

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

***Plamodiophora brassicae* X BRASSICACEAS: VARIABILIDADE
GENÉTICA E PATOGÊNICA, EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA E
EFEITO DE EXSUDATOS RADICULARES E PLANTAS NÃO
BRASSICACEAS NO CONTROLE**

DANIEL DIAS ROSA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Proteção de
Plantas)

BOTUCATU – SP

Abril - 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

***Plamodiophora brassicae* X BRASSICACEAS: VARIABILIDADE
GENÉTICA E PATOGÊNICA, EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA E
EFEITO DE EXSUDATOS RADICULARES E PLANTAS NÃO
BRASSICACEAS NO CONTROLE**

DANIEL DIAS ROSA

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Proteção de
Plantas)

BOTUCATU – SP

Abril - 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO UNESP -FCA - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

R788p Rosa, Daniel Dias, 1979-
Plamodiophora brassicae x brassicaceas: variedade genética e patogênica, epidemiologia da doença e efeito de exsudatos radiculares e plantas não brassicaceas no controle / Daniel Dias Rosa. - Botucatu : [s.n.], 2010.
vii, 100 f.: il., color., grafs., tabs.

Tese(Doutorado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu,2010.
Orientador: Edson Luiz Furtado
Inclui bibliografia.

1. *Plamodiophora brassicae*. 2. Diversidade genética. 3. Diversidade patogênica. 4. Brassicas. 5. População. I. Furtado, Edson Luiz. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

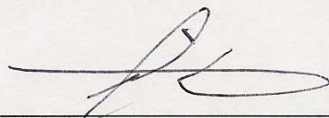
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "Plasmodiophora brassicae X Brassicaceas: VARIABILIDADE GENÉTICA E PATOGÊNICA, EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA E EFEITO DE EXSUDATOS RADICULARES E PLANTAS NÃO BRASSICACEAS NO CONTROLE"

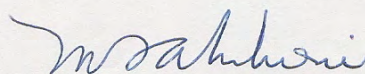
ALUNO: DANIEL DIAS ROSA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

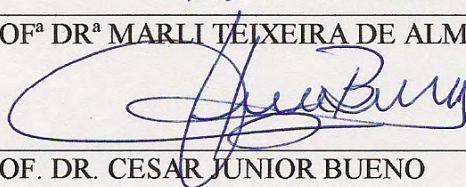
Aprovado pela Comissão Examinadora



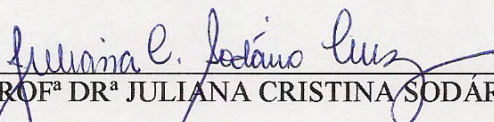
PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



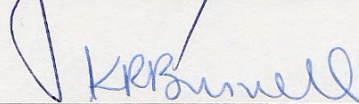
PROFª DRª MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI



PROF. DR. CESAR JUNIOR BUENO



PROFª DRª JULIANA CRISTINA SODÁRIO CRUZ



PROFª DRª KÁTIA REGIANE BRUNELLI

Data da Realização: 26 de abril 2010.

***“Hoje vejo que nem todos alcançarão a perfeição um dia, mas
como é emocionante persegui-lá.”***

A Deus,

A energia mais simples e linda do Universo.

A minha alma gêmea, esposa, cumprice e eterna amiga *Juliana*, que sempre esteve ao meu lado e a minha Amada Isadora, que mesmo não ainda presente, já traz luz as nossas vidas.

OFEREÇO

Aos meus pais, Neusa e Dario por tudo que tenho,
Meu sogro Célio e minha sogra Alice pela amizade,
Meus irmãos, Dario, Darilene, Silvio, Giovane, Carla, Natali e
Saulo pela amizade e carinho.
Aos anjos da Família, Silvia e Lucas,
fonte de luz e alegria a nós.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A meu querido amigo e eterno mestre Prof. Dr. Nilton Luiz de Souza (*in memorian*), por tudo que me ensinou, pelas eternas conversas e principalmente pela grande visão de vida que deixou em mim.

A meu grande amigo Prof. Dr. Edson L. Furtado, pela imensa ajuda e pelas oportunidades singulares.

A minha querida amiga Dra. Eiko Kuramae, que mesmo distante, sempre esteve presente.

Aos companheiros (as) de república Marco A. Basseto, Juliana S. de Alexandre, Julio C. Bogiani e Haroldo A. Chagas por todos os momentos que convivemos juntos, meu carinho e sincero obrigado.

A meu amigo Luis Delmant “Galak” pela grande ajuda por me guiar no labirinto de estradas da região de Piedade para coletas e levantamentos.

A meus amigos Prof. Edson Baldin, Prof. Carlos Forti, Ricardo Fujihara “Japa”, Rafael Barbieri “Geleia”, Ana Carolina Firmino, Ana Rita, Cecilia Toshio “Virola”, Gabi e todas as boas pessoas que eu tive o prazer de conviver por esses anos, meu grande abraço.

As empresas Sakata Seeds e Syngenta pelo fornecimento de sementes para teste.

A CNPq e a FAPESP pela ajuda financeira a minha Bolsa de estudos e ao financiamento do Projeto e pelos intermináveis Relatórios técnicos a serem enviados a elas.

Aos funcionários do Departamento Produção Vegetal-Defesa Fitossanitária;

Meu Muito obrigado a todos que de alguma forma ajudaram o desenvolvimento do projeto nesses anos.

SUMÁRIO

	Página
1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY	3
3. INTRODUÇÃO	5
4. OBJETIVOS	7
5. REVISÃO LITERATURA.....	9
5.1. Hospedeiros	9
5.2. Patógeno.....	10
5.3. Ferramentas da biologia molecular.....	13
5.4. Caracterização das raças conhecidas.	14
5.5. Controle.....	16
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
6.1. Coleta de material, preservação e levantamento de incidência.....	19
6.1.1. Estudo da distribuição espacial da doença	23
6.1.1.1.Índice de dispersão (ID)	23
6.1.1.2. Análise da estrutura de focos da hérnia das crucíferas	24
6.1.1.3. Lei de potência binária	25
6.2. Isolamento monospórico	26
6.2.1. Obtenção dos esporos de <i>Plasmodiophora brassicae</i>	26
6.2.2. Obtenção dos isolados monospóricos de <i>Plasmodiophora brassicae</i>	27
6.3. Teste de agressividade	28
6.4. Teste do efeito de exsudatos radiculares de plantas não brassicaceas na germinação de esporos de <i>Plasmodiophora brassicae</i>	29
6.5. Extração de DNA	30
6.6. Reações de RAPD e Microsatélite	31
6.7. Seqüenciamento da região ITS 5.8S rDNA e gene EF-1 α	34
6.8. Análises de bioinformática.....	35
6.9. Efeito da temperatura sobre a severidade de <i>Plasmodiophora brassicae</i>	36
6.10. Teste do efeito da <i>P. brassicae</i> em plantas não brassicaceas.....	37
6.11. Diferenciação de raças	38
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
7.1. Coleta de material, preservação e levantamento de incidência.....	41

7.2.	Estudo da epidemiologia espacial de hérnia das crucíferas.....	45
7.3.	Isolamento monospórico	56
7.3.1.	Obtenção dos esporos de <i>Plasmodiophora brassicae</i>	56
7.3.2.	Obtenção dos isolados monospóricos de <i>Plasmodiophora brassicae</i>	57
7.4.	Teste de agressividade	61
7.5.	Teste do efeito de exsudatos radiculares de plantas não brassicaceas na germinação de esporos de <i>Plasmodiophora brassicae</i>	66
7.6.	Extração de DNA	69
7.7.	Reações de RAPD e Microsatélite	69
7.8.	Seqüenciamento de regiões genômicas	75
7.9.	Efeito da temperatura sobre a severidade de <i>Plasmodiophora brassicae</i>	78
7.10.	Efeito de culturas não Brassicas sobre a sobrevivência de <i>P. brassicae</i>	83
7.11.	Diferenciação de raças.....	86
8.	CONCLUSÃO	95
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

