

Fontes de resistência à murcha bacteriana em germoplasma de *Capsicum* spp. do estado do Amazonas

Liane Cristine Rebouças DEMOSTHENES¹, Jânia Lília da Silva BENTES²

RESUMO

A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, é uma das doenças mais importantes do gênero *Capsicum* no Brasil. No Amazonas, as condições de elevada temperatura e umidade favorecem o desenvolvimento da doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência à murcha bacteriana de germoplasma, selvagem e comercial, de *Capsicum* spp. Foram avaliados 22 acessos de *Capsicum* em casa de vegetação. A inoculação foi feita mediante ferimento das raízes, seguido de adição no solo, ao redor das plantas, de suspensão bacteriana na concentração de 10^8 ufc mL⁻¹. A avaliação foi feita diariamente a partir do quarto dia após a inoculação, em função desenvolvimento dos sintomas. A partir das médias de progresso dos sintomas foi construída a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), e os dados submetidos ao teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAEG 9.1. Foram selecionados os acessos 30, 20 e 17, da espécie *C. chinense*, como resistentes à murcha bacteriana para ensaios futuros em programas de melhoramento genético.

PALAVRAS-CHAVE: pimentão, pimentas, *Ralstonia solanacearum*

Sources of resistance against bacterial wilt in *Capsicum* spp. germoplasm of the Amazonas state

ABSTRACT

The bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the most important in the genus *Capsicum* in Brazil. In the state of Amazonas, high temperatures and humidity favor the development of the disease. The objective of this work was to evaluate resistance in germoplasm of wild and commercial *Capsicum* spp. to bacterial wilt. Twenty two accesses of *Capsicum* spp. were evaluated in greenhouse conditions. The inoculation was made by means of wounds in the roots, followed by addition of bacterial suspension in the concentration of 10^8 ufc ml⁻¹ in the soil, around the plants. Plant evaluation was made daily after the fourth day of the inoculation (DAI) considering the symptoms progress. From the average progress of symptoms was constructed the area under the disease progress curve (AUDPC), and the data submitted to the Scott-Knott test at 5% of probability, using SAEG statistical program. From the average severity notes, we constructed the area under the disease progress curve (AUDPC). The accesses 30, 20 and 17 were selected from *C. chinense* as resistant to the bacterial wilt, for future use in genetic breeding programs.

KEY WORDS: peppers, sweet pepper, *Ralstonia solanacearum*.

¹ Universidade Federal do Amazonas – UFAM. liacristine@ufam.edu.br

² Universidade Federal do Amazonas – UFAM. jlbentes@ufam.edu.br

A murcha bacteriana, causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* Smith (1896) (Yabuuchi) *et al.* 1996, é favorecida por condições de umidade e temperatura elevadas e chega a inviabilizar o cultivo de diversas espécies em regiões de clima tropical ou subtropical, bem como na época do verão em regiões de clima temperado (Hayward 1991). No estado do Amazonas tem se observado a manifestação de murcha bacteriana principalmente nos municípios de Iranduba e Manacapuru, em várias espécies de plantas, dentre elas o pimentão, restringindo a produção de hortaliças no Estado (Coelho Netto *et al.* 2004).

Este trabalho teve como objetivo identificar fontes de resistência à murcha bacteriana em uma coleção de acessos nativos e comerciais de *Capsicum* spp..

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação, no setor de produção da Faculdade de Ciências Agrárias e no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus. Foram avaliados 22 acessos de *C. chinense* Jack. e *C. annuum* L., sendo 19 nativos e três cultivares comerciais de pimentão, a saber, Nathalie (Syngenta Seeds Ltda.), Magaly R (Sakata Seed Sudamerica) e Casca Dura Ikeda (Hortec Tecnologia de Sementes). Para a produção das mudas, sementes dos 22 acessos foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido de 128 células contendo substrato comercial HT Plantmax® (Eucatex, São Paulo). Utilizaram-se duas épocas de semeadura, com intervalo de 15 dias cada uma. Aos 20 dias após a germinação, mudas do primeiro lote foram transplantadas para recipientes de polietileno com capacidade de 500 mL e as do segundo lote foram transplantadas para recipientes de 250 mL. Para ambos os recipientes utilizou-se mistura autoclavada, de terra e esterco bovino na proporção de 3:1.

