

MÉTODO DE INOCULAÇÃO DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS* PELO SISTEMA RADICULAR PARA AVALIAÇÃO RÁPIDA DE RESISTÊNCIA DE REPOLHO À PODRIDÃO NEGRA

METHOD OF INOCULATION OF XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS IN THE ROOT SYSTEM FOR QUICK EVALUATION OF CABAGGE RESISTANCE TO BLACK ROT

*Cristina Soares de SOUSA*¹; *Cristiano Soares de SOUZA*²; *Lenita Lima HABER*¹; *Denise Garcia de SANTANA*³; *Alcione Silva ARRUDA*⁴; *Armando TAKATSU*⁵

RESUMO: Para conferir a eficiência do método de inoculação, pelo sistema radicular, para a avaliação rápida quanto à resistência de repolho à podridão negra, foram utilizadas duas cultivares bem conhecidas com níveis médios de resistência à doença: Shinsei (medianamente resistente) e Matsukase (medianamente suscetível). A inoculação foi feita mergulhando-se a parte radicular das mudas em suspensão do inóculo de 1×10^8 UFC/ml, durante 10 minutos. As mudas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação. As avaliações foram feitas em função da proporção de folhas com sintomas aos 11 e 21 dias após a inoculação, por meio da escala de notas de 0 a 4. O método mostrou ser bastante promissor para a avaliação rápida de variedades de repolho quanto à resistência à podridão negra em condições de casa de vegetação, tendo em vista que permitiu a distinção destas duas cultivares em teste de Tukey ao nível de 1% nas duas avaliações.

UNITERMOS: *Brassica oleracea* var. *Capitata*, Resistência.

INTRODUÇÃO

As brassicáceas (crucíferas) constituem a família mais numerosa, em termos de espécies oleráceas, ocupando um lugar proeminente na olericultura no Centro-Sul do país. O repolho, a couve-flor e a couve-manteiga destacam-se, pela sua maior relevância econômica (FILGUEIRA, 2000).

A podridão negra, causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, é considerada a principal doença das crucíferas, podendo causar sérios prejuízos à lavoura no período das chuvas. No Brasil, sua distribuição é generalizada, sendo encontrada, praticamente, em todas as regiões produtoras, em razão da bactéria ser transmitida por meio de sementes e de mudas contaminadas (RODRIGUES NETO, 1995).

Metodologias de inoculação e de avaliação, em condições de casa de vegetação são muito importantes em programas de melhoramento de plantas visando resistência à patógenos, pois podem ser executadas em quaisquer épocas do ano e agilizar e ou viabilizar, assim como reduzir os custos destes programas. Entretanto, elas precisam ser ajustadas para cada uma das doenças (patógeno/planta hospedeira) em questão.

Entre os requisitos destas metodologias podem ser destacados como os mais importantes: equivalência dos resultados com os obtidos em condições de campo, confiabilidade, facilidade de execução, rapidez e possibilidade de avaliação de grande quantidade de materiais sem ocupar grande espaço.

Para a podridão negra do repolho, existem muitos métodos de inoculação avaliados. Bain (1951; 1952)

¹ Mestranda do curso de Agronomia. Instituto de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Uberlândia

² Químico. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Patos de Minas

³ Professora Adjunta. Departamento de Fitotecnia. Instituto de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Uberlândia

⁴ Doutorando em Genética e Bioquímica. Instituto de Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia

⁵ Professor Visitante. Departamento de Fitopatologia. Instituto de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Uberlândia

Recebido em 02/05/02

Aceito em 26/08/02

empregou embebição de sementes no inóculo, método utilizado posteriormente por Sharma et al. (1977) e Almeida et al. (1985). A inoculação por aspersão é das mais utilizadas (ORTIZ, 1962/1963; KIMOTO, 1968; LEMOS et al., 1972; SHARMA et al., 1977; ALMEIDA et al., 1985; MACHADO, 1985), assim como a que envolve o corte das pontas das folhas com tesoura previamente imersa no inóculo (SHARMA et al., 1977; OHATA et al., 1986; ALMEIDA et al., 1985; MACHADO, 1985). Outros métodos passíveis de serem empregados e citados na literatura incluem o uso de almofada de alfinetes (SHARMA et al., 1977; ALMEIDA et al., 1985), injeção (ORTIZ, 1962/1963), palito (ALMEIDA et al., 1985) e deposição de gotas de inóculo em ferimentos na axila das folhas (MACHADO, 1985; HENZ et al., 1988).

