

TOSIAKI KIMOTO

ENGENHEIRO AGRÔNOMO

Instrutor da Cadeira N.º 12 - Horticultura
da E. S. A. «Luiz de Queiroz», U. S. P.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE MÉTODO DE
SELEÇÃO DE VARIEDADES LOCAIS DE REPÔLHO
(*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) RESISTENTES
À *Xanthomonas campestris* (PAM.) DOWSON

Tese de Doutorado

apresentada à

Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz», U.S.P.

P I R A C I C A B A

Novembro de 1968

A meus pais,

com gratidão,

dedico.

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3 - MATERIAL	9
3.1 - Repólho	9
3.2 - Patógeno	10
3.3 - Substrato para o cultivo do hospedeiro	10
3.4 - Meio de cultivo do patógeno	11
3.5 - Local do experimento	11
3.6 - Câmara úmida	11
3.7 - Contrôles de temperatura e umidade	11
4 - MÉTODOS	12
4.1 - Isolamento, purificação e conservação do patógeno	12
4.2 - Tratamento das sementes, semeadura e obtenção das plântulas	12
4.3 - Preparo do inóculo, diluição e inoculação..	13
4.4 - Método de avaliação da severidade da doença	14
4.5 - Técnica de autofecundação e cruzamento do repólho	16
4.6 - Experimento I. Teste de resistência das variedades de repólho a <u>Xanthomonas</u>	16
4.7 - Experimento II. Teste de resistência das progênies S ₁ a <u>Xanthomonas</u>	17
4.8 - Experimento III. Teste de resistência das progênies S ₂ a <u>Xanthomonas</u>	19
4.9 - Experimento IV - Teste de concentração do inóculo	21
4.10 - Experimento V. Teste de resistência do repólho a <u>Xanthomonas</u> no campo	22
4.11 - Experimento VI. Teste de comparação dos métodos de classificação das plantas, e de resistência das progênies selecionadas a <u>Xanthomonas</u>	23
4.12 - Métodos de análise estatística	25
5 - RESULTADOS	26
5.1 - Sintomatologia	26
5.2 - Experimento I	29
5.3 - Experimento II	30
5.4 - Experimento III	33
5.5 - Experimento IV	38
5.6 - Experimento V	42
5.7 - Experimento VI	44

6 - DISCUSSÃO	51
7 - CONCLUSÕES	56
8 - RESUMO	57
9 - SUMMARY	59
10 - BIBLIOGRAFIA	61
11 - AGRADECIMENTOS	64

1 - INTRODUÇÃO

O repólho, hortaliça de grande importância econômica e alimentar, é cultivado no Estado de São Paulo durante o ano todo.

Segundo o levantamento estatístico da Cooperativa Agrícola de Cotia (1967)*, foram comercializados em 1966, no Estado de São Paulo, 850.000 sacas de repólho, no valor total de NCr\$ 3.247.000,00. Em 1967, somente a Cooperativa Agrícola de Cotia comercializou 291.497 sacas, no valor total de NCr\$ 2.513.191,45*.

Por outro lado, segundo o levantamento de preços feito pela Cooperativa Agrícola de Cotia (1965) durante um período de dez anos (1955 a 1964), o produto atinge, anualmente, cotação máxima de janeiro a março e mínima de setembro a novembro.

Essa oscilação se deve à dificuldade de produção de hortaliças de folhas nas épocas quentes e úmidas.

As variedades de repólho cultivadas atualmente, apesar de mostrarem bom grau de adaptação às condições de calor e umidade, apresentam diversos graus de suscetibilidade à doença "Podridão Negra das Crucíferas", causada por Xanthomonas campestris (Pam.) Dowson, (daqui para frente referida simplesmente por Xanthomonas).

Essa doença é um dos fatores limitantes da produção de repólho na época quente e chuvosa do ano. Nesse período as condições para a epifitias do patógeno Xanthomonas são excelentes.

A falta de dados dificulta precisar o total de prejuízo causado por essa doença no Estado de São Paulo. Entre-

* Dados colhidos junto à Divisão de Estatística da Cooperativa Agrícola de Cotia (1968).

tanto, a presença do patógeno é constante, causando em muitas culturas até 100% de prejuízo naquela época do ano. Esses fatos foram observados por nós, durante o verão dos anos de 1964 e 1965.

Como medidas de controle de Xanthomonas, WALKER (1965) recomenda:

- a) aquisição de sementes saudáveis;
- b) tratamento das sementes;
- c) rotação de cultura.

Estas recomendações são de difícil execução pois:

- a) A maioria das sementes é produzida pelos próprios lavradores;
- b) as variedades importadas atualmente, apesar da boa qualidade, são altamente suscetíveis a essa doença;
- c) lavradores e vendedores negligenciam no tratamento das sementes;
- d) a rotação de cultura recomendada nem sempre é praticável, pois a maioria dos cultivadores são pequenos proprietários, utilizando, intensivamente, a área disponível, para outros cultivos. Além do mais é comum cultivarem, próximo ao repolho, outras crucíferas hospedeiras da doença.

Desta maneira o patógeno, uma vez instalado, é de difícil erradicação.

Diante desses problemas, propusemo-nos a estudar métodos de seleção do repolho, visando a obtenção de variedades resistentes.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

A "podridão negra das crucíferas" é doença bacteriana conhecida desde fins do século passado.

Segundo MEIER (1934), essa doença foi citada pela primeira vez por Garman em 1891, causando graves prejuízos em culturas de repólho, durante a época quente e chuvosa do ano.

Devido aos graves prejuízos causados na cultura do repólho, a doença foi intensivamente estudada por RUSSEL (1898) e SMITH (1898). Êsses autores verificaram que a penetração da Xanthomonas se fazia através do hidatódio das fôlhas e confirmaram as observações de Garman, que a doença ocorria na época quente e chuvosa do ano.

Após os estudos já citados de SMITH e RUSSEL, vários autores estudaram o mecanismo de infecção da Xanthomonas: STEWART e HARDING (1903), HARDING et al. (1904), DRECHESLER (1914), BROWN e HARVEY (1920), CLAYTON (1925), MEIER (1934), RICHARDSON (1945), BHIDE (1949) e COOK et al. (1952a). Êstes últimos autores estudaram detalhadamente o ciclo da "podridão negra das crucíferas" em repólho e couve-flor, e chegaram às seguintes conclusões: a) a penetração da Xanthomonas se fêz principalmente pelo hidatódio das fôlhas, confirmando as observações de RUSSEL (1898) e SMITH (1898); b) o estômato não era uma importante via de penetração da Xanthomonas, porque a penetração depende unicamente da continuidade líquida entre a abertura estomatal e a câmara subestomática, o que normalmente não acontece na natureza; c) o ferimento da raiz não foi um pré-requisito para a infecção através dos órgãos subterrâneos, embora o ferimento mecânico precedido de inoculação aumentasse a porcentagem de infecção; à medida que a temperatura se elevava, de 20 a 28°C, o patógeno era progressivamente favorecido.

Os estudos sobre a transmissão do patógeno foram

feitos pelos seguintes autores: HARDING et al.(1904), SMITH (1911), WALKER e TISDALE (1920), MONTEITH (1921), CLAYTON (1925), COOK et al.(1952b). Estes últimos autores, diante dos resultados obtidos em seus experimentos, concluíram que as sementes viáveis, provenientes de plantas infectadas, tinham baixa porcentagem de infecção. Partindo dessa pequena quantidade de sementes infectadas, a doença se disseminava no alfobre.

Os estudos sobre o controle da doença foram feitos pelos seguintes autores: SMITH (1911), CLAYTON (1924a,b), BACH e TAUBENHAUS (1930), WALKER (1941a), KLISIEWICZ e POUND (1961).

Existe pouca literatura a respeito do controle da doença por meio de variedades resistentes, apesar das observações da existência de diferentes níveis de suscetibilidade entre variedades e entre plantas da mesma variedade.

Assim, RUSSEL (1898), em seu trabalho, após inocular artificialmente as bactérias em algumas crucíferas, constatou ser a couve-flor a mais suscetível, o repólho facilmente afetado e as couves-comuns as menos suscetíveis das brássicas. O nabo, rabanete e rutabaga foram considerados como ligeiramente suscetíveis.

EDWARDS (1908) concluiu, dos resultados de testes de inoculação, bem como da observação varietal, que a variedade de repólho Houser era praticamente imune à "Podridão Negra das Crucíferas", sob condições de campo.

BACH e TAUBENHAUS (1930), durante a epifítia da "Podridão Negra das Crucíferas" em 1928-29, classificaram as variedades de repólho Glory of Enkuizen como as mais severamente atacadas, seguindo em ordem decrescente em severidade ao ataque da doença, as seguintes variedades: Copenhagen Market, Flat Dutch, Wakefield, All Head Early, Mammoth Red Rock e Savory. As duas úl

timas sofreram menos prejuízos do que as duas primeiras. Observaram ser também altamente suscetíveis a couve-flor e o brócolo.

CLAYTON (1929) afirmou que não há resistência em linhagens de couve-flor da variedade Snowball-Erfurt, mas que tipos selvagens, como Henderson-Erfurt, eram mais tolerantes. O autor conseguiu selecionar linhagens de Snowball-Erfurt que possuíam maior resistência do que a variedade original, mas não as considerou como resistentes. Do cruzamento entre couve-flor e couve-comum tolerante à Xanthomonas e retrocruzamento do F1 com couve-flor, obteve uma linhagem de couve-flor tolerante à "Podridão Negra das Crucíferas", com a mesma tolerância da couve-comum tolerante. Sugeriu que haveria uma boa possibilidade de obter-se couve-flor resistente à Xanthomonas, partindo dessas seleções.

THUNG (1949) descreveu que, entre muitas variedades testadas em solos altamente infestados, em Java, as variedades Late Giant, Early Drumhead, Sugar Loaf e Yellows Resistant mostraram maior resistência, no campo, à "Podridão Negra das Crucíferas" do que Earliest of All, Yates Utility, Glory Enkuizen e outras variedades.

EDDINS (1950) descreveu que, em testes de inoculação com 67 linhagens de repólho, todas as plantas foram infectadas, porém a Xanthomonas desenvolveu-se mais rapidamente em variedades de maturação precoce.

BAIN (1951), em seus testes de inoculação de sementes de repólho, classificou como resistentes à Xanthomonas, as variedades Premium Late Flat Dutch, Succession, Red Acre, Marion Market, Wisconsin Ballhead e Early Round Dutch. Outras variedades, incluindo Glory of Enkuizen e Copenhagen Market, foram consideradas suscetíveis. Nesse trabalho, o autor chamou a atenção para o fato de que o teste e a classificação das plântulas foram feitos analisando-se os sintomas nas folhas cotiledonárias, e também para o fa-

to de encontrar grande quantidade de plântulas que permaneceram sadias. Sugeriu que essas plântulas possuíam um alto grau de resistência à Xanthomonas, ou escaparam à infecção. Recomendou, pela maior facilidade de testar grande número de plantas em uma pequena área, o método de inoculação de sementes.

BAIN (1952), em seus testes de inoculação de sementes de repólho com Xanthomonas, notou que sempre havia plântulas que permaneciam sem apresentar sintomas visíveis e que a quantidade de plantas sem sintomas variava com as variedades. O mesmo autor, num outro teste, incluindo sementes das variedades locais, estrangeiras e provenientes da autofecundação das plantas que permaneceram sadias em teste de inoculação anterior, verificou que as variedades locais eram mais resistentes à Xanthomonas do que as estrangeiras, com exceção das duas variedades, Succession e Early Fuji, que mostraram baixa porcentagem de "Podridão Negra das Crucíferas". Outro resultado interessante, obtido pelo autor, foi a diferença na suscetibilidade entre plantas selecionadas e autofecundadas, e a variedade original. Observou que êsses resultados evidenciaram a existência de fator ou fatores para a resistência do repólho à Xanthomonas, e chamou atenção para a técnica de seleção através da inoculação das sementes, e a possibilidade de selecionar plantas resistentes a partir de certas variedades comerciais.

BAIN (1955a) relatou que a inoculação de Xanthomonas nas sementes pode não ocasionar sintomas nas folhas verdadeiras e cotiledonárias, mesmo em condições favoráveis para o desenvolvimento do patógeno; sintomas poderão aparecer mais tarde, com maior intensidade nas plantas suscetíveis. Concluiu que o método de inoculação de sementes era efetivo para avaliar a resistência, porém outros meios auxiliares deviam ser empregados numa determinação mais acurada.

