

AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA DE CANOLA À PODRIDÃO NEGRA DAS CRUCÍFERAS

Leila Maria Costamilan¹, Gilberto Omar Tomm¹, Cláudia Cristina Clebsch²,
Tammy Aparecida Manabe Kiihl¹, Norimar D´Ávila Denardin³

¹ Pesquisador Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS; ² Analista Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS;
³ Gerente de Qualidade/Administradora CbtecAGRO, Mato Castelhana, RS.

RESUMO

Bacteriose de canola (*Brassica napus*), conhecida como podridão negra das crucíferas, é causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), causando lesões no limbo foliar e queda prematura de folhas afetadas. Não há método eficiente de controle e, devido ao número limitado de fontes de resistência, não há oferta de cultivares comerciais de canola resistentes, no Brasil. O objetivo deste trabalho foi avaliar a reação de genótipos de canola, componentes da coleção de brássicas COLBASE da Embrapa Trigo, a esta doença. Folhas completamente desenvolvidas foram inoculadas com suspensão de células de Xcc (10^4 células/mL) através de dois cortes no limbo foliar, a partir da margem, um de cada lado da nervura central. Foram realizadas medições sequenciais da maior extensão da clorose foliar. Os dados de progresso do tamanho de lesão foram usados para cálculo da severidade da doença, integralizada como área abaixo da curva de progresso da doença. O teste identificou materiais com menor desenvolvimento de área foliar afetada, como 'Ames 24222' e 'Turret'. Estes genótipos podem contribuir como fontes de resistência à bacteriose em programas de melhoramento de canola.

Palavras-chave: *Brassica napus*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

INTRODUÇÃO

Bacteriose de canola (*Brassica napus*), conhecida como podridão negra das crucíferas, é causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Xcc). Sua ocorrência é mundial e afeta outras plantas comercialmente cultivadas, como repolho, couve-flor, brócolis e couve, além de ornamentais e de plantas invasoras da família Brassicaceae. A doença é severa em regiões tropicais e subtropicais de clima quente e úmido. O sintoma principal é lesão em forma de "V" nas margens das folhas, de coloração amarela a marrom, com bordos amarelos e nervuras escurecidas (Figura 1). Folhas afetadas podem cair prematuramente. Sintomas associados incluem deformação de folhas, nanismo e morte de plantas. O controle é difícil e inclui métodos integrados, como uso de material vegetal sadio (sementes e mudas) e de práticas culturais que limitem a disseminação da bactéria, como eliminação de restos culturais infectados e de plantas daninhas da mesma família. Há pouca oferta de cultivares comerciais resistentes (VICENTE; HOLUB, 2013).



Foto: Leila Costamilan

Figura 1. Sintoma de podridão negra das crucíferas, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, em folha de canola.

Das nove raças atualmente conhecidas, somente as raças 1 e 4 têm importância mundial (FARGIER; MANCEAU, 2007; VICENTE et al., 2001). Resistência à raça 4 foi encontrada em *Brassica rapa* (mostarda do campo, de genoma A) e em *Brassica napus* (de genoma AC), indicando origem no genoma A. No genoma B, resistência às raças 1 e 4 foi observada em *Brassica nigra* (mostarda negra, de genoma B) e em *Brassica carinata* (mostarda da Etiópia, de genoma BC). *Brassica juncea* (mostarda da China, de genoma AB) apresentou resistência específica para as raças 1 e 4 e resistência quantitativa para todas as raças. Potencial resistência não específica à raça também foi verificada, em baixa frequência, em *B. rapa*, *B. nigra* e *B. carinata* (TAYLOR et al., 2002).

Resistência completa à raça 4 em canola é controlada por um gene maior (*Xca4*), posicionado no genoma A de *B. napus*, indicando que esta resistência origina-se de *B. rapa* (VICENTE et al., 2002). Resistência incompleta foi identificada em dois genótipos de *B. napus* (PI 469733 and PI 469828), em acessos inoculados com as raças 1 e 4 de Xcc, sendo que, na espécie *B. juncea*, houve 91% de acessos resistentes (GRIFFITHS et al., 2009).

No Brasil, todas as cultivares de canola e de colza da coleção de germoplasma do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) apresentaram suscetibilidade à doença (LEITE et al., 1994).