Os critérios de avaliação, nestes trabalhos, variam com os métodos de inoculação empregados. Para o método de embebição de sementes no inóculo, Bain (1951) baseou-se na aparência geral das plantas, classificando-as em susceptíveis ou resistentes. Posteriormente, Bain (1952) e Sharma et al. (1977) basearam-se na percentagem de plantas doentes para avaliar a resistência, empregando o mesmo método de inoculação. Na maioria dos trabalhos foi utilizada uma escala de notas de acordo com os sintomas externos da moléstia (KIMOTO, 1968; ORTIZ, 1963; WILLIAMS et al., 1972; MOFFET et al., 1976), sendo que Kimoto (1968) também utilizou uma escala de notas baseada em sintomas de descoloração do tecido vascular do caule. Ohata et al. (1986) consideraram as lesões foliares em "V" como triângulos, ordenando os genótipos de acordo com a área lesionada. Almeida et al. (1985) procederam a avaliação, estimando a área foliar lesionada e pela constatação ou não de exsudação bacteriana a 1,3 e 5 cm do bordo inferior das lesões, além da proporção ou percentagem de escurecimento dos vasos.

Apesar deste grande número de artigos existentes sobre a matéria, o uso destas metodologias nos trabalhos de melhoramento é ainda muito restrito, devido, principalmente, à falta de confiabilidade quanto à equivalência dos resultados com os obtidos em condições de campo.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do método de inoculação de mudas de repolho pelo sistema radicular em distinguir as duas cultivares, Shinsei e Matsukase, amplamente cultivadas atualmente nas regiões sudeste e centro-oeste e consideradas, respectivamente, como de resistência medianamente alta e medianamente baixa à podridão negra causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado, como inóculo, a Cultura UFU-63 da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Uberlândia, isolada de um campo de produção de repolho da região severamente afetado. Esta escolha foi considerada adequada em função dos dados de Henz et al. (1987), segundo os quais *X. campestris* pv. *campestris* não apresenta variação em nível de raças e que os isolados coletados de plantações severamente afetadas não apresentam grandes diferenças quanto aos níveis de virulência.

A inoculação foi feita imediatamente antes do plantio, por imersão de raízes de plântulas, no estágio de 3 a 4 folhas verdadeiras, em suspensão do inóculo, durante 10 minutos. A suspensão do inóculo foi preparada com a bactéria cultivada em meio de cultura 523 de Kado e Heskett (1970), por 48 h a 28 - 30° C e a concentração ajustada por diluição a 1×10^8 UFC/ml com base na equação de calibração previamente estabelecida: $X = Y - 0,044 / 0,068$, onde, X = concentração em $n \times 10^8$ UFC/ml e Y = absorvância da suspensão medida no colorímetro com o comprimento de onda de 550nm.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com parcelas constituídas de 2 vasos com 4 plantas cada, sendo 4 tratamentos com 6 repetições. Os tratamentos utilizados foram de cultivares Shinsei e Matsukase, sendo testemunhas as parcelas de plantas das mesmas cultivares tratadas somente com água, sem o inóculo.

Foram feitas duas avaliações, a primeira no décimo primeiro e a segunda no vigésimo dia após a inoculação, baseadas na proporção de folhas com sintomas. Para obtenção dos dados utilizou-se uma escala de notas de 0 a 4, onde: 0 = plantas sem sintomas, 1 = apenas lesões pequenas de até 5 mm, 2 = planta com 35-70% das folhas com sintomas (lesões pequenas e grandes), 3 = planta com 70-100% das folhas com sintomas e 4 = morte da planta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados podem ser visualizados na tabela 1. A diferença significativa ao nível de 1% pelo teste de Tukey, nas duas avaliações, entre as duas cultivares conhecidas e plenamente avaliadas em campos de produção das regiões Sudeste e Centro Oeste, indica que o método é bastante promissor para a avaliação rápida de variedades de repolho quanto à resistência à podridão negra em condições de casa de vegetação.

Um dos aspectos que destaca a presente metodologia das demais testadas até agora é a possibilidade de distinguir entre as variedades medianas, os níveis de resistência ou de suscetibilidade intermediárias como o de Shinsei (medianamente resistente) do de Matsukase (medianamente suscetível). Esta característica da metodologia é fundamental nos trabalhos de melhoramento genético de repolho ou de outras brássicas para a podridão negra no qual dificilmente se obtém materiais altamente resistentes com boas características agronômicas. Na grande maioria dos casos, é necessário selecionar dentre os genótipos segregantes medianos, os que apresentarem melhores níveis de resistência à doença.

A metodologia é ainda passível de aperfeiçoamentos, visto que foi testada somente duas

variedades conhecidas, uma concentração de inóculo, um tempo de imersão de raízes e duas datas de avaliação.

