

Comunicado Técnico 11

Embrapa
Hortaliças

PROTOCOLO DE TECNOLOGIA: Seleção para resistência a doenças em hortaliças

Jorge Roland Menezes dos Santos
Engenheiro Agrônomo, M.S. Fitopatologia

1. Etapas para a seleção de fontes de resistência a doenças

Termos para indexação: Hortaliças; seleção; doença; resistência.

Index terms: Vegetables; selection; diseases; resistance.

O desenvolvimento e/ou a seleção de cultivares resistentes a doenças em hortaliças (Fig. 1 a 4) geralmente requer a avaliação permanente de acessos de bancos de germoplasma, que normalmente contém variedades comerciais, genótipos silvestres e linhagens segregantes. Esse trabalho demanda todavia o conhecimento prévio de várias etapas do processo de seleção de fontes de resistência, as quais consistem principalmente: no estudo da **variabilidade do patógeno**; no conhecimento do tipo de **herança da resistência genética** da planta; na definição da **técnica de produção do inóculo**; e no estabelecimento da **metodologia de seleção**.

Para o estudo da **variabilidade do patógeno** é necessário inicialmente que se faça uma coleção ampla de isolados em nível local, regional e se possível até nacional, desde que tomados os devidos cuidados para não

introduzir patógenos exóticos na região de trabalho. Para isso, é fundamental usar uma boa técnica de manutenção desses isolados (Fennel, 1960), de modo a resguardar a sua integridade morfológica e fisiológica. Deve-se conhecer e avaliar a variabilidade do patógeno em relação à existência de diferentes espécies (Santos, 1995c; Nagata *et al.*, 1995), "formae specialis" (Martyn, 1996), raças (Santos *et al.* 1993a; Tooley & Fry, 1968), biovars (Hayward, 1994), estirpes (Boiteux *et al.*, 1996), etc e qual a sua distribuição no país ou nas regiões de cultivo (Nagata *et al.*, 1995; Kurozawa & Pavan, 1982). Deve-se também avaliar a virulência dos isolados (Santos *et al.*, 1993a; Bittencourt & Oliveira, 1984; Lima & Lopes, 1998) selecionados para uso nas inoculações.

O conhecimento do tipo de **herança da resistência genética** na planta (monogênica, oligogênica ou poligênica) é fundamental no processo de seleção, principalmente na determinação da expressão dos sintomas da doença (Van der Plank, 1968). Esse conhecimento é necessário para que se

possa estabelecer critérios para a avaliação da doença, bem como na caracterização de raças dos isolados do patógeno (Boiteux *et al.*, 1996).

A definição da **técnica de produção do inóculo** requer principalmente o conhecimento da melhor forma de isolamento (Agrios, 1997) e da multiplicação em massa do patógeno (Santos, 1995b; Shahim & Shepard, 1979), para que se possa produzir inóculo suficiente para proceder à inoculação de um grande número de plantas.

O estabelecimento da **metodologia de seleção** adequada para o patossistema de trabalho, normalmente consiste na definição e padronização do **método de inoculação** e do **método de avaliação da doença**.

O **método de inoculação** mais adequado geralmente varia com as exigências de cada patossistema, bem como em função das facilidades e infra-estrutura disponíveis. A inoculação pode ser feita: diretamente no campo (Santos *et al.*, 1993b); sob condições controladas em câmara de crescimento ou *in vitro* em laboratório; ou