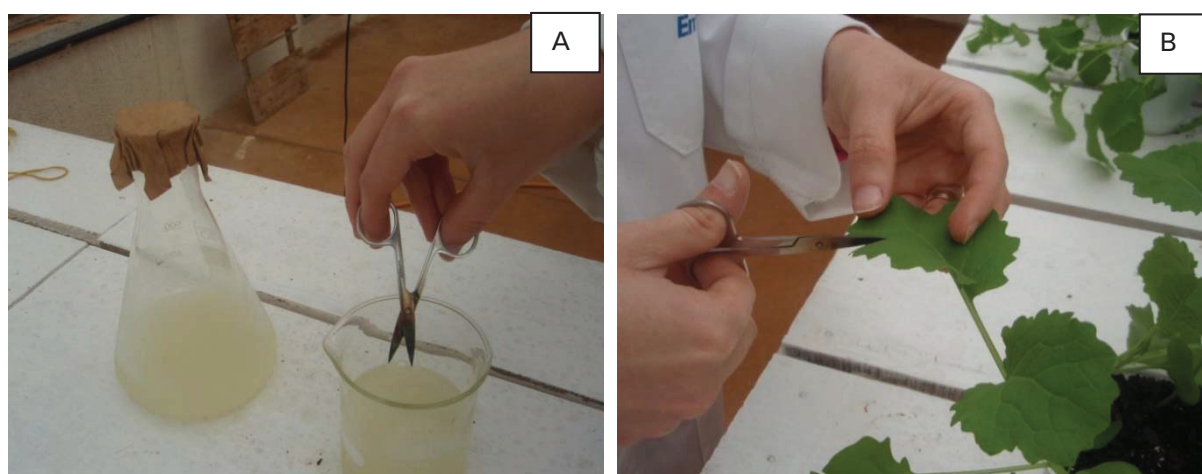
O objetivo deste trabalho foi avaliar a reação de genótipos de canola, componentes da coleção de brássicas COLBASE da Embrapa Trigo, quanto à suscetibilidade à podridão negra das crucíferas.

MATERIAL E MÉTODOS

Inóculo: folhas de canola com podridão negra das crucíferas foram coletadas na área experimental da Embrapa Trigo em 2014. Em laboratório, o tecido vegetal das margens das lesões foi recortado e desinfestado com álcool 70% e hipoclorito 2%, com posterior lavagem em água destilada estéril. Em seguida, o material foi macerado para obtenção de extrato, que foi vertido em placas contendo Nutriente Agar, e incubado a 30 °C por 48 horas. Após este período, colônias mucoides, de pigmentação amarela, superfície lisa, circulares, com bordos lisos e gram negativas foram repicadas novamente para meio Nutriente Agar. Plantas de canola da cultivar Hyola 61 foram usadas para teste de patogenicidade, em casa de vegetação, através de corte de folhas da planta com lâmina de tesoura embebida na suspensão bacteriana, com posterior desenvolvimento de sintomas de podridão negra. A bactéria foi reisolada destas lesões e conservada em geladeira, a 5 °C, até a realização dos testes.

Genótipos: os 65 genótipos testados fazem parte da coleção de brássicas COLBASE, disponibilizada pelo banco ativo de germoplasma (BAG) da Embrapa Trigo (Tabela 1). Sementes foram semeadas em mistura de terra vegetal e terra de campo adubada conforme a necessidade (v/v), contida em copos plásticos de 500 mL de capacidade, sendo preparadas três repetições por genótipo. Ao final de 10 dias, foram deixadas duas plantas por copo. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, em temperatura variando entre 15 °C e 25 °C.

Inoculação: quatro semanas após a semeadura, folhas completamente desenvolvidas (excetuando-se as mais velhas e as mais novas de cada planta) foram inoculadas com suspensão de células de Xcc através de dois cortes, de 2 cm de comprimento, no limbo de cada folha, a partir da margem, um de cada lado da nervura central (Figura 2). Na maioria dos genótipos, foi possível inocular pelo menos 12 folhas (2 folhas por planta). O inóculo foi preparado com colônias de Xcc desenvolvidas por 48 horas em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970). A suspensão de células foi obtida lavando-se com água esterilizada as colônias desenvolvidas em quatro placas de Petri (9 cm de diâmetro), sendo a concentração ajustada em 10^4 células/mL através do método turbidimétrico (ROMEIRO, 2007). Para a inoculação, as lâminas de uma tesoura foram mergulhadas na suspensão bacteriana imediatamente antes de cada corte. Após 1 hora da inoculação, as plantas foram submetidas à aspersão de névoa de água (1 minuto de aspersão a cada 3 minutos) durante 48 horas.