1. RESUMO

Dentro do setor de horticultura, as plantas da família Brassicaceae são de grande expressão, tanto em volume, como em valor agregado na comercialização, por isso, destaca-se o cultivo intensivo de brassicas, como as variedades de *Brassica oleraceae* L. (Couve, repolho, Couve-flor, Brócolos, Couve de Bruxelas), *Brassica napus* L. e *Brassica oleraceae* L. var. *pekinensis* L. (Couve chinesa), sendo a base de sustentação econômica dos pequenos e médios produtores de hortaliças. Como outras culturas de plantio intensivo, as brassicas também enfrentam inúmeros problemas com doenças, dentre estes está a “hérnia das crucíferas”, doença de enorme risco potencial ao produtor, visto seu difícil ou inexistente controle e por condenar a área, impedindo futuros cultivos de brassicas. O agente causal da “hérnia das crucíferas” (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) é um endoparasita obrigatório, pertencente ao reino Protozoa, habitante do solo, sendo um dos fitopatógenos de solo menos estudados no mundo, mas sabe-se que este apresenta raças patogênicas, ou patotipos, sendo que algumas dessas já são conhecidas, principalmente os que ocorrem na Europa e no Japão sabem-se, também, que estas raças “quebram”, com certa frequência, a pouca resistência que os melhoristas conseguem incorporar nas variedades comerciais, fazendo com que quase não haja variedade resistente disponível no mercado, principalmente ao mercado brasileiro onde, possivelmente, haja raças ainda não relatadas. O objetivo deste estudo visou conhecer a variabilidade genética e patogênica de isolados de *P. brassicae* oriundos das principais regiões produtoras de Brassicas do estado de São Paulo, utilizando para isso: a) testes em variedade

diferenciais, nacionais e importadas, com isolados monospóricos e não monospóricos para determinação das raças; b) estudo da agressividade dos isolados frente às cultivares disponíveis no mercado; c) estudo de variabilidade genética intra e inter populacional, utilizando marcadores do tipo RAPD e Microsatélite; d) caracterização genética, através de seqüenciamento de regiões gênicas com valor taxonômico, como região ITS e EF-1 α ; e) estudo do efeito dos exsudados radiculares de plantas não brassicas sobre a germinação dos esporos de resistência de *P.brassicae*; f) estudar o efeito da *P. brassicae* sobre culturas não brassicas, visando obter uma resposta para uma possível rotação de cultura, visto que a utilização de uma cultura inadequada pode implicar em danos e perdas ainda maiores, principalmente quando a planta escolhida permite que o patógeno se multiplique e pior ainda, quando o microorganismo, presente no solo, é patogênico à cultura rotacional, aumentando assim o prejuízo do agricultor; e g) efetuar um levantamento sistemático das áreas de coleta para obtenção de índices reais de incidência da doença podendo, assim, no futuro desenvolver medidas de controle efetivas desse patógeno. Nas coletas de isolados e levantamento de dados de campo, verificou-se alguns campos com até 100% de infestação de *P.brassicae*, sendo que a media de incidência ficou em 5,9% de planta doentes no estado. Observou-se ainda que a temperatura preferencial para o desenvolvimento da doença gira em torno dos 20°C, e que os esporos de resistências respondem a exsudados provenientes de raízes de plantas não hospedeiras, principalmente o coentro, sendo essa uma possível forma de se reduzir o inoculo do solo. Em relação a diversidade patogênica e genética, observou-se uma grande diversidade patogênica, evidenciando a presença de raças patogênicas e em relação a diversidade genética, verificou-se que os isolados são distintos quando analisados com técnicas mais abrangente, como marcador do tipo RAPD, mas a população apresentou baixa diversidade genética em relação a variabilidade da região ITS-5.8S rDNA.

Palavras-chave: *Plasmodiophora brassicae*, diversidade genética, diversidade patogênica, brassicas, população.

Plasmiodiophora brassicae X CRUCIFERS: GENETIC VARIABILITY AND PATHOGENIC, DISEASE EPIDEMIOLOGY, ROOT EXUDATES AND EFFECT OF THE PLANTS NO CRUCIFERS IN DISEASE CONTROL. Botucatu, 2010. 99 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: DANIEL DIAS ROSA

Adviser: EDSON LUIZ FURTADO

2. SUMMARY

Within the horticulture sector, the plants of the Brassicaceae family are widespread in both volume and value-added marketing, so we highlight the intensive cultivation of brassicas, such as varieties of *Brassica oleracea* L. (Kale, cabbage, cauliflower, broccoli, Brussels sprouts), *Brassica napus* L. and *Brassica oleracea* L. var. *pekinensis* L. (Chinese cabbage), and the basis of economic support for small and medium producers of vegetables. Like other intensive planting crops, the brassicas are also facing many problems with diseases, among these is the club root, disease of great potential risk to the producer, because its difficult or no control and order the area, preventing future crops brassicas. The agent causal of the club root (*Plasmiodiophora brassicae* Woronin) is an obligatory endoparasites belonging to the kingdom Protozoa, inhabitant of soil, being one of the pathogens in soil less studied in the world, but it is known that this presents pathogenic races, or pathotypes, and some of these are already known, especially those taking place in Europe and Japan knows it, too, that these races "break" with some frequency, the little resistance that breeders can incorporate into commercial varieties, making that almost no resistant variety available in the market, especially the Brazilian market where perhaps there is not race related. This study aimed to investigate the genetic variability and pathogenic isolates of *P. brassicae* come from the main producing regions Brassicas state of Sao Paulo, using for this: a) testing range differential, domestic and imported, with no single spores and spore for the determination of races, b) study of the aggressiveness of the isolates in the face of cultivars available in the market, c)

study of genetic variability within and between populations, using markers RAPD and Microsatellite d) genetic characterization through sequencing of genetic regions with taxonomic value, as the ITS and EF-1 α , e) study effect of root exudates of plants not brassicas on the germination of spores of resistance *P.brassicae* f) study the effect of *P. brassicae* on brassicas crops not in order to obtain a response to a possible crop rotation, since the use of a culture may result in inadequate damage and even greater losses, especially when the plant chosen allows the pathogen to multiply and worse still, when the microorganism in the soil, is pathogenic to rotational culture, thus increasing the loss of the farmer, eg) make a systematic survey of areas visited to obtain actual rates of incidence of the disease and thus can in future develop effective control measures this pathogen. The samples of the isolated and data collection field, there are some fields with up to 100% infestation of *P.brassicae*, and that the average incidence was 5.9% of patients in the state plan. It was also observed that the preferred temperature for the development of the disease is around 20 ° C, and the resistance of spores respond to exudates from roots of non-host plants, especially coriander, which is one possible way to reduce the inoculum soil. For pathogenic and genetic diversity, there is great diversity in pathogenicity, demonstrating the presence of pathogenic races and for genetic diversity, it was found that the isolates are distinct when analyzed with more comprehensive techniques such as RAPD marker, but the population had low genetic diversity in relation to variability of the ITS-5.8S

Keywords: *Plasmodiophora brassicae*, genetic diversity, pathogenic diversity, brassicaceae, population.

3. INTRODUÇÃO

As espécies de Brassicaceae cultivadas no mundo apresentam inúmeros problemas com patógenos, mas, *Plasmodiophora brassicae* é considerado o patógeno de solo mais importante para estas culturas, pois além de atacar espécies silvestres, como *Arabidopsis thaliana* na Europa (Koch *et al.*, 1991), também ataca as três mais importantes espécies cultivadas de Brassicaceas no mundo, *Brassica oleraceae* L. (Couve, repolho, Couve-flor, Brócolis, Couve de Bruxelas) *Brassica napus* L. e *Brassica oleraceae* L. var. *pekinensis* L. (Couve chinesa), fazendo com que haja uma grande insistência para o desenvolvimento de cultivares resistentes a *P. brassicae* (Crute *et al.*, 1980).

Este propósito de desenvolvimento de cultivares resistentes esbarra na problemática de que o patógeno é dotado de uma alta variabilidade genética e, com isso, desenvolve uma ampla variação patogênica, apresentando, assim, patotipos ou raças, fazendo com que seja cada vez mais difícil se obter uma cultivar resistente ao patógeno. Por isso, estudos que demonstrem, e que apresentem de forma clara, quais as raças presentes em determinada região, pode auxiliar no manejo da doença, e no melhoramento, com isso, tornar possível à convivência com o patógeno.

A rotação de cultura é muitas vezes adotada para se tentar conviver com o patógeno, mas essa prática, quando efetuadas sem o conhecimento do comportamento do patógeno com a cultura rotacional escolhida, pode implicar em danos e perdas ainda

maiores, principalmente quando a planta escolhida permite que o patógeno se multiplique nela, e pior ainda, quando o patógeno presente no solo consegue exercer uma influência patogênica sobre a cultura rotacional, causando redução radicular e tombamento das plantas, aumentando assim o prejuízo do agricultor (Crute *et al.*, 1980).

Dessa forma, o estudo para se caracterizar a variabilidade genética, cultural e patogênica, assim como o estudo da influência do patógeno sobre plantas não Brassicaceas, irá auxiliar e direcionar o manejo adequando a ser dado nas áreas infestadas pela *Plasmodiophora brassicae*.

4. OBJETIVOS

A) Testes em variedade diferenciais, nacionais e importadas, com isolados monospóricos e não monospóricos para determinação das possíveis raças ou patotipos dos isolados de *P. brassicae* por meio de seletividade de hospedeiro, tendo por finalidade:

- 1 – Determinar as raças dos isolados monospórico;
- 2 – Determinar se existem outras raças não obtidas a partir do isolado não monospórico (população) haja vista, que o isolado não monospórico apresenta como característica ser um “mix” de genótipos (ou de raças), sendo assim, o teste do isolado não monospórico (população) nas variedades diferenciais pode indicar a presença de outras raças não obtidas quando do isolamento monospórico, por questões de probabilidade;
- 3 – Determinar o comportamento patogênico dos isolados não monospóricos perante diferentes genótipos (variedades diferenciadoras) uma vez que o isolado não monospórico é o que ocorre na natureza, sendo assim, essa informação pode ser importante pensando-se em infecções conjuntas por mais de uma raça.