em condições semi-controladas em casa-de-vegetação ou em telado. Em todos os casos, é necessário o conhecimento preliminar e/ou o ajuste prévio de vários fatores, dentre eles: a calibração da concentração ideal de inóculo (Morgado *et al.*, 1994; Reifschneider *et al.*, 1986); a definição da idade ideal da planta (Santos, 1995d); e principalmente proporcionar condições edafoclimáticas favoráveis à infecção durante a inoculação (Heber, 1994; Vale & Zambolim, 1996). Diferentes locais ou partes da planta podem ser utilizados para a inoculação, tais como: "callus" inoculado com o patógeno (Shepherd, 1986) ou com filtrados excretados em meio de cultura líquido (Daub, 1986; Bulk, 1991); sementes inoculadas em papel de germinação (Menezes & Dianese, 1988) ou em meio de cultura *in vitro* (Sanchez *et al.*, 1975); solo ou substrato de cultivo (Pita *et al.*, 1986); as raízes (Santos, 1997); o colo da planta (Reifschneider *et al.*, 1986); os cotilédones (Santos, 1995a; Santos, 1996); as axilas (Morgado *et al.*, 1994); as hastes e caules (Pochard & Chambonnet, 1971); as folhas (Santos, 1997); os frutos (Henz *et al.*, 1992), etc. Dentre as formas de inoculação, pode-se usar: inoculação do solo ou do substrato através de rega com suspensão do patógeno (Charchar, 1985; Reifschneider *et al.*, 1986) ou por mistura e incorporação do inóculo (Pita *et al.*, 1986; Santos & Pessoa, 1994); imersão das raízes (Santos *et al.*, 1993a) ou da planta inteira (Cruz *et al.*, 1991) em suspensão; pulverização da parte aérea (Santos, 1997); corte do tecido com tesoura contaminada (Morgado *et al.*, 1994); inoculação com vetor (Piven *et al.*, 1995); inoculação mecânica por contato (Nagata *et al.*, 1995); injeção com alfinete ou palito (Morgado *et al.*, 1994; Henz *et al.*, 1992), etc.

O método de avaliação pode ser feito através da determinação da incidência, mediante a quantificação da percentagem de plantas doentes ou mortas após a inoculação (Reifschneider *et al.*, 1986; Santos & Pessoa, 1994) ou também através da determinação da severidade, mediante a avaliação: do número de lesões (Santos, 1997); da percentagem de área foliar doente (Boff *et al.*, 1991; James, 1971); do tamanho da lesão (Santos, 1997); do tipo de lesão (Santos, 1997); da altura da doença na planta (Chester, 1950; Tokeshi, 1966), etc. Esses parâmetros podem ser definidos através de escalas de notas (Horsfall & Barratt, 1945; Bitencourt & Oliveira, 1984; Santos *et al.*, 1993b) ou serem combinados entre si de modo a

formarem um índice de doença (McKinney, 1923). Dependendo da relação entre o patógeno e o tipo de resistência na planta (poligênica), podem ser avaliados também alguns parâmetros epidemiológicos, tais como: quantidade de esporulação e multiplicação do inóculo na lesão (Santos, 1997); período de incubação; período de latência (Laterrot, 1990); velocidade de desenvolvimento da lesão, etc.

Recentemente, com o desenvolvimento da biotecnologia, técnicas avançadas de sorologia e de marcadores moleculares, tais como isoenzimas ou fragmentos de DNA (RFLP, PCR, etc.), têm sido aplicadas também na taxonomia e identificação de patógenos (Batista, 1993; Ávila *et al.*, 1996) e na seleção de genes de resistência a doenças (Goulart Filho, 1993). Essas técnicas, certamente, ampliam as possibilidades de "screening" em grande escala e de forma precoce, além de serem muito úteis principalmente em casos de seleção para patógenos ou raças/estirpes exóticas ainda não detectados no país ou na região de trabalho.

Qualquer que seja o método de seleção a ser usado, é importante incluir no ensaio as testemunhas-padrão de controle (resistente e suscetível), bem como fazer repetição dos tratamentos. Por isso, é fundamental avaliar primeiramente a reação das testemunhas-padrão, de modo que se tenha a certeza de estar trabalhando com genótipos puros, em homocigose, sem mistura ou contaminação genética, além de confirmar a eficiência do método de seleção. De um modo geral pode-se considerar que o método de seleção está adequado quando ele não promove a quebra da resistência das plantas sabidamente resistentes, bem como não permite o escape das plantas sabidamente suscetíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. *Plant pathology*. 4.ed. New York: Academic Press, 1997. 635p.
- ÁVILA, A.C.; LIMA, M.F.; RESENDE, R.O.; POZZER, E.; MARANHÃO, E.A.A.; CANDEIA, J.A.; COSTA, N.D. Identificação de tospovirus em hortaliças no Submédio São Francisco utilizando DAS-ELISA e DOT-ELISA. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.21, p.503-508, 1996.
- BATISTA, M.F. Métodos moleculares para identificação de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo, v.1, p.165-198, 1993.
- BITENCOURT, C.; OLIVEIRA, C.B. Patogenicidade e virulência de *Rhizoctonia*

