

Foto: Rivadalve Coelho Gonçalves



## Método de Inoculação de *Ralstonia solanacearum* para a Seleção de Plantas de *Piper hispidinervum* Resistentes à Murcha-bacteriana

Rivadalve Coelho Gonçalves<sup>1</sup>  
José Henrique Vallim<sup>2</sup>  
Paulo Eduardo França de Macedo<sup>3</sup>  
Rubens Mamédio Bastos<sup>4</sup>

### Introdução

*Ralstonia solanacearum* (Smith 1986) Yabuuchi et al. 1996 é uma bactéria habitante de solos capaz de causar a murcha-bacteriana em centenas de hospedeiras (Hayward, 1991). No final do século passado, foi relatada afetando plantas de *Piper hispidinervum* C. DC. (pimenta-longa), espécie vegetal utilizada para a produção de safrol (LOPES et al., 1998). No Acre, onde essa doença ocorre de forma endêmica, estudos de melhoramento genético estão em andamento visando à obtenção de cultivares com alto teor de safrol e resistência à murcha-bacteriana para o cultivo comercial da planta. Para estudos do patossistema *Ralstonia solanacearum* x *Piper hispidinervum*, visando à seleção de plantas resistentes, deve-se dispor de um método que possibilite fácil distinção entre plantas com diferentes níveis de resistência. Pelo fato da resistência mais durável

à murcha-bacteriana ser poligênica e quantitativa, influenciada por fatores ambientais, faz-se necessário ajustar a metodologia de inoculação em termos de drasticidade, de modo que se possam distinguir pequenas diferenças entre níveis de resistência, conforme discutido por Lopes & Boiteux (2012).

*Ralstonia solanacearum* penetra no hospedeiro principalmente pelas raízes, por aberturas naturais e ferimentos. Métodos muito drásticos de inoculação (isolado muito virulento, alta concentração de inóculo, excesso de injúria na planta, planta muito jovem, ambiente pós-inoculação muito favorável às interações) podem levar a conclusões errôneas de descarte de plantas eventualmente resistentes. Por outro lado, o método deve ter drasticidade suficiente para que a doença se estabeleça, evitando os escapes que

<sup>1</sup>Engenheiro florestal, D.Sc. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Acre, rivadalve.goncalves@embrapa.br

<sup>2</sup>Farmacêutico bioquímico, M.Sc. em Biotecnologia Médica, analista da Embrapa Meio Ambiente, jose.vallim@embrapa.br

<sup>3</sup>Engenheiro-agrônomo, M.Sc. em Fitopatologia, analista da Embrapa Acre, paulo.macedo@embrapa.br

<sup>4</sup>Sociólogo, assistente da Embrapa Acre, rubens.bastos@embrapa.br

levam à escolha de materiais suscetíveis, como sendo resistentes.

Os métodos de inoculação de bactérias descritos na literatura incluem a atomização, a injeção, inoculação de raízes "in situ", inoculação de raízes lavadas, inoculação por picada, infestação do solo e deposição de bactérias com gaze em plantas com ou sem fermento artificial por instrumentos ou substâncias abrasivas (DENNY; HAYWARD, 1987; ROMEIRO, 2001; LOPES & BOITEUX, 2012).

Em estudos anteriores na Embrapa Acre, utilizando plântulas zigóticas de pimenta-longa com dois pares de folhas e deposição de gota, na axila da segunda folha, de suspensão de bactérias cultivadas em meio de cultura, por 48h, não foi possível encontrar plantas com alto nível de resistência em 25 populações e 28 progênies avaliadas (CAVALCANTE et al., 2005). Os sintomas se desenvolveram mais lentamente em algumas plantas, mas todas morreram à medida que a murcha-bacteriana evoluiu. Em outro estudo, utilizando-se o método de imersão de raízes "in situ", não houve detecção de fonte de resistência, o que permitiu a elaboração da hipótese de drasticidade desse método frente ao tipo de resistência esperado (CAVALCANTE et al., 2001).

A partir das informações obtidas no patossistema em estudo, alguns experimentos foram realizados para avaliar métodos de inoculação e avaliação de doença com o objetivo de estabelecer as bases de um procedimento operacional padrão que possa ser utilizado no programa de melhoramento genético de pimenta-longa para a resistência à murcha-bacteriana.

## Materiais e métodos

Para o isolamento da bactéria, amostras de raízes e do caule (colo) de *P. hispidinervum* com sintomas típicos de murcha-bacteriana foram dissecadas sobre balcão de laboratório até a obtenção das amostras de isolamento com aproximadamente 1,0 cm de comprimento por 0,5 cm de largura. Em câmara de fluxo vertical, limpa e desinfestada com etanol 70%, exposta à luz germicida, 254 nm, por 15 min, as amostras

foram colocadas separadamente em tubos de ensaio (18 cm x 1,8 cm) e desinfestadas com solução de etanol: água destilada autoclavada (70%, v/v) por 30s. Em seguida, descartou-se essa solução e procedeu-se à desinfestação com NaOCl a 12.500 ppm de  $Cl_2$  ativo por 1min. A solução foi descartada e as amostras foram lavadas três vezes seguidas, por 1min, com água destilada estéril. Em cada tubo, foram adicionados 3 ml de água destilada estéril e, após 30min, as bactérias exsudadas foram semeadas com alça de platina nas placas de Petri, sobre plataforma giratória, contendo meio Kelman (KELMAN, 1954). As placas foram colocadas em câmara a 28 °C, por 72h no escuro. Colônias bacterianas individuais, mucoides, fluidas e brilhantes, com centro de cor vermelho-clara e bordos de cor branca ou totalmente brancas, foram repicadas para placas contendo meio Kelman sem TTC e, após serem multiplicadas nesse meio, a 28 °C, por 48h no escuro, foram ressuspendidas e armazenadas em água mineral, pH=7,0, à temperatura ambiente, em tubos de ensaio de 15 cm x 1,5 cm com tampa de polietileno forrada com teflon. Os isolados foram codificados como IPL1 a IPLn ou IPH1 a IPHn com indicação do órgão do qual foi obtida a amostra, ou seja, R para raiz e C para caule. Na segunda fase do trabalho, o mesmo método de isolamento foi utilizado e os isolados de bactérias foram codificados como Rs1, Rs2, Rs3 e Rs4.

## Produção de mudas zigóticas

Sementes de *P. hispidinervum* foram semeadas diretamente em copos plásticos brancos de 150 cm<sup>3</sup> cheios de substrato preparado com terra de horizonte B, de Latossolo Vermelho, areia fina e serragem fina curtida (TAS) (3:1:1), v/v/v autoclavado por 2,5h, a 1 atm, 120 °C, em dois dias alternados de 48h. Após as sementes germinarem e atingirem dois pares de folhas, fez-se o desbaste de modo a permanecer apenas uma planta por copo.

## Produção de mudas clonais

Após a primeira fase de seleção de um isolado virulento de *R. solanacearum* para inoculações, visando obter plantas resistentes, procedeu-se à multiplicação de 10 matrizes de *P. hispidinervum*

por macroestaquia. Essas plantas eram componentes de uma população F2 oriunda da população F1 submetida à intensa seleção massal para alta produtividade de safrol. Em dois experimentos, as estacas de aproximadamente 10 cm de altura e diâmetro de 7 mm a 10 mm foram preparadas com ramos colhidos em plantas submetidas à poda prévia cerca de 90 dias antes. As estacas foram tratadas por imersão da base na solução de 500 ppm de AIB e plantadas em areia lavada nas bandejas de isopor de 72 cavidades (experimento 1) e em substrato Plantmax®, S2, em tubetes de polietileno com 138 cm<sup>3</sup> de capacidade (experimento 2).