As plantas foram inoculadas uma única vez em duas idades, aos 30 e aos 45 dias após a semeadura. O isolado de *R. solanacearum* foi obtido a partir de plantas com sintoma típico de murcha bacteriana em cultivo de pimentão, situado no município de Iranduba, AM. O isolamento foi feito em meio de cultura LPGa (Kpémoua *et al.* 1996) repicando-se, em seguida, para meio de cultura Kelman (Kelman 1954). O isolado foi mantido em água destilada em tubo de ensaio em temperatura ambiente (20 °C) segundo método de Romeiro (2001).

Para a confirmação da identidade do isolado, foram realizados os seguintes testes bioquímicos: teste de Gram por solubilidade em hidróxido de potássio a 3%, de acordo com Sands *et al.* (1990), utilização de asparagina, pigmentação fluorescente em meio B de King, produção de inclusões de poli-β-hidroxibutirato (Bringel 2002). A determinação da biovar foi feita por meio de testes de produção de ácidos a partir de fontes de carbono segundo método de Hayward (1964). Para a inoculação, foi utilizado o isolado P21, biovar

1, cultivado em meio LPGa, durante 48 horas em estufa a 27 °C. Preparou-se a suspensão de inóculo ajustada para a concentração de 10⁸ ufc mL⁻¹ utilizando a escala de McFarland (Király *et al.* 1974). A inoculação foi feita pela adição de 5 mL da suspensão de inóculo no solo, ao redor do colo da planta, cujas raízes foram previamente feridas pela introdução de um bisturi no sistema radicular.

A avaliação da reação de resistência à murcha bacteriana foi visual e feita diariamente a partir do quarto dia após a inoculação, durante 23 dias. Avaliou-se o desenvolvimento dos sintomas de acordo com Lopes e Boiteux (2004), por meio de escala de notas variando de 0 a 5, em que: 0 = ausência de sintomas; 1 = uma folha parcialmente murcha; 2 = duas ou três folhas murchas; 3 = todas as folhas murchas exceto as do ápice; 4 = murcha da planta inteira; e 5 = planta morta (Winstead e Kelman 1952). A partir das médias de progresso dos sintomas foi construída a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) segundo Campbell e Madden (1990). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 22 tratamentos (acessos) e cinco repetições. Cada repetição foi composta de três plantas inoculadas e duas testemunhas tratadas com água destilada esterilizada. Os dados da AACPD foram analisados por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5%, utilizando o programa estatístico SAEG 9.0 (SAEG 2007).

Em relação ao progresso dos sintomas da murcha bacteriana para as plantas inoculadas com 30 dias de idade, os acessos 20, 30, 17 e MG foram considerados resistentes apresentando menores valores da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Tabela 1). Os acessos 13, CD, SG 05, BC 16, BC 12 e BC 19 mostraram-se altamente suscetíveis, apresentando valores elevados de AACPD, confirmando sua maior suscetibilidade à doença em relação aos demais.

Os acessos 17, 20 e 30 foram os que apresentaram melhor desempenho nas condições avaliadas para ambas as idades de inoculação das plantas. Em plantas inoculadas com 45 dias de idade, a manifestação da resistência foi mais evidente. O acesso 17, cujas plantas se mostraram resistentes quando inoculadas aos 30 dias de idade, apresentou menor valor de AACPD que aquele observado quando inoculado aos 30 dias de idade, podendo ser classificado como altamente resistente. Os dados referentes à AACPD (Tabela 1) também confirmaram a maior resistência desse acesso em relação aos demais. A reação mais suscetível dos acessos ao patógeno, em decorrência da inoculação aos 30 dias de idade pode ser devida ao tecido tenro, facilitando a infecção pela bactéria. Outra razão para o resultado é que, com essa idade, a planta pode não ser capaz de ativar seus mecanismos de defesa em tempo de conter a ação do patógeno, fator que ainda precisa ser melhor estudado. Os acessos 20 e 30 também se revelaram