- solani* em ervilha no DF. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.9, p.599-605, 1984.
- BOFF, P.; ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R. do. Escalas para avaliação de severidade da mancha-de-estértil e da pinta-preta em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.16, n.4, p.280-283, 1991.
- BOITEUX, L.; CUPERTINO, F.P.; SILVA, C.; DUSI, A.; MONTE-MESHICH, D.C.; VLUGT, R.A.; FONSECA, M.E.M. Resistance to potato virus Y in *C. annuum* and *C. chinense* is controlled by two independent major genes. *Euphytica*, v.87, p.53-58, 1996.
- CHARCHAR, J.M. Nematóides de importância para a cultura do tomateiro. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 1995. 5p.
- CHESTER, K. S. Plant disease losses: their appraisal and interpretation. *Plant Disease Reporter*, v.193, p.191-362, 1950. Suplemento.
- CRUZ, D.M.R.; LOPES, C.A.; TAKATSU, A. Variabilidade de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* através da inoculação por imersão de plântulas de tomate. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.9, n.1, p.36, 1991. Resumo.
- DAUB, M. E. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, v.24, p.159-186, 1986.
- FENNEL, D.I. Conservation of fungus cultures. *Botanical Review*, v.26, p.79-141, 1960.
- GOULART FILHO, L.R. Métodos para clonagem, isolamento e mapeamento de genes de resistência às doenças de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v.1, p.79-120, 1993.
- HAYWARD, A.C. The host of *P. solanacearum*. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L., ed. *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, P. solanacearum*. Wallingford: CAB International, 1994, p.9-24.
- HEDER, D.M. The influence of mineral nutrition on vegetable diseases. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.12, n.2, p.208-214, 1994.
- HENZ, G.P.; BOITEUX, L.S.; LIMA, M.F. Reação de frutos de *Capsicum* spp. a *Colletotrichum gloeosporioides*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.17, n.2, p.155, 1992. Resumo.
- HORSFALL, J. G.; BARRATT, R.W. An improved grading system for measuring plant disease. *Phytopathology*, v.35, p.655, 1945. Resumo.
- JAMES, W.C. An illustrated series of assessment keys for plant disease, their preparation and usage. *Canadian Plant Disease Survey*, v.51, n.2, p.39-65, 1971.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Distribuição de raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (WR) Snyder e Hansen no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v.8, n.1/2, p.153-160, 1982.
- LATERROT, H. Situation de la lutte genétique contre les parasites de la tomate dans les pays méditerranéens. *Revue Horticole*, n.303, p.5, 1990.