## Testes de patogenicidade e seleção de bactérias

Para a seleção de isolado virulento, na primeira fase dos trabalhos, 14 isolados de *R. solanacearum* obtidos conforme descrito foram inoculados separadamente em raízes de seis plantas de pimenta-longa. Para tanto, as bactérias foram reativadas em meio Kelman sem TTC por 48h, a 28 °C, no escuro, e cultivadas em placas com meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 48h, a 28 °C, no escuro. Preparou-se uma suspensão de células bacterianas de cada isolado, em solução de NaCl 0,85% (ROMEIRO, 2001), pH=6,9±0,2, OD<sub>600</sub>=0,1, ca. de 1x10<sup>8</sup> ufc/ml (DENNY; HAYWARD, 2001). Plantas zigóticas de *P. hispidinervum* de 2 meses de idade, quando apresentavam aproximadamente oito folhas maduras, foram inoculadas por imersão de raízes "in situ" com ferimento artificial (ROMEIRO, 2001) (raízes no próprio vaso da muda) na suspensão de inóculo de cada isolado. Um tratamento testemunha constou da imersão de igual número de plantas na solução de NaCl 0,85% sem a bactéria. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições de duas plantas cada, por isolado, em casa de vegetação. A temperatura dentro da casa de vegetação variou de 18 °C a 38 °C. O experimento foi avaliado diariamente, anotando-se a incidência de plantas murchas até os 21 dias após a inoculação. O menor período de incubação e a maior incidência de plantas murchas indicaram o isolado mais virulento.

Na segunda fase dos trabalhos, quatro isolados (Rs1, Rs2, Rs3 e Rs4) obtidos de plantas com sintomas de murcha-bacteriana coletadas em Xapuri, AC, foram testados quanto à patogenicidade e virulência, utilizando-se o isolado CMEA0410 como testemunha positiva em plantas zigóticas, à semelhança do experimento anterior, porém com plantas produzidas em tubetes de 110 cm<sup>3</sup> e suspensão de células calibrada para a OD<sub>600</sub>=0,1, ca. de 1x10<sup>8</sup> ufc/ml. As avaliações foram feitas do 11º ao 14º dia após a inoculação. O índice de murcha-bacteriana (IMB) foi calculado com os dados da avaliação feita no 14º dia, pela fórmula  $IMB = \frac{\sum(CxP)}{N}$ , onde C = classe de sintoma, P = número de plantas em cada classe de sintoma e N = número total de plantas inoculadas por isolado do patógeno (EMPIG et al., 1962). Nesse ensaio, o maior IMB indicou o isolado mais virulento para ser utilizado nas pesquisas.

## Teste de patogenicidade em mudas clonais e zigóticas

### Inoculação de raízes "in situ" com pouca injúria

Foram conduzidos dois experimentos em delineamento inteiramente ao acaso, com seis repetições, contendo uma a três plantas por repetição, sendo que no experimento 2 (E2) fixou-se o número de mudas por repetição. O método utilizado foi o de inoculação de raízes "in situ", ou seja, mantendo as plantas nos recipientes usados para a sua produção. No experimento 1 (E1), as mudas em bandejas de isopor foram transferidas para a casa de vegetação sem nevoeiro, mas com sistema de resfriamento adiabático com argila expandida. O E2 permaneceu na casa de vegetação com nevoeiro intermitente e água livre constante nas folhas, além da temperatura ser mantida no intervalo de 18 °C a 38 °C pelo mesmo sistema de resfriamento. Nos experimentos 1 e 2, após as raízes terem se externado no fundo pelas cavidades das bandejas ou dos tubetes, procedeu-se a uma incisão das raízes com lâmina de bisturi e imersão das plantas por 1min na suspensão de células de *R. solanacearum*, isolado CMEA410, OD<sub>600</sub>=0,1, ca. de 1x10<sup>8</sup> ufc/ml em NaCl 0,85%,

pH=6,9±0,2, a partir de culturas multiplicadas por 48h, no escuro, a 28 °C em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970). Para tanto, foi utilizada uma bandeja de inox visando conter a suspensão de células bacterianas. Com isso, buscou-se menor drasticidade no método de inoculação, combinando pouca injúria, pouco inóculo, mudas de 60 dias e pouco tempo de exposição ao inóculo.

Nos dois experimentos, um tratamento testemunha constou na imersão de plantas em solução de NaCl 0,85%, sem a bactéria. O experimento foi acompanhado diariamente por 28 dias (E1) e 45 dias (E2). As variáveis relacionadas à doença avaliadas após a inoculação foram: murcha, amarelecimento da folha mais velha, lesão longilínea externa e lesão longilínea no xilema, no experimento 1; murcha, amarelecimento da folha mais velha, amarelecimento geral da planta, lesão longilínea externa e lesão longilínea no xilema, exsudação em tubo e exsudação em gota-d'água, no experimento 2. Em ambos os experimentos, os dados foram anotados na forma de presença ou ausência dos sintomas listados.

#### **Inoculação de raízes “ex situ” não lavadas e inoculação por picada em mudas clonais e zigóticas**

Um experimento para avaliar dois métodos de inoculação em raízes “ex situ”, ou seja, em mudas fora do recipiente de sua produção, foi realizado com cinco populações (grupos de parcelas experimentais) de plantas de pimenta-longa com 60 dias de idade, produzidas em substrato Plantmax®, sendo duas populações clonais e três zigóticas, todas com 10 plantas cada e o isolado CNPH410 de *R. solanacearum*. O experimento foi montado em casa de vegetação com cinco repetições de duas plantas cada. Os tratamentos constaram de: a) picada na axila da segunda folha em mudas clonais, seguida de deposição de gota de suspensão de bactérias; b) poda das raízes de mudas clonais no terço inferior, seguida de pulverização de suspensão bacteriana nas raízes; c) picada na axila da segunda folha em mudas zigóticas, seguida de deposição de gota de suspensão bacteriana; d) poda das raízes de

mudas zigóticas no terço inferior, seguida de pulverização de suspensão de bactérias nas raízes; e e) poda do terço inferior de raízes de mudas zigóticas, seguida de pulverização com solução de NaCl 0,85%, pH=6,9±0,2.

Para tanto, a bactéria foi reativada em meio Kelman sem TTC por 48h a 28 °C e cultivada em placas com meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 48h, a 28 °C, no escuro. Preparou-se uma suspensão de células bacterianas do isolado, em solução de NaCl 0,85%, pH=6,9±0,2, a qual foi calibrada para aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/ml ( $OD_{600}=0,1$ ). Um volume aproximado de 10 ml da suspensão de células bacterianas foi aplicado nas raízes das plantas dos tratamentos 2 e 4, utilizando-se um pulverizador manual, após as raízes serem lavadas e seccionadas com tesoura. A deposição da gota da suspensão da bactéria, ca. 10 µl, foi realizada na axila da segunda folha utilizando-se uma pipeta com ponteira de 100 µl, após picada com bisturi. Nesse experimento, avaliou-se a doença a partir dos sintomas característicos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Parâmetros para avaliação da severidade da murcha-bacteriana em experimentos de reação de plantas de *Piper hispidinervum* à *Ralstonia solanacearum*.

| Classes de severidade | Amplitude da classe de severidade (%)        | Descrição  |
|-----------------------|--|--|
| 0                     | 0=PFCSMB                                     | Plantas sem sintomas   |
| 1                     | 0<PFCSMB≤25%                                 | Plantas com sintomas de amarelecimento e/ou murcha em até 25% das folhas   |
| 2                     | 25%<PFCSMB≤50%                               | Plantas com sintomas de amarelecimento e/ou murcha em mais de 25% e até 50% das folhas                             |
| 3                     | 50%PFCSMB≤75%                                | Plantas com sintomas de amarelecimento e/ou murcha em mais de 50% e até 75% das folhas                             |
| 4                     | 75%PFCSMB≤100%                               | Plantas com sintomas de amarelecimento e/ou murcha em mais de 75% das folhas, porém vivas, sem murcha irreversível |
| 5                     | PFCSMB=100% com murcha irreversível ou morte | Plantas com sintomas de amarelecimento e/ou murcha em 100% das folhas, com murcha irreversível ou mortas           |

PFCSMB: porcentagem de folhas com sintomas da murcha-bacteriana, ou seja, folhas amarelas presas à haste, caídas ou folhas verdes murchas presas na planta.