B) Teste de agressividade de todos os isolados não monospórico perante cinco híbridos de couve chinesa, planta padrão de susceptibilidade para esta doença;

C) Estudo de variabilidade genética intra e inter populacional, utilizando marcadores do tipo RAPD e Microsatélite;

D) Caracterização genética, através de seqüenciamento de regiões gênicas com valor taxonômico, como região ITS e EF-1 α ;

E) Estudo do efeito dos exsudados radiculares de plantas não brassicas sobre a germinação dos esporos de resistência de *P.brassicae*;

F) Estudar o efeito da *P. brassicae* sobre culturas não brassicas, visando obter uma boa alternativa para a utilização na rotação de cultura;

G) Efetuar o levantamento sistemático das áreas de coleta para obtenção dados epidemiológicos relativos à doença nas regiões produtoras.

5. REVISÃO LITERATURA

5.1. Hospedeiros

A família botânica Brassicaceae abriga mais de 3000 gêneros, que agrupa entorno de 12000 espécies e variedades botânicas, sendo que muitas das espécies agrupadas nesta família são de ampla utilização pela humanidade para alimentação. Dentre as brassicas mais utilizadas no mundo, destaca-se o repolho (*Brassica oleraceae* L. var. *capitata* L.), brócolos (*Brassica oleraceae* L. var. *itálica* Plenck), couve (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.), couve-flor (*Brassica oleraceae* L. var. *botrytis* L.), couve chinesa (*Brassica oleraceae* L. var. *pekinensis* L.), rúcula (*Eruca sativa* Mill), na produção de grãos tem-se a canola (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) e dentre as ornamentais são citadas as espécies de *Iberis* spp. e *Matthiola* spp. (Filgueira, 2003; Gemtchújnicov, 1976). Dentre os produtos hortifrutigranjeiros, as brassicas são responsáveis por mais de 30% do setor, que corresponde a uma movimentação entorno de R\$ 40 milhões por anos. Entre as brassicas, destaca-se a cultura de repolho, que possui uma produção aproximadamente de 93 mil t.ano⁻¹ que corresponde a um mercado de aproximadamente R\$ 14 milhões por ano e em seguida a cultura

do brócolo, com uma produção de 44 mil ton.ano⁻¹ que totaliza a renda aproximada de R\$ 9 milhões por ano (Agrianual, 2009).

5.2. Patógeno

Dentre as Brassicas cultivadas, todas apresentam problemas de forma isolada ou não com um ou mais patógenos, como no caso de oídio em canola, mancha de alternaria em couve, couve-flor e repolho, mas há um patógeno que é um grande problema para todas as espécies de Brassicas cultivadas, a *Plasmodiophora brassicae*.

Pertencente a um grupo de organismos endoparasitas obrigatórios, que possui apenas 26 espécies, distribuídas em 10 gêneros, dentro da única família e ordem (Dylewski, 1990; Hawksworth *et al*, 1995), *Plasmodiophora brassicae* é uma das espécies de fitopatógenos de solo menos estudada no mundo. Reclassificada como pertencente ao reino Protozoa, pela presença de quitina na parede celular e por ter uma fase da vida na forma amebóide. Está agrupada no filo Plasmodiophoromicota (Barr, 1992; Braselton, 1995; Hawksworth *et al*, 1995), *Plasmodiophora brassicae* Woronin é um habitante do solo, parasita obrigatório, agente causal da “Hérnia das crucíferas”, e é considerada a doença mais importante à família das Brassicaceae (Crute, 1989).

Plasmodiophora brassicae foi identificado como agente causal da “hérnia das crucíferas” por Woronin em 1878, sendo que existem relatos da doença a partir do século XI, mas somente em 1930 Cook e Swartz relataram o ciclo de vida do patógeno e com isso o ciclo infeccioso da doença (Tommerup e Ingram, 1970). A doença apresenta distribuição cosmopolita (Maringoni, 1995), sendo que no Brasil o patógeno foi constado pela primeira vez em novembro de 1934, no Estado de São Paulo, infectando plantas de couve manteiga (Viegas, A.P., Teixeira, A.R., 1943) e a partir daí pode ser encontrado nas regiões sul e sudeste, devido ao grande cultivo de brassicas nestas áreas e por elas apresentarem características climáticas favoráveis ao patógeno, como temperaturas mais amenas e umidade alta durante todo o ano o que auxilia no desenvolvimento da doença, apesar de se haver relatos da doença em plantas de agrião e rúcula na região centro-norte, uma região caracterizada por temperatura mais elevadas e baixa umidade relativa (Robbs *et al.*, 1972; Andrade *et al.*, 2001).

O protozoa *Plasmodiophora brassicae* ao infectar as radículas e raízes de uma brassica inicia-se o processo de hipertrofia celular do córtex radicular, que leva a formação das chamadas “galha” ou “hérnia”, as quais causam a obstrução dos vasos, paralisando ou diminuindo o fluxo da solução salina do solo para a parte aérea da planta, causando os sintomas de murchas no período mais quente do dia, amarelecimento e conseqüentemente, em casos extremos, a morte da planta (Tommerup e Ingram, 1970).

O ciclo de vida de *P. brassicae* é dividido em duas grandes fases dentro do hospedeiro (Figura 1), sendo que a primeira ocorre dentro dos pelos radiculares, por onde ocorre a penetração da forma infectante do patógeno, o zoósporo primário, a partir daí o patógeno inicia inúmeras e sucessivas divisões celulares do tipo cruciforme, levando à uma fase multinucleada, a qual é desprovida de parede celular rígida e que ocupa as células do hospedeiro, lembrando um plasmódio, no entanto dele difere pela incapacidade de fagocitar e pela ausência de movimentos de fluxos citoplasmáticos. Na segunda fase ocorre a colonização do córtex radicular e o aumento do protoplasto e sua transformação no plasmódio esporangial primário. Desenvolve-se, até atingir condições de formar zoosporângios, que podem se apresentar isolados ou agregados. Dentro dos zoosporângios há a formação dos zoósporos secundários que foram liberados para fora do hospedeiro ou para outras células deste. Com a germinação dos zoósporos secundários resulta, no hospedeiro, o plasmódio secundário, o qual induz a hipertrofia dos tecidos do hospedeiro. O plasmódio secundário dá início a formação de esporos de resistência, após sofrer algumas divisões meióticas; sendo que este esporo pode estar isolado, mas geralmente aparece agrupado. Os esporos de resistência, por sua vez, são liberados dos tecidos do hospedeiro quando este morre e começa a se desintegrar, podendo ficar dormentes até oito anos (Alexopoulos *et al.*, 1996; Tommerup e Ingram, 1970).

A inexistência de dados sobre o impacto econômico, assim como dados de incidência, perdas e prejuízos no Brasil faz com que a doença muitas vezes seja considerada uma doença secundária, mas na cultura da Canola (*Brassica napus* L. var *oleifera*) no Canadá, sabe-se que a incidência deste patógeno sobre variedades susceptíveis pode causar perdas entre 70 a 98% da cultura, demonstrando assim o grande potencial destrutivo da doença (Harding, *et al.*, 2005). Na Austrália estima-se que 10% da produção das Brassicaceas é perdida devido ao ataque deste patógeno, levando a um prejuízo de US\$ 13

milhões (Faggian *et al.*, 1999), por isso faz-se necessário um levantamento sistemático da doença nas regiões produtoras.

Devido ao potencial destrutivo da *P. brassicae*, a procura por resistência é extremamente importante, visto a alta variabilidade deste patógeno, apesar de muito pouco ser conhecido sobre o mecanismo de variabilidade da espécie e de populações isoladas de *P. brassicae*, mas sabe-se que em apenas uma planta com hérnia é possível existir varias raças infectando o seu sistema radicular. Segundo Manzanares-Dauleux *et al.* (2001) a presença de um “mix” de raças, ou genótipos, pode ser comprovado quando é efetuado o isolamento de um único esporo, esporos simples, zoósporo primário, e sua inoculação em planta, podendo ser observar uma grande variabilidade de virulência destes esporos simples, sendo que cada esporo simples se comporta com um índice de infecção acima ou abaixo do índice observado quando se efetua a infecção utilizando-se do “mix” proveniente da “galha”. A existência desta variabilidade atrapalha e muito os programas de melhoramento das Brassicaceas, visto que a distribuição das raças não é homogênea sobre toda a área e que algumas raças apresentam uma seletividade pelo hospedeiro, fazendo com que se tenha um período muito curto em que a cultivar resistente se mostre resistente em condições de campo, levando assim a quebra de resistência e conseqüentemente o abandono da cultivar melhorada (Kuginuki *et al.*, 1999).

