

**DETECÇÃO DO AGENTE DA PODRIDÃO NEGRA DAS CRUCÍFERAS,
Xanthomonas campestris pv. *campestris* (Pamm.) Dowson PELA
TÉCNICA DE INFILTRAÇÃO A VÁCUO***

ROSA AMELIA GOMES DE MELO

Aluno do Curso de Mestrado em Fitossanidade da UFRPE.

ROSA DE LIMA RAMOS MARIANO

Prof. Adjunto do Depto. de Agronomia da UFRPE.

ISRAEL PEREIRA DA SILVA

Prof. Adjunto do Depto. de Agronomia da UFRPE.

Foi avaliada a eficiência da técnica de infiltração a vácuo na detecção da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) em cultura pura e em sementes. Foram estudadas as influências de diferentes hospedeiros (couve, couve-flor, mostarda e repolho), utilizando-se como parâmetros de avaliação: número de folhas infectadas, tempo de aparecimento dos sintomas e porcentagem da área foliar infectada. Os resultados mostraram que a técnica é bastante eficiente podendo detectar Xcc em cultura pura na concentração de $4,5 \times 10^1$ ufc/ml, e em sementes com 1% de infecção. A mostarda foi em geral, o hospedeiro mais suscetível e que apresentou sintomas mais rapidamente. Tanto o número de folhas infectadas, quanto a porcentagem de área foliar infectada foram válidos como parâmetros de avaliação.

INTRODUÇÃO

A podridão negra das crucíferas causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pamm.) Dow. (Xcc) é uma das doenças mais importantes nas áreas em que esta hortaliça é cultivada.

* Trabalho apresentado no XXI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, 1988.

Segundo Silveira (1949), esta doença foi identificada pela primeira vez no Brasil em 1935, no Estado de São Paulo por Drummond Gonçalves. De acordo com Ramos et al. (1985), Mariano et al. (1987, 1989), Mariano, Cabral e Silva (1988) e Melo e Mariano (1988), a doença foi relatada nos Estados de Paraíba à Bahia, tratando-se de uma fitobacteriose prevalente e importante no Estado de Pernambuco.

Além de sementes infestadas e infectadas, perfilhos infectados, restos culturais, solo infestado e, provavelmente, ervas daninhas são fontes de inóculo de Xcc no campo (Schaad e White, 1974b; Schaad e Dianese, 1981; Randhawa e Schaad, 1984; Alvarez e Lou, 1985; Alvarez, Benedict e Mizumoto, 1985).

A detecção de Xcc em sementes, solo infestado e ervas daninhas pode ser feita através do plaqueamento em meios seletivos (Schaad e White, 1974a; Chun e Alvarez, 1983; Ramos et al., 1985). Este método, no entanto, demanda tempo, havendo dificuldade na análise quantitativa, devido ao número elevado de bactérias saprófitas, havendo ainda a necessidade de uma posterior identificação das bactérias obtidas.

Uma alternativa para a detecção de Xcc em possíveis fontes de inóculo, seria o uso da técnica de infiltração a vácuo desenvolvida por Boosalis (1950) e recomendada por Goto (1972) para detecção de baixas populações de patógenos de plantas em solos ou em associação com ervas daninhas. Jones, McCarter e Smitley (1981), a utilizaram com sucesso na detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young et al., agente causal da mancha bacteriana do tomateiro, em folhagens e raízes de ervas daninhas, bem como em extratos de solo de campos artificialmente infestados. A eficiência do método foi elevada e, populações tão baixas quanto 10 ufc por ml da suspensão, ou por grama de solo, puderam ser detectadas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da técnica de infiltração a vácuo na detecção de Xcc em cultura pura e em sementes, verificando-se a influência dos diferentes hospedeiros e dos parâmetros de avaliação, número de folhas com sintomas, tempo de aparecimento dos sintomas e porcentagem de área foliar infectada.

MATERIAL E MÉTODO

Obtenção e Manutenção dos Isolados

A partir de folhas de mostarda e caule de repolho com sintomas de podridão negra, foram realizados isolamentos em meio de cultura NYDA (agar 18g; dextrose 10g; extrato de levedura 5g; extrato de carne 3g; peptona 5g; água des-

tilada 1000 ml). Os isolados após caracterizados e identificados, foram armazenados no mesmo meio de cultura, a 40°C.

