

MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E ÉPOCA DE AVALIAÇÃO PARA *Pseudomonas rubrisubalbicans*, AGENTE DA ESTRIA MOSQUEADA DA CANA-DE-AÇÚCAR*

ROSA DE LIMA RAMOS MARIANO

Prof. Adjunto do Depto. de Agronomia da UFRPE.
Bolsista do CNPq.

WANG SENG LANG

Técnico da Estação Experimental de Carpina.

Pseudomonas rubrisubalbicans foi isolada de planta de cana-de-açúcar apresentando sintomas de estria mosqueada, coleta na Usina Pumati, município de Palmares-PE. Após caracterização do isolado, foi o mesmo mantido em meio agar nutritivo-extrato de levedura-dextrose, até a utilização para testes de inoculação. Plantas de cana-de-açúcar de variedade P4362, com 60 dias de idade, foram inoculadas utilizando-se cinco métodos: (1) pulverização com suspensão bacteriana nas folhas, acompanhada de pré e pós tratamento em câmara úmida, por 48 horas cada, (2) riscas com agulha molhada na suspensão, na superfície das folhas +1 e +2, (3) deposição de 0,5 ml da suspensão em orifício feito com furador de rolha, (4) injeção de 0,5 ml da suspensão e (5) picadas com agulhas molhadas na suspensão. Nos três últimos métodos a suspensão foi inoculada no palmito, 5 cm abaixo do primeiro colar ("dewlap") visível. As avaliações foram feitas 6, 13, 20 e 27 dias após a inoculação, atribuindo-se notas de 1 a 7, através de escala estabelecida pelos autores. De acordo com o teste de Tukey a 1%, o melhor método para inoculação foi o de riscas, embora sem diferença significativa para o de picadas, deposição e injeção. As melhores épocas para avaliação foram 20 e 27 dias, sem diferenças significativas entre elas.

INTRODUÇÃO

A estria mosqueada da cana-de-açúcar (*Saccharum L.*) causada por *Pseudomonas rubrisubalbicans* (Christopher & Edgerton) Krasil'nikov foi assinalada pela primeira vez em Louisiana (USA) por Christopher e Edgerton em 1927, sendo, posteriormente, registrada em 16 países produtores de açúcar (Steindl e Edgerton, 1964).

* Trabalho apresentado no XXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Recife, 1989.

No Brasil, a bactéria foi encontrada em cana-de-açúcar no Estado de Pernambuco (Tokeshi, 1980; Mariano et al. 1987; Mariano, Cabral e Silva, 1988; Mariano, Melo e Holanda, 1989; Mariano e Wang, 1989) e constatada também em guaranazeiros (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.), nos Estados da Bahia e Amazonas (Robbs e Kimura, 1977).

A doença é caracterizada por estrias de cor creme clara com a presença de algumas estrias avermelhadas e amarelo-esbranquiçadas, descontínuas, sendo que, de modo geral, a cor vermelha é predominante. As estrias medem de 1 a 4 mm de largura e são de comprimento variável, desde poucos centímetros até mais de 1 metro, apresentando-se paralelas em relação a nervura central das folhas, com margem bem definida. Estes sintomas são facilmente confundidos com outra doença, a estria vermelha da cana-de-açúcar descrita por Martin e Wismer (1971) causada pela bactéria *P. rubrilineans* (Lee, Purdy, Barnum & Martin) Stapp, na qual as lesões são geralmente em maior número, contínuas, de coloração mais avermelhada, ocorrendo exsudação bacteriana nas folhas e apodrecimento apical.

A escolha de um método de inoculação eficiente para determinado patógeno prende-se à necessidade de se reproduzir os sintomas típicos da doença. Paralelamente o método deve ter certa semelhança com o tipo de infecção natural além de ser prático e econômico.

O presente trabalho teve como objetivo comparar diferentes métodos de inoculação de cana-de-açúcar com o agente da estria mosqueada, e também estudar diferentes épocas de avaliação dos resultados, com a finalidade de selecionar o melhor sistema a ser utilizado em futuros trabalhos que envolvam inoculação tais como: verificação de gama de hospedeiros e resistência varietal.