### Inoculação de raízes “ex situ” lavadas de mudas clonais

O experimento de inoculação de raízes “ex situ”, ou seja, em mudas fora do recipiente de sua produção, foi realizado com mudas clonais de 60 dias produzidas por macroestaquia em vermiculita e irrigadas com água autoclavada durante a fase de enraizamento e brotação, para diminuir a mortalidade devido à podridão-de-estacas. O experimento constou de 29 tratamentos, sendo 28 tratamentos com plantas inoculadas e um tratamento contendo mudas clonais apanhadas ao acaso, tratadas apenas com NaCl 0,85%, pH=6,9±0,2. Quatro mudas completas e sadias de cada planta foram retiradas das bandejas, lavadas em água limpa e suas raízes foram podadas à metade do comprimento com tesoura e inoculadas separadamente por imersão rápida em suspensão de células bacterianas de *R. solanacearum* CMEA410=CNPH410 preparada em NaCl 0,85%, pH=6,9±0,2, calibrada para OD<sub>600</sub>=0,1, ca. de 1x10<sup>8</sup> ufc/ml. Em seguida, as mudas foram plantadas em vasos contendo o substrato (terra:areia:serragem

curtida; 3:1:1, v/v/v). O experimento foi irrigado diariamente, acompanhado e avaliado aos 49 dias, anotando-se os resultados de acordo com a escala para a variável PFCSMB (Tabela 1). O índice de murcha-bacteriana, IMB, foi calculado pela fórmula  $IMB = \sum(CxP)/N$ . As plantas foram classificadas quanto à reação à murcha-bacteriana de acordo com as Tabelas 1 e 2. Na Tabela 2, o índice 4 indica planta ou população altamente resistente nos tratamentos inoculados. O índice 3 indica planta ou população resistente ou baixo potencial de inóculo no tratamento, em relação ao índice 4. Desse modo, em uma população de 100 plantas de uma progênie, em que haja duas plantas com IMB=5, classe 0, e 98 plantas com IMB=1, classe 2, o IMB dessa população será 1,08, sendo classificada como medianamente resistente. Do mesmo modo, se em uma população de uma segunda progênie, são encontradas 20 plantas com IMB=2, classe 0, duas plantas com IMB=5, classe 0, e 78 plantas com IMB=1, classe 2, o IMB da população será 1,28, indicando que é muito suscetível à murcha-bacteriana, embora 78% dos indivíduos tenham IMB=1.

**Tabela 2.** Classes de reação de plantas de *Piper hispidinervum* de acordo com o índice de murcha-bacteriana pela bactéria *Ralstonia solanacearum*.

| Amplitude                   | Classe | Descrição               | Reação |
|-----------------------------|--------|-------------------------|--------|
| 0                           | 4      | Altamente resistente    | AR     |
| $0 < \text{IMB} \leq 0,5$   | 3      | Resistente              | R      |
| $0,5 < \text{IMB} \leq 1,2$ | 2      | Medianamente resistente | MR     |
| $1,2 < \text{IMB} \leq 1,9$ | 1      | Muito suscetível        | MS     |
| $1,9 < \text{IMB} \leq 5,0$ | 0      | Altamente suscetível    | AS     |

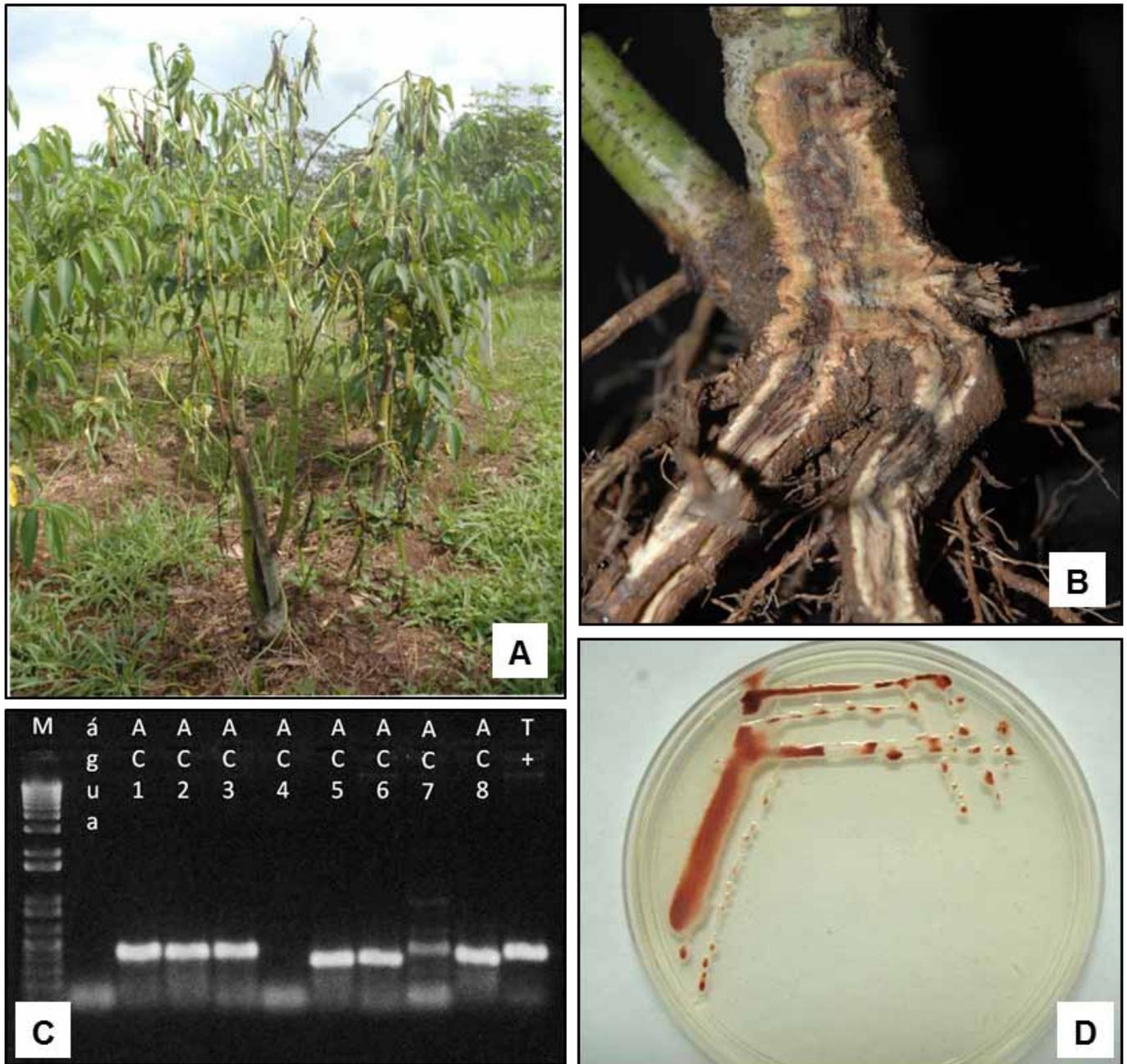
### Inoculação de raízes “ex situ” não lavadas de mudas zigóticas

O experimento foi realizado com 100 mudas zigóticas produzidas em substrato Plantmax® contendo fertilizante Osmocote® 1% (v/v) em tubetes de 110 cm<sup>3</sup> irrigadas com água limpa, tratada com cloro, oriundas de uma população submetida à seleção massal para produção de safrol, resultante de cruzamentos ao acaso de população F2, no campo experimental da Embrapa Acre. As mudas com 60 dias de idade tiveram as raízes seccionadas a aproximadamente 1/3 do comprimento e foram inoculadas separadamente por imersão do cilindro formado pelas raízes e substrato na suspensão de células de *Ralstonia solanacearum*, Rs1, recém-obtida do campo, preparada em NaCl 0,85%, pH=6,9±0,2, calibrada para OD<sub>600</sub>=0,1; ca. de 1x10<sup>8</sup> ufc/ml. Em seguida, as mudas foram plantadas em vasos de 500 cm<sup>3</sup> com substrato de terra:areia:serragem curtida, 3:1:1, v/v/v, autoclavado. Aos 28 dias, o experimento foi avaliado de acordo com a Tabela 1.

