

Este ensaio não foi analisado estatisticamente devido a certas disparidades que poderiam confundir os resultados; no entanto, pode-se verificar que a concentração a  $8.10^4$  cels/ml foi a que menos variações apresentou tanto nas avalia

Tabela 10. Resultados da contagem, a duas alturas acima do solo, dos feixes vasculares descoloridos do colmo de cana-de-açúcar, var. Co 419, em plantas inoculadas com X. albilineans (X 419) em diferentes concentrações<sup>a/</sup>.

Plantas inoculadas	Altura dos pontos examinados do colmo (cm)	Número de feixes vasculares descoloridos		
		$8.10^4$ cels/ml	$8.10^6$ cels/ml	$8.10^8$ cels/ml
1a.	3	1	4	6
	10	0	4	2
2a.	3	3	3	5
	10	3	0	2
3a.	3	1	2	4
	10	0	1	1
4a.	3	1	6	3
	10	1	3	0
5a.	3	1	- <sup>b/</sup>	5
	10	0	-	10
Testemunhas	3	0	0	0
	10	0	0	0

<sup>a/</sup> A avaliação foi efetuada 90 dias após a inoculação; as testemunhas (5 plantas) foram inoculadas com água estéril.

<sup>b/</sup> Planta perdida



Tabela 11. Tamanho das plantas de cana-de-açúcar, var. Co 419, 90 dias após a inoculação de X. albilineans (X 419) em diferentes concentrações e nº médio de feixes vasculares descoloridos observados no colmo a duas alturas.

Inóculos (células/ml)	Altura das plantas (cm)					Médias	Números médios de feixes vasculares descoloridos	
	10 pl.	20 pl.	30 pl.	40 pl.	50 pl.		A 3 cm do solo	A 10 cm do solo
$8.10^4$	45	57	68	70	66	61	1,4	0,8
$8.10^6$	57	61	69	45	-a/	58	3,7	2,0
$8.10^8$	46	50	55	53	25	46	4,6	3,0
Testemunhas <sup>b/</sup>	70	75	72	73	70	72	0	0

a/ Planta perdida

b/ As testemunhas foram inoculadas com água estéril.

ções do nº de plantas com sintomas externos como no nº de feixes vasculares descoloridos entre uma altura e outra.

Observou-se, ainda, relacionamento direto entre nº de feixes vasculares descoloridos no colmo e o tamanho do colmo em altura (Tabela 11).

Houve, também, relação direta entre a concentração do inóculo e os sintomas externos nas folhas e nº de feixes vasculares descoloridos.

#### 5.3.4. Avaliação de resistência varietal pelo nº de feixes vasculares descoloridos com a inoculação de cultura pura de X. albilineans.

##### 5.3.4.1. Experimento 1

Os dados originais do nº de feixes vasculares descoloridos encontrados estão reunidos na Tabela 12. A variedade Co 331 apresentou o menor nº de feixes vasculares descoloridos e a variedade CB 45-155, o maior.

O coeficiente de variação deste experimento foi de 15,53%.

O valor F foi significativo tanto ao nível de 5% como a 1%. Pelo teste de Tukey a 5% ( $\Delta = 0,333$ ), o  $\bar{X}$  Co 331 não diferiu estatisticamente do  $\bar{X}$  Co 421, porém, houve diferença significativa entre o primeiro e os outros dois,  $\bar{X}$  H 50-7209 e  $\bar{X}$  CB 45-155.

Não houve diferença significativa entre  $\bar{X}$  Co

Tabela 12. Resultados da contagem dos feixes vasculares descoloridos 45 dias após a inoculação com  $8.10^5$  células/ml de X. albilineans em quatro variedades de cana-de-açúcar (Experimento 1)

Variedades	Repetições	Número de feixes vasculares descoloridos a/						Totais	Médias
		Por planta da parcela							
		1ª pl.	2ª pl.	3ª pl.	4ª pl.	5ª pl.	6ª pl.		
CB 45-155	1a.	1	4	2	6	1	0	14	2.333
	2a.	1	1	0	8	2	1	13	2.166
	3a.	0	0	0	1	2	1	4	0.666
	4a.	1	2	2	3	1	2	11	1.833
	5a.	4	5	2	0	2	1	14	2.333
	Testemunha <sup>b/</sup>	0	0	0	0	0	0	-	-
Co 331	1a.	0	0	0	1	0	0	1	0.166
	2a.	0	1	0	2	0	0	3	0.500
	3a.	0	0	0	2	0	0	2	0.333
	4a.	1	0	0	0	0	1	2	0.333
	5a.	1	0	0	5	0	0	6	1.000
	Testemunha	0	0	0	0	0	0	-	-
Co 421	1a.	0	1	1	0	1	3	6	1.000
	2a.	0	0	0	1	1	1	3	0.500
	3a.	3	1	2	0	0	0	6	1.000
	4a.	4	0	2	0	2	0	8	1.333
	5a.	0	0	1	0	2	1	5	0.833
	Testemunha	0	0	0	0	0	0	-	-
H 50 7209	1a.	1	7	1	7	0	2	18	3.000
	2a.	0	4	1	1	0	0	6	1.000
	3a.	0	1	1	0	2	1	5	0.833
	4a.	2	1	3	0	1	1	8	1.333
	5a.	2	1	2	0	1	1	6	1.000
	Testemunha	0	0	0	0	0	0	-	-

<sup>a/</sup> A contagem foi feita no nō mais prōximo, a 5 cm do solo, na região da cicatriz da bainha foliar.

<sup>b/</sup> As testemunhas foram inoculadas com água estēril.

421,  $\bar{X}$  H 50-7209 e  $\bar{X}$  CB 45-155.

Ao nível de 1% pelo teste de Tukey ( $\Delta = 0,427$ ) não houve diferença significativa entre  $\bar{X}$  Co 331 e  $\bar{X}$  Co 421 e  $\bar{X}$  H50-7209 nem entre  $\bar{X}$  Co 421,  $\bar{X}$  H50-7209 e  $\bar{X}$  CB 45-155.

O estudo estatístico destes dados encontra-se no Apêndice 1.

#### 5.3.4.2. Experimento 2

Os dados originais do número de feixes vasculares descoloridos encontrados estão registrados na Tabela 13. A variedade Co 331 apresentou o menor número de feixes vasculares descoloridos e a variedade CB 41-76, o maior.

O coeficiente de variação deste experimento foi de 16,52%. O valor F foi significativo ao nível de 5%.

Pelo teste de Tukey a 5% ( $\Delta = 0,449$ ) não houve diferenças entre  $\bar{X}$  Co 331,  $\bar{X}$  CB 40-77 e  $\bar{X}$  CB 40-69, nem entre  $\bar{X}$  CB 40-77,  $\bar{X}$  CB 40-69,  $\bar{X}$  CB 40-13 e  $\bar{X}$  CB 41-76.

O estudo estatístico destes dados encontra-se no Apêndice 2.

### 5.4. Estudo de sobrevivência de X. albilineans in vitro e in vivo.

5.4.1. Sobrevivência de X. albilineans em suspensões em água estéril conservadas a temperatura de - 15,0°C.

Tabela 13. Resultados da contagem dos feixes vasculares descoloridos 45 dias após a inoculação com  $8.10^5$  células/ml de X. albilineans em cinco variedades de cana-de-açúcar (Experimento 2).