Fotos: Leila Costamilan

Figura 2. Inoculação de folhas de canola com suspensão de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. (A) lâminas de tesoura mergulhadas em suspensão bacteriana; (B) corte da lâmina foliar com tesoura embebida na suspensão bacteriana.

Avaliação: genótipos que apresentaram até 2 cm de extensão de lesão, em qualquer período de avaliação e em qualquer folha, foram selecionados para reteste (indicados na Tabela 1), pela metodologia de inoculação descrita, com duas repetições por genótipo. Foram realizadas quatro avaliações em cada folha, a primeira, seis dias após a inoculação e as demais a cada três dias,

tomando-se duas medidas, em milímetros, da maior extensão do sintoma (clorose) no corte do lado direito e no corte do lado esquerdo de cada nervura principal. Os dados foram usados para cálculo da severidade da doença, integralizada como área abaixo da curva de progresso da doença relativo (AACPD_r) (MADDEN et al., 2007), pela fórmula $AACPDr = \{\sum [((y1+y2)/2) * (t2-t1)]\}/n^\circ$ dias de ensaio, onde $y1$ e $y2$ são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos $t1$ e $t2$, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genótipos do reteste, agrupados em índices decrescentes de AACPD, são apresentados na Figura 3. Com menor desenvolvimento de lesão, destacaram-se 'Ames 24222' (mostarda) e 'Turret' (canola) (Figura 4).

Alguns materiais apresentaram área foliar afetada superior à da testemunha suscetível Hyola 61), mesmo após a primeira seleção realizada, quando foram retirados do ensaio os genótipos com lesões acima de 2 cm.