## Resultados e discussão

### Obtenção de *R. solanacearum*, testes de patogenicidade e seleção de bactérias

O estudo da patogenicidade de isolados de RS obtidos de plantas de pimenta-longa com sintomas da murcha-bacteriana (Figura 1A e 1B), utilizando mudas, possibilitou identificar e selecionar aqueles mais virulentos a partir da visualização do progresso da doença. A identificação do isolado mais virulento selecionado no primeiro experimento indicou tratar-se de *Ralstonia solanacearum* biovar 1 (GONÇALVES et al., 2012) (Figura 1C). A bactéria foi reisolada das plantas com sintomas de murcha (Figura 1D).



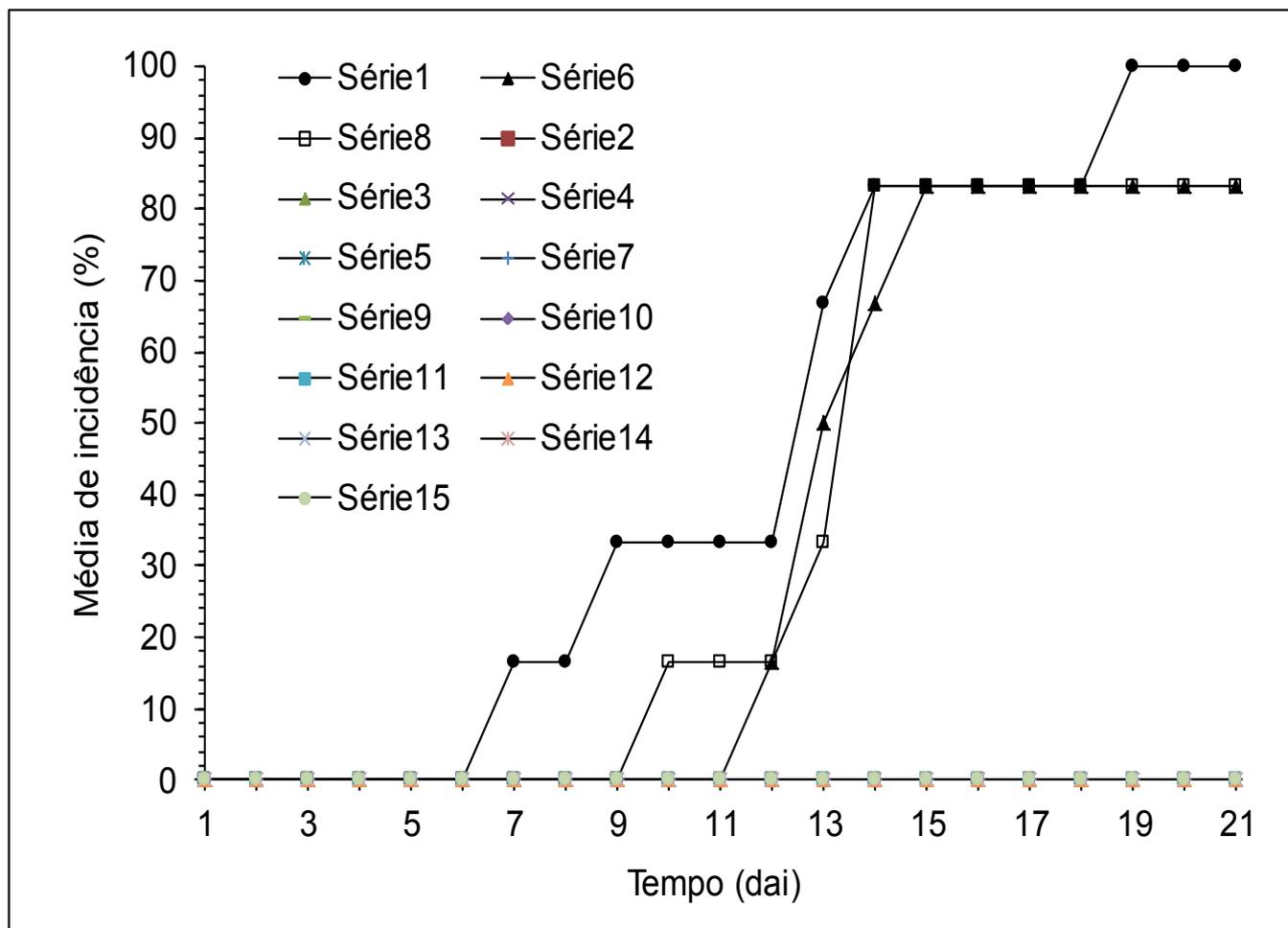
Fotos: Rivadave Coelho Gonçalves (A, B e D); José Rogério de Oliveira (C)

**Figura 1.** Planta de *Piper hispidinervum* com murcha-bacteriana (A); detalhe de raízes e colo de planta atacados pela bactéria (B); gel de agarose com DNA de bactérias submetido à reação de PCR com primers 759 e 760 (OPINA et al., 1997) (C)\*; colônias da bactéria em meio Kelman+TTC (D).

\*M = marcador de 1kb; T = *R. solanacearum* (controle positivo); água = água miliQ (controle negativo); AC 1 a 3 = marcas de DNA de *Ralstonia solanacearum* de pimenta-longa; AC4 = marcas de DNA de bactéria isolada de tomateiro; AC 5 a 8 = marcas de DNA de bactérias isoladas de pimentão.

Os tratamentos com os isolados IPL1R, de raiz, e IPL3C e IPL4C, de caule, resultaram em incidência maior ou igual a 80% de plantas com murcha-bacteriana. Nos demais tratamentos, inclusive testemunha, não houve plantas com sintomas da doença (Figura 2). O tratamento com o isolado IPL1R apresentou menor período de incubação, em

relação aos demais. Esse isolado foi selecionado para os testes posteriores e, na coleção de microrganismos na Embrapa Acre, foi codificado como CMEA0410 (=CNPH410).



**Figura 2.** Gráfico do progresso de murcha-bacteriana em plantas zigóticas de pimenta-longa inoculadas com diferentes isolados de bactérias\*.

\*Os tratamentos com resultado positivo para a patogenicidade indicados por série são: IPL1R = série 1, IPL3C = série 8, IPL4C = série 6. As demais séries correspondem aos isolados não patogênicos e à testemunha negativa.

Os resultados do primeiro experimento com 14 isolados permitiram também verificar que aqueles obtidos do caule de plantas infectadas causam a murcha quando inoculados nas raízes com ferimento, a exemplo dos isolados IPL3C e IPL4C. Na segunda seleção de isolados, utilizando-se aqueles obtidos de plantio em Xapuri e o isolado submetido ao armazenamento e repicagens sucessivas, constatou-se que dois isolados recém-

obtidos do campo foram mais agressivos do que o CMEA410=CNPH410, e dois outros também recém-obtidos foram menos agressivos do que aquele utilizado como testemunha positiva. O IMB final calculado na avaliação de 14 dias após a inoculação (dai) para o isolado Rs1 foi 0,69 e para o Rs2 foi 0,5. *Ralstonia solanacearum*, CNPH410, apresentou IMB=0,17 aos 14 dai nesse experimento (Figura 3).