Variedades	Repetições	Número de feixes vasculares descoloridos <sup>a/</sup>						Totais	Médias
		Por planta da parcela							
		1 <sup>a</sup> pl.	2 <sup>a</sup> pl.	3 <sup>a</sup> pl.	4 <sup>a</sup> pl.	5 <sup>a</sup> pl.	6 <sup>a</sup> pl.		
CB 40-13	1a.	3	3	5	2	3	0	16	2.666
	2a.	1	3	3	2	1	8	18	3.000
	3a.	0	2	2	1	0	2	7	1.166
	4a.	4	9	4	0	3	0	20	3.333
	5a.	1	0	0	2	2	4	9	1.500
	Testemunha <sup>b/</sup>	0	0	0	0	0	0	-	-
CB 40-69	1a.	0	2	0	8	3	3	16	2.666
	2a.	2	3	0	0	1	1	7	1.166
	3a.	3	4	0	2	0	1	10	1.666
	4a.	6	0	5	1	0	3	15	2.500
	5a.	2	2	4	1	4	1	14	2.333
	Testemunha	0	0	0	0	0	0	-	-
CB 40-77	1a.	1	3	0	2	6	0	12	2.000
	2a.	3	0	0	2	2	0	7	1.166
	3a.	1	3	2	3	2	1	12	2.000
	4a.	1	2	0	2	0	0	5	0.833
	5a.	1	2	2	0	5	2	12	2.000
	Testemunha	0	0	0	0	0	0	-	-
CB 41-76	1a.	10	4	5	1	2	0	22	3.666
	2a.	8	4	0	1	2	1	16	2.666
	3a.	0	3	2	8	1	3	17	2.833
	4a.	2	0	0	0	3	1	6	1.000
	5a.	4	0	6	3	3	8	24	4.000
	Testemunha	0	0	0	0	0	0	-	-
CO 331	1a.	0	1	1	0	3	0	5	0.833
	2a.	3	1	0	1	3	0	8	1.333
	3a.	1	1	0	0	0	0	2	0.333
	4a.	1	0	2	1	0	1	5	0.833
	5a.	0	0	2	1	3	1	7	1.166
	Testemunha	0	0	0	0	0	0	-	-

<sup>a/</sup> A contagem foi feita no nó mais próximo, a 5 cm do solo, na região da cicatriz da bainha foliar.

<sup>b/</sup> As testemunhas foram inoculadas com água estéril.

Os resultados do ensaio de sobrevivência da X. albilineans em suspensões aquosas estereis à temperatura de  $-15,0^{\circ}\text{C}$  são apresentados na Tabela 14. Nela estão os dados obtidos até 193 dias de armazenamento, quando as bactérias não foram mais viáveis e o ensaio foi suspenso.

São também apresentados os dados dos testes de patogenicidade em milho doce que tinham por objetivo verificar a perda de viabilidade e patogenicidade da bactéria em estudo.

#### 5.4.2. Sobrevivência de X. albilineans em folhas de cana-de-açúcar com sintomas típicos de doença, conservadas à temperatura de $-15,0^{\circ}\text{C}$ .

Os dados deste ensaio, coletados até 390 dias, estão contidos na Tabela 15. A coleta dos dados de sobrevivência e patogenicidade foram encerrados quando o isolamento da bactéria e os testes de patogenicidade em milho doce passaram a ser negativos, indicando morte das bactérias armazenadas no tecido doente.

#### 5.4.3. Sobrevivência de X. albilineans em folhas secas de cana-de-açúcar com sintomas típicos da doença, conservadas ao ambiente no laboratório.

Os resultados deste ensaio estão contidos na Tabela 16. Aos 25 dias deu-se por encerrado o ensaio, pois não foi mais possível constatar a presença de exsudato, isolar ou

Tabela 14. Resultados do ensaio de sobrevivência e patogenicidade da X. albilineans (X 419) conservada em água estéril à temperatura de - 15,0°C<sup>a/</sup>

Dias de sobrevivência	Crescimento em meio de cultura	Patogenicidade em milho doce
0	+	+
21	+	+
38	+	+
70	+	+
105	+	+
141	+	+
182	+	+
193	-	-

a/ + = bactérias vivas e patogênicas; - = bactérias mortas e sem patogenicidade.

Tabela 15. Resultados do ensaio de sobrevivência de X. albilineans em folhas frescas de cana-de-açúcar com sintomas típicos da Escaldadura das folhas à temperatura de  $-15,00^{\circ}\text{C}$ <sup>a/</sup>.

Dias de sobrevivência	Presença de Esxudato	Crescimento em meio de cultura	Patogenicidade em milho doce
0	+	+	+
27	+	+	+
63	+	+	+
81	+	+	+
109	+	+	+
151	+	+	+
171	+	+	+
186	+	+	+
220	+	+	+
255	+	+	+
291	+	+	+
332	+	+	+
365	+	-	+
390	+	-	-

<sup>a/</sup> + = bactérias vivas e patogênicas, - = bactérias mortas e sem patogenicidade.



testar a patogenicidade do extrato macerado da folha.

Tabela 16. Resultados do ensaio de sobrevivência de X. albilineans em folhas secas de cana-de-açúcar com sintomas típicos de Escaldadura das folhas, conservadas ao ambiente no laboratório<sup>a/</sup>.

Dias de sobrevivência	Presença de exsudato	Crescimento em meio de cultura	Patogenicidade em milho doce
0	+	+	+
5	+	+	+
10	+	+	+
15	+	+	+
20	+	+	+
25	+	-	-

<sup>a/</sup> + = bactérias vivas e patogênicas, - = bactérias mortas e sem patogenicidade.

5.4.4. Sobrevivência de X. albilineans em terra seca à sombra e esterilizada, conservada à temperatura de 28,0°C.

O ensaio foi dado como encerrado após o 25º dia da data do início, quando, pela segunda vez, o desenvolvimento

de colônias em meio de cultura se tornou negativo (Tabela 17).

Aos 15 dias já houve certa dificuldade para se conseguirem algumas colônias da bactéria. Todas as colônias de bactéria obtidas em meio de cultura foram inoculadas em milho doce para os testes de patogenicidade e identificação dos isolados.

Tabela 17. Resultados do ensaio de sobrevivência de X. albilineans (X 419) em terra estéril seca à sombra, conservada à temperatura de 28,0°C<sup>a/</sup>.

Dias de sobrevivência	Crescimento em meio de cultura	Patogenicidade em milho doce
0	+	+
5	+	+
10	+	+
15	+	+
20	-	-
25	-	-

<sup>a/</sup> + = bactérias vivas e patogênicas, - = bactérias mortas e sem patogenicidade.

5.4.5. Sobrevivência de X. albilineans em cilindros de aço conservados à temperatura de 28,0°C.

O ensaio foi dado como terminado após 156 ho

ras, quando as bactérias dos cilindros não deram mais colônias desenvolvidas no meio da cultura. Este resultado corresponde à sobrevivência da bactéria X. albilineans (X 419) em cilindros de aço por 6 dias.

Os dados originais deste ensaio constam da Tabela 18.

Tabela 18. Resultados do ensaio de sobrevivência de X. albilineans (X 419) em cilindros de aço conservados à temperatura de 28,0°C.

Horas de sobrevivência	Dias de sobrevivência	Crescimento de colônias em meio de cultura <sup>a/</sup>
0	0	+
24	1	+
48	2	+
72	3	+
96	4	+
108		+
120	5	+
132		+
144	6	+
156		-

<sup>a/</sup> Após 156 horas não houve mais desenvolvimento de bactérias dos cilindros contaminados.

5.4.6. Sobrevivência de cinco isolados de X. albilineans em suspensões em água estéril, submetidas a diferentes temperaturas de inativação.

Os dados originais deste ensaio estão expostos na Tabela 19, onde se pode verificar que X 45, X 421, X 980 e X 419 tiveram comportamento semelhante a 50,0°C no entanto, X 419 e X 980 apresentaram uma grande queda no número de colônias que desenvolveram em cultura, indicando uma parcial inativação das células bacterianas.

A 52,0°C estes mesmos isolados foram totalmente inativados, não tendo desenvolvido nenhuma colônia em meio de cultura.

O isolado X RSD que, diferindo de todos os outros isolados, apresentou desenvolvimento anormal em meio de cultura, também reagiu de maneira diferente ao tratamento térmico; a inativação parcial, com grande queda no número de colônias desenvolvidas em cultura, só ocorreu a 54°C, e somente a 54,0°C a inativação se tornou total.

Tabela 19. Resultados do ensaio de sobrevivência de isolados de X. albilineans em suspensões aquosas submetidas a diferentes temperaturas de inativação durante 15 minutos.

Isolados	Sem tratamento têrmico	Efeitos das temperaturas de inativação sobre os isolados <sup>a/</sup>				
		48,0°C	50,0°C	52,0°C	54,0°C	56,0°C
X 419	+	+	+	-	-	-
X 45	+	+	+	-	-	-
X 980	+	+	+	-	-	-
X RSD	+	+	+	+	+	-
X 421	+	+	+	-	-	-

<sup>a/</sup> + = crescimento normal de bactérias, - = inativação total das bactérias.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Métodos de isolamento da bactéria X. albilineans em cultura pura.

O método de isolamento com pipeta de Pasteur foi superior ao método original de DEAN (1974) por permitir o isolamento direto do ponto de esxudação da bactéria. No método de DEAN, após a localização da esxudação da bactéria os feixes vasculares são vedados, a seguir as folhas são superficialmente esterilizadas e o isolamento é feito por técnica usual.

