

86

Circular Técnica

Brasília, DF
Setembro, 2010

Autores

Carlos A. Lopes
Eng. Agrôn., Ph.D
Fitopatologia
E-mail:
clopes@cnph.embrapa.br
Brasília, DF

Desenvolvimento e avaliação de metodologia para seleção de clones de batata resistentes à murcha bacteriana



Foto: Carlos A. Lopes

Introdução

A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (SCHMIEDICHE, 1986) Yabuuchi et al. 1996, é uma das principais doenças da batata (*Solanum tuberosum* L.) em regiões de clima tropical e subtropical. Provoca perdas significativas sob altas umidade do solo e temperatura e nenhuma forma individual de controle tem sido eficaz em cultivos submetidos a essas condições (FRENCH, 1994; LOPES, 2005). No Brasil, a batata é afetada pela raça 1 biovar 1 (R1Bv1) e pela raça 3 biovar 2 (R3Bv2) do patógeno. A primeira é mais comum na Região Centro-Oeste e a segunda nas regiões de clima mais ameno do Sul e Sudeste, embora de forma não exclusiva face à eficiente disseminação de inóculo via batata semente com infecção latente (LOPES et al., 1994; LOPES, 2005).

Embora o uso de cultivares resistentes seja considerado um dos métodos mais eficazes de controle de doenças, principalmente por ser de fácil adoção pelos agricultores e não onerar os custos de produção, a resistência praticamente não tem sido utilizado no caso da murcha-bacteriana da batata. Isso se deve à dificuldade de se obter ganho genético pela complexidade inerente à ploidia da batata (autotetraploide); à lentidão no avanço de gerações face à forma de multiplicação para fins comerciais (propagação vegetativa), com dormência de brotação; e à natureza poligênica e parcial da resistência no germoplasma disponível. Os níveis de resistência encontrados em bancos de germoplasma são baixos e pouco estáveis no tempo e no espaço em virtude da alta variabilidade do patógeno e da instabilidade da resistência do tipo horizontal (sensu Vanderplank) a variações climáticas (FRENCH; DE LINDO, 1982; LOPES et al.,

1993; LOPES et al., 1998; NIELSEN; HAYNES, 1960; QUEZADO-SOARES; LOPES, 1999; TUNG et al., 1990).

A busca de fontes de resistência em batata à murcha bacteriana na Embrapa Hortaliças foi iniciada na década de 1980 pela implementação de um projeto de colaboração entre o Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças e o Centro Internacional de la Papa (CIP) (LOPES et al., 1998). Nesse período, os avanços foram lentos. Na falta de uma metodologia eficiente, insistiu-se por muitos anos em selecionar os clones pelo tipo de tubérculo e, então, avaliar esses clones para resistência à doença (Fig. 1). Isso era feito pelo plantio de clones pré-selecionados para tipo de tubérculo em solo naturalmente infestado com a raça 1, biovar 1 (R1Bv1) de *Ralstonia solanacearum*, em Brasília, DF. Essa metodologia, entretanto, restringiu significativamente a probabilidade de avançar no quesito resistência, identificada ao longo dos anos como sendo de frequência muito baixa sob condição tropical. Além disso, a seleção para tipo de tubérculos *per se* era pouco eficaz, porque havia forte segregação de características indesejáveis vindas dos genitores resistentes, que eram espécies silvestres. Essas características consistiam, por exemplo, em desuniformidade de cores da película, olhos profundos, tubérculos



Figura 1. Esquema de seleção para resistência à murcha bacteriana com seleção inicial para tipo de tubérculos.



Fotos: Carlos A. Lopes



Figura 2. Tubérculos não selecionados (fora da rede) e selecionados (na rede) para tipo de tubérculos.

achatados e aderência do estolão (Fig. 2), herdadas de *Solanum sparsipilum*, *S. phureja*, *S. chacoense* e *S. microdontum*, espécies identificadas como genitores resistentes no CIP, das quais eram originadas as sementes para testes de seleção no Brasil (SCHMIEDICHE, 1985).