Para o avanço nos estudos biológicos, assim como o desenvolvimento de cultivares resistentes, há a necessidade de se conhecer os patotipos ou raças presentes dentro do País. Na europa, Buczacki *et al* (1975) desenvolveram o sistema de diferenciação de raças da hérnia das crucíferas para a Europa (European Clubroot Differential – ECD), este sistema consiste na utilização de diversos cultivares da mesma espécie e de espécies diferente para se obter assim uma série diferenciadora de raça, escolhidas com base na resistência e suscetibilidade a *P. brassicae*, construindo, assim, um sistema de diferenciação de patotipos. Outros estudos utilizando a idéia de uma série de plantas diferenciadoras foram efetuados no Japão, onde a doença também é grave, ali os pesquisadores optaram por utilizar cultivares e espécies presentes no país, visto a dificuldade de se obter as linhas diferenciadoras utilizadas na europa e também porque observaram que as raças naquele país se apresentavam muito semelhantes entre si, quando analisadas pelas linhas diferenciadoras da europa, fazendo com houve-se poucas diferenças da infecção nas linhas diferenciadoras por raças distintas, daí a

base para a adoção de cultivares adaptadas e que demonstrassem de forma clara as diferenças entre as raças do país (Kuginuki *et al.*, 1999), por isso, a adoção de cultivares já comercializadas no país onde se pretende estudar as raças de *P. brassicae* é uma prática adotada e bem vista pela sociedade científica internacional.

5.3. Ferramentas da biologia molecular

A alta variabilidade de *P. brassicae* fez com que uma ferramenta amplamente utilizada fosse rapidamente adotada, a análise da variabilidade genética por técnicas moleculares, como RAPD e seqüenciamento de regiões cromossômicas, com o intuito de obter correlações entre esses marcadores genéticos e as raças fisiológicas, assim como o estudo do fluxo gênico entre as populações e também o desenvolvimento de “kits” de detecção molecular, baseados na amplificação por PCR de uma região específica da região ITS-5.8S rDNA da *P. brassicae*, todas envolvem o uso das informações oriundas dos estudos de diversidade do patógeno de vários países, visto que a técnica de detecção via PCR específico é amplamente utilizada, pois a técnica anteriormente adotada, a detecção por sorologia apresentava inúmeras dificuldades e um número de falsos negativos elevado devido à existência das raças (Faggian *et al.*, 1999; Manzanares-Dauleux *et al.*, 2001), por isso, a utilização de técnicas moleculares que forneçam suporte para o estudo da diversidade e que possam ser correlacionadas com as raças, utilizando-se de marcas específicas, como marcadores do tipo SCAR, para esse grupo específico, pode ajudar no melhoramento genético, utilizado neste caso como melhoramento assistido, assim como já utilizado para outros patógenos (Chen *et al.*, 1995; Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000).

Mesmo com o emprego de cultivares resistentes, uma técnica muito utilizada para se efetuar a diminuição do inóculo inicial presente no solo é a rotação de cultura. Esta prática além de trazer benefícios ao solo, também ajuda na quebra do ciclo contínuo de outros patógenos de brassicáceas, mas em relação a *P. brassicae* observa-se muito pouca redução, pois estima-se que a meia vida do esporo de resistência seja de 3 a 4 anos e há relatos de esporos viáveis em solo com “pousio” de até 17 anos (Wallenhammar, 1996), por isso, inúmeros tratamentos feitos pelos produtores, como: fumigação do solo com brometo de

etídeo, solarização, aplicação de fontes de cálcio e de fungicidas, como PentaCloroNitroBenzeno (PCNB) são práticas utilizadas, apesar de que algumas são muito dispendiosa e muitas vezes proibidas pela legislação (Donald *et al.*, 1997).

Ludwig-Müller *et al.* (1999) observaram a existência de uma correlação forte entre a infectividade de *P. brassicae* com a concentração de glucosinolatos radiculares das plantas hospedeiras, as brassicaceas, e plantas não hospedeiras, no caso inúmeras plantas utilizadas para rotação de cultura, dentre elas, *Carica papaya* – Mamão. Neste estudo, os pesquisadores observaram que as formas infectivas de *P. brassicae* foram capazes de infectar o sistema radicular de plantas não brassicaceas e que em algumas plantas, o patógeno foi capaz de se multiplicar e formar esporos de resistências, sendo estes patogênicos a couve chinesa. Este estudo reabre o debate sobre a rotação de cultura para patógenos que ainda não se tem um bom conhecimento e, principalmente, não se sabe o efeito que este patógeno pode ter sobre o sistema radicular de plantas não brassicaceas, visto a verificação de uma redução significativa do sistema radicular de todas as plantas estudadas (Ludwig-Müller *et al.*, 1999). Por isso o estudo do efeito da presença de *P. brassicae* sobre o sistema radicular, assim como a influência dos exsudatos radiculares das plantas utilizadas na rotação de cultura sobre os esporos de resistência faz-se necessário.

5.4. Caracterização das raças conhecidas.

Biologicamente a origem das raças patogênicas esta intimamente relacionada com a evolução entre a interação patogeno-hospedeiro, demonstrando de uma forma mais clara que o principio de especiação que Charles Darwin demonstrou em suas obras, onde uma raça se torna altamente especializada para um grupo de genótipos do hospedeiro, está altamente ativo e funcional. Nos últimos anos, com o avanço da compreensão da biologia da patogênese, assim como uma maior compreensão da genética que controla toda a interação, desde a patogênese, assim como os sistemas de defesa, se tornou mais claro para os especialistas que o principio de especialização, assim como o principio de especiação, estão intimamente ligados a todas as modificações genéticas que o patógeno e o hospedeiro sofrem.

No patossistema *Plasmodiophora brassicae*-Brassicaceae, observa-se essa interligação, apesar de verificar algum nível de dificuldade de demonstrações experimentais, muitas provas já existem a favor dessa hipótese. Entre elas podemos citar os trabalhos de Föhling *et al.* (2003; 2004) onde eles demonstram que um único isolado selvagem coletado em uma única planta pode abrigar mais de 3 raças distintas, demonstrando que os isolados selvagens são um complexo mix de raças, e que estas, estão em frequências distintas no isolado selvagem. Esta frequência pode estar intimamente ligada ao tempo de vida útil de uma cultivar resistente à uma ou mais raças.

A caracterização de raças em *P. brassicae* é um trabalho laborioso, demorado e que muitas às vezes pode sofrer grandes influencias ambientais, principalmente influencias ligadas ao pH do solo onde esta se realizando as diferenciações. Wit e van de Weg (1964) discutem que é possível que algumas raças são, e foram, selecionadas pelas estações do ano e pela localidade de plantio, demonstrando que as raças das regiões mais frias são diferentes as raças encontradas em regiões mais quente.

Em todo o mundo diversos sistemas de diferenciação de raças já foram propostos, mas basicamente o sistema de diferenciação baseia-se na inoculação de um isolado monosporico em um “set” diferencial de hospedeiros (Buczacki *et al.*, 1975; Kuginuki *et al.*, 1999), sendo os mais conhecidos o sistema ECD (European Club-root Differential) o mais conhecido, proposto por Buczacki *et al.*, 1975 e o “set” diferencial de Williams (1966), apesar ser um sistema bastante eficiente, este é um sistema muito restrito, principalmente a dificuldade de se conseguir as linhas diferenciadoras. Atualmente, a importação e manutenção de linhas diferenciadoras só são possíveis com a utilização de estruturas especializadas para a reprodução dessas plantas e também licenças especiais junto aos órgãos reguladores de germoplasma.

Atualmente, com o avanço da biologia molecular, e a grande caracterização das raças conhecidas, a utilização de marcadores moleculares esta tendo grande participação no processo de diferenciação (Faggian *et al.*, 1999; Manzanares-Dauleux *et al.*, 2001), mas devido a grande variabilidade genética, poucos marcadores eficientes foram encontrados, sendo os marcadores do tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) os que vem apresentando melhor correlação com as raças conhecidas (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2001)

Apesar de todo o avanço e conhecimento já obtido relacionado às raças existentes, as diferenças entre elas e distintas formas já encontradas, é um consenso entre os pesquisadores que não é possível obter uma classificação rígida e confiável para as raças no mundo inteiro (Jones *et al.*, 1982a, 1982b), sendo esse o maior obstáculo para o melhoramento genético e para possíveis formas de controle.

5.5. Controle.

Nos últimos 80 anos diversas formas de controle da *Plasmodiophora brassicae* e da doença hérnia das crucíferas foram desenvolvidos e implementados, mas infelizmente sem muito êxito em todos esses anos. O convívio com o patógeno ainda é a forma mais utilizada de manejo da doença.

O controle químico da *P.brassicae* foi por muitos anos perseguido, sendo que fungicidas como pentachloronitrobenzeno, chlorotalonil, fluazinam, cyazofamid, benomil, captafol (Tate, 1977; Tate e Cheah, 1983), fosetyl-al, thiabendazoles e tiofanato-metilico (Humpherson-Jones, 1993) e flusulfamida foram registrados para o seu controle, sendo que muitos dessas moléculas apresentaram uma eficiência média, mas desde que ministrados em altas doses, que causou uma impossibilidade de uso, devido a grande toxidez, com exceção da flusulfamida, que apresentou bons resultados com baixas doses, mas seu uso ainda está sobre restrição em muitos locais, devido o pouco conhecimento de seu funcionamento junto ao solo e o seu modo de ação sobre o patógeno (Tanaka *et al.*, 1999). Outra molécula bastante promissora surgiu no início do século, o Cyazofamid apresenta um grande potencial sobre oomycetos, sendo por isso rapidamente adotado para o controle de *P.brassica* (Mitani *et al.*, 2003), devido a semelhança biológica, mas nos últimos anos verificou-se grande problemática de residual dessas moléculas.