Os mais variados métodos preconizados pela literatura consultada foram experimentados, desde o da simples maceração de tecido afetado em água esterilizada e semeio em meio de cultura, muito comumente utilizado na fitobacteriologia, até aos mais sofisticados, como o de PERSLEY (1972), que emprega meio de cultura seletivo (com penicilina G e ciclo hexamida) para a X. albilineans.

ARRUDA (1944), no Brasil, desenvolveu um método

original de isolamento indireto desta bactéria, método esse que foi também experimentado várias vezes; no entanto, em nenhuma oportunidade obteve-se sucesso.

A maior dificuldade é a localização da exsudação de bactérias pelos feixes vasculares, ao microscópio. A retirada desta exsudação pela pipeta de Pasteur faz-se por capilaridade e com isto uma densa e segura quantidade de células bacterianas é facilmente coletada e depositada em meio de cultura e sua rápida multiplicação ocorre em poucos dias.

#### 6.2. Meio de cultura mais apropriado ao desenvolvimento da bactéria X. albilineans.

Com o intuito de minimizar o tempo de adaptação através do enriquecimento do meio com um suprimento adequado de aminoácidos, principalmente metionina e ácido glutâmico, substituiu-se no meio de Wilbrink a peptona por uma fonte mais rica em aminoácidos, a Neopeptone (DIFCO). Isto produziu efeitos surpreendentes no crescimento da bactéria. A este meio de cultura modificado denominou-se W-2.

Estas dificuldades são observadas principalmente quando do isolamento da bactéria de material doente para o meio de cultura, onde o tempo de incubação se prolonga muitas vezes por até mais de 10 dias. A fase de adaptação ao meio artificial parece bastante demorada, dificultando a rápida proliferação da bactéria.

A X. albilineans é uma espécie atípica de Xantho

monas (DYE, 1966) e tem seu desenvolvimento bastante lento em meio de cultura.

WILBRINK (1920) já havia deparado com esta dificuldade e o desenvolvimento do meio de Wilbrink foi uma grande descoberta. BELL e CONTREL-DORMER (1932) modificaram o meio de Wilbrink incluindo o  $\text{NaSO}_4$ , talvez na tentativa de conservar por mais tempo o pH do meio. NORTH (1925) e ARRUDA (1944) utilizaram meio de cultura com caldo de cana-de-açúcar para isolamentos indiretos da bactéria. PANAGOPOULOS (1969) cita a X. albilineans como bactéria deficiente em metionina e DYE e LELLIOT (1974), em ácido glutâmico.

Outros meios com acréscimo de vitaminas, tamponados com fosfatos foram experimentados, mas em nenhum se conseguiu uma melhoria do meio de Wilbrink.

Pode-se verificar no ensaio de meios de cultura modificados de Wilbrink, usados para isolamento de bactéria, que a mistura de aminoácidos mais purificada produziu bom efeito tanto na qualidade como na quantidade de culturas puras obtidas (Tabela 3).

Este ensaio de meios de cultura foi realizado na fase de isolamento, devido ao fato de ser crucial esta etapa na obtenção da bactéria.

### 6.3. Método e local de inoculação de células bacterianas de cultura pura de X. albilineans.

Com o intuito de testar ou descobrir uma forma



eficiente de inoculação em milho doce e em cana-de-açúcar, procedeu-se à experimentação dos diferentes métodos encontrados na literatura.

O sucesso na inoculação de X. albilineans, caracterizado pela pronta reação da planta mostrando os sintomas típicos da doença, depende diretamente do método de inoculação utilizado (WILBRINK, 1920; NORTH, 1925; ARRUDA, 1944).

O número de métodos de inoculação da bactéria causadora da Escaldadura das folhas da cana-de-açúcar tem-se avolumado com o correr dos anos (KOIKE, 1971), mas inoculações no tolete por injeção, antes do plantio, ou injeção de bactérias na região do palmito foliar são os preferidos para os testes de patogenicidade (WILBRINK, 1920; NORTH, 1925; ARRUDA, 1944). A injeção da bactéria em toletes antes do plantio produz sintomas nas folhas após 90 dias. A injeção da bactéria no palmito foliar propicia avaliações após 10 a 20 dias (MARTIN e ROBINSON, 1961). No entanto, muitas plantas, freqüentemente, deixam de reproduzir os sintomas e conduzem a interpretações errôneas.

PERSLEY (1972), inoculando milho doce com isolados de X. albilineans, conseguiu provar a patogenicidade da bactéria e reproduzir sintomas idênticos aos da doença da cana-de-açúcar, com redução do tempo de observação de sintomas externos.

O corte de folhas com tesoura infestada, utilizado por ROBBS (1962) na inoculação de Pseudomonas solanacearum, e o método de introdução de palito com bactéria no interior da planta, usado por WINSTEAD e KELMAN (1952), aplicados na inocu

lação de X. albilineans não deram resultado positivo, talvez pela rapidez do crescimento das folhas associada à lentidão da multiplicação das células bacterianas. O método da capa de alumínio de KOIKE (1965), que é uma modificação do método de ANTOINE e RICAUD (1961), não deu resultado satisfatório, pois poucas foram as plantas que mostraram sintomas. Dentre os métodos de inoculação experimentados, o método da injeção da bactéria no palmito foi o melhor e o mais eficiente, como mostra a Tabela 6.

O milho doce é sempre mais eficiente na reprodução dos sintomas da bactéria, sendo um suscetível bom indicador da presença da bactéria X. albilineans.

#### 6.4. Local de inoculação de X. albilineans, por injeção no palmito foliar.

Quanto mais próximo do meristema apical a bactéria é injetada, mais precisos são os resultados, qualitativa e quantitativamente. No entanto, a inoculação não deve ser feita junto do meristema apical, ou no próprio meristema, pois o trauma mecânico pode causar sérios danos à planta e os sintomas podem aparecer de modo atípico, ocorrendo a podridão do meristema apical e levando a planta à morte (Tabela 7). A posição ideal para a inoculação no palmito foliar foi a de 5 cm acima do meristema apical (90% das plantas de cana-de-açúcar e 100% das de milho doce mostraram sintomas quando inoculadas nesse local).

Da mesma maneira que EIRA (1972) testou o local do palmito de maior eficiência na reprodução dos sintomas de Fu

sarium moniliformes, procurou-se fazer com a bactéria da Escadadura das folhas a determinação do local exato que desse resultados mais uniformes e positivos. Os experimentos mostram que quanto mais próximo à região de crescimento a bactéria foi colocada, melhores foram os resultados obtidos, concordando com NORTH (1925), que já afirmava que o melhor local de inoculação seria nas áreas e plantas em ativo estado de crescimento, embora sem determinar no palmito foliar o melhor ponto para esta inoculação.

6.5. Avaliação da resistência varietal pela inoculação de células bacterianas de cultura pura de X. albilineans pelo método da injeção no palmito foliar (5 cm acima do meristema apical).

Após a determinação do melhor método de inoculação e da área do palmito mais adequada para o teste, iniciou-se a avaliação da resistência varietal, usando-se variedades suscetíveis e resistentes como padrões para a perfeita avaliação do método de inoculação na seleção de variedades de cana-de-açúcar resistentes a esta bacteriose. Desta forma, variedades resistentes, suscetíveis e intermediárias, assim como algumas consideradas canas nobres, foram selecionadas para os ensaios de verificação da viabilidade do método na qualificação destas variedades.

No primeiro ensaio, com 11 variedades de cana -

de-açúcar, experimentou-se a padronização de inóculo e da idade da planta, na tentativa de, com os padrões internacionais de avaliação de sintomas, averiguar a viabilidade do método na seleção de variedades resistentes (Tabela 8). Algumas variedades tidas como altamente resistentes, como a Co 331 e a POJ 2878, reproduziram os sintomas típicos, mostrando alto grau de suscetibilidade à concentração do inóculo utilizado. Outras, como a CB 45-155 e a CB 56-126, classificadas como suscetíveis, reagiram como resistentes, mostrando sintomas nítidos mas em quantidades mínimas.

RICAUD e PAULO (1970) utilizaram inóculo com 40 e 60% de absorção a 800  $\mu$  sem conseguirem distinguir diferenças nas plantas inoculadas. NORSE (1973), com método original de inoculação por meio do aparelho Panjet, utilizou uma suspensão bacteriana com 50% de absorção a 800  $\mu$ . Num estudo de patogenicidade de diferentes isolados em variedades de cana-de-açúcar, PERSLEY (1973a) utilizou uma concentração de suspensão bacteriana de  $6.10^8$  células por mililitro.