Passou-se então a uma seleção mais suave para tipo de tubérculos, o que possibilitou a obtenção na Embrapa Hortaliças dos clones MB-03 (LOPES et al., 2004) e MB-9846-01 (Fig. 3), ambos com alto grau de resistência e estabilidade da resistência de campo em anos sucessivos de testes. Embora estes clones ainda estejam distantes em termos de aparência do tipo comercial desejado pelo consumidor brasileiro, significam um grande avanço quando comparados ao clone Cruza 148 (Fig. 3), de origem mexicana e usado como referência de resistência no CIP. Cruza 148, embora com bom nível de resistência, não é um bom genitor pelo fato de transmitir grande número de características indesejáveis à progênie, em especial quanto ao aspecto visual dos tubérculos (LIMA, 2005; TUNG et al., 1990). Além de possuir características de



Fotos: Carlos A. Lopes

Figura 3. Genitores resistentes à murcha bacteriana.

tubérculos superior às do clones Cruza 148, o clone MB-03 apresentou nível de resistência de campo similar ao de 'Cruza 148', quando plantados em campos infestados com as raças 1 e 3 do patógeno (SILVEIRA, 2002; SILVEIRA et al., 2007; LIMA, 2005).

Com a finalidade de apoiar o pré-melhoramento de batata, foi desenvolvida uma nova metodologia de seleção de clones com resistência à murcha bacteriana, primeiramente para resistência em vez da aparência do tubérculo (Fig. 4). Esta metodologia foi avaliada para duas famílias clonais de cruzamentos entre dois clones resistentes selecionados na Embrapa Hortaliças e a cultivar Baraka, privilegiando inicialmente a resistência à doença, para posterior seleção para aparência do tubérculo em clones resistentes.



Figura 4. Esquema de seleção para resistência à murcha bacteriana com seleção inicial para resistência.

Desenvolvimento e avaliação da metodologia

Sementes verdadeiras de duas famílias clonais (50 e 51), geradas respectivamente a partir do cruzamento entre os clones resistentes MB-03 e MB-9846-01 e a cultivar Baraka, foram semeadas em bandejas para produção de mudas com 288 células, contendo substrato comercial Plantmax[®]. Vinte dias após a semeadura, quando apresentavam tamanho de 1 a 2 cm (Fig. 5), as mudas foram transplantadas individualmente para copos de plástico de 250 mL contendo o mesmo substrato misturado com solo esterilizado em iguais proporções (Fig. 6). As mudas foram mantidas em casa de vegetação telada, bem arejada e com boa luminosidade, para evitar estiolamento. Dez dias após o transplante, as mudas foram inoculadas vertendo-se na base da planta 10 mL de suspensão bacteriana (Fig. 7), preparada com isolado virulento RS CNPH 252, R3Bv2 de *R. solanacearum*, procedente do Estado do Paraná. A concentração de aproximadamente 10^7 ufc/mL



Foto: Carlos A. Lopes

Figura 5. Mudanças de batata provenientes de sementes botânicas produzidas em bandejas.



Fotos: Carlos A. Lopes



Figura 6. Mudanças de batata transplantadas para copos de 250 mL.



Foto: Carlos A. Lopes

Figura 7. Inoculação de planta com suspensão bacteriana.

foi usada com base em resultados preliminares nas condições ambientais em que os experimentos foram conduzidos, quando se observou que concentrações mais altas matam praticamente todas as plantas e concentrações mais baixas resultam no aparecimento de escapes ou falsos resistentes (dados não publicados). Como testemunhas, 200 mudas provenientes de 'Cupido' autofecundada também foram inoculadas da mesma forma e 200 mudas de cada cruzamento foram mantidas sem inoculação.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura que variou de 20°C a 40°C, com aquecimento noturno, essencial para garantir a infecção e reduzir a frequência de escapes. Sintomas de murcha foram observados a partir de cinco dias após a inoculação (Fig. 8). A cada três dias, os copos contendo plantas murchas foram retirados e descartados. As plantas sobreviventes depois de 15 dias após a inoculação foram transplantadas para vasos de 3L contendo mistura de solo e substrato e transferidas para casa de vegetação telada (20°C-30°C) (Fig. 9). Também nesta etapa, as plantas de vasos que apresentavam sintoma tardio de murcha foram eliminadas. Os mini-tubérculos originados de plantas sobreviventes inoculadas (pré-seleção) e não inoculadas (sem pré-seleção) produzidos nos vasos foram colhidos 95 dias após a sementeira (Fig. 10) e receberam identificação clonal. Esses tubérculos foram submetidos a um choque frio por 15 dias em câmara fria para estimular a brotação e mantidos à temperatura ambiente até que os brotos atingissem cerca de 5 a 10 mm, que ocorreu para a maioria dos clones após 60 dias. A cada semana, os tubérculos foram vistoriados, sendo eliminados os secos e os podres.