BAIN (1955b) relatou os resultados de dois testes no campo, nos anos de 1952-53, com progênies autofecundadas, provenientes das plantas selecionadas pela inoculação das sementes das variedades comerciais Round Dutch, Early Fuji e Huguenot. O autor inoculou Xanthomonas três vezes por pulverização nas folhas e duas vezes por injeção no caule das plantas. Nos dois testes realizados, as plantas foram selecionadas de acordo com o desenvolvimento dos sintomas nas folhas. Em ambos testes, as progênies Early Fuji e Huguenot apresentaram baixo índice de infecção, mas a Round Dutch apresentou índice de infecção um pouco maior. Observou que essas progênies, aparentemente sem sintomas (Early Fuji e Huguenot), apresentavam uma pequena porcentagem de plantas com vasos do caule descoloridos. A necrose se limitava junto ao ferimento produzido pela agulha de injeção.

POPOV (1957) relatou que, sob condições de infecção natural ou artificial com Xanthomonas, certas variedades de repólho mostraram alta resistência à "Podridão Negra das Crucíferas". Observou que, embora tanto a variedade resistente como a suscetível se tornassem infectadas quando inoculadas, as variedades resistentes permaneciam sem sintomas ou somente os mostravam tardiamente.

ORTIZ (1962-63) realizou testes de resistência em 14 variedades locais de repólho, inoculando Xanthomonas, por pulverização, nas folhas das plantas com 30 dias de idade. Fazendo avaliação da doença, de acordo com o desenvolvimento dos sintomas nas 6 folhas mais novas, concluiu que nenhuma das variedades testadas era imune à Xanthomonas e que havia um grau de suscetibilidade dentre as variedades e entre plantas da mesma variedade.

IKUTA et al.(1965), estudando o comportamento de 50 variedades locais e híbridas japonesas, avaliaram a infecção natural de Xanthomonas pela leitura dos sintomas nas folhas. Con

cluíram que as variedades locais (Repólho Louco) apresentaram qualidade relativamente boa e que as híbridas japonesas Shikidori e Natsumaki-Rissô não eram as melhores para o cultivo em nossas condições. Entretanto atribuíram mesma nota em relação ao ataque da Xanthomonas para as variedades Louco I.G., Louco Mogi, Híbridos Shikidori e Natsumaki-Rissô.

3 - MATERIAIS

3.1 - Repólho

As variedades de repólho utilizadas no presente trabalho são originárias do repólho Louco cultivado no verão. Segundo TOKESHI (1963), essas variedades foram selecionadas conforme o gosto e preferência do lavrador, para determinadas características, resultando daí praticamente tantas variedades quantos são os produtores de sementes, e é por essa razão que todos os repolhos Loucos aqui relacionados recebem o nome dos produtores, excetuando-se as variedades produzidas por órgãos oficiais, obtidas segundo métodos científicos e, no geral, com objetivos pré-determinados.

VARIEDADES	PROCEDÊNCIA
D - Repólho Louco I.G.	Instituto de Genética - ESALQ
C - Repólho Louco Nilo Garcia	Biritiba Mirim (SP) - Lavrador
B - Repólho Louco Jimenes	Sementes Jimenes - Cia. de Sementes
A - Repólho Louco Akio Owatari	Mogi das Cruzes (SP) - Lavrador

Justifica-se a utilização do material local por terem sido observados, "in loco", diferentes graus de resistência, e também porque, uma vez selecionadas, as variedades resistentes serão muito semelhantes às variedades locais originárias, quanto às características agronômicas.

Além das variedades de repólho Louco, utilizou-se um híbrido japonês, denominado Shikidori, como controle de suscetibilidade. Essa variedade, segundo IKUTA (1965), vem sendo importada do Japão desde 1960, e seu cultivo vem aumentando, com relativo sucesso, substituindo, em parte, a variedade local. Entretanto, nas visitas realizadas às culturas, sempre observamos que essa variedade era altamente suscetível à "Podridão Negra das Crucíferas".

3.2 - Patógeno

O patógeno empregado nos experimentos foi coletado junto a várias propriedades agrícolas, das principais regiões produtoras de repólho. Os isolamentos utilizados foram os abaixo relacionados:

Procedência dos patógenos utilizados.

ISOLAMENTO Nº	HOSPEDEIRA	BAIRRO	MUNICÍPIO
01	Couve-flor	Santa Catarina	Mogi das Cruzes
02	Repólho	Santa Catarina	Mogi das Cruzes
03	Repólho	Biritiba-Ussu	Mogi das Cruzes
04	Repólho	Santo Ângelo	Jundiapéba
05	Repólho	B. dos Remédios	Salesópolis
06	Repólho	Santa Catarina	Mogi das Cruzes
07	Repólho	B. dos Remédios	Salesópolis
08	Repólho	Biritiba-Mirim	Biritiba-Mirim
09	Repólho	B. dos Remédios	Salesópolis
10	Repólho	Pindorama	Jundiapéba
11	Repólho	Biritiba-Mirim	Biritiba-Mirim
12	Repólho	Pôsto	Ribeirão Pires

3.3 - Substrato para o cultivo do hospedeiro

Em todos os experimentos, cultivou-se o hospedeiro em uma mistura de solo (8 partes de terra rôxa, 6 partes de estêrco peneirado e uma parte de areia grossa), colocada em caixas de madeira, descritas por TOKESHI (1963), com as seguintes dimensões: 43 cm de comprimento, 32 cm de largura e 10 cm de altura.

Os solos e as caixas foram sempre esterilizados em autoclave a 1,5 atmosfera, durante 2 horas, com bastante antecedência à sua utilização.

3.4 - Meio de cultivo do patógeno

Para isolamento, purificação e conservação do patógeno proveniente do campo, utilizamos o meio sólido de ágar nutritivo, contendo peptona (5 gramas), extrato de carne (3 gramas) e ágar (15 gramas), dissolvidos em 1.000 ml de água destilada.

O pH do meio foi ajustado para 7 e esterilizado em autoclave a 1,5 atmosfera durante 30 minutos.

3.5 - Local do experimento

Todos os experimentos foram conduzidos na Casa de vegetação da Cadeira nº 11-Fitopatologia e Microbiologia Agrícola, e na horta da Cadeira nº 12-Horticultura.

3.6 - Câmara úmida

A câmara úmida, para inoculação do patógeno, foi feita dentro da casa de vegetação, cobrindo-se as caixas contendo plântulas, com filmes de polietileno. As caixas eram abundantemente irrigadas antes da colocação do polietileno.

3.7 - Contrôles de temperatura e umidade

O controle da temperatura dentro da casa de vegetação foi feito com aquecedor e refrigerador automáticos.

Para manter o ambiente com umidade elevada, o piso da casa de vegetação foi forrado com serragem e mantido sempre úmido, com irrigação constante. As temperaturas máximas e mínimas registradas durante o decorrer dos experimentos, foram em média, respectivamente, 32°C diurnos e 23°C noturnos.

4 - MÉTODOS

4.1 - Isolamento, purificação e conservação do patógeno

O isolamento das culturas utilizadas no experimento seguiu a seguinte marcha: os materiais de repólho e couves-flôres foram trazidos do campo para o laboratório, e aí as hastes ou as nervuras das fôlhas, com bastante sintomas internos na região vascular, foram selecionadas e desinfetadas superficialmente por flambagem. O córtex foi removido em seguida e um pequeno pedaço de tecido foi retirado da região dos vasos e transferido para o tubo de ensaio contendo água esterilizada, para obtenção de suspensão bacteriana. Depois de 20 a 30 minutos de repouso, uma alça de suspensão foi plaqueada em caixa de petri, contendo ágar nutritivo e incubada a 28°C durante 48 horas. As colônias crescidas separadamente foram purificadas por três plaqueamentos sucessivos.

Para conservação, os patógenos foram cultivados em tubos de ensaio, contendo ágar nutritivo, e as superfícies da colônia foram cobertas com óleo mineral (Nujol) esterilizado. Finalmente os tubos foram conservados em câmara frigorífica a 17°C.

4.2 - Tratamento das sementes, semeadura e obtenção das plântulas

Tôdas as sementes foram tratadas segundo técnica recomendada por KLISIEWICZ e POUND (1961). As sementes foram mergulhadas em uma solução de aureomicina, na concentração de 1.000 ppm, durante 30 minutos; a seguir foram lavadas em água corrente e mergulhadas por 30 minutos em solução de fosfato biácido de potássio (KH_2PO_4), à concentração de 0,25 M, para a eliminação do excesso de antibiótico.

Após êsses dois tratamentos, as sementes foram secadas sôbre fôlhas de jornal, à sombra, e em seguida sofreram um

tratamento com Arasan-75 (Thiran), até ficarem com a superfície inteiramente recoberta pelo fungicida. As sementes tratadas foram conservadas em câmara de conservação de sementes até a época de sua utilização.

A sementeira foi feita em sulco, a uma profundidade de 1 cm, e as sementes foram cobertas com estêrco de curral peneirado e esterilizado.

Para evitar ataque de Rhizoctonia solani Kühn, logo após a sementeira, a superfície do solo foi pulverizada com Brassicol (PCNB), colocando-se mais ou menos 5 gramas do produto por caixa.

Após a germinação, as plântulas defeituosas foram eliminadas, e as perfeitas tutoradas com barbante passado ao longo das mesmas e prêsas às extremidades das caixas. As plântulas foram inoculadas quando apresentavam 2 a 3 folhas verdadeiras bem desenvolvidas.

4.3 - Preparo do inóculo, diluição e inoculação

O inóculo foi preparado, repicando-se cada isolamento em vaso de Erlenmeyer, contendo 250 ml de nutriente líquido, e incubando em estufa a 28°C, durante 72 horas.

Após a incubação, os diferentes isolamentos foram misturados, e a seguir diluídos em água destilada na proporção de 1:1.

Quando se efetuou o teste de concentração do inóculo (Experimento 4), as bactérias incubadas isoladamente foram misturadas e diluídas em água destilada nas seguintes proporções:

- 1 - 1:1
- 2 - 1:10
- 3 - 1:100

4 - 1:1.000

5 - 1:10.000

Preparou-se a suspensão bacteriana, adicionando-se espalhante adesivo Esapon. Essa suspensão foi então inoculada, por pulverização, nas plântulas previamente submetidas às condições da câmara úmida, por 24 horas. Teve-se o cuidado de cobrir, com a pulverização, toda a superfície das folhas. A seguir as plântulas tratadas foram recolocadas na câmara úmida onde permaneceram por um período de 24 a 30 horas.

Completado esse período, as caixas com as plântulas foram retiradas da câmara úmida, e permaneceram sob controle parcial de temperatura e umidade, até a época de seleção.

Todas as plântulas foram inoculadas quando apresentavam 2 a 3 folhas verdadeiras bem desenvolvidas.

4.4 - Método de avaliação da severidade da doença

Utilizaram-se 2 métodos para a avaliação da doença: o primeiro, utilizado por BAIN (1955b) e ORTIZ (1962-63), e modificado por nós, consistiu em classificar as plântulas de acordo com o desenvolvimento dos sintomas nas folhas inoculadas, 14 a 15 dias após a inoculação, atribuindo-se as seguintes notas:

Nota Sintomas nas folhas inoculadas

0	Sem sintomas
1	Sintomas leves
2	Sintomas moderados
3	Sintomas severos

Esse método de classificação foi empregado nos experimentos I, II, III e IV, e comparado com o outro método no experimento VI.

No experimento IV observamos que, entre 20-25 dias após a inoculação, ocorreu queda das folhas inoculadas e apare-

cimento de um outro tipo de sintoma nas folhas não inoculadas da variedade suscetível. Entre 25 a 30 dias após a inoculação os sintomas apareceram também nas folhas do ápice, ocasionando o murchamento e a morte das plântulas. Aos 35 dias a maioria das plântulas do híbrido Shikidori estava morta.

Nas progênies selecionadas como resistentes pelo método anterior algumas plântulas apresentavam os sintomas acima mencionados, mas a maioria permanecia aparentemente sadia, sem sintomas visíveis. Entretanto, seccionando-se os caules, longitudinalmente, encontrou-se necrose na parte interna, junto ao tecido vascular do caule. Essa necrose foi encontrada circunscrita junto à cicatriz das folhas inoculadas e caídas, ou avançando um pouco acima. Houve casos de ausência da necrose.

Essa observação nos levou a adotar um segundo método de avaliação. Esse método foi baseado no desenvolvimento dos sintomas no tecido vascular do caule das plântulas, 35 dias após a inoculação, quando a maioria das plântulas do híbrido Shikidori estava morta.