Deteção de Xcc em Cultura Pura Através da Técnica de Infiltração a Vácuo

Foram realizados três experimentos. No experimento 1 usou-se um isolado Xcc1 proveniente de folhas de mostarda e nos experimentos 2 e 3, foi utilizado o isolado Xcc2 proveniente de caule de repolho. As suspensões bacterianas foram obtidas a partir de culturas com 36-48 horas de idade, em meio de cultura YDC (agar 18g; extrato de levedura 5g; dextrose 20g; peptona 10g; água destilada 1000 ml), a 25-28°C.

Inicialmente, foi obtida uma suspensão com a concentração de aproximadamente $4,5 \times 10^8$ ufc/ml e em seguida, diluições em série foram realizadas para a obtenção das concentrações $4,5 \times 10^3$; $4,5 \times 10^2$ e $4,5 \times 10^1$ ufc/ml.

Plantas de couve, mostarda e repolho foram cultivadas em casa-de-vegetação por doze a catorze dias, em copos de polietileno, contendo solo esterilizado com brometo de metila. Plantas com aproximadamente 12 a 15 cm de altura foram recolhidas dos copos, tiveram suas raízes agitadas manualmente para retirar o excesso de solo e, sua folhagem foi imediatamente imersa nas suspensões bacterianas contidas em beakers, às quais foram adicionadas uma a duas gotas do espalhante adesivo Tween 80. Os beakers foram colocados em dessecador com capacidade para quatro litros, ao qual se acoplou uma bomba de vácuo, Modelo 141, Tipo 2 VC. Fez-se então vácuo de 66 cm de mercúrio por um, dois e três minutos, consecutivamente, seguindo-se evacuação súbita, até completa infiltração da folhagem. As testemunhas foram tratadas similarmente com água destilada. Fez-se imediatamente o replantio em vasos plásticos, os quais foram colocados em casa-de-vegetação, onde a temperatura variou de 20 a 35°C.

O delineamento estatístico foi inteiramente ao acaso e o número de repetições (3 a 4) variou em função da disponibilidade de plântulas. Para análise estatística, os dados foram transformados em $\sqrt{x+1}$ ou Arc sen $\sqrt{\%}$.

A avaliação dos resultados foi realizada diariamente através do número de dias necessários ao aparecimento dos sintomas e contagem do número de folhas infectadas por planta, sendo que no último experimento foi avaliada a percentagem de área foliar infectada.

Deteção de Xcc em Sementes de Mostarda Através da Técnica de Infiltração a vácuo

Amostras contendo 300 sementes de mostarda, foram tomadas de lote

apresentando 1% de infecção por Xcc, desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio por um minuto e lavadas por três vezes em água destilada e esterilizada. Cada amostra foi então macerada com 300 ml de água (contendo 1% de carbonato de cálcio) em liquidificador esterilizado. As suspensões obtidas foram filtradas em gaze esterilizada e colocadas em beakers esterilizados, aos quais foram adicionadas duas gotas de espalhante adesivo Tween 20. Realizou-se então a infiltração de cada suspensão separadamente em plantas de couve, couve-flor, mostarda e repolho. O delineamento estatístico foi inteiramente ao acaso, com três repetições por tratamento. Para análise, os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$. Os procedimentos para replantio, incubação e leitura dos sintomas foram similares àqueles utilizados na detecção de Xcc em cultura pura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Detecção de Xcc em Cultura Pura Através da Técnica de Infiltração a Vácuo

Nas Tabelas 1, 2 e 3 observa-se que ocorreram diferenças significativas na detecção de Xcc, com relação aos diferentes hospedeiros. Nos experimentos 1 e 3, a mostarda destacou-se como planta mais suscetível, pela apresentação de maior número de folhas infectadas, o mesmo ocorrendo com o repolho no experimento 2.

Nota-se uma certa especificidade entre patógeno-hospedeiro uma vez que Xcc1 utilizado no experimento 1, foi obtida de mostarda, e os resultados mostram este hospedeiro como o mais suscetível. Esta mesma relação de especificidade foi evidenciada no experimento 2, em relação ao repolho. Resultado diferente, foi obtido no experimento 3, quando Xcc2, isolada de repolho foi utilizada, e o melhor hospedeiro foi a mostarda. Apesar das evidências de especificidade dos isolados, todos os hospedeiros apresentaram sintomas em todos os experimentos, o que sugere a validade da técnica, para detecção de Xcc, proveniente de qualquer brássica hospedeira.