Desta maneira, foram obtidos 38 clones pré-selecionados da família 50 (MB-03 x Baraka) e 52 clones da família 51 (MB-9846-01 x Baraka). Estes 90 clones pré-selecionados e os clones não pré-selecionados testemunhas, 62 e 64 (clones mais produtivos) respectivamente das mesmas famílias, foram plantados em campo, na Embrapa Hortaliças, em área naturalmente infestada com a R1Bv1 de *R. solanacearum*. A infestação e a uniformidade dessa área é mantida pelo plantio de batata entre os meses de maio a agosto, com colheita dos tubérculos aparentemente sadios e



Fotos: Carlos A. Lopes



Figura 8. Mudas de batata inoculadas mostrando sintomas da murcha bacteriana nos genótipos suscetíveis.

posterior incorporação dos restos culturais por meio de aração e gradagem. A área é deixada em pousio e o solo é novamente preparado para testes de seleção e manutenção de inóculo a partir de fevereiro.

Para este ensaio, foram plantados de dois a quatro tubérculos de tamanho médio (de 3 a 4 cm de diâmetro) de cada clone, alternando-se parcelas formadas por dez clones de cada cruzamento.



Foto: Carlos A. Lopes

Figura 9. Mudas de batata sobreviventes da inoculação em copos desenvolvendo-se em vasos. Ao centro, planta com infecção tardia.



Fotos: Carlos A. Lopes



Figura 10. Tubérculos produzidos em vasos de plantas sobreviventes da inoculação em copos.

Como testemunha suscetível, foram plantados cinco tubérculos da cultivar Monalisa a cada dez parcelas de clones experimentais. Quando o número de clones é menor, ou em avaliações de clones mais avançados, a parcela de 'Monalisa' é

plantada entre cada um ou dois clones (Fig. 11); isso permite constatar a distribuição do patógeno na área e proporcionar maior garantia que plantas sobreviventes não são “escapes” pela ausência ou baixa população do inóculo na parcela.

Sintomas da murcha-bacteriana no campo apareceram na testemunha suscetível 25 dias após o plantio (DAP), com desenvolvimento mais acelerado a partir da amontoa, realizada 32 DAP. A uniformidade do campo experimental foi adequada, conforme observado pelo murchamento bem distribuído da testemunha suscetível entre as parcelas experimentais.

Para ambas as famílias clonais, a porcentagem de seleção em copos em casa de vegetação foi similar, em torno de 16 %. Entretanto, quando os clones pré-selecionados foram plantados em campo, a família 51 teve maior porcentagem de plantas sobreviventes, 55,8% em comparação com 21,1% da família 50. Quando não houve pré-seleção, o comportamento das duas famílias também foi semelhante, com cerca de 3 % de sobrevivência, respectivamente, com evidências de que a pré-seleção foi efetiva, mesmo com a utilização de raças diferentes do patógeno na seleção em copos (R3Bv2) e em campo (R1Bv 1) (Tabela 1). De fato, a inoculação de raças diferentes foi proposital para permitir seleção de clones resistentes às duas raças, pois essas podem ocorrer simultaneamente na mesma região ou até mesmo no mesmo campo (LOPES et al., 1994). Além disso, existe a indicação de que a resistência às duas raças tenha controle genético similar, pois Silveira et al. (2007)



Foto: Carlos A. Lopes

Figura 11. Teste de resistência à murcha bacteriana em campo dos clones de batata pré-selecionados em copos.

ratificaram a resistência dos genótipos MB-03 e Cruza 148 no Estado do Rio Grande do Sul, na presença da R3Bv2 de *R. solanacearum*.

Quando se consideram as duas seleções, a família 51 também proporcionou maior porcentagem de seleção, com 4,5 % em relação ao número inicial de clones, em comparação com a família 50, com 1,9 % (Tabela 1). A maior porcentagem de seleção da família 51 pode ser explicada pela melhor adaptação do genitor resistente, MB 9846-01, à condição de Cerrado, visto que este clone foi selecionado nestas condições e é bem mais produtivo do que o clone MB-03 (dados não publicados).