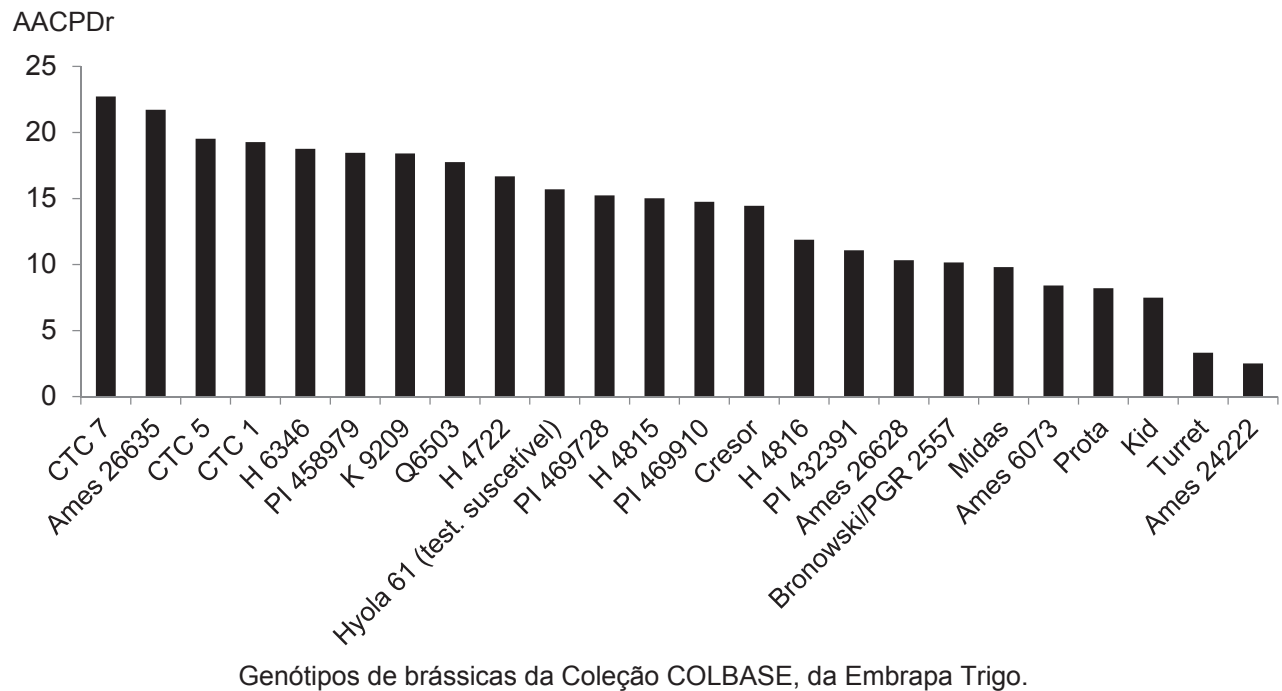


Figura 3. Índice de área abaixo da curva de progresso da doença relativo (AACPD_r) em folhas de genótipos de canola após inoculação com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2017.

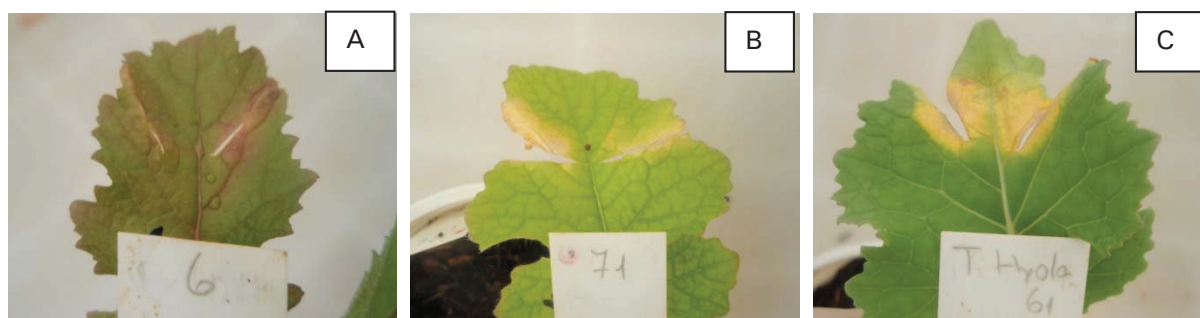


Figura 4. Genótipos de canola, nove dias após inoculação com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. (A) Ames 24222; (B) Turret; (C) testemunha suscetível Hyola 61.

CONCLUSÕES

O teste de reação de genótipos de canola à podridão negra das crucíferas foi capaz de identificar materiais da coleção COLBASE com menor desenvolvimento de área foliar afetada. Estes genótipos devem participar de outros testes, visando à confirmação da reação, e podem contribuir, como fontes de resistência à podridão negra das crucíferas, em programas de melhoramento de canola.

Tabela 1. Genótipos de canola componentes da coleção COLBASE, testados para reação à podridão negra das crucíferas.

Número de ordem	Origem	Cultivar	Espécie	Selecionada para reteste ¹
1	Ames 1670	-	?	
2	Ames 6073 (PI 649127)	-	<i>Brassica napus</i>	X
3	Ames 15939	Comet	<i>B. napus</i>	
4	Ames 22548 (PI 311727)	Bronowski	<i>B. napus</i>	
5	Ames 22550	-	?	
6	Ames 24222	-	<i>Brassica juncea</i>	X
7	Ames 26628	-	<i>B. napus</i>	X
8	Ames 26635	Polo Canola	<i>B. napus</i>	X
9	PI 311727	Bronowski/PGR 2557	<i>B. napus</i>	X
11	PI 458920	Cresor	<i>B. napus</i>	X
12	Seleção Cotrijuí	CTC 1	<i>B. napus</i>	X
13	Seleção Cotrijuí	CTC 2	<i>B. napus</i>	
14	Seleção Cotrijuí	CTC 4	<i>B. napus</i>	
15	Seleção Cotrijuí	CTC 5	<i>B. napus</i>	X
16	Seleção Cotrijuí	CTC 7	<i>B. napus</i>	X
17	-	Erglu	<i>B. napus</i>	X
19	-	Garant	<i>B. napus</i>	
20	-	H 4815	<i>B. napus</i>	X
21	-	H 4816	<i>B. napus</i>	X
22	-	H 4722	<i>B. napus</i>	X
23	-	H 6346	?	X
24	-	H 6509	?	
25	-	I 4403	<i>B. napus</i>	

Continua...