O critério de classificação das plântulas foi baseado em WELLMAN (1939), empregado por TOKESHI (1966) em Fusarium do tomateiro, com pequenas modificações, e adaptado por nós ao repólho. De acordo com o desenvolvimento dos sintomas no tecido vascular do caule foram dadas as seguintes notas:

Critério de classificação:

Notas

Sintomas apresentados pelas plantas

- | | |
|-----|---|
| 0 | Sem necrose no tecido vascular do caule. |
| 20 | Necrose do tecido vascular limitada junto às 2ª e 3ª folhas. |
| 40 | Necrose do tecido vascular até a altura da 5ª folha. |
| 60 | Necrose do tecido vascular até a metade do caule. |
| 80 | Necrose do tecido vascular até próximo à gema apical. |
| 100 | Necrose do tecido vascular até à gema apical, e plantas mortas. |

Para facilidade, os métodos de classificação das plântulas baseando-se no desenvolvimento dos sintomas nas folhas inoculadas e no tecido vascular do caule, doravante serão denominados, respectivamente, de método 1 e método 2.

4.5 - Técnica de autofecundação e cruzamento

Foram utilizadas técnicas de autofecundação e cruzamento semelhantes às aquelas utilizadas por TOKESHI (1963).

Para autofecundação, escolhíamos hastes florais bem desenvolvidas, eliminávamos as flôres abertas e botões muito novos e, em seguida, cobríamos as hastes com saquinhos de papel. Dois dias depois, quando encontravam-se abertas algumas flôres, utilizávamos o pólen dessas flôres para polinizar os botões da mesma haste, expondo o estigma com auxílio de uma pinça cirúrgica. A polinização foi feita destacando-se o saco polínico com a pinça e esfregando-se levemente o pólen sobre o estigma. Essa operação foi feita com a finalidade de contornar a auto-incompatibilidade, muito comum nas brássicas.

Para o cruzamento, efetuávamos primeiro a emasculação dos botões. Estes botões eram imediatamente cobertos com saquinhos de papel e um a dois dias após, quando as flôres estavam abertas, efetuávamos o cruzamento desejado e as recobríamos, imediatamente, com saquinhos de papel. O pólen utilizado nos cruzamentos foi extraído das flôres guardadas com antecedência em ambiente fechado.

4.6 - Experimento I - Teste de resistência das variedades de repólho à Xanthomonas

Para êsses estudos foram utilizadas as seguintes variedades:

- A - Repólho Louco Akio Owatari
- B - Repólho Louco Jimenes
- C - Repólho Louco Nilo Garcia
- D - Repólho Louco I.G.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com 4 tratamentos e 8 repetições. Cada parcela era constituída de 100 plântulas, semeadas de acôrdo com o processo descrito no item 4.2. O ensaio foi instalado em casa de vegetação no dia 8/4/1965. A inoculação do patógeno foi feita em 24/4/1965 de acôrdo com o descrito no item 4.3. Em 14/5/1965, portanto 15 dias após a inoculação, foi feita a classificação das plântulas pelo método 1.

Para o efeito de análise da variância foram classificadas sòmente 20 plântulas por parcela, tomando-se sempre as duas fileiras centrais.

As plântulas que receberam notas zero e um foram repicadas em vasos, e posteriormente transplantadas para o campo, para produção de sementes. Do total de 112 plantas selecionadas, sòmente 72 floresceram, e estas foram então autofecundadas, e as sementes foram colhidas.

4.7 - Experimento II. Teste de resistêcia das progênies S_1 à Xanthomonas.

Neste ensaio, testamos 27 progênies da 1ª geração autofecundada, sendo 17 progênies da variedade Louco I.G., 7 progênies de Nilo Garcia e 3 progênies da variedade Louco Jimenes. A variedade Louco Akio Owatari não floresceu, razão porque foi eliminada.

Para o contrôle de suscetibilidade e eficiência da inoculação, foi incluído o híbrido Shikidori. As progênies testadas são as abaixo relacionadas:

<u>Tratamento nº</u>	<u>Progenie</u>
1	D1
2	D2
3	C3
4	C4
5	C5
6	D6
7	D7
8	C8
9	C9
10	C10
11	Híbrido Shikidori
12	D12
13	C13
14	D14
15	D15
16	D16
17	D17
18	D18
19	D19
20	D20
21	B21
22	D22
23	D23
24	D24
25	D25
26	D26
27	B27
28	B28

As letras maiúsculas indicam a procedência das progênies: D = Var. Louco I.G., C = Var. Louco Nilo Garcia, etc.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com 28 tratamentos e 5 repetições. Cada parcela era constituída de 25 plântulas. A semeadura foi feita em casa de vegetação em 22/12/1965, semeando-se quatro progênies por caixa, de acôrdo com o descrito no item 4.2. A inoculação foi feita em 17/1/1966, segundo o descrito no item 4.3. Catorze dias depois da inoculação, isto é, em 31/1/1966, foi feita a classificação das plântulas pelo método 1. As plântulas que receberam notas zero e um foram repicadas em vasos e posteriormente transplantadas para o campo.

Selecionaram-se para a produção de sementes somente as plantas que formaram cabeças comerciáveis. As plantas que floresceram foram autofecundadas, cruzadas entre irmãos (sib-cross) e entre progênies que apresentaram maior número de plantas resistentes.

4.8 - Experimento III - Teste de resistência das progênies S_2 à Xanthomonas.

Das 27 progênies S_1 testadas, selecionadas e autofecundadas, escolhemos 42 progênies S_2 e testamos novamente a resistência à Xanthomonas. Incluiu-se a variedade Louco I.G. para verificar-se a eficiência da seleção, isto é, o aumento de resistência nas progênies selecionadas. Incluiu-se também o híbrido Shikidori para observar-se a eficiência da inoculação.

As progênies e as variedades testadas estão relacionadas na fôlha seguinte.

<u>Tratamento</u>	<u>Progenie</u>	<u>Tratamento</u>	<u>Progenie</u>
<u>Nº</u>	<u>Nº</u>	<u>Nº</u>	<u>Nº</u>
1	D 1-15	23	D18-21
2	D 1-17	24	D19- 4
3	D 1-18	25	D19- 8
4	D 1-31	26	D19- 9
5	D 2- 7	27	B21- 9
6	D 2- 8	28	B21-10
7	D 2- 9	29	B21-12
8	D 2-17	30	B21-14
9	C 5- 3	31	B21-15
10	D 6- 4	32	B21-24
11	D 6-13	33	D19-11
12	D 7- 2	34	D23- 1
13	D 7- 7	35	D23-10
14	D 7- 8	36	D24- 6
15	D 7-10	37	D24- 3
16	D 7-21	38	D24-38
17	D 15- 4	39	D25- 2
18	D 15- 5	40	D25- 6
19	D 15- 7	41	B28- 2
20	D 15- 9	42	B28- 3
21	D 18- 1	43	Var.Louco I.G.
22	D 18-16	44	Híbrido Shikidori

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com 4 tratamentos e 4 repetições. Cada parcela era constituída de 25 plântulas. A semeadura foi feita no dia 29/11/1966, de acôrdo com o exposto no item 4.2. A inoculação do patógeno foi feita em 17/12/1966, segundo o descrito no item 4.3. A classificação das plântulas foi feita em 2/1/1967, de acôrdo com o método 1.

As plântulas que receberam notas zero e um foram repicadas em vasos e posteriormente transplantadas para o campo. As plantas que produziram cabeças comerciáveis foram selecionadas para a produção de sementes. As que floresceram foram autofecundadas, cruzadas entre irmãos (sib-cross) e entre progênies que apresentaram maior número de plantas resistentes.

4.9 - Experimento IV - Teste de concentração do inóculo

Este teste foi instalado com a finalidade de testar a influência da concentração do inóculo de Xanthomonas na resistência do repólho.

Utilizaram-se o híbrido Shikidori e a progênie D23-1-167, e 5 concentrações do inóculo (1:1, 1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000). A semeadura foi feita em casa de vegetação no dia 8/11/1967, de acôrdo com o item 4.2. A inoculação do patógeno foi feita no dia 2/12/1967, de acôrdo com o item 4.3. Com base no desenvolvimento dos sintomas nas fôlhas inoculadas, classificaram-se as plântulas de dois em dois dias, iniciando-se no dia 6/11/1967 e finalizando-se no dia 19/12/1967.

Com os dados obtidos dessas classificações organizaram-se gráficos para avaliar o efeito das diversas concentrações do inóculo na velocidade de colonização nas fôlhas inoculadas.

Após a última classificação, as parcelas cujas concentrações eram de 1:1 e 1:10 foram deixadas em observação, até o dia 4/1/1968. Nessa data, portanto 33 dias após a inoculação, fez-se uma nova classificação das plântulas nessas parcelas, utilizando-se o método 2.

4.10 - Experimento V - Teste de resistência do repólho à Xanthomonas no campo

Com a finalidade de observar, em condições de campo, a resistência à Xanthomonas, testaram-se as seguintes variedades e progênies selecionadas:

- 1 - Híbrido Shikidori
- 2 - Variedade Louco I.G.
- 3 - Progênie D500, da 1ª geração autofecundada
- 4 - Cruzamento entre progênies da 2ª geração
- 5 - Cruzamento entre progênies da 3ª geração
- 6 - Cruzamento entre irmãos da 3ª geração D23-10 (sib-cross)
- 7 - Cruzamento entre irmãos da 3ª geração D23-1 (sib-cross)

A semeadura foi feita em 27/12/1967 em caixas de madeira, que foram colocadas em casa de vegetação. No dia 3/1/1968 as plântulas foram repicadas em vasos e deixadas no viveiro.

A inoculação foi feita no dia 16/1/1968 quando as mudas estavam com 2 a 3 folhas verdadeiras bem desenvolvidas.

Os vasos não foram colocados em câmara úmida, pois havia chovido e o tempo apresentava-se nublado e úmido, sendo desnecessário criar condições de umidade e temperatura artificiais.

Em 26/1/1968, as mudas foram transplantadas para o campo, obedecendo ao delineamento experimental blocos ao acaso, com 8 repetições. Cada parcela era constituída de 10 plantas.

O espaçamento utilizado foi de 0,60 x 0,30 m. Aplicaram-se na adubação básica, 100 gramas de adubo de fórmula 5-10-5

por metro linear de sulco. A adubação foi complementada com 3 aplicações em cobertura, com salitre do Chile (NaNO_3) e 4 aplicações de bórax comercial misturado com fungicidas, inseticidas e espalhante adesivo, em pulverização foliar.

A irrigação, apesar da chuva mais ou menos constante, foi feita em sulco de infiltração, toda vez que se julgava necessário.

Em 10/4/1968, quando a maioria das plantas estavam com as cabeças formadas, foram classificadas com base no desenvolvimento dos sintomas da doença no tecido vascular do caule. Para isso as plantas eram colhidas e as cabeças cortadas ao meio em sentido vertical.

4.11 - Experimento VI - Teste de comparação dos métodos de classificação das plantas, e de resistência à Xanthomonas das progênies selecionadas

Esse ensaio foi instalado com a finalidade de se comparar os métodos de classificação das plantas resistentes e avaliar o aumento de resistência das progênies selecionadas de várias gerações.

Para essa finalidade, foram testadas as seguintes variedades e progênies de diferentes gerações:

Tratamentos N^{os}

- 1 - Progênie D27 (S_1)
- 2 - Progênie D6-4-174 (S_3)
- 3 - Progênie B21-10-400 (S_3)
- 4 - Progênie D23 (S_1)
- 5 - Progênie C22 (S_1)
- 6 - Progênie D14 (S_1)
- 7 - Progênie D12 (S_1)
- 8 - Cruzamento entre progênies da 2^a geração (7-10 x 21-12)

- 9 - Progenie B21-12 (S_2)
- 10 - Progenie D17-15 (S_2)
- 11 - Progenie D17-13 (S_2)
- 12 - Cruzamento entre progênies da 2ª geração (27-12 x 17-15)
- 13 - Cruzamento entre progênies da 2ª geração (21-4 x 17-13)
- 14 - Cruzamento entre irmãos da progênie 21-12 (sib-cross)
- 15 - Cruzamento entre irmãos da progênie 23-10 (sib-cross)
- 16 - Cruzamento entre progênies da 2ª geração
- 17 - Cruzamento entre irmãos da progênie 23-1 (sib-cross)
- 18 - Cruzamento entre progênies da 3ª geração
- 19 - Cruzamento entre irmãos da progênie nº 7 (sib-cross)
- 20 - Cruzamento entre progênies da 2ª geração
- 21 - Progenie D500 (S_1)
- 22 - Variedade Louco I.G.
- 23 - Variedade Louco Nilo Garcia
- 24 - Híbrido Shikidori

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com 3 repetições. Cada parcela era constituída de 20 plantas. A semeadura foi feita no dia 26/3/1968, de acôrdo com o descrito no item 4.2. A inoculação do patógeno foi feita no dia 15/4/1968, de acôrdo com o processo exposto no item 4.3. No dia 30/4/1968, foi feita a classificação das plântulas de acôrdo com o método 1. Após a classificação, as plântulas permaneceram em casa de vegetação até o dia 23/5/1968, quando se realizou uma nova classificação de acôrdo com o método 2.