Xcc foi detectada, em todas as concentrações utilizadas nos três experimentos, indicando uma grande eficiência da técnica. Estes dados concordam com aqueles obtidos por Jones, McCarter e Smitley (1981) que conseguiram detectar populações tão baixas quanto 10^1 u.f.c. de *P. syringae* pv. *tomato* por ml de suspensão ou grama de solo.

A influência do hospedeiro na detecção de Xcc, medida através do tempo de aparecimento dos sintomas foi analisada conjuntamente, nos experimentos 1, 2 e 3. Apesar de não haver análise estatística dos dados, uma vez que, apenas o dia de aparecimento do primeiro sintoma, em cada tratamento, foi observado, no primeiro e segundo experimentos a mostarda comportou-se como o hospedeiro

deiro que apresentou sintomas mais rápida e uniformemente nas três concentrações. No terceiro experimento ocorreu uma grande uniformidade de aparecimento dos sintomas em todos os hospedeiros e concentrações.

No cômputo geral, a mostarda foi o hospedeiro que apresentou sintomas mais rapidamente em todas as concentrações estudadas, fator importante num teste de detecção e que recomenda a sua utilização na detecção de Xcc através da técnica de infiltração a vácuo.

Como pode ser observado na Tabela 4, o uso de porcentagem de áreas foliar infectada como parâmetro, também mostrou diferença significativa entre hospedeiros. Couve, couve-flor e mostarda foram as plantas mais suscetíveis, sendo que esta última apresentou maior porcentagem de área foliar infectada.

A utilização da porcentagem de área foliar infectada, também possibilitou a detecção das três concentrações testadas, o que indica a sua eficiência para detecção de baixas concentrações de Xcc.

Conforme Tabela 4, não houve diferença significativa entre os tempos utilizados para a observação dos sintomas, recomendando-se a avaliação final, cinco dias após o teste.

Os resultados expressos na Tabela 5 evidenciam diferenças significativas entre os hospedeiros utilizados, na detecção de Xcc em sementes, destacando-se entre eles a mostarda como a mais indicada, tanto pelo maior número de folhas infectadas, quanto pelo menor número de dias necessários ao aparecimento dos sintomas. Mais uma vez foi verificada a especificidade da bactéria em estudo, pois as sementes testadas eram de mostarda, e a alta eficiência da técnica, uma vez que, a porcentagem de infecção deste lote de sementes, por Xcc, era de 1%.

TABELA 1 - Influência do hospedeiro na detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* medida através do número de folhas infectadas, utilizando-se a técnica de infiltração a vácuo, Experimento 1

HOSPEDEIRO	Nº DE FOLHAS INFECTADAS
Couve	2,08 b ¹
Couve-flor	1,57 bc
Mostarda	3,89 a
Repolho	2,21 b
DMS 5%	0,54
C.V. = 17,04%	

¹ Médias de três repetições por tratamento; médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 2 - Influência do hospedeiro na detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* medida através do número de folhas infectadas, utilizando-se a técnica de infiltração a vácuo, Experimento 2

HOSPEDEIRO	Nº DE FOLHAS INFECTADAS
Couve	2,05 ab ¹
Couve-flor	1,83 b
Mostarda	1,98 ab
Repolho	2,24 a
DMS 5%	0,33
C.V. = 14,39%	

¹ Médias de quatro repetições por tratamento; médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 3 - Influência do hospedeiro na detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* medida através do número de folhas infectadas, utilizando-se a técnica de infiltração a vácuo, Experimento 3

HOSPEDEIRO	Nº DE FOLHAS INFECTADAS
Couve	1,91 ab ¹
Couve-flor	1,89 ab
Mostarda	2,05 a
Repolho	1,81 b
DMS 5%	0,23
C.V. = 10,64%	

¹ Médias de quatro repetições por tratamento; médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 4 - Influência do hospedeiro e tempo para observação dos sintomas na detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* medida através da porcentagem da área foliar infectada, utilizando-se a técnica de infiltração a vácuo.

HOSPEDEIRO	ÁREA FOLIAR INFECTADA (%)	TEMPO (d)	ÁREA FOLIAR INFECTADA (%)
Couve	53,27 ab ¹	5	56,25 a
Couve-flor	59,79 a	10	55,49 a
Mostarda	65,29 a	15	55,10 a
Repolho	44,11 b		
DMS (%)	11,25		8,85
C.V. = 32,62%			

¹ Médias de quatro repetições por tratamento; médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 5 - Influência do hospedeiro na detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em sementes de mostarda, medida através do número de folhas infectadas e tempo de aparecimento dos sintomas, utilizando-se a técnica de infiltração a vácuo.