- LIMA, M.F.; LOPES, C.A. Variabilidade da virulência de isolados de *Fusarium solani* em batata. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.23, n.2, p.121-126, 1998.
- MARTYN, R.D. Fusarium wilts. In: ZINTTER, T.A.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.F. *Compendium of cucurbit disease*. St. Paul: APS Press, 1996, p.11-13.
- McKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *H. sativum*. *Journal of Agricultural Research*, v.26, n.5, p.195-217, 1923.
- MENEZES, J.R.; DIANESE, J.C. Race characterization of Brazilian isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* and detection of resistance to anthracnose in *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology*, v.78, p.650-655, 1988.
- MORGADO, H.S.; LOPES, C.A.; TAKATSU, A. Métodos para avaliação de resistência a murcha bacteriana em berinjela. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.29, n.2, p.237-245, 1994.
- NAGATA, T.; AVILA, A.C. de; TAVARES, P.C.; BARBOSA, C.; JULIATTI, E.; KITAJIMA, E.W. Occurrence of different tospovirus in six states of Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, n.1, p.90-95, 1995.
- PITA, A.C.; REIFSCHEIDER, F.J.B.; GIORDANO, L. de B.; CORDEIRO, C.M.T. Tratamento de sementes de ervilha para controle de rizactoniose. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.11, p.647-654, 1986.
- PIVEN, N.M.; USCÁTEGUI, R.C.; DIÓGENES INFANTE, H. Resistance to Tomato Yellow Mosaic Virus in species of *Lycopersicon*. *Plant Disease*, v.79, p.539, 1995.
- POCHARD, E.; CHAMBONNET, D. Methods de sélection du piment pour la résistance au *Phytophthora capsici* et au virus du concombre. *Annales Faculte des Sciences Université de Torino*, v.7, p.270-281, 1971.
- REIFSCHEIDER, F.J.B.; CAFÉ-FILHO, A.C.; REGO, A.M. Factors affecting expression of resistance in pepper (*Capsicum annuum*) to blight cause by *Phytophthora capsici* in screening trials. *Plant Pathology*, v.35, p.451-456, 1986.
- SANCHEZ, L.E.; ENDO, R.M.; LEARY, J.V. A rapid technique for identifying the clones of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* causing crown and root rot of tomato. *Phytopathology*, v.65, n.6, p.726-727, 1975.
- SANTOS, J.R.M., LOPES, C.A.; LIMA, B.J.C. Cultivares de tomateiro diferenciadoras de raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 11, n. 1, p. 27-29, 1993a.
- SANTOS, J.R.M.; PESSOA, H.B.S.V.; GIORDANO, L.B. Resistência de campo a oídio em germoplasma de ervilha. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.18, n.1, p. 123-125, 1993b.
- SANTOS, J.R.M.; PESSOA, H.B.S.V. Avaliação de germoplasma de ervilha a *Rhizactonia solani*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.19, p.307, 1994.
- SANTOS, J.R.M. Seleção massal para resistência à *Stemphylium lycopersici*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, p. 302, 1995a. Resumo. Suplemento.
- SANTOS, J.R.M. Produção massal de esporos de *Stemphylium lycopersici*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, p.354, 1995b. Resumo. Suplemento.
- SANTOS, J.R.M. Levantamento de espécies de *Stemphylium* em tomateiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, p.354, 1995c. Resumo. Suplemento.
- SANTOS, J.R.M. Influência da idade da planta na seleção para resistência a *Stemphylium lycopersici*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, p.354, 1995d. Resumo. Suplemento.
- SANTOS, J.R.M. Avaliação da resistência de cucurbitáceas a oídio (*Sphaerotheca fuliginea*). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.21, p.410, 1996. Resumo. Suplemento.
- SANTOS, J. R. M. Methodology for screening tomato for Fusarium wilt, Verticillium wilt, Gray leaf spot, Early blight and Septoria leaf spot. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL TOMATO DISEASES, 1., 1996. Recife, PE. Proceedings... Recife: IPA, 1997. p.164-166.
- SHAHIM, E.A.; SHEPARD, V.F. An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria solani*. *Phytopathology*, v.69, p.618-620, 1979.
- SHEPHERD, S.L.K. Utilização das técnicas de culturas de tecido e testes de resistência susceptibilidade ao fungo *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout em plantas de tomateiro. Campinas: UNESP, 1986. 309p. Tese Doutorado.
- TOKESHI, H. Murcha de *Fusarium* em tomateiro: estudo da variabilidade do patógeno e hospedeiro. Piracicaba: ESALQ, 1966. 57p. Tese Mestrado.
- TOOLEY, P.W.; FRY, W.E. Genetic of *Phytophthora infestans*. *Annual Review of Phytopathology*, v.6, p.375-396, 1968.
- VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. Influência da temperatura e da umidade nas epidemias de doenças de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo, v.4, p.149-207, 1996.
- VAN DER PLANK, J. E. Disease resistance in plants. New York: Academic Press, 1968. 206p.
- VAN DER BULK, R.W. Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding: a review. *Euphytica*, v.56, p.269-285, 1991.

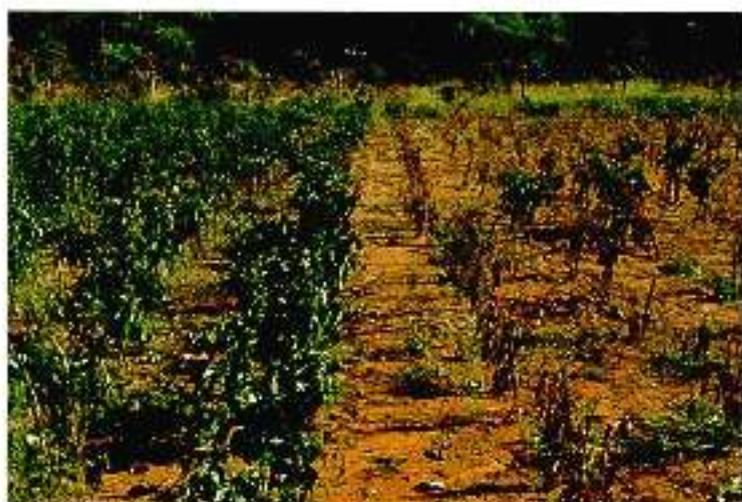


Fig. 1 - Pimentão cultivar Apolo (à esquerda) resistente à queimadura (*Phytophthora capsici*) ao lado da cultivar susceptível (à direita).