4.12 - Métodos de análise estatística

Para as análises estatísticas, todos os dados obtidos, expressos em porcentagem, foram transformados em arco seno $\sqrt{\frac{p}{100}}$, segundo recomendado por SNEDOCOR (1948).

Para as comparações das médias foi utilizado, sempre que necessário, o teste de Tukey, de acordo com PIMENTEL GOMES (1963).

5 - RESULTADOS

5.1 - Sintomatologia

Em todos os testes realizados em casa de vegetação, os sintomas nas folhas inoculadas apareceram entre 4 a 5 dias após a inoculação. Inicialmente, os bordos das folhas junto aos hidatódios mostravam pontos necróticos circundados por um leve encharcamento. Em pouco tempo, partindo desses pontos necróticos, iniciava-se o amarelecimento dos tecidos, que avançava até o centro da folha, em forma de V, com a base voltada para a nervura central. As nervuras dessas áreas cloróticas apresentavam-se de cor escura (foto 1).

Entre 20 a 25 dias, apareceram, nas folhas não inoculadas do híbrido Shikidori, sintomas de infecção sistêmica. Nessas folhas os sintomas, iniciando-se junto à nervura principal, progrediram para as extremidades das mesmas (foto 1). Entre 25 a 30 dias, a maioria das plântulas desse híbrido mostraram sintomas de infecção nas folhas próximas à gema apical (foto 2). Aos 35 dias a maioria das plântulas estavam mortas.

Nas progênies selecionadas, e nas variedades Louco I.G. e Nilo Garcia, algumas plântulas mostraram os sintomas acima descritos, mas a maioria permaneceu sem sintomas externos (foto 2), embora o caule mostrasse, internamente, necrose circunscrita junto à cicatriz das folhas inoculadas e caídas. Algumas plântulas não mostraram necrose do tecido vascular.

No experimento V, os sintomas nas folhas inoculadas apareceram entre 9 a 10 dias. No híbrido Shikidori, a morte das primeiras plantas ocorreu entre 63 a 67 dias após a inoculação. As plantas desse híbrido que permaneceram aparentemente sadias até à época da classificação mostraram, internamente, necrose total do tecido vascular do caule e as cabeças apodrecidas (fotos 3 e 4).

Nas progênies selecionadas, tôdas as plantas permaneceram sem mostrar sintomas externos, mas mostraram infecção do tecido vascular do caule limitada junto à cicatriz das fôlhas inoculadas, ou avançando um pouco acima. As cabeças, porém, mostraram-se internamente sadias (foto 5).

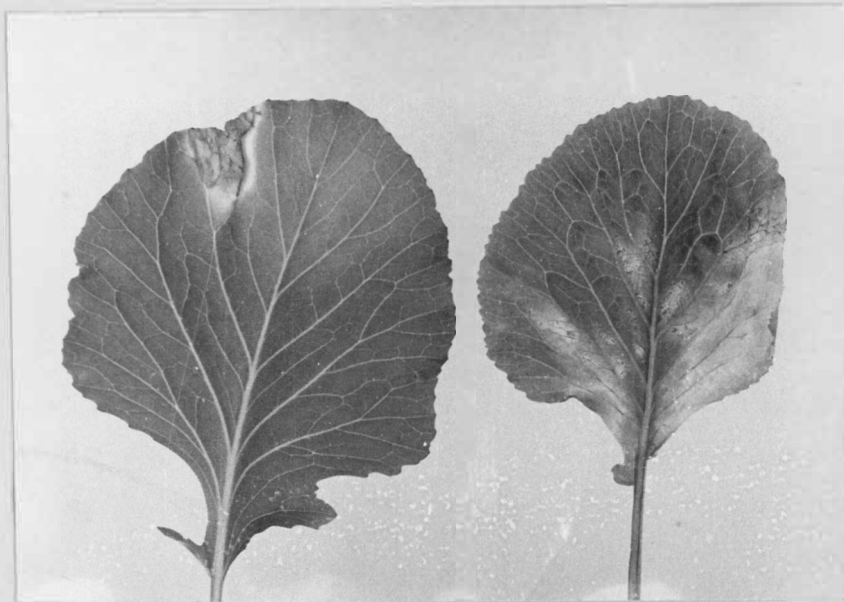


Foto 1 - Sintomas em fôlhas de repólho, mostrando à direita, sintomas de colonização sistêmica.

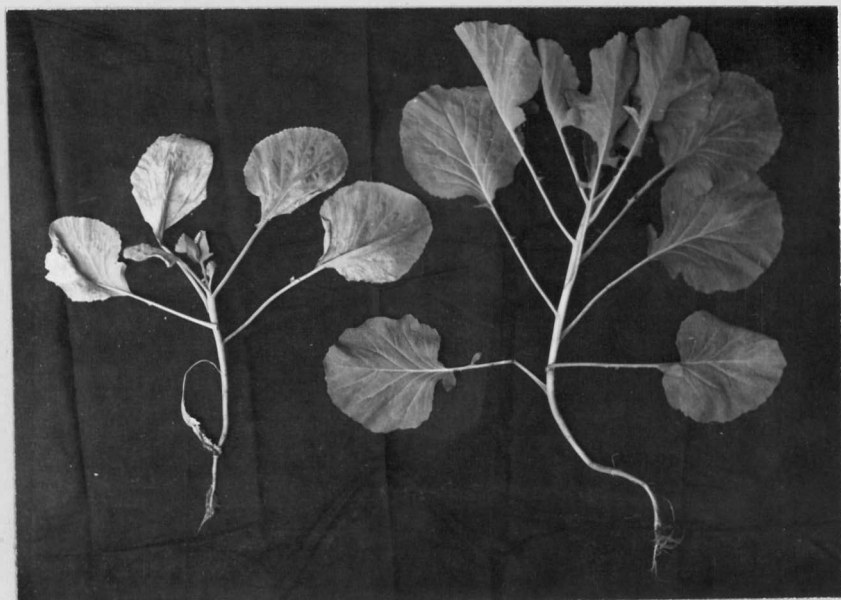


Foto 2 - Aspecto das plantas, 35 dias após a inoculação. Esquerda: planta suscetível. Direita: planta resistente.

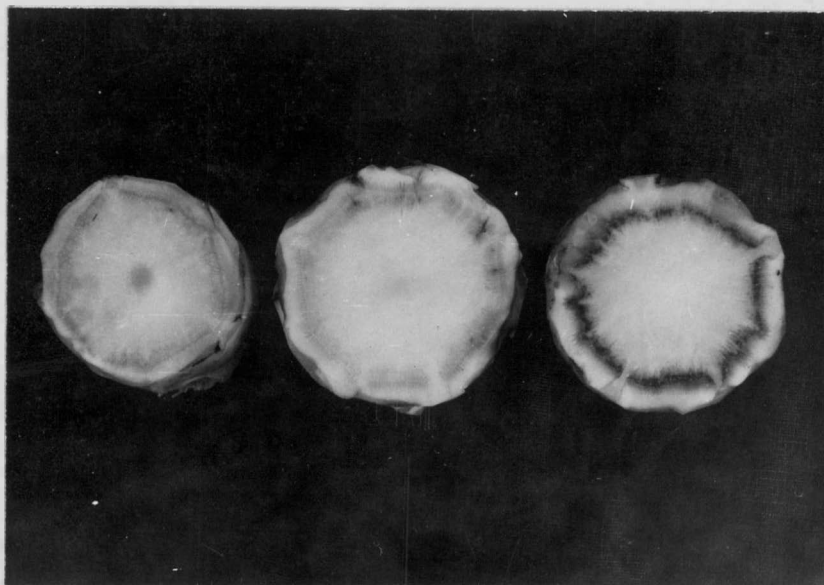


Foto 3 - Secção transversal do caule de repólho inoculado com Xanthomonas. Esquerda e Centro: plantas resistentes. Direita: planta suscetível.

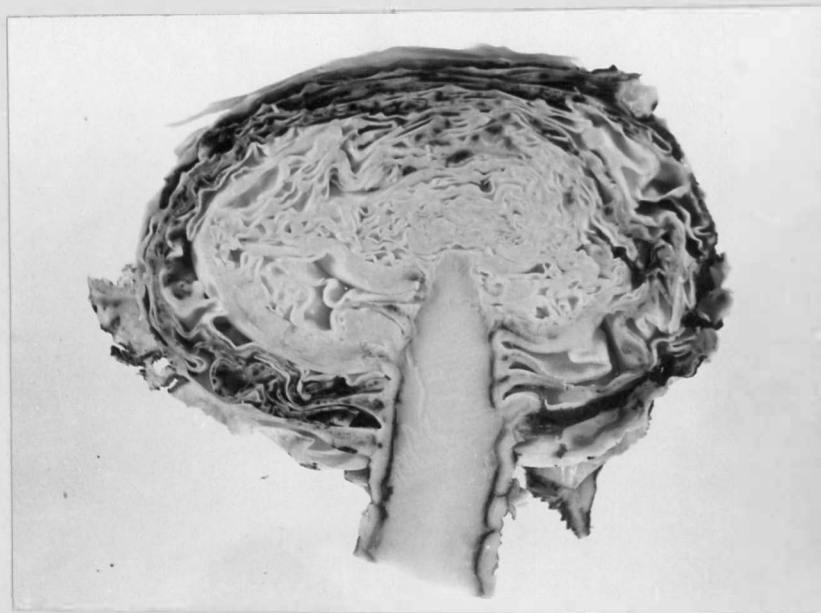


Foto 4 - Secção longitudinal da planta suscetível, inoculada com Xanthomonas.



Foto 5 - Secção longitudinal de planta de repólho resistente inoculada com Xanthomonas.

5.2 - Experimento I - Teste de resistênciã das variedades de repólho à Xanthomonas.

Os resultados da classificação das plântulas pelo método 1 e expressos em porcentagem de severidade da doença encontram-se no quadro 1.

A análise da variância dos dados encontra-se no quadro 2.

Quadro 1 - Resultados do teste de resistênciã das variedades de repólho, classificadas de acôrdo com o desenvolvimento dos sintomas nas fôlhas, expressos em porcentagem de severidade da doença.

VARIÉDADES	% de severidade da doença repetições						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
A-Louco A.Owatari	96,60	96,60	87,90	100,00	100,00	100,00	100,00
B-Louco Jimenes	100,00	8,30	38,20	100,00	89,90	100,00	100,00
C-Louco N.Garcia	95,30	90,00	96,60	18,30	100,00	95,00	98,30
D-Louco I.G.	30,30	96,60	100,00	22,60	44,90	86,60	98,30

Quadro 2 - Análise da variância dos resultados do teste de resistência de variedades de repólho à Xanthomonas.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Variedades	3	1.349,50	449,83	0,73 n.s.
Blocos	6	1.714,66		
Resíduo	18	11.062,66	614,59	
Total	27	14.126,82		

C.V. = 35,13%

n.s. = não significativo

Na análise da variância o F não foi significativo.

O coeficiente de variação foi 35,13%.

5.3 - Experimento II - Teste de resistência das progênies (S_1) à Xanthomonas.

Os resultados da classificação das plântulas pelo método 1, expressos em porcentagem de severidade da doença, estão no quadro 3.

Os resultados da análise da variância encontram-se no quadro 4.

Quadro 3 - Resultados dos testes de resistência à Xanthomonas de 27 progênies S₁ e um híbrido de repólho, classificados pelo desenvolvimento dos sintomas nas fôlhas, expressos em porcentagem de severidade da doença.

Tratamentos	% de severidade da doença			Repetições	
	I	II	III	IV	V
D1	69,40	25,90	30,50	23,70	46,30
D2	70,60	78,60	50,00	60,00	69,50
C3	74,60	89,30	68,00	82,00	91,30
C4	69,30	82,40	84,00	57,10	93,30
C5	85,30	66,50	51,20	54,70	81,00
D6	65,60	83,20	74,20	71,80	66,60
D7	87,20	76,90	78,60	71,80	80,30
C8	90,60	85,50	95,00	76,60	92,30
C9	83,10	81,90	91,00	72,70	95,40
C10	33,20	73,60	70,50	59,70	73,00
Shikidori	97,10	100,00	100,00	92,80	100,00
D12	96,00	92,30	83,30	85,30	94,40
C13	91,90	77,70	100,00	87,50	95,80
D14	83,20	89,50	42,20	52,20	88,30
D15	88,20	84,80	65,30	66,60	97,20
D16	84,60	76,80	57,60	70,60	79,10
D17	89,20	88,00	85,50	67,90	87,10
D18	91,10	73,00	80,00	56,90	93,00
D19	54,90	56,50	68,00	38,40	73,80
D20	70,90	59,10	93,90	82,60	94,60
B21	56,80	81,10	81,90	56,00	89,40
C22	55,40	56,00	79,50	57,30	70,90
D23	88,60	81,10	93,00	73,90	95,80
D24	42,00	43,50	50,60	57,70	72,00
D25	65,20	86,10	95,00	64,10	100,00
D26	51,10	70,60	84,00	64,70	68,20
B27	69,40	84,80	89,40	58,30	75,00
B28	63,90	81,80	73,50	70,80	81,10

Quadro 4 - Análise da variância dos resultados do teste de resistência das progênies à Xanthomonas.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	27	11.547,22	427,67	7,55 **
Blocos	4	2.720,72		
Resíduos	108	6.114,29	56,61	
Total	139	20.382,23		

C.V. = 12,21%

** = significativo ao nível de 1%

A análise da variância revelou diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade, para os tratamentos.