MATERIAL E MÉTODO

Planta de variedade B4362 com sintomas de estria mosqueada foi coletada na Usina Pumaty, Palmares-PE, e o isolamento do agente etiológico foi realizado em dois meios de cultura: Wilbrink's agar (Tuite, 1969) com a seguinte composição: peptona 5,0 g; fosfato de potássio dibásico 0,5 g; sulfato de magnésio 0,25 g; sacarose 10,0 g; agar 18,0 g; água destilada 1.000 ml, pH 6,8; e Agar nutritivo-dextrose-extrato de levedura (NYDA) com a seguinte composição: extrato de carne 3,0 g; peptona 5,0 g; dextrose 10,0 g; extrato de levedura 5,0 g; agar 18,0 g; água destilada 1.000 ml; pH 6,8 a 7,0. Após identificação, o isolado foi mantido em NYDA a 4°C, até o momento das inoculações.

Plantas da variedade B4362, com 60 dias de idade, obtidas pelo semeio de gema única em vasos, em condições de casa-de-vegetação, foram inoculadas

com suspensão de *P. rubrisubalbicans*, contendo 10⁹ ufc/ml. As plantas foram irrigadas diariamente e adubadas com intervalos de 20 dias durante o experimento.

Foram testados cinco métodos de inoculação, conforme Steindl e Edgerton (1964), Akiba, Sanguino e Tokeshi (1976), Romeiro (1977), Chinea, Marquez e Canada, 1978 e Schaad (1980) descritos a seguir:

- (1) Pulverização realizada nas faces dorsal e ventral das folhas, fazendo-se uma cobertura total do limbo foliar. As plantas receberam pré e pós tratamento em câmara úmida, durante 48 horas cada;
- (2) Riscas com agulha molhada na suspensão na superfície das folhas +1 e +2;
- (3) Deposição de 0,5 ml da suspensão em orifício feito com auxílio de furo-dor de rolha, com 2 mm de diâmetro;
- (4) Injeção de 0,5 ml da suspensão usando-se seringa hipodérmica de 5 ml;
- (5) Picadas com agulhas molhadas na suspensão, fazendo-se 10 picadas por planta, numa área de aproximadamente 50 mm².

Nos três últimos métodos a inoculação foi feita no palmito, 5 cm abaixo do primeiro colar ("dewlap") visível. Em todos os testes a testemunha foi tratada com água destilada e esterilizada.

As avaliações foram realizadas 6, 13, 20 e 27 dias, após a inoculação atribuindo-se notas de 0 a 7 conforme escala abaixo:

- 0 = sem sintomas
- 1 = sintomas ao redor do ferimento até 1 cm de comprimento
- 2 = estria de 1,1 a 2,0 cm de comprimento
- 3 = estria de 2,1 a 3,0 cm de comprimento
- 4 = estria de 3,1 a 4,0 cm de comprimento
- 5 = estria de 4,1 a 5,0 cm de comprimento
- 6 = estria maior que 5,1 cm
- 7 = coalescência de estrias

A comparação de médias, para a influência de época de avaliação na expressão dos sintomas encontra-se na Tabela 2. Observa-se que as melhores épocas para avaliação dos sintomas foram aos 20 e 27 dias indistintamente, as quais diferiram significativamente dos 13º e 6º dias. De acordo com Chinea, Marquez e Canada (1978) os métodos de picada e pistola de pressão induziram um desenvolvimento mais rápido dos sintomas, nos primeiros dias após a inoculação, no entanto, no final da avaliação, ou seja 45 dias, não houve diferença

significativa entre aqueles métodos e o de injeção. Neste trabalho, observou-se que, tanto aos 20 como ao 27 dias, não houve diferença entre as avaliações, embora na primeira época (seis dias) os métodos que induziram maior severidade tenham sido respectivamente, picada, injeção e riscas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A bactéria isolada das lesões típicas de estria mosqueada foi identificada como *P. rubrisubalbicans*, de acordo com testes morfológicos, fisiológicos e de patogenicidade (Hayward, 1962; Bradbury, 1986) sendo que o meio de cultura NYDA favoreceu mais o crescimento do que o meio de Wilbrink, recomendado anteriormente para o cultivo da bactéria (Tuite, 1969).