Durante a fase vegetativa, foram feitas anotações quanto ao vigor das plantas e precocidade do clone. Os tubérculos dos clones selecionados em campo

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência de plantas de batata-pré-selecionadas ou não pela inoculação de mudas com a R3Bv2 de *Ralstonia solanacearum* em copos em casa de vegetação, com posterior plantio em campo naturalmente infestado com a R1Bv1 do patógeno. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2009.

Família***	Pré-seleção (R3Bv2)*			Seleção em campo (R1Bv1)**		
	Mudas total/inoculadas	Plantas sobreviventes	% de sobrevivência	Clones plantados	Clones sobreviventes	% de sobrevivência
50	431/431	69	16,0	38	8	21,1
51	639/639	106	16,1	52	29	55,8
50	200/0	200	100	62	2	3,2
51	200/0	200	100	64	2	3,1
Cupido (autofec.)	200/200	0	0	0	0	0

* Pré-seleção em copos, em casa de vegetação, fev/mar, com R3Bv2 de *R. solanacearum*;

** Seleção em campo naturalmente infestado, jun/set, com a R1Bv1 de *R. solanacearum*, Brasília, DF;

*** Família 50 = MB-03 x Baraka; Família 51 = MB-9846-01 x Baraka

(37 clones neste lote) foram avaliados quanto ao tipo, sendo eliminados aqueles com defeitos muito graves, como cor e aspereza excessiva da pele, manchas internas, formato indesejável e desuniformidade dos tubérculos. Os clones selecionados foram mais duas vezes avaliados em campo, desta vez com repetição na área infestada para comprovação e quantificação da resistência. Somente são selecionados os clones iguais ou melhores que as testemunhas MB-03 e MB-9846-01, que representa aproximadamente até 15% de plantas murchas em parcelas em que as testemunhas 'Bintje' e 'Monalisa' apresentam 100% de murcha. Os dois melhores (CNPH MB51-02 e CNPH MB51-11) (Figura 12), com base no grau estável durante três avaliações consecutivas da resistência e boa aparência de tubérculos (tubérculos amarelos, alongados, pele lisa) encontram-se cultura de tecidos para garantia de limpeza de vírus e de infecção latente de *R.*



Fotos: Carlos A. Lopes

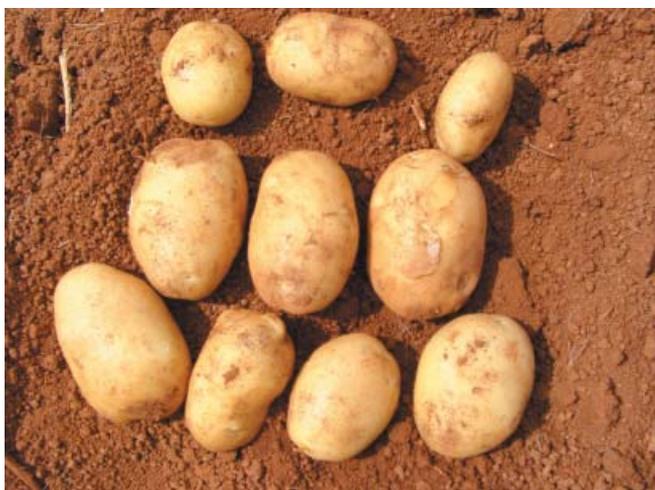


Figura 12. Clones de batata MB 51-02 (A) 51-11 (B) selecionados para resistência à murcha bacteriana em copos e posteriormente em campo.

solanacearum. Tubérculos pré-básicos desses clones e de outros poderão ser distribuídos para os melhoristas interessados, cumpridas as normas institucionais de transferência de germoplasma. Novos clones, derivados de outros cruzamentos, também vêm sendo desenvolvidos de acordo com a metodologia descrita.

Conclusões

A pré-seleção de genótipos de batata para resistência à murcha-bacteriana pela inoculação de mudas em copos de plástico de 250 mL permite avaliar grande número de plantas em espaço relativamente pequeno;

A pré-seleção em copos foi efetiva, pois permitiu maior sobrevivência de plantas em campo (condição natural de infecção) quando comparada com ausência de pré-seleção dos clones;

A seleção de campo é essencial por permitir selecionar genótipos mais adaptados ao ambiente, característica importante quando se trata de resistência do tipo horizontal à murcha-bacteriana;

O clone resistente MB9846-01, comparativamente ao clone resistente MB-03, quando cruzados com a cultivar Baraka, gerou uma progênie com maior probabilidade de seleção em campo de clones resistentes à murcha bacteriana;