Ao contrário do controle químico, o controle mais efetivo foi verificado em meados da década de 70, na Europa, principalmente em solos ácidos, quando recebiam compostos alcalinizantes, como a calagem, verificava-se uma redução da agressividade da hérnia, verificando-se que a infecção pelo zoósporo do patógeno era dificultada em pH 7.0. A partir desse momento a prática de calagem se tornou um item

essencial para o convívio com o patógeno. No início da década de 90, do século passado, verificou-se uma grande eficiência de controle da doença quando da incorporação de cianamida de cálcio (CaCN_2) (Cheah 1995), um adubo que visava fornecer nitrogênio, mas que por seu potencial alcalinizante e mostrou bastante efetivo, prática que se tornou bastante comum na Europa, USA e Canada. O controle neste caso não está somente relacionado com a mudança do pH, mas sim a presença do cálcio de forma livre na solução do solo, que acaba desativando os zoósporos de *P.brassicae*, no Brasil, Ruaro *et al.* (2009) verificaram que fontes de nutrientes que acidificam o solo levam a um aumento significativo na severidade da doença, assim como, quando se utiliza fontes de nutrientes, principalmente de nitrogênio, como o adubo Nitrato de cálcio, verifica-se uma redução da severidade e da incidência da doença.

Nos últimos anos, impulsionados pelas práticas ambientalmente recomendadas, novos controles de *P.brassicae* surgiram, principalmente práticas que visam aumentar a germinação dos esporos de resistência na ausência de seu hospedeiro, tornando bastante eficiente a redução da população e com isso obtivesse um grande controle da doença. Há muitos anos já era conhecido que exudatos radiculares de plantas não hospedeiras estimulam a germinação dos esporos de resistência de *P. brassicae* (Macfalan 1952; Kroll ET AL., 1984), mas essa prática foi por muito tempo abandonada, sendo retomada no final de 1980, quando muitos especialistas relataram que a alternância de cultivares de brassicas com vários níveis de resistência poderia diminuir a população de *P.brassicae* no solo (Yamagishi ET AL., 1986), desde então a intercalação do cultivo de espécies susceptíveis com espécies de brassicas resistente se tornou uma prática comum em muitos países produtores (Murakami ET AL., 2000).

No Brasil essa prática vem sendo exercida nas regiões produtoras, como cultivos de brassicas resistentes, como por exemplo, o plantio de rabanete selvagem ou nabo forrageiro, entre os plantios de repolho, couve-flor e brócolé, na região do cinturão verde do estado de São Paulo, assim como o uso de plantas não brassicas que estimulam a germinação dos esporos de resistência no período de entre-safra ou como rotação, sendo dessas culturas o coentro (Informação pessoal)

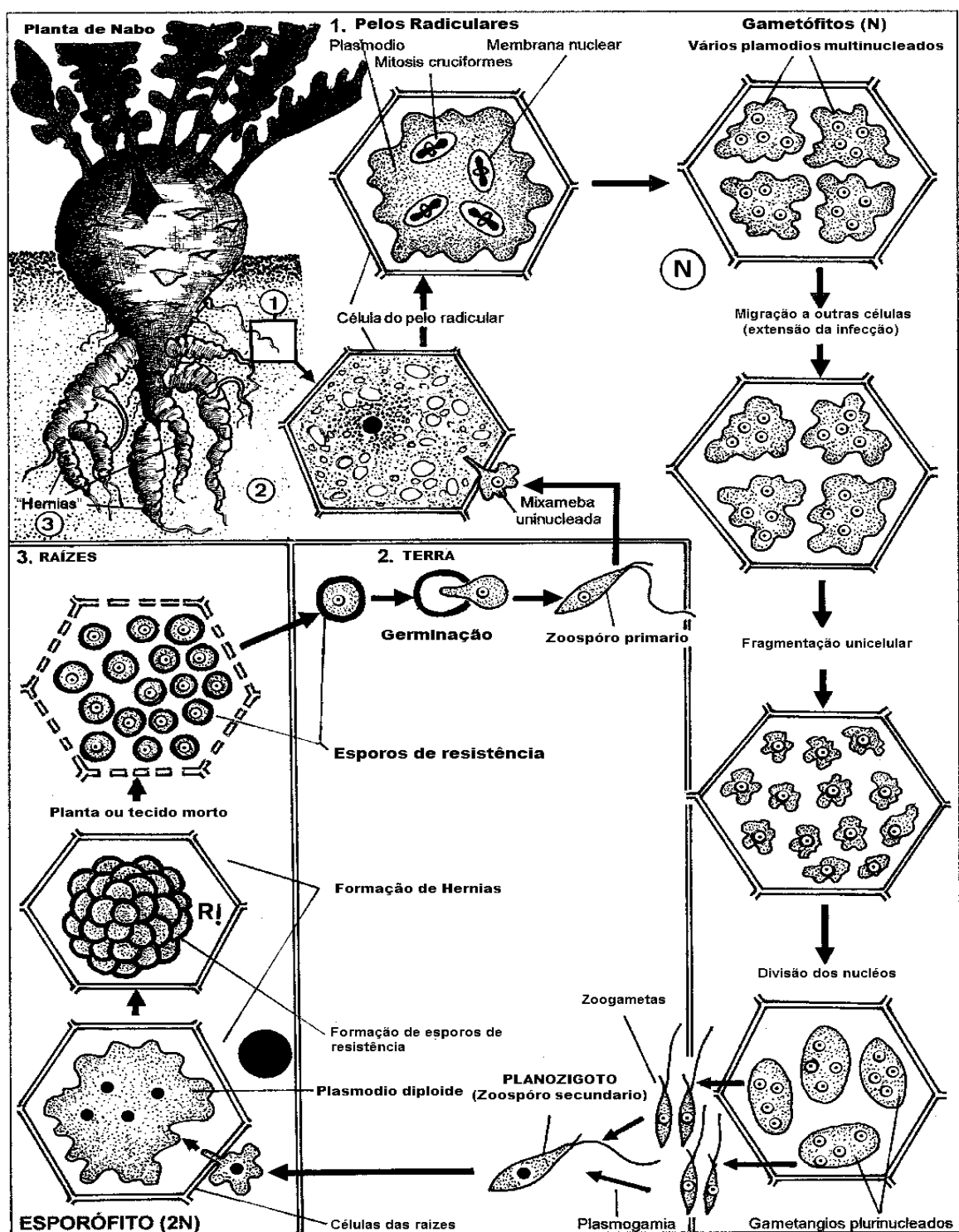


Figura 1 – Ciclo de vida da *Plasmodiophora brassicae* em uma planta de Nabo (*Brassica napus*) nos vários estádios fenológicos tanto na planta quanto sua sobrevivência no solo. Adaptado de Tomás E. DÍAZ GONZÁLEZ.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Coleta de material, preservação e levantamento de incidência.

Os isolados de *Plasmodiophora brassicae* utilizados neste estudo foram coletados nas principais regiões produtoras de Brassicaceas do Estado de São Paulo, principalmente a região conhecida como cinturão verde de São Paulo (Figura 2), sendo esta dividida em 6 partes, onde foram efetuadas duas coletas em cada um dos seguintes municípios: Atibaia, Mairiporã, Mogi das Cruzes e Suzano, Embu-guaçu, São Roque e Piedade e Cabreúva. Visando-se manter o mesmo numero de coletas, foram efetuadas coletas em quatro cidades fora do cinturão verde de São Paulo, sendo elas Botucatu, Itapeva, São João da Boa Vista e Ribeirão Preto. As plantas doentes coletadas foram identificadas através de um questionário com todas as informações necessárias a fim de se manter um extensivo banco de isolados. O condicionamento deu-se em caixa de isopor com gelo para manter a qualidade do material durante o transporte.

Para o levantamento de incidência utilizou-se os dados obtidos junto ao levantamento epidemiológico efetuado das áreas amostradas, sendo que em cada município visitado utilizou-se duas áreas distintas e distantes entre si para coleta, em cada área foi utilizada 4 parcelas, sendo que cada parcela consistiu em uma área de 10 X 10 plantas,

totalizando 100 plantas por parcela e 400 plantas por área, e 800 plantas por municípios, sendo esse número significativo para o cálculo de índice de incidência (II), o qual foi calculado utilizando-se $II = (\text{plantas com sintomas} / \text{total de plantas analisadas}) \times 100$, onde cada município visitado recebeu um índice geral, considerando-se o índice das propriedades visitadas. Com base no II e na área amostradas, efetuou-se a projeção para a região onde está inserido o município, utilizando-se informações obtidas junto a secretaria de agricultura do estado de São Paulo para essa projeção.

Os materiais (hérnias) coletados foram trazidos para o Laboratório de Patógenos de Solo “Nilton L. de Souza”, da Faculdade de Ciências Agronômicas - FCA, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita” – UNESP, Campus Botucatu. Foi efetuada a lavagem das raízes, secagem com papel toalha e acondicionadas individualmente em sacos de 10X15 cm de polietileno para posterior congelamento em “freezer” a -20°C , sendo mantidas, juntamente com os outros isolados já presentes na micoteca do laboratório (Tabela 1), nesta temperatura até o seu uso.