A análise estatística dos resultados demonstrou que houve diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade para métodos e épocas de avaliação. A comparação de médias, para a influência de métodos de inoculação na expressão dos sintomas, encontra-se na Tabela 1. Observa-se que, com exceção do método de pulverização, todos os outros foram eficientes na indução dos sintomas, embora as técnicas de riscas e picada tenham produzido sintomas com maior intensidade.

Estes resultados estão de acordo com Christopher e Edgerton apud Steindl e Edgerton (1964) e Steindl apud Chinea, Marquez e Canada (1978) os quais, trabalhando com a mesma bactéria, obtiveram sucesso respectivamente com os métodos de riscas nas folhas e de injeção com seringa hipodérmica. Trabalhando também com a estria vermelha, Chona e Bourne apud Chinea, Marquez e Canada (1978) citam métodos de picada e pistola de pressão como eficazes, sendo o primeiro mais eficiente, causando estrias mais longas, embora em menor número. Chinea, Marquez e Canada (1978) compararam os métodos de picada, injeção e pistola de pressão com a pulverização simples, com atomizador De Vilbiss e observaram que os três primeiros métodos diferiram significativamente da pulverização, em relação ao comprimento da estria vermelha, o que, apesar de se tratar da *P. rubrilineans*, também concorda com o resultado aqui apresentado para *P. rubrisubalbicans*, o qual foi avaliado pelo mesmo parâmetro. Conforme Akiba, Sanguino e Tokeshi (1976) o método de injeção para *P. rubrilineans* foi tão eficiente sob condições de casa-de-vegetação, 25-30°C e alta umidade relativa, que os resultados puderam ser comparados áqueles obtidos em campo, para as mesmas variedades.

TABELA 1 - Influência de métodos de inoculação na expressão de sintomas produzidos por *Pseudomonas rubrisubalbicans* em cana-de-açúcar, var. B4362. Dados transformados em $\sqrt{x+1}$

Método de Inoculação	Sintomas ¹
Riscas	2,34 a ²
Picada	2,31 a
Injeção	2,12 a
Deposição	1,82 ab
Pulverização	1,00 b
Testemunha	1,00 b

D.M.S. (1%) = 1,04

C.V. = 21,12%

1 Avaliação segundo escala de notas de 0 a 7 onde: 0 = sem sintomas; 1 = sintomas ao redor do ferimento até 1 cm de comprimento; 2 = estria de 1,1 a 2,0 cm de comprimento; 3 = estria de 2,1 a 3,0 cm de comprimento; 4 = estria de 3,1 a 4,0 cm de comprimento; 5 = estria de 4,1 a 5,0 cm de comprimento; 6 = estria maior que 5,1 cm; 7 = coalescência de estrias.

2 Média de quatro repetições por tratamento; médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 2 - Influência de diferentes épocas de avaliação na expressão dos sintomas produzidos por *Pseudomonas rubrisubalbicans* em cana-de-açúcar, var. B4362. Dados transformados em $\sqrt{x+1}$

Época de Avaliação (dias)	Sintomas ¹
20	2,01 a ²
27	2,01 a
13	1,92 ab
06	1,80 b

D.M.S. (5%) = 0,17

C.V. = 4,33%

1 Avaliação segundo escala de notas de 0 a 7 onde: 0 = sem sintomas; 1 = sintomas ao redor do ferimento até 1 cm de comprimento; 2 = estria de 1,1 a 2,0 cm de comprimento; 3 = estria de 2,1 a 3,0 cm de comprimento; 4 = estria de 3,1 a 4,0 cm de comprimento; 5 = estria de 4,1 a 5,0 cm de comprimento; 6 = estria maior que 5,1 cm; 7 = coalescência de estrias.

2 Média de quatro repetições por tratamento; médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos conclui-se que qualquer um dos métodos aqui estudados, com exceção da pulverização podem ser utilizados para inoculação da *P. rubrisubalbicans*, recomendando-se, no entanto, os de picada e riscas, pela praticidade, rapidez e facilidade de esterilização do equipamento. Quanto à época de avaliação, recomenda-se que seja feita aos 20 dias.