A comprovação definitiva desta metodologia poderá ser obtida somente quando, na avaliação de grande número de variedades e genótipos nos trabalhos de melhoramento, os materiais selecionados apresentarem níveis de resistência correspondentes também nas condições de campo.

Apesar de a bactéria ser um patógeno que, em condições naturais, infecta pela parte aérea e se transloca até as raízes pelos vasos do xilema, o presente trabalho demonstrou que, em inoculação artificial, o inverso é perfeitamente viável.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: CNPq

ABSTRACT: In order to evaluate the efficiency of inoculation method in the root systems for fast evaluation of cabbage resistance to black rot, seedlings (2-3 true leaves) of two well known cultivars of intermediate resistance: Shinsey (moderately resistant) and Matsukase (moderately susceptible), were inoculated by immersion of roots in bacterial suspension of 1×10^8 CFU/ml. The plants were evaluated at 11 and 21 days after inoculation using the severity scale ranked from 0 to 4, considering the proportion of leaves with symptoms. The results of two evaluations showed significant differences on the level of resistance of these cultivars by Tukey test at 1%. By these results the inoculation method can be considered very promising for quick evaluation of cabbage varieties under green-house conditions.

UNITERMS: *Brassica oleracea v. capitata*; Resistance.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, G. P.; HENZ, G. P., REIFSCHNEIDER, F. J. B.; GIORDANO, L. B. Avaliação de metodologias de avaliação para identificação de fontes de resistência à podridão negra em brássicas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 327, 1985.

BAIN, D. C. Observations on resistance to black rot in cabbage. **Plant Disease Report**, v. 35, n. 4, p. 200-204, 1951.

BAIN, D. C. Reaction of *Brassica* seedlings to black rot. **Phytopathology**, v. 42, p. 497-500, 1952.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. São Paulo: Agronômica Ceres, 2000. p. 338.

HENZ, G.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Avaliação de método de inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* para detecção de fontes de resistência em brássicas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, n. 3, p. 207-210, 1988.

HENZ, G.; TAKATSU, A., REIFSCHNEIDER, F. J. B. Avaliação da virulência e variabilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, n. 4, p. 350-353, 1987.

KADO, D. I. ; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969-967, 1970.

KIMOTO, T. **Contribuição ao estudo de métodos de seleção de variedades locais de repolho**. 1968. 64 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1968.

LEMOS, M. A.; NEDER, R. N.; AZEVEDO, J. L. Tratamento de sementes de *Brassica oleracea* var. *capitata* com antibióticos e sua ação em *Xanthomonas campestris*. **Revista de Microbiologia**, v. 3, n. 2, p. 69-73, 1972.

MACHADO, D. **Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson associada a ervas daninhas**. 1985. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 1985.

MOFFET, M. L.; TRIMBOLI, D. ; BONNER, I. A. A bacterial leaf spot of several Brassica varieties. **Australian Plant Pathology Society Newsletter**, v. 5, p. 30-32, 1976.

OHATA, K. I.; AZEGAMI, K.; TSUCHIYA, Y. Clip inoculation , a brief evaluation method for the black rot resistance of cabbage varieties. **Bulletin of National Institute of Agricultural Science: Series C**, v. 0, n.36, p. 89-96, 1986.

ORTIZ, M. T. Resistencia varietal de la col a la pudrición negra. **Agricultura Técnica em México**, v. 2, n. 2, p. 50-52, 1962/1963.

RODRIGUES NETO, J. Doenças causadas por bactérias em crucíferas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, n. 183, p. 56-59, 1995.

SHARMA, B. R.; SWARUP, V.; CHATTERJEE, S. S. Resistance to black rot in cauliflower. **Science Horticulture**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 1977.

WILLIAMS, P. H.; STAUB, T. ; SUTTON, J. C. Inheritance of resistance in cabbage to black rot. **Phytopathology**, v. 62, p. 247-252, 1972.

Tabela 1. Reações de cultivares de repolho inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* por imersão de raízes em suspensão de 10^8 UFC/ml por 10 minutos.

Tratamentos	Médias das notas de severidade	
	Aos 11 dias a.i. ⁽¹⁾	Aos 20 dias a.i.
1. Cv. Matsukase	2,78 a ⁽²⁾	3,24 a
2. Cv. Shinsei	1,25 b	2,29 b
3. Controle cv. Matsukase ⁽³⁾	0,00 c	0,00 c
4. Controle cv. Shinsei ⁽³⁾	0,00 c	0,00 c
Coefficiente de variação	30,57%	16,18%

(1): a.i.=após inoculação; (2): médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem significativamente entre si, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; (3): Controle tratado somente com água, sem inóculo.