As médias para os tratamentos foram:

<u>Tratamentos</u>	<u>Médias</u>
1	25,90 ± 3,36
24	46,89 ± 3,36
19	49,91 ± 3,36
10	52,13 ± 3,36
22	53,23 ± 3,36
2	54,37 ± 3,36
26	55,68 ± 3,36
5	55,92 ± 3,36
6	58,39 ± 3,36
14	58,73 ± 3,36
21	59,48 ± 3,36
16	59,48 ± 3,36
27	60,85 ± 3,36
28	62,06 ± 3,36
4	62,41 ± 3,36
7	62,82 ± 3,36
18	63,68 ± 3,36
3	64,80 ± 3,36
20	65,04 ± 3,36
15	65,18 ± 3,36
17	66,52 ± 3,36
9	67,84 ± 3,36
25	68,44 ± 3,36
23	69,32 ± 3,36
8	70,36 ± 3,36
12	72,39 ± 3,36

<u>Tratamentos</u>	<u>Médias</u>
13	74,45 \pm 3,36
Shikidori	84,92 \pm 3,36
	D.M.S. = 18,20

A diferença mínima significativa do teste de Tukey foi $\Delta 5\% = 18,20$.

Este teste mostrou que a média da progênie D₁ diferiu de todas as outras, isto é, foi a menor média de severidade da doença. Das 27 progênies testadas, apenas 21 diferiram do híbrido Shikidori.

5.4 - Experimento III - Teste de resistência à Xanthomonas das progênies S₂.

Os resultados da classificação das plântulas, baseando-se no método 1, expressos em porcentagem de severidade da doença, encontram-se no quadro 5.

A análise da variância encontra-se no quadro 6.

Quadro 5 - Resultados do teste de resistência de 42 progênies S₂ e duas variedades de repólho, classificadas de acordo com o desenvolvimento dos sintomas nas fôlhas, expressos em porcentagem de severidade da doença.

Tratamentos	% de severidade da doença			
	R E P E T I Ç Õ E S			
	I	II	III	IV
1	47,30	44,40	70,60	66,60
2	27,40	77,20	85,40	69,00
3	76,00	88,90	85,00	88,20
4	71,40	82,20	69,20	94,80
5	50,00	33,30	94,40	77,70
6	45,80	53,00	61,60	66,60
7	64,70	22,20	90,20	66,60
8	62,70	94,10	85,80	76,00
9	74,00	57,90	77,20	72,20
10	51,00	35,30	52,10	87,00
11	66,60	100,00	77,70	79,60
12	76,40	78,20	60,60	57,10
13	71,40	47,60	79,10	83,30
14	65,00	72,00	64,90	69,80
15	75,00	60,70	85,10	75,90
16	60,00	72,20	88,80	66,60
17	59,10	75,50	80,70	85,10
18	86,10	76,20	64,10	97,70
19	78,50	44,40	77,10	73,30
20	54,10	40,40	60,40	46,40
21	78,10	66,00	63,80	84,40
22	58,00	88,90	83,30	97,60
23	68,40	56,80	98,10	81,60
24	78,80	88,80	71,40	93,30

continua na fôlha 35

25	63,00	90,70	68,30	92,10
26	77,70	64,30	75,50	82,20
27	76,00	86,60	71,80	94,80
28	87,50	91,60	80,40	97,90
29	87,10	72,10	78,40	82,30
30	47,60	71,40	75,70	67,70
31	35,40	80,50	87,10	68,20
32	79,50	88,30	86,60	73,30
33	100,00	69,20	86,60	83,20
34	45,80	25,60	69,00	37,50
35	66,60	47,00	68,50	43,30
36	100,00	54,40	88,90	88,80
37	94,40	78,50	95,50	92,30
38	78,40	53,00	97,40	81,60
39	70,00	53,30	71,80	82,30
40	72,50	89,60	74,00	81,20
41	92,10	95,00	95,20	92,10
42	70,00	54,60	45,40	69,70
43	72,90	71,80	93,60	68,80
44	98,20	100,00	100,00	96,00

Quadro 6 - Análise da variância dos resultados do teste de re sistência das progênes de repôlho à Xanthomonas.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	43	12.460,20	289,77	3,13 **
Blocos	3	1.503,00		
Resíduos	129	11.937,60	92,53	
Total	175	25.900,80		

C.V. = 15,92%

** = significativo ao nível de 1%

A análise da variância revelou diferença significativa, ao nível de 1% de probabilidade, para os tratamentos.

As médias para os tratamentos foram:

<u>Progênes</u>	<u>Tratamentos</u>	<u>Médias</u>
D23-1	34	41,74 \pm 4,80
D15-9	20	45,19 \pm 4,80
D23-10	35	48,74 \pm 4,80
D2-8	6	48,93 \pm 4,80
D6-4	10	49,27 \pm 4,80
D1-15	1	49,27 \pm 4,80
B28-3	42	50,86 \pm 4,80
D2-9	7	52,03 \pm 4,80
D1-17	2	54,18 \pm 4,80
B21-14	30	54,28 \pm 4,80
D2-7	5	54,59 \pm 4,80
D7-8	14	55,52 \pm 4,80
D7-2	12	55,82 \pm 4,80
D15-7	19	56,21 \pm 4,80
D21-15	31	56,23 \pm 4,80
D25-2	39	56,68 \pm 4,80
C5-3	9	57,13 \pm 4,80
D7-7	13	57,49 \pm 4,80
D7-21	16	58,51 \pm 4,80
D18-1	21	59,04 \pm 4,80
D7-10	15	59,76 \pm 4,80
D19-9	26	60,12 \pm 4,80
D15-4	17	60,45 \pm 4,80
Var. Louco I.G.	43	61,98 \pm 4,80
D18-21	23	62,84 \pm 4,80
D25-6	40	63,30 \pm 4,80
D19-8	25	63,54 \pm 4,80

<u>Progênes</u>	<u>Tratamentos</u>	<u>Médias</u>
D24-38	38	63,58 \pm 4,80
B21-12	29	63,62 \pm 4,80
D1-31	4	63,95 \pm 4,80
D2-17	8	64,20 \pm 4,80
B21-24	32	65,12 \pm 4,80
D15-5	18	65,84 \pm 4,80
B21-9	27	65,98 \pm 4,80
D19-4	24	66,42 \pm 4,80
D18-16	22	66,77 \pm 4,80
D1-18	3	67,07 \pm 4,80
D6-13	11	67,41 \pm 4,80
D24-6	36	69,62 \pm 4,80
D19-11	33	70,15 \pm 4,80
B21-10	28	71,96 \pm 4,80
D24-3	37	72,58 \pm 4,80
B28-2	41	75,44 \pm 4,80
H. Shikidori	44	85,19 \pm 4,80

D.M.S. 5% = 27,51

A diferença mínima significativa do teste de Tukey foi $\Delta 5\% = 27,81$.

Este teste mostrou que das 42 progênes testadas, nenhuma diferiu da variedade Louco I.G. Entretanto, embora não

diferissem estatisticamente, 19 tiveram a média de severidade da doença aumentada em relação à variedade Louco I.G.

Das 4 progênies D1 provenientes da S₁, apenas duas diferiram do híbrido Shikidori.

O híbrido Shikidori diferiu estatisticamente das 18 progênies testadas.

Das progênies testadas, a D23-1 teve a menor média de severidade da doença.

5.5 - Experimento IV. Teste de concentração do inóculo

As curvas de desenvolvimento dos sintomas nas diversas concentrações do inóculo nas folhas inoculadas do Híbrido Shikidori encontram-se no gráfico 1.

As curvas de desenvolvimento dos sintomas nas diversas concentrações do inóculo na progênie 23-1-167 encontram-se no gráfico 2.

Os resultados da classificação das plântulas baseando-se no método 2, expressos em porcentagem de severidade da doença, encontram-se no quadro 7.

A análise de variância encontra-se no quadro 8.