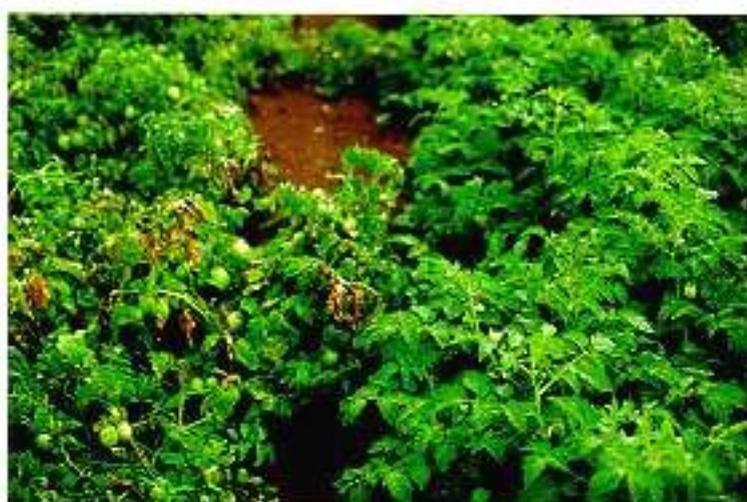


Fig. 2 - Tomate híbrido Zenith (à direita) resistente à pinta-bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv *tomato*) ao lado da cultivar susceptível (à esquerda).



Fig. 3 - Cenoura cultivar Brasília (à esquerda e à direita) resistente à queimadas-folhas (*Alternaria dauce* e *Cercospora carotae*) ao lado da cultivar Nantes susceptível (ao centro)

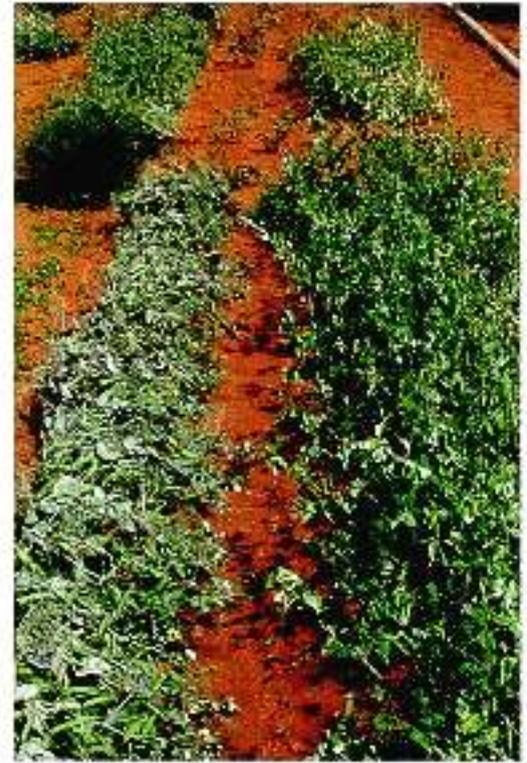


Fig. 4 - Ervilha cultivar Triofin (à direita) resistente ao Oídio (*Erysiphe pisi*) ao lado da cultivar susceptível (à esquerda).



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças**

Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Km 09 - BR 060 - Caixa Postal 218
CEP 70359-970
Fone (0xx61) 385-9000
Fax (0xx61) 556 5744 e 556 2284
e-mail: sac.hortaliças@embrapa.br
www.cnph.embrapa.br

Tiragem: 1000 exemplares

Tratamento editorial: Dione Melo da Silva
Área de Comunicação e Negócios

O Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças da Embrapa, criado em 1981, tem por missão *viabilizar soluções para o desenvolvimento sustentável da agronegócio de hortaliças por meio da geração, adaptação e transferência de conhecimentos e tecnologias, em benefício da sociedade.*

Localizado em Brasília, dispõe de um campo experimental de 115 hectares irrigáveis e seus laboratórios e demais instalações ocupam 22.000m² de área construída. O Centro conta com uma equipe técnica composta por 60 pesquisadores e técnicos especializados, atuando em diversas especialidades da pesquisa agrônômica.

A série Comunicação Técnico da Embrapa Hortaliças é destinada principalmente a agentes de assistência técnica, extensão rural, produtores rurais, estudantes, professores, pesquisadores e jornalistas.