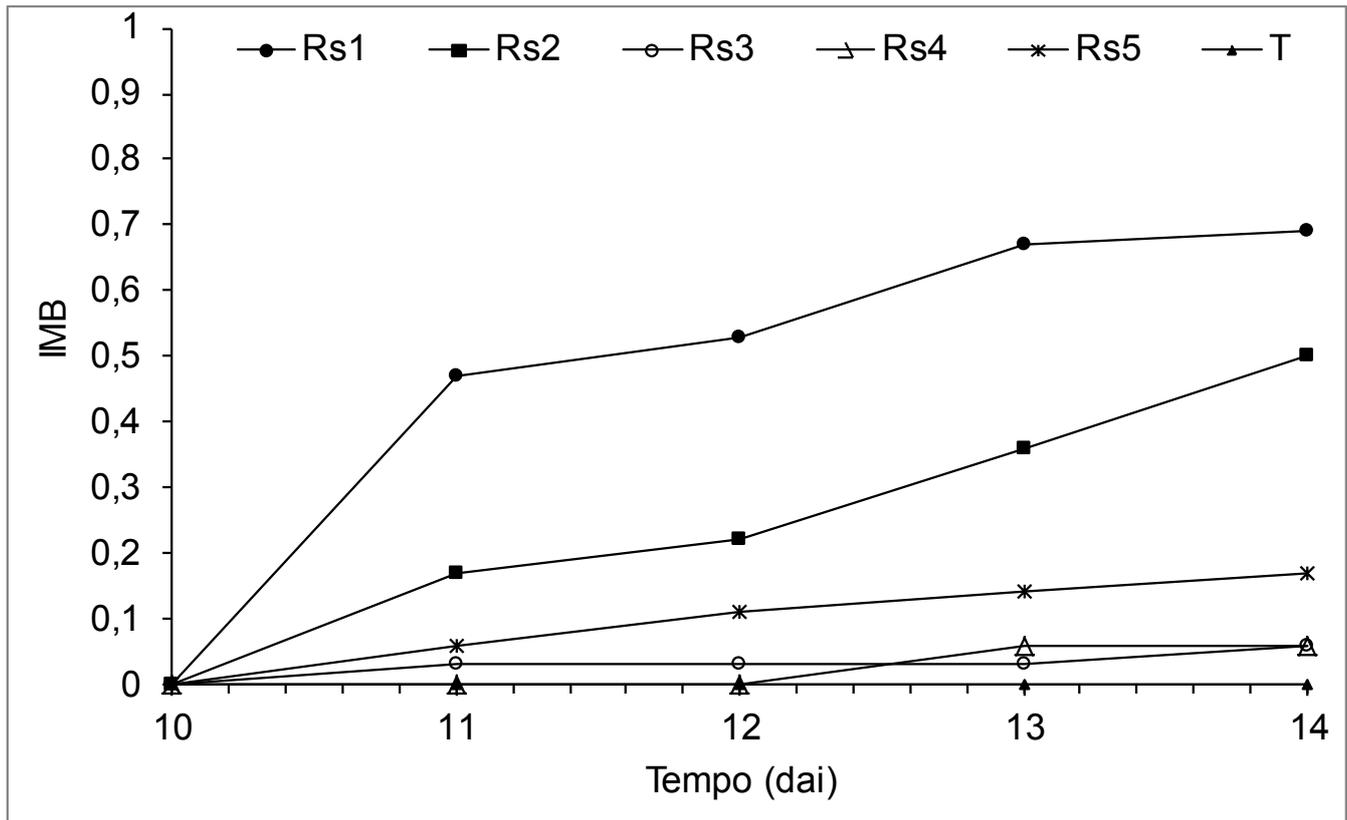


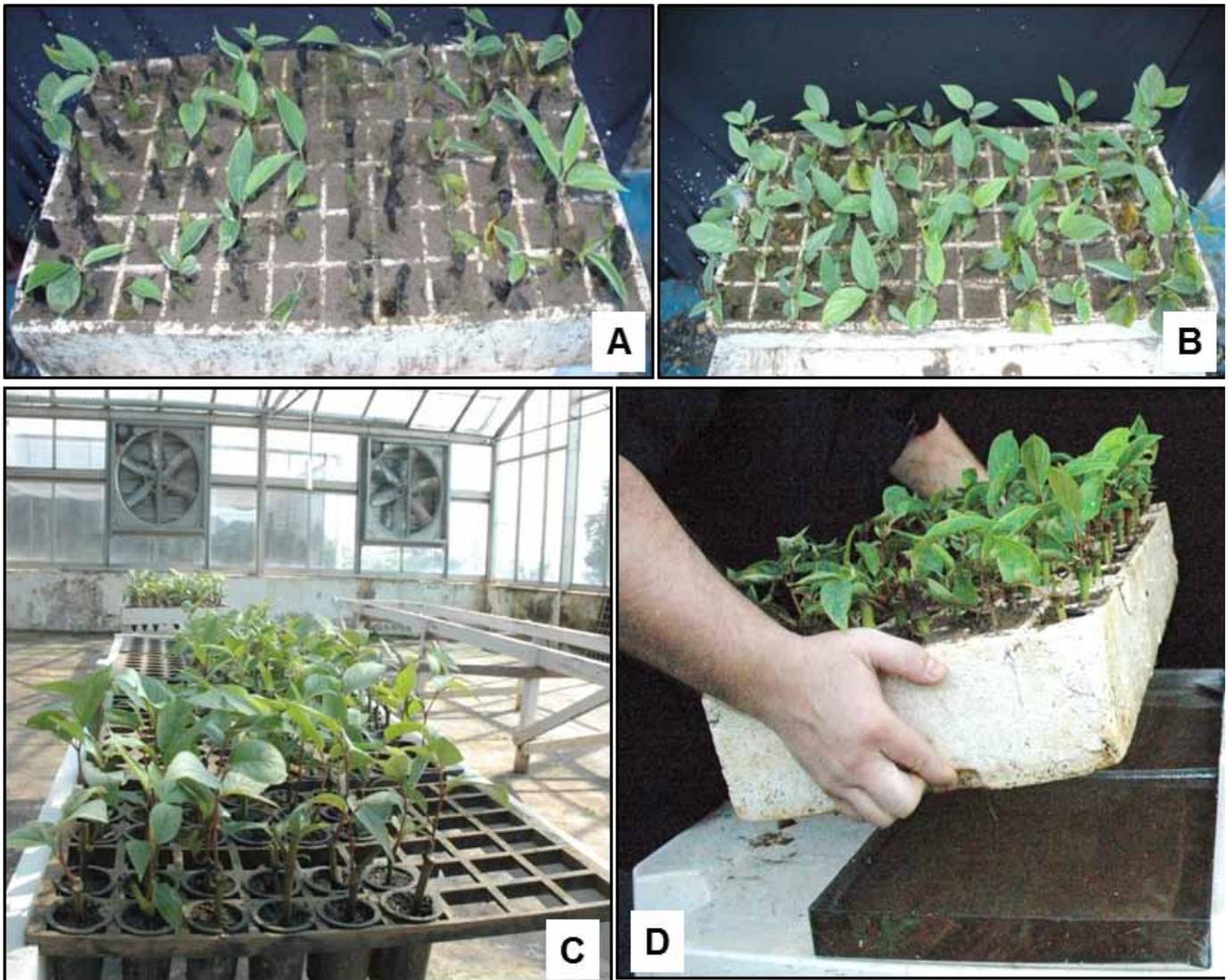
Figura 3. Gráfico do progresso da murcha-bacteriana em plantas zigóticas de pimenta-longa\*.

\*Tratamento testemunha positiva: isolado Rs5 = CMEA410, *R. solanacearum*; tratamento testemunha negativa: T = solução de NaCl 0,85%; Rs1, Rs2, Rs3 e Rs4: novos isolados de bactéria de pimenta-longa.

A análise por meio da média da incidência de plantas murchas ou pelo cálculo do IMB permitiu a seleção de isolados para estudos de resistência. A avaliação das plantas e o cálculo da média da incidência de plantas murchas são mais fáceis e indicam, precisamente, se na interação planta x patógeno há ou não o sintoma final imediatamente antes da morte da muda, ou seja, a murcha irreversível, mesmo que em pequena proporção na parcela. No entanto, a avaliação por meio da escala de notas e o cálculo do IMB constituem método mais detalhado, o qual permite perceber pequenas variações na interação planta x patógeno, dentro e entre parcelas.

### Inoculação de raízes “in situ” com pouca injúria

A produção de mudas clonais de pimenta-longa por macroestaquia em areia lavada (Figura 4A e B) e em substrato Plantmax® (Figura 4C) permitiu a inoculação das plantas nas próprias bandejas, por imersão rápida em suspensão de células bacterianas (Figura 4D).



**Figura 4.** Preparo de mudas de pimenta-longa para inoculação de *Ralstonia solanacearum* em bandeja com areia (A e B); em bandeja com substrato de composto orgânico (C); e mudas sendo inoculadas (D).

Na Figura 5A, observa-se a diferença entre os tratamentos inoculados dos clones H60008 (bandeja à esquerda) e H260001 (bandeja à direita). As mudas inoculadas apresentaram sintoma de podridão ascendente da estaca provavelmente

devido à mortalidade de raízes (Figura 5B) e as mudas saudáveis de tratamento não inoculado apresentaram sistema radicular fasciculado bem-desenvolvido e saudável (Figura 5C).