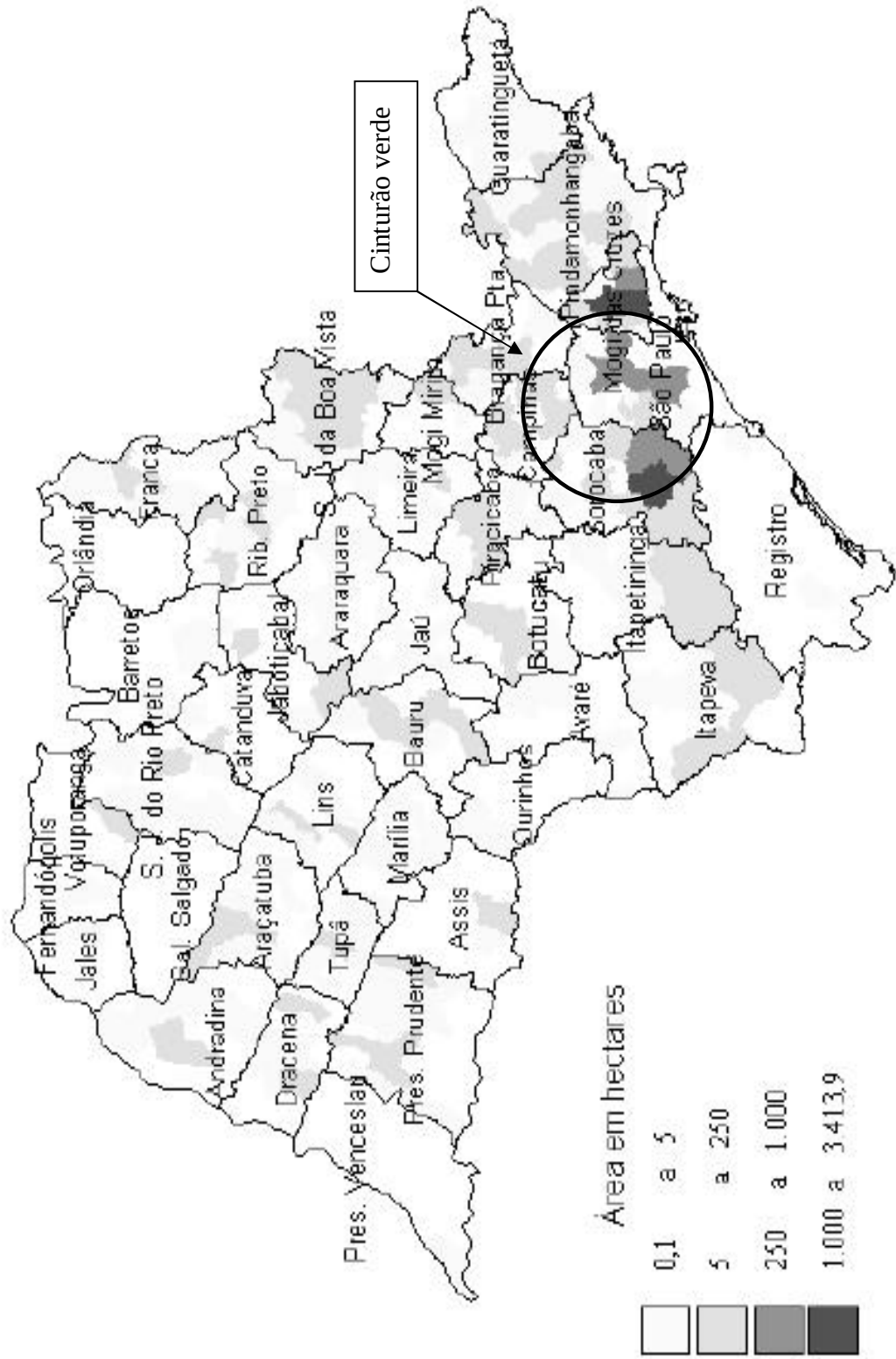


Figura 2 – Mapa do estado de São Paulo mostrando as regiões produtoras de Brassicas, em hectares. O círculo representa a área do conhecido cinturão verde de São Paulo, região com alto índice de produção hortícola.

Tabela 1 – Isolados de *Plasmodiophora brassicae* já armazenados no Laboratório de Patógenos de Solo “Nilton L. de Souza”.

Identificação	Local	Cultura	Coletor	Data
PB1	Vargem Grande Paulista - SP	Reponho Sunshei	Claudio (Eucatex)	1/12/2005
PB2	Pardinho – SP	Rúcula	Ester Baldini	28/08/2005
PB3	Piedade – SP	Repolho	Aniello (Sakata)	29/08/2005
PB4	Colombo – PR (C4163-1)	Couve Chinesa	Aniello (Sakata)	18/11/2005
PB5	Colombo – PR (C4163-2)	Couve Chinesa	Aniello (Sakata)	18/11/2005
PB6	Colombo – PR (C4163-3)	Couve Chinesa	Aniello (Sakata)	18/11/2005
PB7	Colombo – PR (C4163-4)	Couve Chinesa	Aniello (Sakata)	18/11/2005
PB8	Colombo – PR (C4163-5)	Couve Chinesa	Aniello (Sakata)	18/11/2005
PB9	Divinolândia – SP	Brócolis	César Bueno (APTA)	21/07/2003
PB10	Carandaí –MG	Repolho	Rafael dos Anjos	24/08/2005
PB11	Pardinho – SP	Brócolis	Prof. Nilton L. de Souza	19/01/2006
PB12	São José do Rio Pardo	Brócolis	Daniel D. Rosa	21/07/2003

6.1.1. Estudo da distribuição espacial da doença

6.1.1.1. Índice de dispersão (ID)

A análise do padrão espacial da hérnia das crucíferas foi realizada através de mapeamento de áreas amostrais em cada região de coleta visitada, sendo que em cada área amostral avaliou-se 4 parcelas de 100 plantas, totalizando 400 plantas por área, os dados obtidos foram transformados em dados binários (presença ou ausência da doença). As plantas com sintomas de hérnia das crucíferas foram examinadas e calculou-se a incidência da doença com a seguinte fórmula: $(p = T/D)$.

Em que: T = número total de plantas por parcela; D = número total de plantas doentes. Os dados de incidência foram à base para o cálculo do índice de dispersão (ID) (Gottwald et al., 1996; Madden et al., 1995; Laranjeira et al., 1998; 2004). Cada mapa foi dividido em quadrats de 4 (2x2) plantas/quadrat. Para cada mapa foi realizado uma análise individual. A análise da distribuição das plantas doentes dentro dos quadrats, em cada parcela, foi estimada pela análise binomial, através do cálculo do índice de dispersão binomial, que é a (Vobs) variância observada entre quadrats e a (Vbin) variância da distribuição binomial (Madden & Hughes, 1995).

Para cada um dos noventa e seis mapas a análise binomial (planta doente ou sadia) foi calculada na forma de variância observada (Vobs), conforme preconiza Gottwald et al, (1996) e Hughes & Madden, (1992) em que: $V_{bin} = p(1-p)/n$ onde: p = incidência da doença na parcela n = número de plantas no quadrat $V_{obs} = [(x_i - np)^2 / n^2(N-1)]$ onde: X_i = número de plantas doentes no quadrat N = número total de quadrats. Para o cálculo do índice de dispersão (ID) utilizaram-se os resultados da V_{obs} / V_{bin} sendo possível concluir, sobre o padrão de distribuição espacial das plantas doentes em cada mapa. Para os valores de ID obtidos de cada quadrat foi aplicado o teste do χ^2 (qui-quadrado) para verificar se o valor calculado foi maior ou igual a 1 a nível de significância de 5%. Valores de ID significativamente iguais a 1 indicam que as plantas com hérnia estão distribuídas aleatoriamente no campo. Valores de ID significativamente maiores que 1 indicam que as

plantas com hérnia estão agregadas (Madden & Hughes, 1995). A hipótese de afastamento da aleatoriedade que consiste em rejeitar a aleatoriedade, foi realizado para cada área dentro do *quadrat* 2X2 através da aplicação do teste do qui-quadrado (χ^2) onde o ID $\neq$ 1 a 0,05% (Eliliot, 1983). χ^2 observados = ID (N-1) > χ^2 calculado; ID = Índice de dispersão; N = número de quadrat; χ^2 calculado = $0,5 [1,645 + (2 (N-1) -1)05]^2$. Quando o χ^2 observado > χ^2 calculado rejeita-se o ajuste da distribuição estudada. A hipótese nula foi a de que o padrão observado era aleatório e a hipótese alternativa, de que era agregado. Valores de ID que não diferiram estatisticamente de 1 foram considerados como indicativo de aleatoriedade, enquanto que valores estatisticamente diferentes de 1 foram tomados como indicativos de agregação.