WINSTEAD e KELMAN (1952) concluíram que quantidade de inóculo e resistência de tomateiro a Pseudomonas solanacearum estavam diretamente correlacionados.

Neste estudo, a inoculação de grande quantidade de células bacterianas ( $8.10^8$  células/ml) deve ter influenciado de modo uniforme a suscetibilidade das variedades testadas, não possibilitando uma real qualificação destas variedades, devido ao excesso de bactérias.

Este resultado contraditório, obtido pela avaliação dos sintomas externos, levou-nos à procura de outras formas de avaliação que dessem resultados mais seguros, como a avaliação da colonização do sistema vascular das plantas inoculadas pelo número de feixes vasculares descoloridos. As plantas inoculadas mostraram reações gradativas muito mais nítidas que os sintomas externos. No Havaí, KOIKE (1971) cita que, nas variedades que não mostram sintomas externos após a inoculação, são também examinados os sintomas internos de descoloração dos feixes vasculares.

No ensaio seguinte testaram-se 22 variedades de cana-de-açúcar, incluindo as 11 já experimentadas, todas inoculadas com uma concentração de  $8.10^4$  células/ml. O objetivo visado era o de, reduzindo-se a quantidade de células bacterianas, diminuir a manifestação dos sintomas externos que possivelmente tinham sido causados pelo excesso de inóculo.

RICAUD (1968) afirma que a concentração de bactéria no inóculo natural, comparada à de qualquer inoculação artificial, é baixa.

Usando o critério de descoloração vascular foi possível avaliar a resistência varietal 20 dias após a inoculação das plantas com  $8.10^4$  células/ml. A avaliação de resistência varietal pelos sintomas externos não foi realizada pela ausência desses sintomas em muitas plantas inoculadas, indicando claramente a superioridade dos sintomas internos sobre os externos, desde que não haja interferência de outros fatores.

O nº de feixes vasculares descoloridos e a presença assegurada da bactéria nos feixes vasculares colonizados em cada planta inoculada deu margem a uma análise mais concreta para uma classificação quantitativa da reação de resistência a X. albilineans.

Este sintoma no colmo das plantas infestadas pela X. albilineans é bastante conhecido. WILBRINK (1920), NORTH (1925), ARRUDA (1944), MARTIN e ROBINSON (1961), WISMER (1968) e RICAUD e PAULO (1970) citam que estes sintomas estão sempre presentes nas plantas inoculadas, mesmo que estas não produzam sintomas externos que só se manifestam quando as condições ambientes são muito favoráveis.

RICAUD e PAULO (1970), estudando a viabilidade da bactéria no colmo, encontraram-na em maior quantidade nos feixes vasculares da parte mais basal das plantas inoculadas e afirmam que isto facilita a disseminação da doença pelo fãção de corte.

NORSE (1973), no entanto, admite que os sintomas de descoloração dos feixes vasculares podem ser confundidos com outras enfermidades e não devem ser utilizados na determinação de resistência varietal.

Os sintomas externos são realmente indicações fortes de que uma variedade é suscetível e quanto mais intensos sejam eles, tanto mais suscetível será a variedade, porém, os sintomas de necrose e obstrução dos feixes vasculares indicam facilidade de multiplicação da bactéria e são, aparentemente, mais precisos, pois permitem separar variedades tolerantes à bactéria em questão.

A descoloração vascular pôde estar muito mais correlacionada com a baixa produção da lavoura do que um sintoma externo e sua influência estará sempre presente, mesmo que a planta não manifeste sintomas externamente.

Os inóculos utilizados nestes dois ensaios eram misturas de vários isolados (3 no primeiro e 5 no segundo) que poderiam ter influenciado particularmente a reação de alguma variedade devido à ocorrência de estirpes diferentes, fato referido por vários autores (ANON, 1964; BISESSAR, 1965, KOIKE e ROGERS, 1967; PERSLEY, 1973a). Procurando sanar uma possível causa de erro experimental e confirmar a utilização deste sintoma interno na qualificação de variedades, testaram-se diferentes níveis de inóculo do isolado X 419 na variedade Co 419.

A Tabela 11 enseja a comparação do tamanho das plantas inoculadas com o das testemunhas; todas as plantas inoculadas apresentaram menor crescimento, demonstrando mais uma vez que, mesmo não se manifestando os sintomas externos, os distúrbios fisiológicos internos são capazes de influenciar a produção.

Este ensaio, cujos resultados foram obtidos 90 dias após a inoculação, mostrou que somente uma alta concentração de inóculo ( $8.10^8$  células/ml) pode induzir uniformemente sintomas externos, enquanto que concentrações menores ( $8.10^4$  células/ml) somente induzem sintomas internos.

A quantidade de feixes vasculares descoloridos cresce com o aumento da concentração do inóculo, diferença es

ta não observada por RICAUD e PAULO (1970), quando testaram concentrações diferentes de inóculo e utilizaram os sintomas externos na avaliação do ensaio,

O ponto do colmo a cuja altura os feixes são mais descoloridos e numerosos, devido à colonização da bactéria, localiza-se na parte mais baixa do colmo; estes dados estão de acordo com as observações de RICAUD e PAULO (1970).

Uma vez determinados os fatores que mais interferiam no método de avaliação de resistência varietal pelo número de feixes vasculares descoloridos, realizaram-se dois experimentos (Tabelas 12 e 13), cujos resultados indicaram haver correlação entre os dados da avaliação da resistência varietal pelas sintomatologias externa e interna. As avaliações pela sintomatologia externa foram obtidas em condições de campo e inoculações artificiais em casa de vegetação, enquanto as avaliações pela descoloração vascular, que permitem a separação de plantas resistentes, tolerantes e suscetíveis, foram obtidas em condições de casa de vegetação. Os dados obtidos permitem a suposição de que este último método de avaliação é mais preciso e eficiente pela sua rapidez e diminui a possibilidade de interferência de outras doenças ou fatores do ambiente que interferem na manifestação dos sintomas externos.

A variedade Co 331, tanto no experimento 1 como no experimento 2, foi a variedade que apresentou número menor de feixes vasculares descoloridos e na análise do seu histórico constatamos que ela sempre é tida como uma das variedades



mais resistentes.

As variedades nacionais CB 40-13 e CB 41-76, ambas muito cultivadas em todo o Brasil, apresentaram grande número de feixes vasculares descoloridos em relação à Co 331 e são variedades tidas como mais suscetíveis.

A utilização de cultura pura da bactéria possibilitou a padronização da concentração do inóculo com  $8.10^5$  células/ml e foi possível avaliar-se a resistência varietal pela descoloração vascular na metade do tempo normalmente usado para avaliações pelos sintomas das folhas. A altura do ponto do colmo em que a contagem do número de feixes vasculares descoloridos foi realizada mostrou que as diferenças entre uma e outra planta não interferiu significativamente, pois o coeficiente de variação tanto no experimento 1 como no 2, foi médio.

A análise global dos resultados de avaliação de resistência varietal pela descoloração vascular ainda não nos autoriza a dizer que o método ora proposto permita sua utilização em larga escala. Ela permite, no entanto, dizer que o método retrata com maior veracidade a extensão da colonização da planta pela X. albilineans e possibilita maior precisão de seleção sobre as plantas tolerantes ao agente patogênico e até mesmo a sua eliminação. A eliminação de plantas tolerantes já não é possível se utilizarmos só a sintomatologia das folhas.

É conveniente ressaltar que no método de avaliação em estudo a precisão experimental tende a ser maior devido às seguintes variáveis controladas total ou parcialmente:

- a. colmos-sementes tratados termicamente e possivelmente livres de outras bactérias;
- b. idade e tamanho das plantas padronizadas;
- c. ambiente da casa de vegetação com temperatura e umidade do solo parcialmente controladas;
- d. inoculação com culturas puras da bactéria;
- e. concentração de bactéria controlada;
- f. estirpe de bactéria constante;
- g. local de inoculação pré-determinado;
- h. época de avaliação constante.

Acredita-se que, com o controle das variáveis enumeradas, se evitou a interferência de outros agentes patogênicos que podem também causar descoloração vascular, tais como: a) agente do Raquitismo das Soqueiras; b) agente do "Chlorotic Streak"; c) Fusarium moniliformes; d) Colletotrichum falcatum; e) bactérias da microflora vascular, habitantes normais das plantas (TOKESHI et alii, 1974).