Fotos: Rivadalve Coelho Gonçalves

**Figura 5.** Bandejas com mudas inoculadas e não inoculadas dos clones H060008 (à esquerda) e H260001 (à direita), indicando uma maior tolerância do clone H260001 à murcha-bacteriana (A); muda com sintoma de podridão devido à morte progressiva de raízes (B); e mudas com sistema radicular saudável (C).

No experimento 2, as mudas do tratamento testemunha permaneceram saudas com raízes brancas e as mudas inoculadas apresentaram reduzido número de raízes. Pelo teste em tubo de ensaio e em lâmina de microscopia com água foi verificada a presença de bactérias por exsudação de pus bacteriano (Tabela 3). Nas estacas em que não se constatou a exsudação tanto em tubo quanto em gota na lâmina de microscopia, foram

observadas descoloração vascular, estruturas semelhantes a tiloses nas células e presença de células bacterianas. A descoloração vascular é característica de invasão dos tecidos por *R. solanacearum* (WINSTEAD; KELMAN, 1952) e, quando seguida da confirmação da presença do patógeno, constitui-se uma técnica bastante segura de diagnóstico da doença.

**Tabela 3.** Padrão de reação de mudas clonais de pimenta-longa produzidas em substrato S2, inoculadas com *Ralstonia solanacearum*, e avaliadas aos 45 dias.

| Clones  | Plantas inoculadas |     |   |    |    |     |     | Plantas não inoculadas |     |   |    |    |     |     |
|---------|--------------------|-----|---|----|----|-----|-----|------------------------|-----|---|----|----|-----|-----|
|         | AFV                | APF | M | LE | DV | TET | TEG | AFV                    | APF | M | LE | DV | TET | TEG |
| H010001 | +                  | +   | - | -  | +  | +   | +   | -                      | -   | - | -  | -  | -   | -   |
| H010002 | +                  | +   | - | -  | +  | +   | +   | -                      | -   | - | -  | -  | -   | -   |
| H260001 | +                  | +   | - | -  | +  | +   | +   | -                      | -   | - | -  | -  | -   | -   |
| H170001 | +                  | +   | - | -  | +  | +   | +   | -                      | -   | - | -  | -  | -   | -   |
| H110011 | +                  | +   | - | -  | +  | +   | +   | -                      | -   | - | -  | -  | -   | -   |
| H200006 | +                  | +   | - | -  | +  | +   | +   | -                      | -   | - | -  | -  | -   | -   |
| H050004 | +                  | +   | - | -  | +  | +   | +   | -                      | -   | - | -  | -  | -   | -   |
| H120012 | +                  | +   | - | -  | +  | +   | +   | -                      | -   | - | -  | -  | -   | -   |
| H130006 | +                  | +   | - | -  | +  | +   | +   | -                      | -   | - | -  | -  | -   | -   |
| H060008 | +                  | +   | - | -  | +  | +   | +   | -                      | -   | - | -  | -  | -   | -   |

AFV = amarelecimento da folha mais velha; APF = amarelecimento progressivo das folhas maduras; M = murcha; LE = lesão longilínea externa; DV = descoloração vascular; TET = teste de exsudação em tubo de ensaio; TEG = teste de exsudação em gota.

Estudos sobre a murcha-bacteriana em testes de curto prazo em casa de vegetação, com mudas clonais de 60 dias de idade produzidas por macroestaquia em areia, podem conduzir à falsa evidência de resistência genética devido à profusão de raízes novas em compensação às raízes apodrecidas durante a evolução da doença. Esse fenômeno acontece com maior expressão em alguns clones do que em outros e pode ser devido a três fatores: a) fatores genéticos dos clones para a característica produção de raízes; b) baixo potencial inicial de inóculo estabelecido pela pequena quantidade de raízes inoculadas, com vistas a evitar a drasticidade do método; e c) substrato altamente friável. Contudo, a mortalidade de raízes e a necrose nos vasos da muda já indicam o perfeito estabelecimento do patógeno e o desenvolvimento da doença, a qual pode matar a planta no campo, posteriormente. Há que se estudar se essa maior capacidade de

produção de raízes de algumas plantas constitui vantagem para a sobrevivência em campo com *R. solanacearum*.

Entre os métodos testados na produção da muda clonal para ensaios de inoculação, aquele que faz uso de tubetes e substrato organomineral Plantmax®, S2, é mais vantajoso por permitir de modo fácil e rápido a seleção e o rearranjo das melhores mudas nas bandejas antes da inoculação, dando condições de fixar igual número de plantas por repetição, sem necessitar de grande quantidade de espaço em casa de vegetação. A não ocorrência de mortalidade nas plantas inoculadas indica que os métodos testados são de baixa drasticidade e condicionam um baixo potencial de inóculo nas mudas clonais. Portanto, deve-se optar por um método em que haja injúria artificial na maioria das raízes disponíveis na planta, maior quantidade de inóculo por muda e

mais tempo de exposição ao inóculo para se ter mudas completamente murchas em estágio 5, de acordo com a escala de avaliação, no tratamento testemunha positiva. Em estudos de seleção de plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.) para resistência à murcha-bacteriana, o método de imersão de raízes de mudas plantadas em bandejas na suspensão de células bacterianas por 10min, seguido de irrigação de cada muda com 3 ml da suspensão, foi eficiente ao propósito pretendido, utilizando-se plântulas zigóticas em estágio inicial de desenvolvimento submetidas ao pré-tratamento de um dia sem irrigação (LIMA; LOPES; MELO, 1996). Outros pesquisadores também têm adotado a abordagem de inoculação direta e/ou indireta de *R. solanacearum* nas raízes em testes de patogenicidade e avaliação de resistência genética com resultados positivos (DIANESE; DRISTIG, 1993; QUEZADO-SOARES; LOPES, 1994). Lopes & Boiteux (2012) descrevem nove passos fundamentais para um bom método de identificação de fontes de resistência genética em plantas. Dentre os métodos ilustrados, a inoculação natural nas raízes pelo plantio de mudas em solo infestado, a deposição de suspensão bacteriana em torno de mudas individuais, a pulverização de suspensão de células bacterianas diretamente no sistema radicular de mudas individuais sem ferimento e a mergulhia das mudas com ferimentos na suspensão de bactérias constituem possibilidades para trabalhos com murcha-bacteriana em diversos hospedeiros (LOPES; BOITEUX, 2012). A inoculação em raízes sem ferimentos em mudas do tipo plântula, com concentração de  $1 \times 10^8$  ufc/ml, é classificada como método suave e muito efetivo na separação de plantas resistentes e suscetíveis para a resistência quantitativa (LOPES; BOITEUX, 2012) em idade apropriada ao plantio

no campo. Desse modo, a inoculação de mudas no estágio posterior ao de plântula, pela imersão de raízes com ferimentos e suspensão de células a  $1 \times 10^8$  ufc/ml, constitui um método intermediário quanto à drasticidade, sendo muito efetivo ao mesmo propósito, à semelhança do método anterior, por não permitir a ocorrência de escape.

## Inoculação de raízes “ex situ” não lavadas e inoculação por picada

O teste dos métodos inoculação por picada (Figura 6A e B) e inoculação de raízes não lavadas, utilizando-se mudas clonais e zigóticas e o isolado de *R. solanacearum* (CMEA410=CNPH410) de pimenta-longa, resultou em sintomas pouco expressivos da murcha-bacteriana. A não ocorrência de sintomas na parte aérea da maioria das plantas inoculadas com *R. solanacearum* (CMEA410=CNPH410) até os 28 dias (Tabela 4) pode ser devido à perda de virulência do isolado, que, em experimento anterior, apresentou resultado satisfatório. Nesse experimento, 50% de plantas do tratamento 1 (por picada) em mudas clonais apresentaram sintomas de lesão escura externa próxima ao ponto de inoculação. Desse modo, concluiu-se que, apesar de manter a patogenicidade, o isolado teve um comportamento de baixa virulência. Optou-se por utilizar esse isolado no ensaio seguinte, uma vez que foi obtido de pimenta-longa e tem identificação ao nível de espécie, adotando-se a imersão de raízes na suspensão de células bacterianas. Com esse novo ensaio buscou-se também averiguar a repetibilidade do comportamento de baixa virulência do isolado, apresentado no experimento anterior, para a tomada de decisão sobre o seu uso nos próximos experimentos.