6.1.1.2. Análise da estrutura de focos da hérnia das crucíferas

No estudo da estrutura dos focos da hérnia das crucíferas, foi quantificado o Índice médio de Forma de Focos (IFF) e o Índice médio de Compactação de Focos (ICF), através das equações:

$$IFF = [(lf/lc)]/NF$$

Em que:

Valores de IFF = 1,0 indicam focos isodiamétricos.

Valores de IFF > 1,0 indicam focos com maior comprimento na direção paralela as linhas de plantio.

Valores de IFF < 1,0 indicam focos com maior comprimento na direção da linha de plantio.

$$ICF = [(NPF/lc*lf)]/NF$$

Em que:

Valores de ICF próximos a 1,0 indicam focos mais compactos, isto é, maior agregação e proximidade entre todas as plantas pertencentes ao foco (Nelson, 1995). Todas essas variáveis calculadas foram relacionadas com a incidência das plantas com sintomas da hérnia nas doze regiões.

6.1.1.3. Lei de potência binária

Taylor (1961) demonstrou que os dados de distribuição espacial de populações de uma espécie possa se relacionar linearmente com o logaritmo da variância observada (Vobs) e o logaritmo da média. Assim, a lei de potência binária relaciona por meio de regressão linear [$\text{Log (Vobs)} = \log (A) + b \cdot \log (\text{Vbin})$] a agregação de uma população em um ambiente (Hughes & Madden, 1992; Madden & Hughes, 1995).

O parâmetro b da lei de potência binária é um índice de agregação, sendo que os parâmetros da equação podem representar o padrão de comportamento de determinada espécie. O padrão espacial é indicativo de agregação quando $b > 1$, e quando $b = 1$ indica aleatória da população. A partir do cálculo do índice de dispersão (ID) para o quadrat de 2x2, gerou-se as variâncias (Vbin) e (Vobs). Estimando-se o logaritmo de cada variância, efetuou-se a regressão linear dos dados obtidos, sendo que como variável independente considerou-se o $\log (\text{Vbin})$ e como variável dependente, o $\log (\text{Vobs})$.

A significância da regressão foi determinada pelo teste F e a adequação do ajuste foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2) e pela análise da distribuição de resíduos.

Quando a distribuição das plantas com hérnia das crucíferas for ao acaso, os valores de $A=0$ e $b=1$. Se o valor de $A \neq$ de zero e $b \neq 1$ a distribuição espacial da doença no campo não é ao acaso, sendo que valores $b > 1$ demonstra um comportamento de agregação da doença, sendo que quando mais alto o valor, maior o índice de agregação, já quando $b < 1$ o padrão de comportamento é regular.

A equação de regressão foi avaliada para cada conjunto de dados e para cada quadrat, através do Teste t (Madden et al., 1995). Foram testados a hipótese de $b = 1$ ($b = \log \text{Vbin}$) e a hipótese alternativa de $b > 1$. Valores de b significativamente diferentes de 1 a nível de 5 % de probabilidade foram considerados indicativos de agregação e valores estatisticamente iguais a 1 foram considerados indicativos de aleatoriedade. Através da regressão do logaritmo da variância observada e o logaritmo da variância binomial por meio da equação $\log (\text{Vobs}) = \log (A) + b \log (\text{Vbin})$, foi possível determinar os valores dos

parâmetros b e A para os quadrat estudados e para cada área e região, assim como o coeficiente de determinação (R^2) para cada conjunto de dados.

6.2. Isolamento monospórico

6.2.1. Obtenção dos esporos de *Plasmodiophora brassicae*

Utilizando-se de uma alíquota de 20 gramas das galhas coletadas foi procedida a retirada dos esporos. O material vegetal sofreu uma desinfestação superficial utilizando-se de uma solução de hipoclorito de sódio a 5%, seguido de lavagem com água destilada esterilizada. Após esta lavagem o material foi triturado com auxílio de liquidificador acrescido de 100 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, a suspensão obtida foi submetida à filtração em camadas de 15 folhas de gaze, e, posteriormente, em filtro de poliéster de 100 μ m. O volume filtrado foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 1500 x g, sendo que o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada esterilizada e centrifugado novamente para obtenção de um pellet limpo, o qual foi ressuscitado em um volume máximo de 5 mL de água destilada esterilizada.

A suspensão obtida foi purificada com uso de diferença de densidade. Nesta etapa foram testados dois métodos, sendo o primeiro, o método de diferença de densidade utilizando-se de Ficoll 400, em uma coluna de gradiente entre 12 e 36% (P/V) e o segundo, o método do gradiente de sacarose, com gradiente de 60, 40, 20 e 5% de sacarose. As bandas formadas foram coletadas e analisadas, visando encontrar em qual delas encontra-se a de maior concentração de esporos e maior pureza. A banda coletada foi acondicionada em microtubo de 2 mL e centrifugado para formação de pellet, sendo este ressuscitado em um volume de 2 mL para se obter uma alta concentração, a qual foi analisada utilizando-se de hemocitômetro.

6.2.2. Obtenção dos isolados monospóricos de *Plasmodiophora brassicae*

Foram utilizadas três técnicas distintas a fim de se escolher a melhor delas.

A primeira técnica é descrita por Buczacki (1977) e consiste na utilização de uma suspensão de 10^1 a 10^2 esporos. mL^{-1} , utilizado-se de uma alíquota de 1000 μL desta suspensão, a qual foi aplicada sobre meio Agar-água (50 gramas de Agar em 1000 mL de água) em placas e plaqueado com auxílio de uma alça de Drigalski. Utilizando-se de um microscópio estereoscópico e de um microscópio óptico foram localizados os esporos que se apresentem individualizados sobre o meio e estes foram coletados pela extração de fragmentos do meio contendo o mesmo. Este fragmento de meio de cultura+esporo foi colocado em contato com as radículas de plântulas com dois dias de idade, germinadas em câmara de germinação do tipo germibox, e mantidas no escuro. Após 48 horas da inoculação, as mudas foram replantadas copos plásticos de 200 mL contendo substrato orgânico desinfestado (Plantimax), com pH ajustado para 6.0, e acomodadas em estufa do tipo BOD a 20°C com fotoperíodo de 12 horas de luz por 12 de escuro. As mudas foram analisadas após 20 dias da inoculação, verificando-se a presença de “galhas”, estas foram coletadas e conservadas em freezer até sua utilização no teste de diferenciação de possíveis raças.

O segundo método, proposto por Manzanares *et al.* (1994), consiste na utilização de uma suspensão de 10^1 a 10^2 esporos. mL^{-1} , a qual é borrifada uma única vez sobre as raízes de plântulas de 5 dias de idade, sendo que as mudas foram replantadas em copos plásticos de 200 mL contendo substrato orgânico desinfestado (Plantimax), com pH ajustado para 6.0, e acomodadas em estufa do tipo BOD a 20°C com fotoperíodo de 12 horas de luz por 12 de escuro. As mudas foram analisadas após 20 dias da inoculação, verificando-se a presença de “galhas”, estas foram coletadas e conservadas em freezer até sua multiplicação e utilização no teste de determinação de possíveis raças.

O terceiro método foi descrito por Graveland *et al.* (1992) que consiste no cultivo axênico de plântulas de Brassicaceas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) por 5 dias no escuro a 25°C , sendo que no 6º dia foi adicionado sobre as raízes 0,5 mL de uma suspensão de 10^2 esporos/mL. Após a inoculação, as placas contendo as raízes foram

incubadas no escuro por 12 dias, efetuando daí o exame com o auxílio de lupa estereoscópica de campo claro para a detecção de galhas. Estas galhas foram separadas, acondicionadas em microtubos e conservadas em freezer -20°C até o momento de multiplicação.

6.3. Teste de agressividade

Todos os isolados selvagens foram testados em relação ao nível de agressividade a cinco híbridos de couve chinesa (*Brassica oleraceae* L. var. *pekinensis* L.) (Híbridos 80028(CR Power); Híbrido Pak Choi SC8-104; Híbrido Komachi; Híbrido AF66 e Híbrido Pak Choi Canton SK). O teste de agressividade sofreu pequena alteração em seu delineamento devido à limitação no espaço físico na casa de vegetação utilizada, devido ao grande número de isolado coletados. Os testes foram compostos por 5 blocos ao acaso, sendo que cada bloco contava com as cinco variedades utilizadas e todos os isolados selvagens coletados, ou seja 24 isolados. Utilizaram-se uma planta como repetição dentro de cada bloco, que totalizou 120 plantas por bloco, ou 600 plantas no experimento, sendo que cada isolado foi representado por 5 plantas no experimento total. Cada planta foi alocada em uma vaso de plástico preto, com pratinho, utilizando-se substrato orgânico com pH ajustado para 6.0. Optou-se pelo modelo experimental em blocos para eliminar possíveis variações edáficas comuns a casa de vegetação. O processo de inoculação das plantas se deu utilizando-se 3 mL de uma suspensão de 10^6 esporo/mL distribuídos na região do colo das plantas de 30 dias de idade, esta suspensão foi obtida da trituração de 40 gramas de galhas coletadas, adicionadas a 200 mL de água destilada esterilizada, sendo triturada em um liquidificador por 30 segundos. O nível de agressividade foi analisado utilizando-se a escala de nota descrita por Klewer *et al.* (2000). Utilizando-se das notas de 0 a 4, sendo que a nota 0 corresponde a planta sadia, nota 1 até 25% do sistema radicular afetado, nota 2 até 50% do sistema radicular afetado, nota 3 até 75% do sistema radicular afetado e nota 4 onde 100% do sistema radicular foi afetado. De posse das respectivas notas, efetuou-se o cálculo do Índice de Agressividade (IA), ou Índice de Severidade (IS), com base na formula $IA, \text{ ou } IS, = (1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) \times 100/4N_t$, onde n_1 ao n_4 é o número de plantas dentro das respectivas notas e N_t é o número de plantas testadas. Com base no índice de agressividade (IA, ou IS), foi possível avaliar a patogenicidade de um