Cabe, no entanto, lembrar que o método de avaliação de resistência varietal pela descoloração vascular, apesar de ser mais eficiente que a avaliação pelos sintomas externos, é mais difícil de ser aplicado na atual fase de desenvolvimento de todas as instituições encarregadas de efetuar pesquisas em cana-de-açúcar no país.

A persistência da avaliação de resistência varietal pelos sintomas externos é um dos fatores mais importan

tes para a disseminação da bactéria a novas áreas do país através dos colmos tolerantes à bactéria.

6.6. Estudos de sobrevivência da X. albilineans in vitro e in vivo.

Estes ensaios foram realizados para elucidar um fato observado quando do isolamento da bactéria de partes afetadas. O fato é que, quando colmos ou folhas com sintomas de Escaldadura eram conservados em congelador, mesmo que por vários dias, a operação do isolamento da bactéria tornava-se mais fácil.

Submetendo-se, então, folhas frescas com sintomas característicos da doença, assim como suspensões aquosas de bactérias, à temperatura de congelador de -15,0°C, chegou-se aos resultados mostrados nas Tabelas 14 e 15: em folhas frescas congeladas a -15,0°C a bactéria permaneceu viável e patogênica permitindo isolamentos até 365 dias de armazenamento, e em suspensão aquosa, as células bacterianas permaneceram viáveis até 182 dias.

Na literatura consultada sobre X. albilineans não foi encontrado nenhum trabalho referente ao assunto, para comparação. Acreditamos serem estes os primeiros dados sobre armazenamento da bactéria em material fresco ou cultura congelada.

TOKESHI et alii (1974) consideraram estes fatos muito concordantes com os da sobrevivência do agente causador

do Raquitismo das Soqueiras na cana-de-açúcar e comparáveis aos resultados obtidos por MATSUOKA (1972).

Em cana-de-açúcar com sintomas típicos de Escaldadura das folhas ocorre a necrose prematura da folha seguida de seu secamento. Os restos de cultura, que são muitas vezes reincorporados ao solo, ou simplesmente nele abandonados, constituem uma das vias mais conhecidas de disseminação e sobrevivência de agentes patogênicos.

O ensaio foi realizado com o objetivo de determinar por quanto tempo após o secamento das folhas as bactérias permaneceriam viáveis.

O resultado de laboratório não pode ser diretamente extrapolado para as condições de campo, porém indicam uma fonte de disseminação de X. albilineans, pois esta pode permanecer viva até 20 dias em folhas secas.

GOTO (1972) conseguiu sobrevivência X. citri até 3 anos após a inoculação em tecido corticoso de troncos de árvores de citrus de vinte anos de idade. ROBBS e DESLANDES (1972), no Brasil, conseguiram sobrevivência também da X. citri durante 8 meses em lesões e folhas secas de citrus, conservadas em ambiente de laboratório.

O ensaio de sobrevivência em solo estéril foi realizado com um único isolado X 419, que permaneceu viável por 15 dias. Este resultado não pode ser comparado com sobrevivência em condições de campo ou mesmo em solos conservados em casa de vegetação, pois de acordo com os resultados que GOTO (1970) obteve, Xanthomonas citri foi capaz de sobreviver em so

lo conservado em casa de vegetação durante 3 meses e, neste mesmo solo, quando conservado fora da casa de vegetação, sua sobrevivência duplicou. O mesmo pode ocorrer também com esta bactéria. GOTO julga que, provavelmente, o tempo rigoroso (frio do inverno) fora da casa de vegetação, eliminando os microrganismos concorrentes existentes no solo, a deva ter auxiliado nesse desempenho.

As técnicas de constatação da X. albilineans em solos contaminados ainda é uma incógnita, ou pela ineficiência dos processos utilizados na bacteriologia, ou devido ao desconhecimento de certos fatores intrínsecos da bactéria.

GOTO (1971) fez um levantamento de várias outras bactérias patogênicas em plantas cultivadas, comprovando sobrevivência bastante prolongada destas em solo natural. PERSLEY (1973c) assegura que X. albilineans tem capacidade de sobreviver por poucos dias no solo. Em outro trabalho (PERSLEY, 1971) cita a capacidade desta de sobreviver por apenas dois dias, concordando com as observações de HUCHINSON e ROBERTSON (1953).

Este resultado de laboratório pode explicar a capacidade de disseminação da bactéria pelo solo. HUGHES (1969) cita que a água de lixiviação pode deslocar, no solo, inóculos de plantas doentes até plantas saudáveis.

A utilização dos roletes de aço deu ótimo resultado, pois procuramos substituir a lâmina de facão por um produto basicamente semelhante ao utilizado na confecção de facões. Os roletes infestados, conservados à temperatura de 28°C

em câmara de incubação, revelaram a sobrevivência da bactéria até o 6º dia, comprovando a real eficiência do facão na transmissão de planta a planta, momentaneamente, como é apontada por todos os estudiosos da X. albilineans; o facão utilizado na colheita é, pois, o grande transmissor de planta a planta.

ANTOINE e RICAUD (1961) e RICAUD e PAULO (1970) apontam a base do colmo como sendo a região de maior concentração da bactéria, facilitando assim a aderência das células bacterianas ao facão.

WILBRINK (1920) e NORTH (1925) comprovaram a fácil transmissão da bactéria de colmo a colmo pelo facão infestado. ARRUDA (1944) observou que, no campo, quando uma touceira doente está presente é comum as subseqüentes da mesma linha também adquirirem a doença após o corte pelo facão, na colheita.

No entanto, em nenhum destes trabalhos encontramos referências sobre a sobrevivência da bactéria no facão, onde ela pode permanecer perfeitamente viável por mais de seis dias, possibilitando a disseminação também a longa distância.

Com a obtenção de vários isolados da bactéria X. albilineans e, principalmente de um denominado X RSD foi possível determinar a temperatura de inativação destes isolados. Da análise destes resultados (Tabela 19) pôde-se separar os isolados testados em três grupos: a) X 419 e X 980, inativação parcial a 50,0°C b) X 45 e X 421, inativação total a 52,0°C; c) X RSD inativação parcial a 54,0°C.

Experimentando com suspensão em caldo de cana-

de-açúcar, MUNGOMERY e HUGHES (1960), concluíram que esta bactéria pode ser inativada completamente à temperatura de 50,0°C, quando exposta durante 20 a 30 minutos.

STEINDL (1971) testou o tratamento, também à temperatura de 50,0°C, de suspensões de cultura pura e caldo de colmos doentes e concluiu que nenhuma bactéria cresceu em cultura após o tratamento durante 40 minutos.

Os isolados do grupo a, parecem ter comportamento semelhante ao que MUNGOMERY e HUGHES (1960) testaram e os do grupo b, têm ligação com a temperatura de inativação de STEINDL (1971).

No entanto, o isolado X.RSD, que suportou a temperatura de 54,0°C durante 15 minutos, só sendo inativado totalmente a 56,0°C, indica a presença de uma estirpe extremamente termorresistente.

O colmo da cana-de-açúcar afetada é o principal agente de disseminação da bactéria X. albilineans em todo o mundo.

No Brasil, esta doença, segundo ARRUDA (1944), deve ter chegado em colmos doentes de variedades australianas. A variedade Badila, segundo NORTH (1925), foi uma grande disseminadora da bactéria por ser altamente tolerante, fazendo passar despercebida a doença, sendo o veículo de introdução da bacteriose em todas as regiões australianas.

ARRUDA (1944), tratando colmos sementes portadores de X. albilineans pela imersão em água quente a 52,0°C por

20 minutos, como o utilizado por MARTIN et alii (1932), concluiu pela ineficiência do tratamento para a erradicação da bactéria.

Outros tratamentos semelhantes, com variações da temperatura, foram já experimentados (MUNGOMERY e HUGHES, 1960; STEINDL, 1967; HUGHES et alii, 1967; SHEFFIELD, 1969; STEINDL, 1971), usando temperaturas acima de 50,0°C e tempo de imersão variando de 20 minutos a 3 horas.

MUNGOMERY e HUGHES (1960) observaram, no entanto, que o tratamento dos colmos à temperatura de 50,0°C durante 3 horas não era suficiente para eliminar a bactéria.

STEINDL (1971) preconiza um bom tratamento em que os colmos sementes afetados são submetidos a uma imersão prévia em água fria durante 24 horas e em seguida a um tratamento em água quente a 50,0°C durante 3 horas.