**Figura 6.** Inoculação por picada (A) e deposição de gota de suspensão de bactérias na axila da segunda folha após ferimento com bisturi (B).

**Tabela 4.** Incidência e frequência de plantas com sintomas de murcha-bacteriana em mudas clonais e zigóticas de pimenta-longa aos 28 dias.

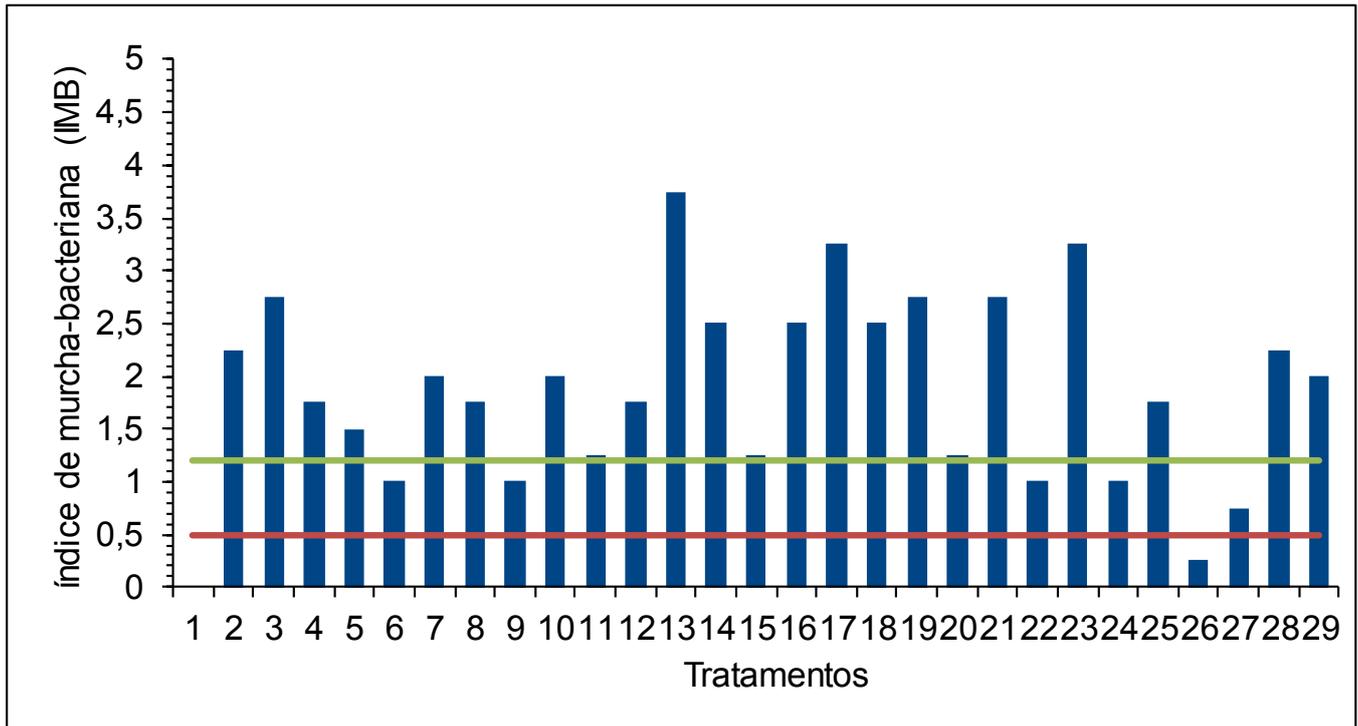
| Tratamentos | Repetições |    |    |    |    |    |    |    |    |    | Fr(%) |
|-------------|------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|
|             | r1         |    | r2 |    | r3 |    | r4 |    | r5 |    |       |
|             | p1         | p2 | p1 | p2 | p1 | p2 | p1 | p2 | p1 | p2 |       |
| 1           | 1          | 1  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 1  | 1  | 0  | 50    |
| 2           | 0          | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 10    |
| 3           | 0          | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0     |
| 4           | 0          | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0     |
| 5           | 0          | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0     |

p1 e p2: planta 1 e planta 2 da parcela experimental.

### Inoculação de raízes "ex situ" lavadas em população clonal

O índice de murcha-bacteriana, IMB, foi variável entre os clones analisados (Figura 7). O tratamento 26, referente à planta H689902, teve o menor IMB, abaixo de 0,5. Outras oito plantas resultaram em IMB menor ou igual a 1,2. O IMB menor ou igual a 0,5 indica uma planta da classe 3, ou seja, resistente. O IMB maior que 0,5 e menor ou igual a 1,2 indica uma planta da classe 2, ou seja, medianamente resistente. As plantas referentes aos tratamentos 11, 15 e 20 apresentaram IMB igual a 1,25, sendo denominadas muito suscetíveis

(classe 1). As demais plantas foram classificadas como altamente suscetíveis, por estarem na classe 0. Esses resultados mostram que é possível avaliar a resistência de pimenta-longa em grande escala de plantas, em casa de vegetação, por esse método. Devem-se, contudo, incluir isolados de alta e baixa virulência nos experimentos. O IMB pode ser utilizado diretamente para classificar as plantas quanto à resistência genética (MORGADO; LOPES; TAKATSU, 1994). No presente trabalho, procedeu-se à classificação das plantas em classes de resistência após a avaliação da doença e cálculo do IMB, utilizando-se os critérios estabelecidos na Tabela 2.



**Figura 7.** Reação de plantas de diferentes acessos de pimenta-longa a isolado pouco virulento de *R. solanacearum*, em casa de vegetação.

### Inoculação de raízes “ex situ” não lavadas em população zigótica

O método de inoculação de raízes em mudas “ex situ”, ou seja, muda retirada do recipiente de produção, foi o mais apropriado para a avaliação das plantas. O resultado da análise dos dados obtidos no experimento de inoculação da população de plantas submetidas a primeira seleção massal para a produção de safrol revelou um IMB médio de 4,94 com desvio padrão de 0,13 no tratamento inoculado e IMB médio zero no tratamento não inoculado aos 28 dias. Os dados de

frequência relativa mostram que 5% dos indivíduos apresentaram nota 2 de severidade, enquanto 95% obtiveram nota 5. Desse modo, a população pode ser classificada como altamente suscetível, uma vez que mais de 90% das plantas inoculadas com *R. solanacearum* morreram (Figura 8). O método que faz uso das técnicas descritas e aplicadas nesse experimento, aqui definido como inoculação de raízes “ex situ”, é eficiente para ser aplicado em estudos que visam à seleção de plantas de *P. hispidinervum* com resistência genética em curto período de tempo, em grande escala, de modo seguro, porque elimina a possibilidade de ocorrência de escape.



**Figura 8.** Plantas de *Piper hispidinervum* não inoculadas e saudáveis (A) e plantas inoculadas, doentes e mortas pela murcha-bacteriana (B).

## Resumo dos resultados

Diante dos resultados encontrados, descreve-se, a seguir, o método considerado apropriado para dar prosseguimento aos estudos de seleção de *Piper hispidinervum*, denominado inoculação de raízes "ex situ". Por esse método, os valores de IMB correlacionam-se inversamente à resistência genética das plantas.

1) Produzir as mudas clonais por macroestaquia ou mudas zigóticas por sementes em tubetes rígidos de 110 cm<sup>3</sup> ou 130 cm<sup>3</sup>, com substrato organomineral fino livre de patógenos, dispostos em bandejas, em canteiros suspensos, com água limpa e livre de patógenos. O tempo de produção da muda é de 60 dias a contar da data de semeio ou plantio das estacas.

2) Reativar a bactéria *Ralstonia solanacearum* pura em meio Kelman com TTC a 0,0005%, à temperatura de 28 °C por 72h.

3) Semear a bactéria *Ralstonia solanacearum* a partir de colônias típicas puras, em 10 placas de Petri estéreis com meio 523, utilizando alça de platina, e armazenar as placas à temperatura de 28 °C por 48h.