como boas fontes de resistência apresentando menores valores de AACPD. Os acessos BC 16, 13 (*C. chinense*) e CD (*C. annuum*) apresentaram maiores médias de notas e valores de AACPD, sendo considerados altamente suscetíveis ao isolado utilizado (Tabela 1). Observa-se que a resistência não está relacionada às espécies de *Capsicum* testadas, pois acessos de *C. chinense* se comportaram tanto como resistentes (AC 17, 20 e 30) quanto suscetíveis (BC 16 e 13) à bactéria. Portanto, a resistência pode estar relacionada a alguma característica de resistência intrínseca aos acessos, considerando a grande variabilidade existente tanto em *C. chinense* quanto em *C. annuum*. Alguns estudos realizados em *Capsicum*, visando obter fontes de resistência às doenças, mostraram resultados semelhantes quanto à variação da reação de resistência dos acessos avaliados. Bento *et al.* (2009) avaliaram 127 acessos de *Capsicum* quanto à resistência ao mosaico amarelo do pimentão, causada pelo vírus PePYMV (*Pepper yellow mosaic virus*), e encontraram nove acessos resistentes sendo dois acessos da espécie *Capsicum baccatum* e sete da espécie *Capsicum chinense*. Cezar *et al.* (2008) ao avaliarem 86 genótipos de pimentões e pimentas quanto à resistência a tobamovírus, utilizando duas espécies conhecidas, ToMV (*tomato mosaic virus*) e PMMoV (*Pepper mild mottle mosaic virus*), encontraram oito fontes de resistência ao ToMV e, somente, um acesso mostrou-se resistente ao PMMoV.

Outros estudos em *Capsicum* buscando fontes de resistência à murcha bacteriana também detectaram a variabilidade dentro deste gênero. Lopes e Boiteux (2004) avaliaram 23 acessos de *Capsicum* considerados resistentes à murcha bacteriana, utilizando isolados das biovars 1 e 3; os autores observaram diferenças entre os acessos na manifestação dos sintomas à inoculação com ambas as biovars, sendo que plantas inoculadas com estirpes da biovar 1 mostraram-se assintomáticas. Uma linhagem de *C. chinense* e uma de *C. baccatum* apresentaram resistência a isolados da biovar 1, mas foram suscetíveis a dois isolados da biovar 3. Um isolado da biovar 3 mostrou-se o mais agressivo, resultando em índices de doença que atingiram valor igual a 100.

A resposta à infecção por *R. solanacearum* nos acessos estudados deve, ainda, ser melhor investigada para o esclarecimento da natureza do mecanismo de resistência, se estrutural ou bioquímico e qual seu papel na proteção da planta ao patógeno. Rahman *et al.* (1999) detectaram, na cultivar resistente Kulai, de *C. annuum*, a formação de um revestimento nas paredes celulares. Esse mecanismo de resistência confinou a bactéria no interior das células e protegeu a parede celular da degradação enzimática, diminuindo a intensidade da doença. A resposta à infecção por *R. solanacearum* nos acessos mais resistentes, deve, ainda, ser melhor investigada para o esclarecimento da natureza do mecanismo de resistência, se estrutural ou bioquímico, a exemplo de Egea *et al.* (1996)

Tabela 1 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da murcha bacteriana em plantas de *Capsicum* spp. Avaliadas com 30 e 45 dias de idade inoculadas com um isolado da biovar 1 de *Ralstonia solanacearum* em casa de vegetação após os 23 dias de avaliação.

Plantas com 30 dias		Plantas com 45 dias	
Acesso	AACPD	Acesso	AACPD
AC 13	1948,0 a	AC CD	1401,6 a
BC 06	1882,4 a	AC 13	1366,4 a
AC CD	1880,7 a	BC 16	1364,4 a
SG 05	1774,4 a	SG 05	1236,8 a
BC 16	1751,2 a	AC 16	1235,2 a
BC 12	1689,6 a	SG 04	1211,2 a
BC 19	1688,0 a	BC 12	1148,0 a
SG 01	1595,2 a	SG 01	1126,3 a
SG 04	1592,8 a	BC 19	1120,0 a
BC 01	1573,6 a	AC 04	1105,6 a
AC 16	1572,8 a	BC 01	1042,4 a
AC 04	1560,0 a	AC 01	920,8 a
AC 03	1449,6 a	AC 19	785,6 b
AC 19	1386,4 a	BC 06	752,8 b
AC 01	1383,2 a	AC 03	749,5 b
AC 02	1241,6 b	AC 02	725,6 b
AC 08	1154,3 b	MG	636,0 b
MG	1018,3 b	AC 08	624,8 b
NT	964,8 b	NT	594,3 b
AC 30	898,4 b	AC 30	441,6 c
AC 20	852,8 b	AC 17	433,6 c
AC 17	732,8 b	AC 20	261,6 c

Acessos Comerciais: AC CD – Casca dura Ikeda (Hortec), AC MG – Cultivar Magaly R(Sakata), AC NT – Cultivar Nathalie(Syngenta). Os demais constituem os acessos selvagens de *Capsicum* spp. Escala de notas segundo Wisnstead e Kelman (1952). Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Plantas inoculadas após 30 e 45 dias de semeadura, respectivamente.