As duas fases consecutivas de seleção (pré-seleção e campo) indicaram que menos de 5% de genótipos originados de cruzamentos entre clones resistentes e suscetíveis podem ser selecionados considerada a combinação usada de isolado, concentração de inóculo e ambiente após a inoculação;

A concentração de inóculo, aproximadamente 10^7 ufc/mL, para inoculação de plantas com cerca de 15 cm de altura em copos, é recomendada, porém pode haver necessidade de ajustes em função da virulência do isolados de *R. solanacearum* e das condições pós-inoculação;

Após a inoculação das mudas em copos, a temperatura deve variar de 20°C a 40°C. Temperaturas muito altas provocam quebra da resistência (que é do tipo quantitativa) e a ocorrência de temperaturas noturnas baixas favorecem escapes (falsos resistentes).

Referências

FRENCH, E. R. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Ed.). **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum**. Wallingford: CAB International, 1994, p.199-207.

FRENCH, E.; DE LINDO, L. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato: specificity and temperature sensitivity. **Phytopathology**, St. Paul, v.72, n. 11, p.1408-1412, Nov. 1982.

LIMA, A. F. **Avaliação da resistência de clones cultivares de batata à murcha bacteriana (*Ralstoniasolanacearum*)**. 2005. 93 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Departamemtno de Fitopatologia, Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília, Brasília, DF.

LOPES, C. A. **Murchadeira da batata**. Itapetininga: ABBA; Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2005. 65 p.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; BUSO, J. A. **MB 03: clone de batata resistente à murcha bacteriana**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2004. 10p. (Embrapa Hortaliças. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 04).

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M.; BUSO, J. A.; MELO, P. E. Breeding for resistance to bacterial wilt of potatoes in Brazil. In: PRIOR, P.; ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J. (Ed.). **Bacterial wilt Disease**. Paris: INRA, 1998. p. 290-293.

LOPES, C. A.; NAZARENO, N. R. X.; FURIATTI, R. S. Prevalência, mas não exclusividade, da Raça 3 de *Pseudomonas solanacearum* em batata no Estado

do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 18, p. 312, 1993. Resumo. Suplemento.

NIELSEN, L. W.; HAYNES, F. L. Resistance in *Solanum tuberosum* to *Pseudomonas solanacearum*. **American Potato Journal**, Orono, ME, v.37, p.260-267, 1960.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LOPES, C. A. Desempenho de cultivares de batata em solo infestado com *Ralstonia solanacearum*, raça 1. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.17, n.3, p.244-247, nov. 1999.

SCHMIEDICHE, P. Breeding potatoes for resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. In: PERSLEY, G. J. (Ed.). **Bacterial wilt disease in Asia and South Pacific: proceedings**. Canberra: ACIAR, 1986. p. 105-111. (ACIAR, Proceedings, 13).

SILVEIRA, J. R. P. **Aspectos epidemiológicos e de resistência à *Ralstonia solanacearum* na cultura da batata no Rio Grande do Sul**. 2002. 104 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SILVEIRA J. R. P.; DUARTE, V.; MORAIS, M. G.; LOPES, C. A.; FERNANDES J .M.; BARNI, V.; MACIEL, J. L. N. Epidemiological analysis of clones and cultivars of potato in soil naturally infested with *Ralstonia solanacearum* Biovar 2. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 3, p. 183-188, maio/jun. 2007.

TUNG, P. X.; RASCO, E. T.; ZAAG, P.; SCHMIEDICHE, P. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato: I Efeccts of sources of resistance and adaptation. **Euphytica**, Alexandria, v. 45, n.3, p. 203-210, 1990.

Circular Técnica, 86 Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: **Embrapa Hortaliças**

Endereço: BR 060 km 9 Rod. Brasília-Anápolis
C. Postal 218, 70.539-970 Brasília-DF
Fone: (61) 3385-9115
Fax: (61) 3385-9042
E-mail: sac@cnph.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2009): 2000 exemplares

Comitê de Publicações Presidente: Warley M. Nascimento
Editor Técnico: Mirtes F. Lima

Membros: Jadir B. Pinheiro
Miguel Michereff Filho
Milza M. Lana
Ronessa B. de Souza

Expediente Normalização Bibliográfica: Antonia Veras de Souza
Editoração eletrônica: André L. Garcia



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