No Brasil, a termoterapia efetuada com água aquecida a 50,5°C durante 2 horas dá ótimos resultados no controle do Raquitismo das Soqueiras (RSD) da cana-de-açúcar.

Estes tratamentos, com variações da temperatura e do tempo de exposição, são hoje ainda utilizados de modos diversos nos países onde se cultiva a cana-de-açúcar. Em cada país, a utilização de uma ou outra variante é recomendada.

STEINDL (1971) observa que o tratamento térmico realmente não é capaz de inativar totalmente a bactéria no colmo e que há uma sobra de células bacterianas atenuadas que muitas vezes não pode nem ser isolada em cultura pura, indicando



que pode haver a real possibilidade de seleções de estirpes mais ou menos resistentes ao fator temperatura.

Como esta prática de tratamento térmico de colmos sementes é de uso rotineiro, há fortes indicações de ter este processo selecionado e ainda estar selecionando estirpes termorresistentes.

A patogenicidade das culturas obtidas após o tratamento térmico não foi comprovada em inoculação em suscetível sadio; no entanto, STEINDL (1971) observa que a volta desta forma atenuada a uma forma virulenta depende ainda de estudos futuros.

## 7. CONCLUSÕES

Dos resultados dos testes e experimentos efetuados foram obtidas as seguintes conclusões:

1. A inoculação de cultura pura de X. albilineans, em concentração determinada, a 5 cm acima do meristema apical e a avaliação dos sintomas internos pela quantificação dos feixes vasculares descoloridos permite a separação de variedades resistentes, tolerantes e suscetíveis.

2. A concentração de células bacterianas no inóculo de X. albilineans interfere na avaliação da resistência varietal.

3. A injeção de X. albilineans a 5 cm acima do meristema apical das plantas, em concentração de  $8.10^8$  células/ml induz sintomas externos mesmo em variedades tidas como altamente resistentes.

4. Na concentração de inóculo de  $8.10^5$  células/ml de X. albilineans, nas condições do experimento, a coloniza

ção dos feixes vasculares são observáveis uniformemente em todas as variedades suscetíveis e possibilita avaliação quantitativa da resistência da variedade a níveis comparáveis aos obtidos em condições de campo.

5. A avaliação dos feixes vasculares descoloridos é mais fácil na base do colmo independente da quantidade de células bacterianas inoculadas.

6. A variedade de cana-de-açúcar Co 331 foi a variedade mais resistente a X. albilineans, quando avaliada pelos sintomas externos e internos.

7. O "Método pipeta" de isolamento direto da bactéria X. albilineans proporciona isolamento com grande facilidade. Proporciona também obtenção de culturas puras tanto de materiais doentes de folhas com pequenas estrias como das grandes necroses, assim como dos feixes vasculares de colmos infectados.

8. O desenvolvimento do meio de cultura W-2 proporcionou isolamentos da bactéria X. albilineans com melhor crescimento e com menor tempo de incubação.

9. É possível armazenar inóculo de X. albilineans em água e nas folhas por longos períodos a - 15,0°C.

10. O facão de corte utilizado na colheita da cana-de-açúcar não só transmite a bactéria de planta a planta como também possibilita com sua prolongada viabilidade (6 dias) disseminar a bactéria a longa distância. Os restos de cultura

podem também contribuir para isto.

11. A X. albilineans apresenta estirpes com diferentes pontos de inativação térmica.

## 8. SUMMARY

The agent of sugarcane leaf scald disease Xanthomonas albilineans (Ashby) Dowson, was isolated in pure culture and inoculated in 24 varieties that were susceptible, tolerant, intermediate and resistant to the disease. Three culture media and different methods of isolation were evaluated to determine those most suitable for the isolation and growth of the bacterium.

In tests for pathogenicity, injection of the bacteria into the spindle of the sugarcane plant gave the best results of the inoculation methods tested. This procedure was improved by determining the best point of spindle inoculation and the concentration of the bacteria necessary to produce external symptoms and vascular discoloration. It was shown that the vascular discoloration was the most constant symptom and gives more accuracy in the selection of resistant varieties.

In vitro and in vivo studies on bacterial survival showed that bacteria frozen in water at  $-15,0^{\circ}\text{C}$  can survive for 182 days and in frozen diseased leaves for 365 days. Survival in dry leaves for 20 days, sterile soil for 15 days and blades of harvesting knives during 6 days was determined. The implications of this in epiphytotics is discussed.

Tests were carried out to determine the thermal inactivation of 5 isolates of the bacteria, in hot water. A variation between  $52,0$  and  $56,0^{\circ}\text{C}$  was demonstrated. The results indicate the possibility of the bacteria surviving the extended hot water treatment used generally for the control of RSD.

## 9. LITERATURA CITADA

- ANÔNIMO; 1964. Leaf scald disease in Argentina, La Ind. Azucar (853):427-428.
- ANTOINE, R. e C. RICAUD, 1961. Cane diseases: a method for inoculating leaf scald in field trials. Mauritius Sugar Ind. Res. Inst., Ann. Report, p. 55-56.
- ARRUDA, S.C., 1944. A escaldadura das folhas, doença da cana-de-açúcar nova no Brasil. Arq. Inst. Biológico, São Paulo 15(12):141-199.
- BAUDIN, P., 1963. Le leaf scald a Madagascar. Agron. Trop. p. 576-588.
- BELL, A.F., 1935. Two inoculation methods. Proc. Int. Soc. Sugarcane Tech., 5:199-200.
- BELL, A.F. e W. CONTRELL-DORMER, 1932. An improved method for isolation of leaf scald organism. Proc. Int. Soc. Sugarcane Tech., 4:72-80.

- BISESSAR, S., 1965. Varietal resistance of sugarcane to leaf scald disease in British Guyana. Sug. Bull. Min., 33:57-61.
- BISESSAR, S., 1970. Grading sugarcane varieties for resistance to leaf scald in Guyana: Sugarcane Pathologists Newsletter, 4:38.
- BRIEGER, F.O., 1970. Diseases and varieties. Sugarcane Pathologists Newsletter, 4:26.
- BUKHOLDER, W.H. e M.P. STARR, 1948. The generic and specific characters of phytopathogenic species of Pseudomonas and Xanthomonas. Phytopathology, 38:494-502.
- CARVALHO, P.C.T., 1963. Doenças do colmo da cana-de-açúcar. Doenças das folhas da cana-de-açúcar. Curso de especialização - pós-graduação. Dept. Fitopatologia ESALQ, Piracicaba, S.P., p.23-58.
- CARVALHO, P.C.T., A. TAKATSU, O. BRINHOLI, I.J.A. RIBEIRO e H. SUGETA, 1968. Doenças na cana-de-açúcar. Bol. Informat. Cooperest. São Paulo, 11:4-12.
- CONTRELL-DORMER, W., 1925. Cane pests and diseases. Queensland Agric. J., 5:441-443. §
- CONTRELL-DORMER, W., 1935. The variability of plant pathogens, Proc. Int. Soc. Sugarcane Tech., p. 712-713.
- DANTAS, B., 1958. A escaldadura das folhas da cana-de-açúcar. Comiss. Combate às Pragas da Cana-de-açúcar no Estado de Pernambuco, nº 7 (set).



- DANTAS, B., 1970. Moléstias da cana-de-açúcar no Nordeste. Ciência e Cultura, 22(4):392-399.
- DEAN, J.L., 1974. A method for isolating Xanthomonas albilineans from sugarcane leaves. Plant Dis. Reporter, 58:439-441.
- DOWSON, W.J., 1943. On the generic names Pseudomonas, Xanthomonas and Bacterium for certain bacterial plant pathogens. Trans. Brit. Mycol. Soc., 26:4-14.
- DYE, D.W., 1962. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of Xanthomonas spp. New Zel. J. Sci. 5:393-416.
- DYE, D.W., 1966. A comparative study of some atypical Xanthomonads. New Zel. J. Sci., 9(4):843-854.
- DYE, D.W. e R.A. LELLIOT, 1974. Genus II - Xanthomonas Dowson 1939, 187 - in Bergey's manual of determinative Bacteriology, 8th. ed., p. 243-249.
- EGAN, B.T., 1958. Leaf scald resistance trial in North Queensland. Cane Cr. Quart. Bull., 21(4):129-130.
- EGAN, B.T., 1968. Evaluation of the aluminum-cap method for leaf scald disease resistance testing in Queensland. Proc. Int. Soc. Sugarcane Tech., p. 1153-1158.
- EGAN, B.T., 1969. Leaf scald strains: a good subject for international cooperation. Sugarcane Pathologists Newsletter, 3: 12.
- EGAN, B.T., 1971a. Leaf scald disease-introduction. Proc. Int.