que avaliando a resposta da cultivar resistente Smith-5, de *C. annuum*, à infecção por *Phytophthora capsici*, encontraram altos níveis de capsidiol, uma fitoalexina produzida em solanáceas. Nakaho *et al.* (2004) detectaram, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, que a colonização dos tecidos difere entre cultivares e que nas cultivares resistentes, a presença de um material altamente denso e aposições próximas às células do parênquima limitou o movimento ascendente de *R. solanacearum* nos vasos.

A baixa frequência de fontes de resistência à murcha bacteriana ocorre devido à complexidade e variabilidade do patógeno. A essas características aliam-se à influência das

condições ambientais, de elevada temperatura e umidade, as quais dificultam a busca de plantas com respostas promissoras para resistência à doença. Considerando que houve maior suscetibilidade das plantas aos 30 dias de idade, sugere-se esse procedimento para a avaliação de resistência à murcha bacteriana em *Capsicum* visando obter resultados com mais rapidez.

Existe variabilidade genética entre os acessos nativos de *Capsicum* quanto à resistência à murcha bacteriana. Entre os acessos avaliados, AC 17, AC 20 e AC 30 da espécie *C. chinense* podem ser considerados resistentes à murcha bacteriana causada por *R. solanacearum* biovar 1.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Bento, C.S.; Rodrigues, R.; Zerbini Junior, F.; Sudré, C.P. 2009. Source of resistance against *Pepper yellow mosaic virus* in chilli pepper. *Horticultura brasileira*, 27:196-201.
- Bringel, J.M.M. 2002. *Biochemical, pathogenic and molecular characterization of Ralstonia solanacearum Biovar 2 isolates of potato and eggplant*. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. 103 pp. (in Portuguese, with abstract in English).
- Campbell, C.L.; Madden, L.V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons: New York. 532 pp.
- Cezar, M.A.; Krause-Sakate, R.; Pavan, M.A.; Costa, C.P. 2008. Evaluation of resistance of *Capsicum* spp. genotypes to tobamovirus. *Summa Phytopathologica*, 35: 39-43.
- Coelho Netto, R.A.; Pereira, B.G.; Noda, H.; Boher, B. 2004. Bacterial wilt in Amazonas State, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 29: 21-27 (in Portuguese, with abstract in English).
- Egea, C.; Alcazar, M.D.; Candela, M.E. 1996. Capsidiol: its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiology Plantarum*, 98: 737-742.
- Hayward, A.C. 1964. Characteristic of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 27: 265-277.
- Hayward, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 29: 65-87.
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*, 44: 693-695.
- Király, Z.; Klement, Z. Solymosy, F.; Vörös, J. 1974. *Methods in Plant Pathology*. Akadémiai Kiado, Budapeste. 509 pp.
- Kpémoua, K.; Boher, B., Nicole, M.; Colatayud, P; Gêger, J.P. 1996. Cytochemistry of defense response in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihots*. *Canadian Journal of Microbiology*, 42: 1131-1143.
- Lopes, C.A.; Boiteux, L.S. 2004. Biovar-specific and broad-spectrum sources of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in *Capsicum*. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4: 350-355.
- Nakaho, K.; Inoue, H.; Takayama, T.; Miyagawa, H. 2004. Distribution and multiplication of *Ralstonia solanacearum* in tomato with resistance derived from different origins. *Journal of Genetics Plant Pathology*, 70: 115-119.
- Rahman, M.A.; Abdullah, H.; Vanhaecke, M. 1999. Histopathology of susceptible and resistant *Capsicum annuum* cultivars infected with *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*, 147: 129-140.
- Romeiro, R.S. 2001. *Methods in plant bacteriology*. Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, Minas Gerais. 279 pp. (in Portuguese)
- SAEG. 2007. System for Statistical Analyses. Fundação Arthur Bernardes: Viçosa, Minas Gerais.
- Sands, D.C. Physiological criteria – Determinative Tests. In: Klement, Z.; Rudolph, K.; Sands, D.C. 1990. *Methods in Phyto bacteriology*. Akadémiai Kiado, Budapeste. 568 pp.
- Winstead, N.N.; Kelman, A. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 42: 628-634.

Rcebido em 23/06/2010

Aceito em 24/11/2010