Tabela 1. Continuação

Número de ordem	Origem	Cultivar	Espécie	Selecionadas para reteste ¹
26	-	I 6654	<i>B. napus</i>	
27	-	K 9111	-	
28	-	K 9209	<i>B. napus</i>	X
29	-	Kid	<i>B. napus</i>	X
30	-	Lovas	?	
31	PI 431571	Midas	<i>B. napus</i>	X
32	PI 469999	Nugget	<i>B. napus</i>	
33	-	Niklas	<i>B. napus</i>	
34	PI 458941	Norin 16	<i>B. napus</i>	
36	-	PFB 2	<i>B. napus</i>	
37	PI 269449	-	<i>B. napus</i>	
38	PI 274452	-	-	
39	PI 282571	NU 52589	<i>B. napus</i>	
40	PI 284859	A 19890	<i>B. napus</i>	
41	PI 305280	NU 51625	<i>B. napus</i>	
42	PI 391553	Shang-You	<i>B. napus</i>	
44	PI 409023	Lesira	<i>B. napus</i>	
46	PI 431572	Regent	<i>B. napus</i>	
47	PI 431574	Tower	<i>B. napus</i>	
48	PI 432391	BAU-M/49	<i>B. napus</i>	X
49	PI 432392	BAU-M/50	<i>B. napus</i>	
50	PI 436555	Gan You n° 2	<i>B. napus</i>	
51	PI 458979	77-70	<i>B. napus</i>	X
52	PI 458980	77-71	<i>B. napus</i>	
53	PI 469724	Aomori	<i>B. napus</i>	
54	PI 469726	Aomori-1	<i>B. napus</i>	
55	PI 469727	Aoyagi	<i>B. napus</i>	
56	PI 469728	Armander	<i>B. napus</i>	X
57	PI 469729	Austria-3	<i>B. napus</i>	
58	PI 469730	Azuma	<i>B. napus</i>	
59	PI 469731	Azuma 22	<i>B. napus</i>	
60	PI 469910	Mokpo 4	<i>B. napus</i>	X
61	PI 469911	Mokpo 5	<i>B. napus</i>	
62	PI 469912	Mokpo 6	<i>B. napus</i>	
63	PI 469913	Mokpo 7	<i>B. napus</i>	
64	PI 458955	Prota	<i>B. napus</i>	X
65	-	Q 6501	<i>B. juncea</i>	
66	-	Q 6503	<i>B. juncea</i>	X
67	-	Rapanui	<i>B. napus</i>	
69	-	Span	<i>Brassica campestris</i>	
71	PI 365644	Turret	<i>B. napus</i>	X
72	-	Zephyr	<i>B. napus</i>	
Testemunha suscetível	-	Hyola 61	<i>B. napus</i>	

¹ Lesões foliares menores que 2 cm em avaliação anterior.

REFERÊNCIAS

- FARGIER, E.; MANCEAU, C. Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. **Plant Pathology**, London, v. 56, n. 5, p. 805-818, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2007.01648.x
- GRIFFITHS, P. D.; MAREK, L. F.; ROBERTSON, L. D. Identification of crucifer accessions from the NC-7 and NE-9 plant introduction collections that are resistant to black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) races 1 and 4. **Hortscience**, Alexandria, v. 44, n. 2, p. 284-288, 2009.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970.
- LEITE, R. M. V. B. C.; RUANO, O.; KOMORI, N. Caracterização de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolada de canola. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 20, n. 1, p. 35-38, 1994.
- MADDEN, L. V.; HUGHES, G.; VAN DEN BOSCH, F. **The study of plant disease epidemics**. St. Paul: APS Press, 2007. 432 p.
- ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 172 p.
- TAYLOR, J. D.; CONWAY, J.; ROBERTS, S. J.; ASTLEY, D.; VICENTE, J. G. Sources and origin of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica* genomes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 1, p. 105-111, 2002.
- VICENTE, J. G.; CONWAY, J.; ROBERTS, S. J.; TAYLOR, J. D. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 5, p. 492-499, 2001.
- VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. **Molecular Plant Pathology**, Orlando, v. 14, n. 1, p. 2-18, 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x/full>>. Acesso em: 25 jan. 2017.
- VICENTE, J. G., TAYLOR, J. D., SHARPE, A. G., PARKIN, I. A. P., LYDIATE, D. J.; KING, G. J. Inheritance of race-specific resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica* genomes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 10, p. 1134-1141, 2002.