4) Ressuspender as células com auxílio de uma alça de Drigalski em cerca de 5,0 ml de solução de NaCl 0,85%, pH=6,9±0,2, esterilizada por autoclavagem a 120 °C, 1 atm, por 15min, e transferir a suspensão para erlenmyer de 500 ml contendo a mesma solução com uma pipeta automática e ponteira de 1 ml, dentro da câmara de fluxo vertical de ar.

5) Repetir o passo 4 com as demais placas nas quais a bactéria tenha crescido até obter uma suspensão pouco turva.

6) Agitar manualmente o frasco de modo a homogeneizar a suspensão e pipetar essa suspensão pouco turva para uma cubeta limpa. Mensurar a densidade ótica pela absorbância em um espectrofotômetro com filtro para 600 nm calibrado e zerado com a solução de NaCl 0,85% sem a bactéria.

7) Anotar a leitura, dispensar a suspensão em frasco apropriado para descarte e repetir a operação.

8) Caso a leitura de absorbância em 600 nm seja  $OD_{600}=0,1$  (densidade ótica igual a 0,1), o que corresponde a ca. de  $1 \times 10^8$  ufc/ml, levar a suspensão para inocular, caso contrário, fazer os cálculos para: a) suspensão com  $OD_{600} < 0,1$ : aumentar a quantidade de células bacterianas na suspensão; ou b) suspensão com  $OD_{600} > 0,1$ : diluir a suspensão de trabalho, usando a fórmula  $C1 \times V1 = C2 \times V2$ , em que: V1 é o volume da suspensão inicial, C1 é a concentração da suspensão inicial, V2 é o volume final e C2 a concentração final da suspensão 2 ou suspensão final desejada.

9) Manter a suspensão calibrada em local fresco e transferir cerca de 100 ml para um béquer, para a inoculação.

10) Retirar as mudas dos tubetes, realizar a poda das raízes a aproximadamente 1/3 do comprimento, imergir as raízes no inóculo de bactérias e transplantar imediatamente para vasos de 500 cm<sup>3</sup> com substrato à base de solo, areia e serragem curtida, 3:1:1, v/v/v, autoclavado, por duas vezes, 2,5h por vez, a 1 atm, 120 °C com intervalo de 48h.

11) Irrigar o solo com água limpa, após a inoculação, manter as plantas à temperatura de 25 °C ± 2 °C e diariamente úmidas.

12) Observar as plantas diariamente, quanto aos sintomas, e anotar a classe de sintomas de acordo com a Tabela 1.

13) Avaliar as plantas aos 28 dias utilizando o critério de incidência de murcha-bacteriana para aquelas que apresentarem nota 3 a 5, atribuindo 1 para resultado positivo e 0 para resultado negativo, e registrar as notas de severidade em cada planta de acordo com a Tabela 1.

14) Calcular a média e o total da incidência de murcha-bacteriana nas parcelas, bem como o IMB.

15) Analisar os dados obtidos das parcelas e populações em estudo de modo a classificar as plantas de acordo com a resistência genética.

## Conclusões

O método de inoculação e avaliação da doença murcha-bacteriana descrito é o mais apropriado para estudos da interação de *Ralstonia solanacearum* com *Piper hispidinervum* visando à classificação de plantas ou populações em diferentes classes de resistência. O uso de isolado com baixa virulência mostrou diferenças na reação de resistência de plantas utilizadas como parentais no programa de melhoramento genético, mas a progênie de polinização aberta desses parentais, quando confrontada com isolado agressivo de *R. solanacearum*, mostrou-se muito suscetível à murcha-bacteriana. O método desenvolvido permite avaliar a resistência genética em mudas com idade fisiológica semelhante à das mudas utilizadas para plantio no campo, sem risco de escape.

## Referências

- CAVALCANTE, M. J. B.; LOPES, C. A.; MENDONÇA, H. A.; LEDO, F. J. S. Screening long pepper (*Piper* spp.) for resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. Minnesota: APS Press, 2005. p. 269-273.
- DENNY, T. P.; HAYWARD, A. C. Gram-negative bacteria. F: *Ralstonia*. In: SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3th ed. Minnesota: APS Press, 2001. 373 p.
- DIANESE, J. C.; DRISTIG, M. C. G. Screening eucalyptus selections for resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. In: HARTMAN, G. L.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial wilt: Proceedings of an international conference held at Kaohsiung, Taiwan, 28-31 October 1992**. Canberra: ACIAR, 1993. p. 206-210. (ACIAR Proceedings).
- EMPIG, L. T.; CALUB, A. G.; KATIGBAK, M. M.; DEANON JR., J. R. Screening tomato, eggplant and pepper varieties and strains for bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) resistance. **Philippine Agriculturist**, Los Baños, v. 46, p. 303-314, 1962.
- GONÇALVES, R. C.; VALLIM, J. H.; LOPES, C. A.; OLIVEIRA, J. R. Murcha-bacteriana em *Piper hispidinervum* no Acre. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 37, 2012. (Resumo, 257). 1 CD-ROM. Suplemento. Edição do 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2012, Manaus.
- KELMAN, A. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology**, Minnesota, v. 44, n. 12, p. 693-695, 1954.
- KADO, C. I.; HESKETT M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Minnesota, v. 60, n. 6, p. 969-976, June 1970.
- LIMA, M. F.; LOPES, C. A.; MELO, P. E. Seleção de genótipos de batata no estágio de plântulas a murcha bacteriana para a resistência à murcha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 4, p. 249-257, abr. 1996.
- LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S. Melhoramento para resistência a doenças bacterianas. In: FRITSCHENETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de plantas para condições de estresses bióticos**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2012. p. 61-68.
- LOPES, C. A.; POLTRONIERI, L. S.; ALBUQUERQUE, F. C.; TRINDADE, D. R. *Piper hispidinervum*, a new host of bacterial wilt. **Bacterial Wilt Newsletter**, Canberra, n. 15, p. 4, 1998.
- MORGADO, H. S.; LOPES, C. A.; TAKATSU, A. Avaliação de genótipos de berinjela para resistência à murcha-bacteriana. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 10, n. 2, p. 77-79, 1992.
- OPINA, N.; TAVNER, F.; HOLLWAY, G.; WANG, J.-F.; LI, T.-H.; MAGHIRANG, R.; FEGAN, M.; HAYWARD, A. C.; KRISHNAPILLAI, V.; HONG, W. F.; HOLLOWAY, B. W.; TIMMIS, J. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, Malaysia, v. 5, n. 1, p. 19-30, apr. 1997.

QUEZADO-SOARES, A. M.; LOPES, C. A.  
Resistência de genótipos de tomateiro a biovars I e III de *Pseudomonas solanacearum*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 12, n. 2, p. 161-165, 1994.

ROMEIRO, R. da S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2001. 279 p.

WINSTEAD, N. N.; KELMAN, A. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, Minnesota, v. 42, p. 628-634, 1952.

### Comunicado Técnico, 185

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

#### Embrapa Acre

**Endereço:** Rodovia BR 364, km 14, sentido Rio Branco/Porto Velho, Caixa Postal 321, Rio Branco, AC, CEP 69900-056

**Fone:** (68) 3212-3200

**Fax:** (68) 3212-3284

<http://www.embrapa.br/acre>

<https://www.embrapa.br/fale-conosco>

**1ª edição**

1ª impressão (2014): 300 exemplares



### Comitê de publicações

**Presidente:** José Marques Carneiro Júnior

**Secretária-Executiva:** Cláudia Carvalho Sena

**Membros:** Carlos Maurício Soares de Andrade, Clarissa Reschke da Cunha, José Tadeu de Souza Marinho, Lúcia Helena de Oliveira Wadt, Luciano Arruda Ribas, Patrícia Silva Flores, Rodrigo Souza Santos, Tádário Kamel de Oliveira, Tatiana de Campos

### Expediente

**Supervisão editorial:** Cláudia C. Sena/Suely M. Melo

**Revisão de texto:** Cláudia C. Sena/Suely M. Melo

**Normalização bibliográfica:** Renata do Carmo F. Seabra

**Editoração eletrônica:** Bruno Imbroisi