- Soc. Sugarcane Tech.(XIV Congr.), p. 906-931.
- EGAN, B.T., 1971b. Breeding for resistance to leaf scald disease. Proc. Int. Soc. Sugarcane Tech.(XIV Congr.), p. 920-924.
- EGAN, B.T., 1971c. The decline of leaf scald as a major disease in Northern Queensland. Proc. 38th. Conf. Queensland Soc. Sugarcane Tech., 157-161.
- EIRA, A.F., 1972. Fatores que influem na triagem das variedades de cana-de-açúcar (Saccharum spp.) ao Fusarium moniliformes Sheldon, agente causal de "Pokkah Boeng". Tese Doutor em Sciences Fac. Cienc. Med. e Biol. de Botucatu, S.P. 51 p.
- GOODMAN, R.N., 1967. Proceedings of the First Workshop on Phyto bacteriology. University of Missouri. Columbia 71 p.
- GOTO, M., 1970. Studies on citrus canker disease III- Survival of Xanthomonas citri (Hasse) Dowson in soils and on the surface of weeds. Bull. Fac. of Agric., Shizuoka Univ. 20:21-29.
- GOTO, M., 1971. The significance of vegetation for the survival of plant pathogenic bacteria. Proc. 3rd. Inst. Conf. on Plant Pathog. Bact. Wageningen (April):39-53.
- GOTO, M., 1972. Survival of Xanthomonas citri in the bark tissues of citrus trees. Can. J. Botany, 30(12)2629-2635.
- HUGH, R. e E. LEIFSON, 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. J. Bact., 66:24-26.
- HUGHES, C.G., 1969. Transmission of leaf scald by soil leachate. Sugarcane Pathologists Newsletter, 1:27-28.

- HUGHES, C.G., D.R.L. STEINDL e B.T. EGAN, 1967. Division of Pathology leaf scald (Xanthomonas albilineans (Ashby) Dowson. Rep. Bur. Sug. Expt. Sta. Qd., 67:54-57.
- HUTCHINSON, P.B., 1968. A note on Disease resistance ratings for sugarcane varieties. Proc. Int. Soc. Sugarcane. Tech. (13):1087-1089.
- HUTCHINSON, P.B. & J.R. ROBERTSON, 1953. Leaf scald in British Guiana, Proc. Int. Soc. Sugarcane Tech. (8th Congr.) p.877-883.
- KOIKE, H., 1965. The aluminum-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. Phytopathology, 55:317-319.
- KOIKE, H., 1971. Testing sugarcane varieties for leaf scald disease resistance. Proc. Int. Soc. Sugarcane Tech. p. 909-919.
- KOIKE, H., W.E. ROGERS, 1967. Pathogenicity studies with isolates from sugarcane infected with leaf scald disease. Plant Dis. Reporter, 51(6):491-492.
- LEIFSON, E., 1960. Atlas of bacterial flagellation. Acad. Press. N.Y. and London, 171 p.
- MARTIN, J.P. e G.W. CARPENTER, 1935. Testing cane varieties for disease resistance in Hawaii. Proc. Int. Soc. Sugarcane Tech., 5:519-521.
- MARTIN, J.P. e P.E. ROBINSON, 1961. Leaf scald. In: MARTIN, J.P., E.V. ABBOTT & C.G. HUGHES. Sugarcane disease of the world.

- Chap III, Elsevier Publ. Co. N.Y., p. 79-107.
- MARTIN, J.P., C.W. CARPENTER e D.M. WELLE, 1932. Leaf scald disease of sugar cane in Hawaii. The Hawaii Planters Rec. 36: 145-196.
- MATSUOKA, S., 1972. Raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar : diagnose e estudos sobre o seu agente causal. Tese de Doutorado. ESALQ, Piracicaba, S.P., 77 p.
- MUNGOMERY, R.W. e G.C. HUGHES, 1960. Reports of the Division of Entomology and Pathology Disease Investigations. Rep. Bur. Sug. Exp. Stn. Qd., 60:66-90.
- NORSE, D., 1973. A quantitative inoculation technique for screening sugarcane varieties for resistance to leaf scald. Plant Dis. Report, 57:582-583.
- NORTH, D.S., 1925. Leaf scald, a bacterial disease of sugarcane. Colonial Sugar Refining Co. Ltd., Agr. Rept, 8 (Technical) Sydney, NSW. (§)
- NORTH, D.S. e H.A. LEE, 1924. JAVA gum disease identical to leaf scald of Australia. Phytopathology, 14:585.
- ORIAN, G., 1962. A disease of Paspalum dilatatum in Mauritius caused by a species of bacterium closely resembling Xanthomonas albilineans (Ashby) Dowson. Rev. Agric. Sucr. Maurice 41(1):7-24.
- PANAGOPOULOS, C.G., 1969. The disease "Tsilik Marasi" of Grapevine its description and identification of the causal agent

- (Xanthomonas ampelina sp nov.) Ann. Inst. Phytop. Benaki, N.S.,9(1):26.
- PERSLEY, G.J., 1971. A progress report on leaf scald investigations. Proc. 38th Cong. Queensland Soc. Sugarcane Tech., p. 163-168.
- PERSLEY, G.J., 1972. Isolation methods for the causal agent of leaf scald disease. Sugarcane Pathologists Newsletter 8:24.
- PERSLEY, G.J., 1973a. Pathogenic variation in Xanthomonas albilineans (Ashby) Dowson, the causal agent of leaf scald disease. Aust. J. Biol. Sci., 26:786-787.
- PERSLEY, G.J., 1973b. Epiphytology of leaf scald in the central district of Queensland. Sugarcane Pathologists Newsletter, 10:30-31.
- PERSLEY, G.J., 1973c. Naturally occurring alternative hosts of Xanthomonas albilineans in Queensland. Plant. Dis. Report. 57(12):1040-1042.
- PLANALSUCAR, 1972. Relatório Anual do Inst. Açúcar e Alcool. Estações Experimentais. Brasil, 32 p.
- PLANALSUCAR, 1977. Reações das variedades às doenças. Relatório da Seção de Fitopatologia (março)., 12 p.
- RICAUD, C., 1965. Leaf scald. Maurit. Sug. Ind. Res. Inst., Ann. Report., p. 76-78.
- RICAUD, C., 1968. Leaf scald. Maurit. Sug. Ind. Res. Inst.,

- Ann. Report, p. 55-57.
- RICAUD, C. e M.E. PAULO, 1970. Leaf scald. Maurit. Sug. Ind. Res. Inst. Ann. Report., p. 87-92.
- ROBBS, C.F., 1962. Descrição de um método prático para constatação de Pseudomonas solanacearum (Smith) em tubérculos suspeitos de batatinha (Solanum tuberosum L.) Revista Olericultura, 2:146-149.
- ROBBS, C.F., 1966. Alguns métodos rápidos para a identificação de bactérias patogênicas em batata-semente. Revista Agronômica, 24:33-39.
- ROBBS, C.F. e J.A. DESLANDES, 1972. Viabilidade de Xanthomonas citri (Hasse) em folhas de citros nas condições de laboratório. Revista Agronomia, 30:27-32.
- ROBINSON, P.E., 1962. Appraisal of some cane disease control measures. Proc. Int. Soc. Sugarcane. Tech., p. 728-735.
- SHEFFIELD, F.M.L., 1969. Leaf scald again. Sugarcane Pathologists Newsletter (3):10.
- SILVA, W.M., 1974. Produção de "seedlings" de cana-de-açúcar pelo beneficiamento do "fuzz" e transplante precoce. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, para obtenção do grau de "Magister Scientiae", 34 p.
- STARR, M.P., 1946. The nutrition of phytopathogenic bacteria. Minimal requirements of the genus Xanthomonas. J. Bact., 51: 131-143.