ABSTRACT

Pseudomonas rubrisubalbicans was isolated from sugarcane collected in Palmares-PE-Brazil, showing symptoms of mottled stripe. After the characterization of the bacteria, it was preserved on nutrient agar-yeast extract-dextrose slants until its use. Sugarcane plants, variety B4362, sixty days old, were inoculated by using five methods: (1) foliar spray of leaves with pre and post-treatments in moist chamber for 48 hours, (2) needle scratch on the +1 and +2 leaves, (3) deposition of 0,5 ml of the suspension into a corkborer hole, (4) injection of 0,5 ml of the suspension and (5) punctures with needles containing the bacterial suspension. In the last three methods, inoculation was made in the palmetto, 5 cm bellow the first visible dewlap. The evaluations were made 6, 13, 20 and 27 days after the inoculation, by disease index varying from 1 to 7, based in a scale established by the authors. According to the Tukey's test (1%) the best method of inoculation was the scratch however no significant difference from needle punctures, injection and deposition was found. The best time span for evaluation were 20 and 27 dyas, without significant difference between each other.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AKIBA, F.; SANGUINO, A.; TOKESHI, H. Reação de 18 variedades de cana-de-açúcar a *Pseudomonas rubri lineans*. *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v. 2, n. 4, p. 275-279, 1976.
- 2 BRADBURY, G. *Guide to plant pathogenic bacteria*. Ferry Lane: CAB, 1986. 332 p.
- 3 CHINEA, A.; MARQUEZ, F. R.; CANADA, A. Methods for artificial inoculation of the causal organism of red stripe in sugar. In: CONGRESS OF THE ISSCT, 16., 1977, São Paulo. *Proceedings*. São Paulo: [s. n.], 1978. p. 337-345.
- 4 HAYWARD, A. C. *Studies on bacterial pathogens of sugar cane. II. Differentiation, taxonomy and nomenclature of the bacteria causing red stripe and mottle stripe disease*. [s. l.]: Mauritius Sugar Industry Research Institute, 1962. 27 p. (Occasional Paper, 13).
- 5 MARIANO, R. L. R.; WANG, S. L. Métodos de inoculação e época de avaliação para *Pseudomonas rubrisubalbicans*, agente da estria mosquеada da cana-de-açúcar. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 14, n. 2, p. 158, jul. 1989. Resumo, 275.
- 6 MARIANO, R. L. R.; CABRAL, G. B.; SILVA, M. S. S. G. da. Levantamento de fitobacterioses do Estado de Pernambuco em 1987. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 13, n. 2, p. 130, 1988. Resumo.

- 7 — ; — ; MELO, R. A. G. et al. Levantamento das fitobacterioses relatadas no Estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 12, n. 2, p. 155, 1987. Resumo.
- 8 — ; MELO, R. A. G.; HOLANDA, V. T. et al. Levantamento de fitobacterioses no Estado de Pernambuco, no biênio 1987-1988. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 14, n. 2, p. 158, jul. 1989. Resumo, 276.
- 9 MARTIN, J. P.; WISMER, C. A. Red stripe. In: MARTIN, J. P.; WISMER, C. A.; ABBOTT, E. V. et al. *Sugar-cane diseases of the world*. Amsterdam : Elsevier, 1961. cap. 4, p. 108-126.
- 10 ROBBS, C. F.; KIMURA, O. Uma doença bacteriana do guaranazeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 2, n. 1, p. 99, 1977. Resumo.
- 11 ROMEIRO, R. S. *Identificação de bactérias fitopatogênicas*. Viçosa : Imprensa Universitária, 1977. p. 2-10: Patogenicidade.
- 12 SCHAAD, N. W. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. St. Paul : The American Phytopatological Society, 1980. 72 p.
- 13 STEINDL, D. R. L.; EDGERTON, C. N. Mottled stripe. In: HUGHES, C. G.; ABBOTT, E. V.; WISMER, C. A (ed). *Sugar-cane diseases of world*. Amsterdann : Elsevier, 1964. v. 2, p. 13-16
- 14 TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F.; CARVALHO, P. C. T.; TOKESHI, H. et al. *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo : Agronômica "Ceres", 1980. v. 2., p. 141-206.
- 15 TUITE, J. *Plant pathological methods: fungi and bacteria*. Minneapolis : Burgess, 1969. p. 1-80: Média and nutrient solutions used by plant pathologists and mycologists.

Recebido para publicação em 15 de julho de 1992.