HOSPEDEIRO	Nº DE FOLHAS INFECTADAS	TEMPO (d)
Couve	1,35 b ¹	4,25 bc
Couve-flor	1,20 b	4,89 c
Mostarda	2,19 a	2,00 a
Repolho	1,27 b	3,59 b
DMS 5%	0,32	1,05
C.V. = 10,23%		

¹ Médias de quatro repetições por tratamento; médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

ABSTRACT

The efficiency of the vacuum infiltration technique for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) in pure culture and seeds, was evaluated. The influence of host species (Kale, cauliflower, mustard and cabbage), and the evaluation parameters, number of infected leaves, time of symptoms appearance and, percent of foliar area infected, were studied. The results showed that technique is highly efficient, detecting $4,5 \times 10^1$ ufc/ml of Xcc in pure culture and 1% of seed infection. The mustard was the most susceptible host and the first one who showed symptoms. Both, number of infected leaves and percent of foliar area infected, can be used as parameters to evaluate the test.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALVAREZ, A. M.; LOU, K. Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by ELISA. *Plant Disease*, St. Paul, v. 69, p. 1021-10112, 1985.
- 2 —; BENEDICT, A. A.; MIZUMOTO, C. Y. Identification of xanthomonads and grouping of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with monoclonal antibodies. *Phytopathology*, St. Paul, v. 75, p. 722-728, 1985.
- 3 BOOSALIS, M. G. A partial-vacuum technique for inoculating seedlings with bacteria and fungi. *Phytopathology*, St. Paul, v. 40, p. 2-3, 1950. Abstract.
- 4 CHUN, W. C.; ALVAREZ, A. M. A starch-methionine medium isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from plant debris in soil. *Plant Disease*, St. Paul, v. 67, p. 632-635, 1983.
- 5 GOTO, M. The significance of vegetation for survival of plant pathogenic bacteria. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 3., 1972, Wageningen. *Proceedings...* Wageningen : Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1972. p. 39-53.
- 6 JONES, J. B.; McCARTER, S. M.; SMITLEY, D. R. A vacuum infiltration inoculation technique for detecting *Pseudomonas tomato* in soil and plant tissue. *Phytopathology*, St. Paul, v. 71, n. 11, p. 1187-1190, Nov. 1981.
- 7 MARIANO, R. L. R.; CABRAL, G. B.; SILVA, M. S. S. G. da. Levantamento de fitobacterioses do Estado de Pernambuco em 1987. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 13, n. 2, p. 130, 1988. Resumo.
- 8 —; —; MELO, R. A. G. et al. Levantamento das fitobacterioses relatadas no Estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 12, n. 2, p. 155, 1987. Resumo.
- 9 —; MELO, R. A. G.; HOLANDA, V. T. et al. Levantamento de fitobacterioses no Estado de Pernambuco, no biênio 1987-1988. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 4, n. 2, p. 158, jul. 1989. Resumo, 276.
- 10 MELO, R. A. G.; MARIANO, R. L. R. Detecção do agente da podridão negra das crucíferas

(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) pela técnica de infiltração à vácuo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 13, n. 2, p. 102, 1988.

- 11 RAMOS, R. L. B.; BARROS, S. T.; MENEZES, M. et al. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em lotes de sementes comerciais de brássicas. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 10, n. 3, p. 423-426, 1985.
- 12 RANDHAWA, P. S.; SCHAAD, N. W. Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology*, St. Paul, v. 74, n. 3, p. 268-272, 1984.
- 13 SCHAAD, N. W.; DIANESE, J. C. Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifera. *Phytopathology*, St. Paul, v. 71, n. 11, p. 1215-1220, 1981.
- 14 SCHAAD, N. W.; WHITE, W. C. A selective medium for soil isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 64, n. 11, p. 876-880, 1974a.
- 15 —; —. Survival of *Xanthomonas campestris* in soil. *Phytopathology*, St. Paul, v. 64, n. 12, p. 1518-1520, 1974b.
- 16 SILVEIRA, V. D. *Elementos de fitopatologia*. Rio de Janeiro: [s n.], 1949. v. 8, p. 207-247: Doenças bacterianas.

Recebido para publicação em 15 de julho de 1992