- STEINDL, D.R.L., 1965. Testing sugarcane varieties for disease resistance at the Bureau Pathology Farm Queensland. Proc. Int. Soc. Sugarcane Tech. p.1133-1137.
- STEINDL, D.R.L., 1967. Investigations into the control of leaf scald by sett treatment. Cane Growers Quart. Bull. 31(2) : 59-60.
- STEINDL, D.R.L., 1971. The elimination of leaf scald from infected planting material. Proc. Int. Soc. Sugarcane Congr. Tech., p. 925-929.
- TOKESKI, H., A. SANGUINO e F. AKIBA, 1974. Xanthomonas albilineans, provável agente causal de raquitismo da soqueira e escaldadura de cana-de-açúcar. Brasil, Açucareiro, 6:564-576.
- WIEHE, P.O., 1961. Leaf scald and chlorotic streak, two sugarcane diseases occurring in British Guiana. Lect. Brit. Guia. Sug. Prod. Ass., p. 27-33. (§)
- WILBRINK, G., 1920. De Gomziekte van net sui kerrit, hare oorzaak em hare Bestrijding. Arch. Suikerindus Ned. Indie 28: 1389-1525.(§)
- WINSTEAD, N.M. e A. KELMAN, 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to Pseudomonas solanacearum. Phytopathology, 42(11):628-634.
- WISMER, C.A., 1968. Resistant varieties can harbor bacteria that cause leaf scald disease. Expt. Sta. Hawaii an Sugar Planters. Assoc., Ann. Rept., p. 68-70.

---

Obs.: Os trabalhos assinalados com (§) não foram consultados no original.

## APÊNDICES



Apêndice 1. Dados da Tabela 12, transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$  para fins de análise estatística.

Variedades	Repe- ti- ções	Número de feixes vasculares descoloridos						Totais	Médias
		Por planta da parcela							
		1 <sup>a</sup> .pl.	2 <sup>a</sup> .Pl.	3 <sup>a</sup> .pl.	4 <sup>a</sup> .pl.	5 <sup>a</sup> .pl.	6 <sup>a</sup> .pl.		
CB 45 155	1 <sup>a</sup>	1,225	2,121	1,581	2,550	1,225	0,707	9,409	1,568
	2 <sup>a</sup>	1,225	1,225	0,707	2,915	1,581	1,225	8,878	1,480
	3 <sup>a</sup>	0,707	0,707	0,707	1,225	1,581	1,225	6,152	1,025
	4 <sup>a</sup>	1,225	1,581	1,581	1,871	1,225	1,581	9,064	1,511
	5 <sup>a</sup>	2,121	2,345	1,581	0,707	1,581	1,225	9,560	1,593
Cb 331	1 <sup>a</sup>	0,707	0,707	0,707	1,225	0,707	0,707	4,760	0,793
	2 <sup>a</sup>	0,707	1,225	0,707	1,581	0,707	0,707	5,634	0,939
	3 <sup>a</sup>	0,707	0,707	0,707	1,581	0,707	0,707	5,116	0,853
	4 <sup>a</sup>	1,225	0,707	0,707	0,707	0,707	1,225	5,278	0,880
	5 <sup>a</sup>	1,225	0,707	0,707	2,345	0,707	0,707	6,398	1,066
Co 421	1 <sup>a</sup>	0,707	1,225	1,225	0,707	1,225	1,871	6,960	1,160
	2 <sup>a</sup>	0,707	0,707	0,707	1,225	1,225	1,225	5,796	0,966
	3 <sup>a</sup>	1,871	1,225	1,581	0,707	0,707	0,707	6,798	1,133
	4 <sup>a</sup>	2,121	0,707	1,581	0,707	1,581	0,707	7,404	1,234
	5 <sup>a</sup>	0,707	0,707	1,225	0,707	1,581	1,581	6,508	1,085
H 50 7209	1 <sup>a</sup>	1,225	2,739	1,225	2,739	0,707	1,581	10,216	1,703
	2 <sup>a</sup>	0,707	2,121	1,225	1,225	0,707	0,707	6,692	1,115
	3 <sup>a</sup>	0,707	1,225	1,225	0,707	1,581	1,225	6,670	1,112
	4 <sup>a</sup>	1,581	1,225	1,871	0,707	1,225	1,225	7,834	1,306
	5 <sup>a</sup>	1,581	0,707	1,581	0,707	1,225	1,225	7,026	1,171

# Análise de Variância

FV	GL	SQ	QM	F
Total	24	2,033		
Tratamento	4	0,917	0,229	4,089*
Resíduo	20	1,116	0.056	

$$C = 51,492$$

$$CV = 16,52\%$$

$$\text{Tukey } \bar{\alpha} \text{ 5\%} = (\Delta = 0,449)$$

## Médias

$\bar{X}$ CB 41-76	= 1.667	
$\bar{X}$ CB 40-13	= 1.561	
$\bar{X}$ CB 4069	= 1.481	
$\bar{X}$ CB 4077	= 1.356	
$\bar{X}$ Co 331	= 1.111	

Apêndice 2. Dados da Tabela 13, transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$  para fins de análise estatística.

Variedades	Repetições	Número de feixes vasculares descoloridos						Totais	Médias
		Por planta da parcela							
		1. <sup>a</sup> pl.	2. <sup>a</sup> pl.	3. <sup>a</sup> pl.	4. <sup>a</sup> pl.	5. <sup>a</sup> pl.	6. <sup>a</sup> pl.		
CB 40 13	1. <sup>a</sup>	1,871	1,871	2,345	1,581	1,871	0,707	10,246	1,708
	2. <sup>a</sup>	1,225	1,871	1,871	1,581	1,225	2,915	10,688	1,781
	3. <sup>a</sup>	0,707	1,581	1,581	1,225	1,707	1,581	7,382	1,230
	4. <sup>a</sup>	2,121	3,082	2,121	0,707	1,871	0,707	10,609	1,768
	5. <sup>a</sup>	1,225	0,707	0,707	1,581	1,581	2,121	7,922	1,320
CB 40 69	1. <sup>a</sup>	0,707	1,581	0,707	2,915	1,871	1,871	9,652	1,609
	2. <sup>a</sup>	1,581	1,871	0,707	0,707	1,225	1,225	7,316	1,219
	3. <sup>a</sup>	1,871	2,121	0,707	1,581	0,707	1,225	8,212	1,369
	4. <sup>a</sup>	2,550	0,707	2,345	1,225	0,707	1,871	9,405	1,568
	5. <sup>a</sup>	1,581	1,581	2,121	1,225	2,121	1,225	9,854	1,642
CB 40 77	1. <sup>a</sup>	1,225	1,871	0,707	1,581	2,550	0,707	8,641	1,440
	2. <sup>a</sup>	1,871	0,707	0,707	1,581	1,581	0,707	7,154	1,192
	3. <sup>a</sup>	1,225	1,871	1,581	1,871	1,581	1,225	9,354	1,559
	4. <sup>a</sup>	1,225	1,581	0,707	1,581	0,707	0,707	6,508	1,085
	5. <sup>a</sup>	1,225	1,581	1,581	0,707	2,345	1,581	9,020	1,503
CB 41 76	1. <sup>a</sup>	3,240	2,121	2,345	1,225	1,581	0,707	11,219	1,870
	2. <sup>a</sup>	2,915	2,121	0,707	1,225	1,581	1,225	9,774	1,629
	3. <sup>a</sup>	0,707	1,871	1,581	2,915	1,225	1,871	10,170	1,695
	4. <sup>a</sup>	1,581	0,707	0,707	0,707	1,871	1,225	6,798	1,133
	5. <sup>a</sup>	2,121	0,707	2,550	1,871	1,871	2,915	12,035	2,006
Co 331	1. <sup>a</sup>	0,707	1,225	1,225	0,707	1,871	0,707	6,442	1,074
	2. <sup>a</sup>	1,871	1,225	0,707	1,225	1,871	0,707	7,606	1,268
	3. <sup>a</sup>	1,225	1,225	0,707	0,707	0,707	0,707	5,278	0,880
	4. <sup>a</sup>	1,225	0,707	1,581	1,225	0,707	1,225	6,670	1,112
	5. <sup>a</sup>	0,707	0,707	1,581	1,225	1,871	1,225	7,316	1,219

Análise de variância.

FV	GL	SQ	QM	F
Total	19	1,322		
Tratamento	3	0,773	0,258	7,588*
Resíduo	16	0,549	0,034	

$C = 28,068$ ;  $CV = 15,53\%$  - Tukey a 5% = = 0,333

Tukey a 1% = = 0,427

Médias:  $\bar{X}$  CB 45.155 = 1.435      5%      1%

$\bar{X}$  H 50.7209 = 1.281

$\bar{X}$  Co 421 = 1.116

$\bar{X}$  Co 331 = 0,906