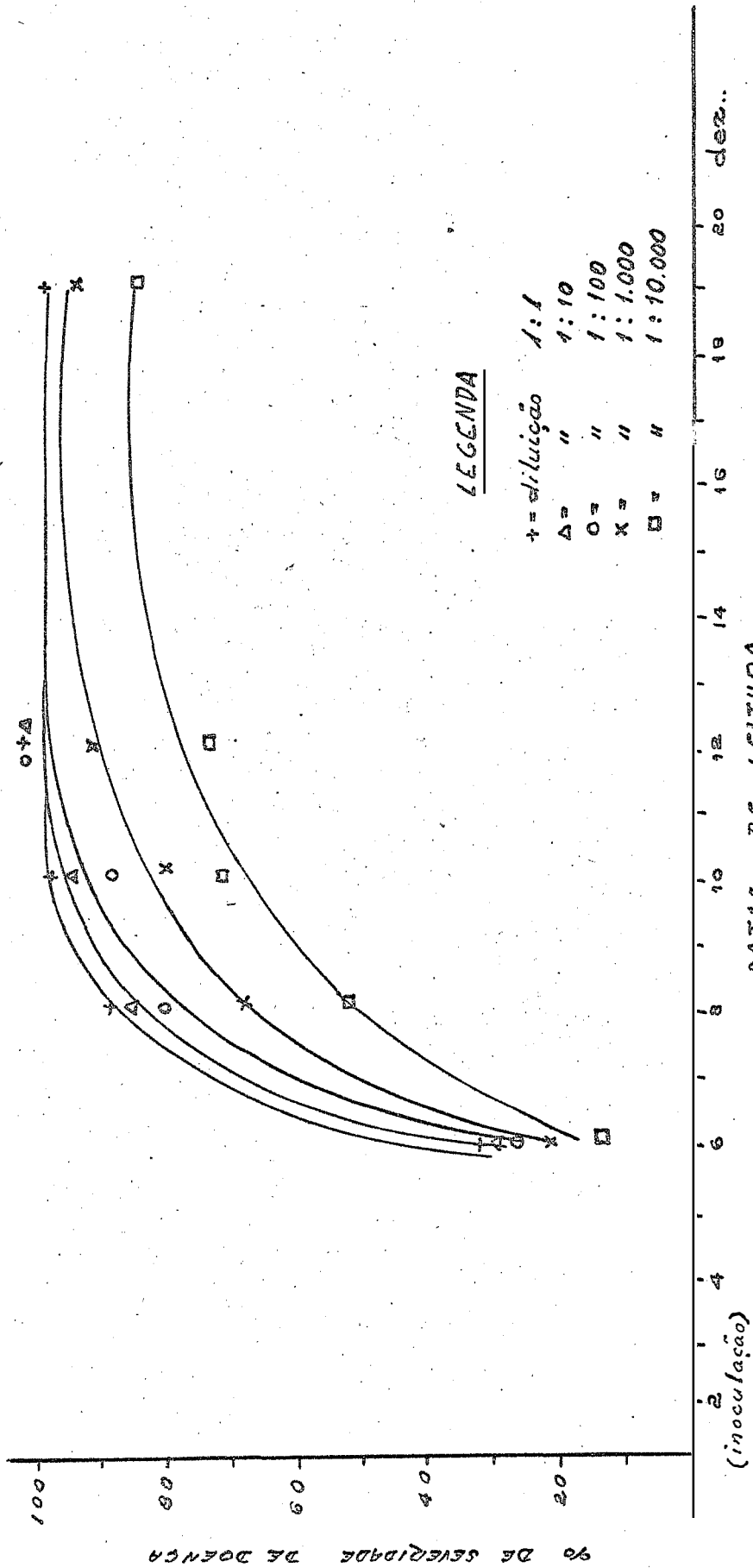


GRÁFICO I - CURVA DE DESENVOLVIMENTO DOS SINTOMAS NAS FÓLHAS INOCULADAS DO HÍBRIDO SHIKIDORI

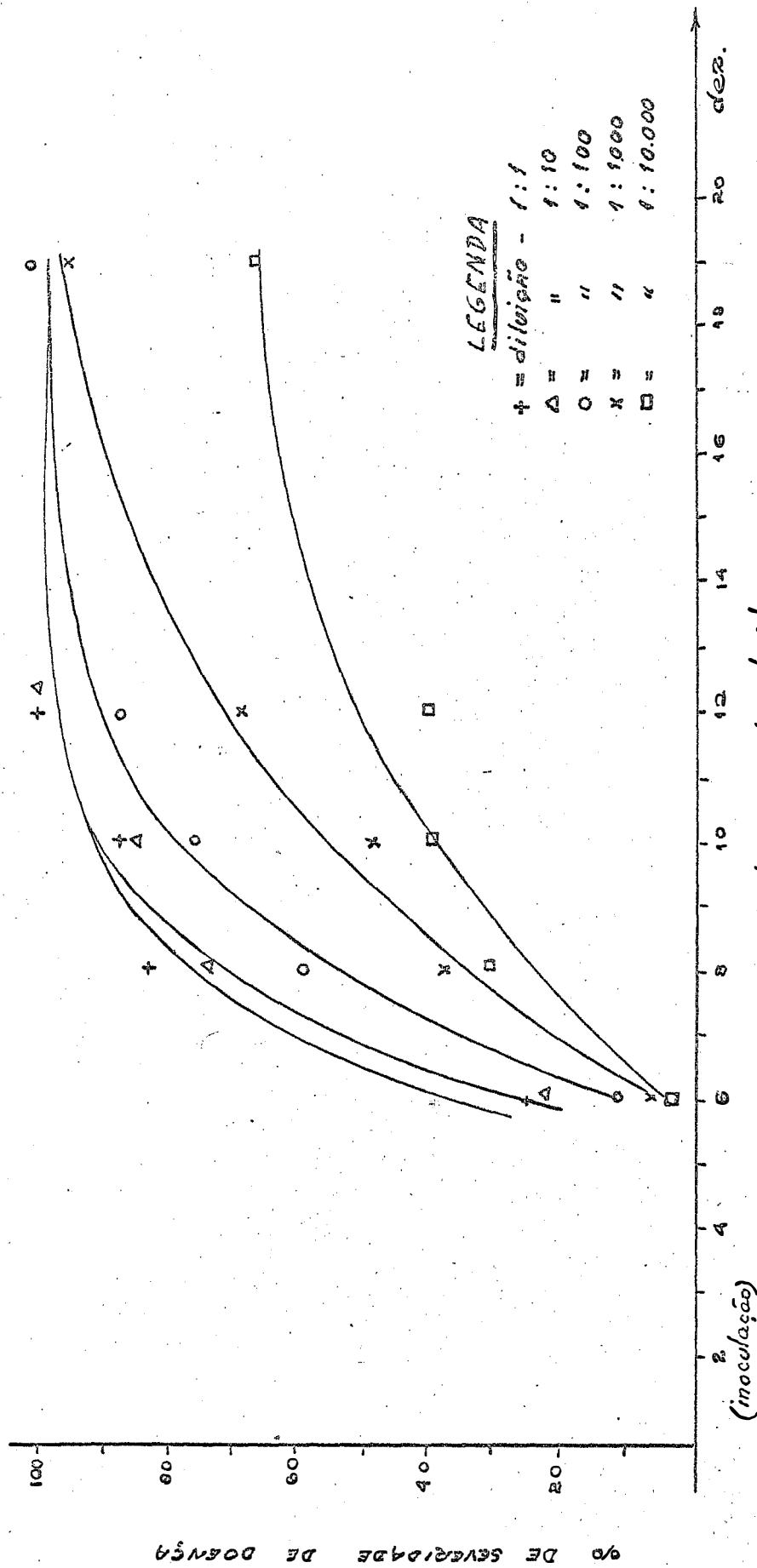


GRÁFICO II - CURVA DE DESENVOLVIMENTO DOS SINTOMAS NAS FOLHAS INOCULADAS
 DA PROGENIE - nº 23-1-167.

Pela curva do desenvolvimento dos sintomas nas folhas do repólho dos gráficos I e II nota-se que:

a) As concentrações mais elevadas de inóculo atingiram o máximo de severidade da doença 12 dias após a inoculação, tanto no híbrido Shikidori como na progênie 23-1-167.

b) As bactérias, uma vez inoculadas em condições favoráveis, colonizaram as folhas inoculadas de repólho, tanto das plantas suscetíveis como das resistentes.

c) Houve uma pequena diferença no desenvolvimento inicial dos sintomas e na velocidade de colonização entre híbrido Shikidori e progênie 23-1-167, isto é, as curvas do desenvolvimento dos sintomas da primeira foram mais acentuados do que as da segunda.

d) As curvas da severidade da doença na concentração de 1:10.000 não atingiram o máximo de severidade de doença até a última data de leitura, mostrando uma tendência de estabilização.

Quadro 7 - Resultados do teste de concentrações do inóculo, para parcelas constituídas de 2 níveis de inóculo e duas variedades de repólho, classificadas de acordo com o desenvolvimento dos sintomas no tecido vascular do caule, expressos em porcentagem de severidade da doença.

Concentração do inóculo	Variedades	% de severidade da doença				Repetições	
		I	II	III	IV	V	VI
1:1	Shikidori	100,00	100,00	100,00	100,00	96,00	97,60
1:1	23-1-167	17,30	24,40	8,50	30,40	28,00	18,20
1:10	Shikidori	100,00	100,00	98,00	100,00	100,00	79,70
1:10	23-1-167	16,60	41,60	15,60	18,10	16,30	21,60

Quadro 8 - Análise de variância dos dados do teste de concentração do inóculo para tratamentos, constituídos de 2 níveis de inóculo e duas variedades.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Conc. do inóculo	1	3,50	3,50	0,07
Variedades	1	20.513,62	20.513,62	461,39 **
Interação Variedades x Conc. do inóculo	1	16,26	16,26	0,36
Blocos	5	414,50		
Resíduo	15	666,98	44,46	
Total	23	21.614,86		

** Significativo ao nível de 1% C.V. = 11,87%

Na análise da variância o F foi significativo ao nível de 1% de probabilidade somente para as variedades, cujas médias foram:

Híbrido Shikidori = $85,38 \pm 2,72$

Progênie 23-1-167 = $26,91 \pm 2,72$

5.6 - Experimento V - Teste de resistência do repólho à Xanthomonas em condições de campo

Os resultados da classificação das plantas pelo método 2 e expressos em porcentagem de severidade da doença encontram-se no quadro 9.

A análise de variância dos dados encontra-se no quadro 10.

Quadro 9 - Resultados dos testes de resistência à Xanthomonas de 2 variedades e 5 progênies selecionadas de repólho, classificadas de acôrdo com o desenvolvimento dos sintomas no tecido vascular do caule, expressos em porcentagem de severidade da doença.

Tratamentos	% de severidade da doença					Repetições		
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	96,00	86,00	96,00	88,00	84,00	84,00	80,00	88,90
2	38,90	16,00	33,30	42,00	32,00	42,00	32,50	42,50
3	10,00	4,00	22,00	18,00	10,00	15,50	10,00	2,50
4	16,00	38,00	25,00	30,00	38,00	38,00	15,00	10,50
5	8,00	18,00	12,50	10,00	16,00	26,00	25,00	20,00
6	18,00	11,10	16,00	28,70	22,00	17,70	5,00	5,50
7	16,00	22,20	20,00	8,80	18,00	7,50	10,00	22,00

Quadro 10 - Análise de variância dos dados dos testes de resistência à Xanthomonas no campo, de 2 variedades e 5 progênies.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	6	15.075,79	2.512,63	66,32 **
Blocos	7	250,52		
Resíduo	42	1.583,78	37,70	
Total	55	16.910,09		

** Significativo ao nível de 1% C.V. = 19,11%

Na análise de variância o F foi significativo ao nível de 1% de probabilidade para os tratamentos.

As médias para os tratamentos foram:

<u>Tratamentos</u>	<u>Médias</u>
Híbrido Shikidori	70,18 ± 2,17
Variedade Louco I.G.	36,01 ± 2,17
Cruzamento entre progênes da 2ª geração	30,33 ± 2,17
Cruzamento entre progênes da 3ª geração	23,93 ± 2,17
Cruzamento entre irmãos das progênes D23-10	22,48 ± 2,17
Cruzamento entre irmãos da progênie D23-1	22,86 ± 2,17
Progênie S ₁ nº D500	19,02 ± 2,17
	D.M.S. 5% = 9,52

A diferença mínima significativa do teste de Tukey foi de $\Delta 5\% = 9,52$. Este teste mostrou que o híbrido Shikidori diferiu da variedade Louco I.G. e de tôdas as progênes testadas.

A variedade Louco I.G. diferiu significativamente das progênes S₁ D500, cruzamento entre progênes da 3ª geração, cruzamentos entre irmãos das progênes de 3ª geração D23-1 e D23-10. Não diferiu apenas do cruzamento entre progênes da 2ª geração, e este, diferiu da progênie D500.

5.7 - Experimento VI - Teste de resistência do repêlho à Xanthomonas e comparação dos métodos de seleção de plantas resistentes

Os resultados da classificação das plântulas pelo método 1, e expressos em porcentagem de severidade da doença, encontram-se no quadro 11.

A análise da variância encontra-se no quadro 12.

Os resultados da classificação das plântulas pelo método 2, transformados em porcentagem de severidade da doença, encontram-se no quadro 13.

A análise da variância encontra-se no quadro 14.

Quadro 11 - Resultados dos testes de resistência à Xanthomonas de 21 progênies e 3 variedades de repólho, classificadas de acordo com o desenvolvimento dos sintomas nas fôlhas, expressos em porcentagem de severidade da doença.

Tratamentos	% de severidade da doença		
	I	II	III
1	100,00	96,00	100,00
2	68,60	88,60	78,60
3	54,50	78,40	70,20
4	98,50	100,00	91,60
5	100,00	95,60	98,60
6	98,60	100,00	98,50
7	80,80	58,60	63,30
8	100,00	97,20	100,00
9	96,30	98,40	87,40
10	100,00	100,00	96,80
11	100,00	94,50	100,00
12	100,00	98,60	100,00
13	97,70	90,30	100,00
14	100,00	100,00	98,50
15	97,30	98,60	100,00
16	77,70	58,90	68,60
17	100,00	100,00	95,40
18	92,40	98,60	93,00
19	88,50	77,70	55,80
20	95,40	100,00	100,00
21	58,80	77,10	65,30
22	80,00	78,50	98,60
23	96,80	95,60	100,00
24	100,00	98,60	100,00

Quadro 12 - Análise da variância dos resultados do teste de resistência do repólho à Xanthomonas.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	23	10.133,15	440,58	9,47 **
Blocos	2	13,70		
Resíduo	46	2.138,19	46,48	
Total	71	12.285,39		

** = significativo ao nível de 1% de probab.

C.V. = 8,84%

A análise de variância revelou F significativo ao nível de 1% de probabilidade para os tratamentos.

As médias para os tratamentos foram:

<u>Tratamentos</u>	<u>Médias</u>
21	55,13 \pm 3,93
7	55,55 \pm 3,93
3	55,60 \pm 3,93
16	55,95 \pm 3,93
2	62,42 \pm 3,93
19	63,44 \pm 3,93
22	69,67 \pm 3,93
9	76,95 \pm 3,93
18	77,28 \pm 3,93
13	81,04 \pm 3,93
4	82,03 \pm 3,93
23	82,52 \pm 3,93
5	83,69 \pm 3,93
15	84,58 \pm 3,93
6	85,38 \pm 3,93
11	85,48 \pm 3,93
17	85,57 \pm 3,93
20	85,87 \pm 3,93
1	86,15 \pm 3,93
10	86,56 \pm 3,93
8	86,79 \pm 3,93
14	87,65 \pm 3,93
24	87,73 \pm 3,93
12	87,73 \pm 3,93

D.M.S. 5% = 21,92

A diferença mínima do teste de Tukey foi $\Delta 5\% = 21,92$.

Este teste revelou que 6 progênies diferiram da variedade Shikidori, 4 progênies diferiram da variedade Louco I.G.

e nenhuma da variedade Nilo Garcia.

Quadro 13 - Resultado dos testes de resistência à Xanthomonas, de 21 progênies e 3 variedades de repólho, classificadas de acordo com o desenvolvimento dos sintomas no tecido vascular do caule, expressos em porcentagem de severidade da doença.

Tratamentos	% de severidade da doença		Repetições
	I	II	III
1	24,90	31,60	37,50
2	47,50	38,20	56,80
3	12,60	25,80	16,60
4	23,60	39,90	44,70
5	36,60	29,50	43,60
6	40,00	41,60	51,20
7	36,60	46,30	72,10
8	24,00	28,30	30,00
9	18,80	23,50	30,00
10	46,60	44,80	56,70
11	26,60	40,00	45,20
12	29,90	23,20	30,40
13	22,90	44,60	25,80
14	32,50	21,60	43,60
15	17,50	24,30	21,60
16	18,30	29,10	35,40
17	19,10	20,00	29,70
18	25,20	17,00	44,30
19	21,20	35,20	32,10
20	25,00	38,10	60,00
21	23,30	22,50	28,60
22	47,50	75,00	53,50
23	60,00	47,90	66,90
24	87,60	100,00	99,10

Quadro 14 - Análise da variância dos dados do teste de resistência do repólho à Xanthomonas.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	23	9.201,35	400,58	16,28 **
Blocos	2	712,15		
Resíduo	46	1.129,99	24,56	
Total	71	11.043,49		

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade C.V. = 14,49%

A análise da variância revelou F significativo ao nível de 1% de probabilidade para os tratamentos.

As médias por tratamento foram:

<u>Tratamentos</u>	<u>Médias</u>
24	81,31 ± 2,84
22	50,19 ± 2,84
23	49,81 ± 2,84
7	46,07 ± 2,84
10	44,64 ± 2,84
2	43,55 ± 2,84
6	41,69 ± 2,84
20	39,63 ± 2,84
5	37,51 ± 2,84
11	37,15 ± 2,84
4	36,63 ± 2,84
1	36,30 ± 2,84
14	34,59 ± 2,84
13	33,68 ± 2,84
19	32,77 ± 2,84
18	32,07 ± 2,84
12	31,80 ± 2,84
8	31,56 ± 2,84
16	31,49 ± 2,84

<u>Tratamentos</u>	<u>Médias</u>
9	29,70 \pm 2,84
21	29,30 \pm 2,84
17	28,50 \pm 2,84
15	27,31 \pm 2,84
3	25,12 \pm 2,84

D.M.S. 5% = 15,67

A diferença mínima do teste de Tukey foi $\Delta 5\% = 15,67$.

Este teste mostrou que o híbrido Shikidori diferiu significativamente das variedades Louco I.G., Nilo Garcia e de tôdas as progênes testadas.

Das 21 progênes testadas, 12 diferiram significativamente das variedades Louco I.G. e Nilo Garcia.

A análise de correlação entre os dois métodos de seleção das plantas deu coeficiente de correlação $r = 0,22$ e o teste t deu $t = 1,07$ n.s. (não significativo).

Portanto não houve correlação entre os dois métodos.

Comparando-se os resultados obtidos no campo (experimento V) e na Casa de Vegetação (experimento VI) pela classificação das plântulas baseando-se no desenvolvimento dos sintomas no tecido vascular do caule (quadro 15) nota-se que comportaram-se da mesma forma nos dois ambientes diferentes. Notou-se apenas aumento da severidade da doença em condições da casa de vegetação.

Quadro 15 - Comparação das médias dos testes realizados em condições ambientais diferentes.

Tratamentos	Severidade da doença	
	Experimento no Campo	Experimento na Casa de Vegetação
Híbrido Shikidori	70,18	81,31
Variedade Louco I.G.	36,01	49,81
Cruz. entre Prog. da 2ª geração	30,33	39,63
Progenie S ₁ D 500	19,02	29,30
Cruz. entre irmãos da Prog. D23-1	22,48	28,50
Cruz. entre irmãos da Prog. D23-10	22,86	27,31
Cruz. entre Prog. da 3ª geração	23,93	32,07
	D.M.S.=9,52	D.M.S.= 15,67

A análise da correlação entre os resultados obtidos nos dois ambientes deu coeficiente de correlação $r = 0,99$ e o teste t deu $t = 32,68^{**}$ (significativo ao nível de 1% de probabilidade).

Portanto houve uma correlação altamente significativa entre os dois ambientes.

6 - DISCUSSÃO

O contrôle da temperatura e da umidade tem grande importância no sucesso da inoculação artificial do patógeno. MEIER (1934) salienta a importância da existência da via líquida entre a ponta do traqueídeo e o hidatódio das fôlhas. COOK et al. (1952a) confirmaram os resultados de MEIER (1934) e salientaram a importância da temperatura no desenvolvimento dos sintomas.

No presente trabalho, com a colocação das plântulas em câmara úmida por cerca de 24 a 30 horas antes e depois da inoculação, mantendo-se a temperatura entre 23 e 32°C, foram obtidos sintomas nas fôlhas inoculadas 4 a 5 dias após a inoculação. Esses resultados, obtidos por um processo simples e de fácil instalação, coincidiu com aqueles obtidos por COOK et al. (1952a), e em um espaço de tempo mais curto que aquele mencionado por BROWN (1920) e ORTIZ (1962/63).

A inoculação das plântulas com 2 a 3 fôlhas verdadeiras reveste-se de importância para a seleção das plantas resistentes à Xanthomonas, pois, segundo WALKER (1941), a infecção e a disseminação do patógeno têm lugar principalmente no estágio de plântulas no viveiro, e, segundo CLAYTON (1929), quando as plantas são infeccionadas no estágio de plântulas, o prejuízo na cultura de repólho atinge grandes proporções.

No presente trabalho, os sintomas observados nas fôlhas inoculadas, e os sintomas de colonização sistêmica nas fôlhas não inoculadas e no tecido vascular do caule, foram semelhantes aos descritos por WALKER (1965).

No experimento I, o fato de as variedades de repólho testadas serem originárias da variedade Louco, embora de diversas procedências, poderia ter sido uma das causas da não significância de resistência pelo teste F da análise da variância.

Nos testes de resistência à Xanthomonas das progênes de 1ª geração autofecundada (experimento II) e de 2ª geração autofecundada (experimento III), em que as plântulas foram classificadas pelo método 1, os resultados obtidos não foram satisfatórios. Mostraram uma certa diferença quando comparados com aqueles obtidos por BAIN (1952b) em suas seleções de resistência à Xanthomonas, nos quais constatou baixa porcentagem de sintomas nas folhas. No experimento II, apenas 21 progênes diferiram do híbrido Shikidori, e, no experimento III, nenhuma das progênes de segunda geração autofecundada, selecionadas no experimento II, diferiu estatisticamente da variedade Louco I.G. Além disso, 18 progênes apresentaram uma severidade maior de doença, embora não significativa estatisticamente, em relação à variedade Louco I.G.

As causas do insucesso da seleção das plântulas pelo método 1 podem ser esclarecidas pelos resultados do experimento IV. Nota-se, pelos gráficos (I e II) deste experimento, que as bactérias, uma vez inoculadas, colonizaram as folhas tanto das plantas suscetíveis como das resistentes. Houve apenas uma pequena diferença na velocidade de colonização das folhas.

Entretanto, através do exame do tecido vascular do caule, notou-se que a Xanthomonas, após a colonização das folhas inoculadas, desenvolveu-se pela nervura principal até o tecido vascular do caule, estabelecendo uma invasão sistêmica. Nas plantas suscetíveis, a colonização do tecido vascular do caule foi rápida, atingindo em poucos dias a gema apical, desta maneira matando as plantas. Nas plantas resistentes, porém, a colonização do tecido vascular foi bloqueada ou retardada.

Tendo-se em vista esse bloqueamento ou retardamento da colonização no caule, as plântulas inoculadas com concentrações 1:1 e 1:10, do experimento IV, foram classificadas conforme o método 2, obtendo-se desta forma, pela análise da variância, resul

tado altamente significativo, isto é, o teste F revelou que existe diferença de resistência altamente significativa entre o híbrido Shikidori e a progênie D23-1-167. Utilizando-se, entretanto, para as plantas acima mencionadas o método 1 de classificação, tanto o híbrido Shikidori como a progênie D23-1-167 tiveram a mesma severidade de doença (100%), nas plantas inoculadas.

A comparação entre os resultados obtidos mostrou que as plantas resistentes possuíam resistência à colonização do tecido vascular do caule, fato este observado por POPOV (1957).

Observou-se também no experimento IV que, nas maiores concentrações, a severidade da doença atingiu o máximo (100%), 7 dias antes que nas concentrações baixas. Essas observações estão de acordo com as obtidas por WEINDLING (1948) com Xanthomonas malvacearum (E.F.Sm.) Dowson em algodoeiro.

As curvas de severidade da doença da concentração mais baixa dos gráficos indicam que essa concentração favoreceu o escape das plântulas, principalmente nas progênies resistentes. Isto demonstra que, para seleção de plantas resistentes, devem-se utilizar concentrações elevadas de inóculo.

No experimento V, sob condições de campo, classificando-se as plantas pelo método 2, observou-se uma diferença de resistência entre o híbrido Shikidori e a variedade Louco I.G. e entre esta e as progênies selecionadas. Apenas o cruzamento entre progênies da 2ª geração não diferiu da variedade Louco I.G.

No experimento VI, em condições de casa de vegetação, classificando-se as plântulas pelo método 2, observou-se diferença de resistência do híbrido Shikidori com as variedades Louco I.G. e Nilo Garcia, e das duas últimas com 12 progênies selecionadas. Entretanto, pelo método 1, os resultados obtidos para o experimento VI não foram os mesmos. Por este processo não foi possível, de modo idêntico ao ocorrido nos experimentos

II e III, diferenciar a resistência entre o híbrido Shikidori e as variedades Louco I.G. e Nilo Garcia, e apenas 4 progênies diferiram significativamente destas duas últimas.

Os resultados da classificação das plântulas do experimento VI pelo método 2 mostraram a existência de algumas progênies de 1ª, 2ª e 3ª geração, selecionadas pelo método 1, que não diferiram das variedades originais. No mesmo experimento VI, classificadas pelo método 1, algumas progênies resistentes não diferiram da variedade original. Estes resultados indicaram que o método 1, embora permita selecionar plantas resistentes, não exclui a possibilidade de selecionar plantas suscetíveis ou eliminar algumas resistentes. Essa dificuldade de seleção das plantas pelo método 1 provém do fato de o mecanismo de resistência, nas variedades testadas, estar relacionado com a colonização das plantas pelo tecido vascular do caule.

Isto demonstra que, para selecionar plantas de repólho resistentes à Xanthomonas, deve-se considerar o desenvolvimento dos sintomas no tecido vascular do caule. Sendo Xanthomonas uma bactéria de atuação sistêmica, essa resistência tem grande importância econômica.

Pelo método 2 de classificação determinou-se a diferença de resistência entre o híbrido Shikidori e a variedade Louco, o que nunca foi possível determinar utilizando-se o método 1. IKUTA et al.(1965) obtiveram os mesmos resultados pela classificação das plantas baseando-se no desenvolvimento dos sintomas nas folhas. Os resultados obtidos por ORTIZ (1962/63) podem apresentar falhas da mesma natureza, uma vez que ele afirmou que não existia imunidade, encontrando apenas diversos graus de suscetibilidade nas folhas inoculadas das plantas.

Comparando-se os resultados obtidos pelos dois métodos

todos de classificação no experimento VI, não se obteve correlação entre ambos, confirmando a dificuldade de selecionar plantas resistentes pelo método 1.

Aplicando-se o método 2, foram obtidos os mesmos resultados em dois ambientes diferentes (campo e casa de vegetação), isto é, o comportamento das variedades e progênes testadas nesses ambientes foram semelhantes. Houve uma alta correlação entre os resultados obtidos nos dois ambientes. Contudo nota-se, pelo quadro 15 que, em condições de casa de vegetação, as progênes testadas apresentaram uma severidade maior de doença que em condições de campo. Isto demonstra, além da eficiência do método de seleção, a eficiência da seleção dentro da casa de vegetação. Segundo WALKER (1941b), as condições médias do campo nem sempre são ótimas para o desenvolvimento das doenças, e condições mais severas, em casa de vegetação, permitem maior rigor na seleção das plantas resistentes.

Há, sem dúvida possibilidade de seleção de plantas resistentes da variedade Louco, uma vez que essa variedade apresentou resistência muito superior à do híbrido Shikidori, e as progênes selecionadas apresentaram grau de resistência superior às variedades originais.

O tipo de resistência encontrada nas variedades locais parece ser diferente do encontrado por BAIN (1955b), pois as progênes selecionadas por ele, embora em condições do campo, estavam praticamente sem sintomas nas folhas, apesar de ter inoculado a Xanthomonas em pulverização foliar.

7 - CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1 - O método de seleção nº 2, aplicado às plantas de repólho baseando-se no desenvolvimento dos sintomas no tecido vascular do caule, foi superior ao método nº 1, permitindo selecionar plantas resistentes à Xanthomonas.

2 - Tanto as fôlhas de plantas resistentes como de suscetíveis, inoculadas por pulverização, quando testadas em casa de vegetação ou em condições de campo, apresentaram-se com sintomas.

3 - As variedades de repólho Louco, por possuírem linhagens que apresentam resistência à colonização do tecido vascular do caule, são excelentes fontes de seleção.

4 - A seleção em casa de vegetação sob controle de temperatura e umidade permite um maior rigor na seleção de plantas resistentes.

5 - Existe uma pequena diferença na velocidade de colonização das fôlhas por Xanthomonas entre as plantas do híbrido Shikidori e as progênies resistentes.

6 - A velocidade de colonização das fôlhas inoculadas foi influenciada pela concentração do inóculo empregada, sendo mais rápida para maiores concentrações.

7 - Concentrações baixas de inóculo parecem favorecer o escape, principalmente nas progênies resistentes.

8 . . . RESUMO

O presente trabalho estuda dois métodos de seleção de repólho resistente à Xanthomonas campestris (Pam.) Dowson. O primeiro método baseado na classificação das plantas pelos sintomas das fôlhas inoculadas, e o segundo pelos do tecido vascular do caule.

Utilizaram-se, como fonte de seleção, diversas variedades de repólho Louco e o híbrido Shikidori como testemunha.

O patógeno foi coletado em várias regiões de cultivo de brássicas, e a seguir isolado, purificado e conservado até a época da sua utilização.

Para inoculação, os patógenos das diversas procedências foram cultivados isoladamente e a seguir misturados e diluídos em água destilada.

A inoculação foi feita por pulverização quando as plântulas se apresentavam com 2 a 3 fôlhas verdadeiras. Antes e depois da inoculação as plântulas permaneceram por 24 a 30 horas na câmara úmida. Obtiveram-se sintomas da doença 4 a 5 dias após a inoculação.

As plântulas que receberam notas zero e um, pelo método 1 de classificação, foram autofecundadas e novamente testada a sua resistência à Xanthomonas. Esse procedimento foi repetido, obtendo-se progênes de 1ª, 2ª e 3ª geração.

Entretanto, por esse método de classificação, não foi possível diferenciar a resistência entre híbrido Shikidori e as variedades de repólho Louco e suas progênes selecionadas.

O teste de concentração do inóculo demonstrou que a Xanthomonas, uma vez inoculada, colonizava as fôlhas tanto do híbrido Shikidori como das progênes selecionadas, e que a ve

locidade de colonização foi sempre mais rápida nas concentrações maiores. Neste experimento foi também observado que, nas plantas suscetíveis, após a penetração do patógeno no tecido vascular do caule, a colonização deste tecido era rápida, matando as plantas em poucos dias. Nas plantas resistentes, entretanto, a colonização do tecido vascular do caule era bloqueada ou retardada.

Com base nos experimentos anteriores, passamos a observar o desenvolvimento dos sintomas no tecido vascular do caule das plântulas selecionadas. Por este método de classificação foi possível determinar a diferença de resistência existente entre híbrido Shikidori e a variedade Louco, e entre esta e as progênies selecionadas. Desta forma, conseguiu-se obter os mesmos resultados tanto para as plântulas de repólho testadas em condições do campo como para as da casa de vegetação, comprovando ser o método 2 mais eficiente.

Diante desses resultados concluiu-se que: o método 2 foi superior ao método 1. Tanto as plantas suscetíveis como as resistentes sempre apresentaram sintomas nas folhas inoculadas. As variedades de repólho Louco possuem linhagens que apresentam resistência à colonização do tecido vascular do caule, o que possibilitaria a produção de variedades resistentes à Xanthomonas. A seleção de plantas em casa de vegetação sob controle de temperatura e umidade permitiu um maior rigor na seleção de plantas resistentes.

9 - SUMMARY

The author studied two methods for selecting cabbage plants resistant to Xanthomonas campestris(Pam.)Dowson. The selection method Nº 1 was based on symptoms development of artificially inoculated leaves, while selection method Nº 2 took into account the discoloration of the vascular tissue of the stem.

The plant populations studied regarding resistance to X. campestris were several varieties of Louco Cabbage and as susceptible host the hybrid Shikidori was used.

Several isolates of the pathogen were obtained from different regions of the State of São Paulo. Inoculation of the plants consisted in spraying a bacterial suspension, consisting of a mixture of different isolates, on plants presenting 2 to 3 true leaves. The plants were kept in a moist chamber 24 to 30 hours before and after inoculation. Symptoms development on the leaves was evident 4 to 5 days after inoculation.

Plants showing trace or no symptoms development on the artificially inoculated leaves, were selfed for 3 generations.

When resistance was measured based on symptoms development on leaves no differences were observed among the hybrid Shikidori, the varieties of Louco Cabbage and their inbreedings. It was observed that X. campestris was able to colonize the inoculated leaves of the susceptible as well as those of the Louco Cabbage's inbreedings. Symptoms development on the leaves occurred more rapidly at higher inoculum concentrations.

When resistance was measured based on the discoloration of the vascular tissue of the stem it was observed that colonization of the stem tissue was rapid in the case of susceptible plants, while in the case of resistant plants the

colonization of the stem tissue was either retarded or stopped. In this case it was possible to detect differences in the disease severity between the susceptible hybrid and the varieties Louco, and between the last mentioned varieties and their inbreedings.

Based on the results obtained the author concludes that: selection of resistant plants based on discoloration of vascular tissue of the stem is more efficient as compared with selection based on leaf symptoms development; both susceptible and resistant plants always showed symptoms on the inoculated leaves; the varieties of Louco Cabbage originated progenies resistant to colonization of the vascular tissue of the stem; this evidenced the possibility of selecting varieties resistant to X. campestris.

Selection of resistant plants was more efficient under controlled greenhouse than under field conditions.

10 - BIBLIOGRAFIA

- BACH, W.J. e J.J.TAUBENHAUS, 1930 - Black rot of cabbage and its control. Texas Agr. Exp. Sta. Circ. 57.
- BAIN, D.C., 1951 - Observations on resistance to blackrot in cabbage. U.S. Dept. Agr. Plant. Dis. Repr. 35: 200-205.
- , 1952 - Reaction of brassica seedlings to blackrot. Phytopathology 42: 497-500.
- , 1955a - Disappearance of blackrot symptoms in cabbage seedlings. (abst.). Phytopathology 45: 55-56.
- , 1955b - Resistance of cabbage to blackrot. Phytopathology 45: 35-37.
- BHIDE, V.P., 1949 - Stomatal invasion of cabbage by Xanthomonas campestris (Pam.) Dowson. Indian Phytopathology 2: 132-133.
- BROWN, N.A. e R.B. HARVEY, 1920 - Heart rot, rib rot and leaf spot of chinese cabbage. Phytopathology 10: 81-90.
- CLAYTON, E.E., 1924a - A progress report on blackrot investigations, with special reference to cauliflower on Long Island (abst.). Phytopathology 14: 24.
- , 1924b - Control of blackrot and blacklig of cruciferous crops by seed and seedbed treatments (Abst.) Phytopathology 14: 24-25.
- , 1925 - Second progress report of blackrot (Pseudomonas campestris) investigations on Long Island: seed infection and seasonal development (abst.). Phytopathology 15: 48-49.
- , 1929 - Studies of the blackrot or blight disease of Cauliflower. N.Y. State Agr. Exp. Sta. Bul. 576.
- COOK, A.A., J.C. WALKER e R.H.LARSON, 1952a - Studies on the disease cycle of blackrot of cruciferous. Phytopathology 42: 162-167.

- COOK, A.A., J.C.WALKER e R.M. LARSON, 1952b - Relation of the blackrot pathogen to cabbage seed. *Phytopathology* 42: 316-320.
- DRECHESLER, C., 1914 - Cotyledon infection of cabbage seedlings by Pseudomonas campestris. *Phytopathology* 9: 275-282.
- EDDINS, A.H., 1950 - Cabbage diseases - blackrot. *Florida Agric. Exp. Sta. Ann. Rept. for 1949-1950*: 116-117.
- EDWARDS, S.J., 1908 - Cabbage resistance to blackrot. *Ontario Agric. Col. Ann. Rept. (for 1952)* 33: 134.
- HARDING, H.A., F.C. STEWART e M.J. PRUCHA, 1904 - Vitality of the cabbage blackrot germ on cabbage seed. *N.Y. State Agr. Exp. Sta. Bul.* 251.
- IKUTA, H., S. KAWASAKI, R. VENCOVSKY, 1965 - Ensaio de variedades e híbridos de repólho para o verão. Trabalho apresentado na Vª Reunião da Sociedade de Olericultura do Brasil, Recife-Pe. (mimeografado).
- ÍNDICE DE VARIAÇÃO ESTACIONAL DE HORTALIÇAS NA C.A.C., 1965 - Divisão de Estatística da C.A.C. (mimeografado).
- KLISIEWICZ, J.M. e G.S. POUND, 1961 - Studies on control of blackrot of crucifers by treating seeds with antibiotics. *Phytopathology* 51: 495-500.
- MEIER, D., 1934 - A cytological study of the early infection stages of the blackrot of cabbage. *Bull. Torrey Botanical Club*, 61: 173-190.
- MONTEITH, J., Jr., 1921 - Seed transmission and overwintering of cabbage blackrot. *Phytopathology* 11: 53-54.
- ORTIZ, M.T., 1962/63 - Resistência varietal de la col a la Pudrición Negra. *Agricultura Tecnica en Mexico* 2: 50-52.
- PIMENTEL GOMES, F., 1963 - Curso de Estatística Experimental. 2ª Edição, U.S.P., "E.S.A. "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 384pp.
- POPOV, V.I., 1957. Varietal resistance of cabbage to blackrot. *Vsesojuz Akad. Sel'sk. Nauk*, 22: 5 in *Horticultural Abstracts* 27: 550, 1957.

- RICHARDSON, J.K., 1945 - Black rot of Rutabagas. Sci.Agr. 25: 415-425.
- RUSSEL, H.L., 1898 - A bacterial rot of cabbage and allied plants. Wisconsin Agr.Exp.Sta. Bul. 65.
- SMITH, E.F., 1898 - The Blackrot of cabbage. U.S.Dept.Agr. Farmer's Bul. 68.
- , 1911 - Bacteria in relation to plant disease. Carnegie Institution, Washington D.C. Vol. II: 300-334.
- SNEDOCOR, G.W., 1948 - Métodos de Estatística, 1ª edição. Acme Agency Soc. Resp. Ltda. Buenos Aires, 558pp.
- STEWART, F.C. e H.A. HARDING, 1903 - Combating the blackrot of cabbage by the removal of affected leaves. N.Y. Agr. Exp. Sta. Bul. 232.
- THUNG, T.H., 1949 - Zwart-rot van Kool, Landbouw, 21: 259-266 in Rev.Appl. Mycology 28: 555, 1949.
- TOKESHI, H., 1963 - Resistência a Fusarium oxysporum f. conglutinans (Wr) Sny & Hans, em algumas variedades de Brassica oleracea L., cultivadas no Estado de São Paulo. Tese, E.S. A.L.Q., U.S.P. Piracicaba. (mimeografado).
- , 1966 - Murcha de Fusarium em tomateiro. Estudo da variabilidade do Patógeno e Hospedeiro. Tese, E.S.A.L.Q., U.S. P. Piracicaba. (mimeografado).
- WALKER, J.C., 1941a - Origin of cabbage blackrot epidemics. U.S. Dept. Agr., Plant Disease Rptr. 25: 91-94.
- , 1941b - Disease Resistance in the Vegetable Crops. The Botanical Review 7: 458-506.
- , 1965 - Patologia Vegetal. Ediciones Omega, S.A. Barcelona: 150-155.
- e W.B. TISDALE, 1920 - Observations on seed transmission of the cabbage black rot organism. Phytopathology 10: 175-177.
- WEINDLING, R., 1948 - Bacterial Blight of cotton under Conditions of artificial inoculation. U.S.Dept.Agric., Washington, D.C. Technical Bulletin 956.
- WELLMAN, F.L., 1939 - A tecnic for studying host resistance and Pathogenicity in tomato Fusarium wilt. Phytopathology 29: 945-956.

II - A G R A D E C I M E N T O S

Ao Professor Dr. Salim Simão, pela orientação e estímulo;

Ao Professor Dr. Ferdinando Galli, pelas sugestões e ampla facilidade, colocando à nossa disposição laboratório e casa de vegetação;

Ao Professor Dr. Hasime Tokeshi, pelas sugestões e críticas;

Aos Professores Dr. Caio O.N. Cardoso, Dr. Eric Balmer, Dr. Paulo C.T. Carvalho e Dr. Hiroshi Kimati pelas colaborações prestadas;

Aos Professores Marcílio S. Dias e Dr. Hiroshi Ikuta, pelo fornecimento das sementes;

Aos professores da Cadeira de Matemática e Estatística, pelas sugestões na parte estatística;

Ao Sr. Francisco G. Elias e aos funcionários Srs. Jonas D'Abronzo, Gildo Brancalion, Flávio P. dos Santos, Ângelo Turim, Aristides dos Santos e Alcindo J. Ferreira, Santo Pavan, pela ajuda imprescindível nos trabalhos realizados;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelos recursos que forneceu à Cadeira de Horticultura e que permitiram o desenvolvimento do presente trabalho;

A todos os que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.