isolado em relação a diversos hospedeiros e a resistência deste hospedeiro em relação aos isolados patogênicos, podendo assim, num futuro, ser utilizado para avaliar a resistência ou susceptibilidade de cultivares. Pois valores de $IS \leq 25$ pode-se considerar que a planta é resistente, valores entre $25 \geq IS \leq 50$ pode-se considerar uma resistência intermediária e valores de $IS \geq 50$ considera-se que a cultivar é susceptível, já em relação aos isolados, considerou-se que $IA \leq 10$ baixa agressividade, $10 \geq IA \leq 40$ média agressividade e $IA \geq 40$ considerou-se o isolado como agressivo (Strelkov et al., 2007).

6.4. Teste do efeito de exsudatos radiculares de plantas não brassicáceas na germinação de esporos de *Plasmodiophora brassicae*

Foram utilizadas 20 diferentes plantas cultivadas, mais uma planta padrão de susceptibilidade que é a couve chinesa. As plantas utilizadas para este teste foram escolhidas devido a sua comum utilização e existência em áreas de produção de brassicáceas, foram elas: alface (*Lettuce sativa*); cenouca (*Daucus carota*); beterraba (*Beta vulgaris*); mamão (*Carica papaya*); soja (*Glycine max*); tomate (*Lycopersicon esculentum*); amendoim (*Arachis hypogaea*); pepino (*Cucumis sativus*); ervilha (*Pisum sativum*); mamona (*Ricinus communis*); quiabo (*Abelmoschus esculentus*); berinjela (*Solanum melongena*); maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*); girassol (*Helianthus annuus*); melão (*Cucumis melon*); caupi (*Vigna unguiculata*); feijão (*Phaseolus vulgaris*); pimentão (*Capsicum annuum*); milho (*Zea mays*) e chicória (*Eryngium foetidum*).

As plantas foram obtidas em câmara do tipo Germibox, sendo que após 3 dias da germinação. Utilizaram-se duas repetições para cada planta, sendo que em cada repetição contou-se com 5 plantas. Utilizando-se de um Becker de 40 mL, foram colocados 10 mL de água destilada esterilizada e sobre o Becker foi aplicado uma camada de filme plástico com o intuito de conter a evaporação. No filme plástico foram efetuados cinco orifícios, nos quais foram colocadas as plântulas. O recipiente foi envolto por papel alumínio, a fim de se manter as raízes em um ambiente escuro, sendo em seguida acondicionados em estufa do tipo BOD com temperatura de 22°C com fotoperíodo de 12 horas de luz por 12 horas de escuro,

por um período de 4 dias, sendo que após este período, as plantas foram retiradas e a solução contida no Becker foi coletada e utilizada na germinação dos esporos.

Na germinação dos esporos o volume recuperado de cada Becker, aproximadamente 20 mL, foi acondicionado em Erlenmeyer de 50 mL e nesta solução foram adicionados 10^7 esporos. mL^{-1} de *P. brassicae*. Esta suspensão foi incubada a temperatura ambiente, no escuro, sobre agitação leve contínua, sendo que a cada 48 horas foi coletadas 10 amostras de cada repetição por um período de 8 dias. Cada amostra de 0,2 μL da suspensão foi observada em microscópio óptico de campo claro, nos aumentos de 400 e 1000 X, para a verificação da germinação dos esporos (Naiki *et al.*, 1987) sendo que foram escolhidos 200 esporos dentro de um campo para essa amostragem, verificando-se assim a porcentagem de germinação dos esporos. Foi efetuada também a análise da germinação dos esporos de resistência somente em água destilada esterilizada como testemunha. A média das amostras foi tratada como o valor da repetição e os valores foram submetidos à análise de comparação entre médias com 5% de probabilidade.

6.5. Extração de DNA

Este processo seguirá o protocolo de extração de DNA proposto por Manzanares-Daeleux *et al.* (2001). Partindo de 20 gramas de galhas mais 50 mL de água destilada esterilizada bater ambos em liquidificador por 30 segundos e em seguida filtrar a suspensão obtida utilizando-se de um filtro de gaze, composto por 10 camadas de gazes, em seguida adicionar o filtrado em microtubos de 2 mL e centrifugar por 10 minutos por 2500 xg.

Após a obtenção de um pellet limpo, acrescentar sobre o pellet 700 μL da solução I (2 mL de tris HCl 200 mM pH 8.0; 1 mL de MgCl_2 1M; 7 mL de água destilada esterilizada e 30 $\mu\text{g/mL}$ de DNase) e incubar por 3 horas a 37°C, centrifugar por 5 minutos a 2500 xg após esse período. Descarte o sobrenadante e adicione 700 μL da solução II (100 μL de EDTA 5mM; 500 μL de SDS 0,5%; 100 μL de tris 10 mM; 9300 μL de água destilada esterilizada e 20 $\mu\text{g/mL}$ de Proteinase K) ressuspensão o pellet e incube por 30 minutos a 37°C, após esse período, centrifugue por 5 minutos a 2500 xg e descarte o sobrenadante. Adicione a solução III (200 μL de CTAB 2%; 2,8 mL de NaCl 1,4 M; 400 μL de EDTA 20 mM; 1 mL de

tris 10mM e 6,6 mL de água destilada esterilizada), ressuspenda o pellet e incube-o por 30 minutos a 65°C.

Adicionou-se 300 µL de Clorofórmio:Álcool isoamílico (CIA 24:1) e misturou-o gentilmente, centrifugou-se por 2 minutos a 1100 xg e transfere a fase superior para um novo microtubo de 1,6 mL, adicionou 2 volumes de etanol gelado e inverteu 5 vezes gentilmente e foi incubado por 50 minutos a -20°C. Centrifugou-se por 15 minutos a 11000 xg e após descartou-se o sobrenadante.

O ‘pellet’ obtido foi seco em SpeedVac por 10 minutos. O DNA foi dissolvido em 1/10 TE (10mM Tris, pH 8,0, 1mM EDTA) e tratado com 40 µg/ml de RNase DNase-free a 37°C, durante 3 horas. A quantificação do DNA foi feita em GenQuant (Pharmacia). Foi lida a razão A_{260nm}/A_{280nm} de todas as amostras de DNA para determinar a qualidade do DNA, a qual deve estar entre 1,7 e 1,9 indicando que estes estão livres de proteínas e carboidratos. Todas as amostras de DNA foram mantidas a -20°C até o momento de seu uso.

6.6. Reações de RAPD e Microsatélite

Utilizando-se do DNA extraído procedera-se as reações de RAPD (“random amplified polymorphic DNA”) e de regiões polimórficas citados por Manzanares-Dauleux *et al.* (2001).

Nas reações de RAPD foram realizados utilizando-se os ‘primers’ randômicos OPA-04, OPA-07, OPA-10, OPA-13, OPJ-20, OPK-10, OPK-20, OPL-02, OPL-14, OPM-14, OPR-02, OPR-12 e OPR-15, provenientes dos ‘kits’ da Operon (Operon Technologies Inc. Alameda, CA) (Tabela 1). Os procedimentos para as reações da RAPD foram basicamente aqueles descritos por Williams *et al.* (1990), onde a reação foi realizada em tubos “Eppendorf” de 200µL contendo 1X de tampão *Taq* polimerase, 10 mM da mistura dos quatro nucleotídeos, 50 mM de MgCl₂, 10µM de “primer”, 100 ng de DNA e 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies).

A programação do termociclador foi uma denaturação inicial de 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 35°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e trinta

segundos e, mais uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Depois da amplificação, foi adicionada em cada amostra 4 µL de tampão de carregamento (40% de sacarose e 0,25% bromofenol azul) (Sambrook *et al.*, 1989) e esta foi aplicada em gel de agarose a 1,5% em TBE (0,1M de Tris-HCl, 0,1M de ácido bórico, 0,02mM de EDTA, pH 8,3) contendo 10 mg/ml de brometo de etídio (Sambrook *et al.*, 1989), juntamente com 500 ng de marcador de peso molecular 100 bp Ladder misturado com 4 µL de tampão de carregamento, e o gel foi submetido a eletroforese 5V/cm de gel por 40 minutos para a separação dos fragmentos obtidos. Os géis foram fotografados e impressos em aparelho 'Eagle Eye' em preto e branco, para análise.

As análises dos dados do polimorfismo de DNA amplificados ao acaso (RAPD) foram realizadas no programa computacional NTSYS-pc 1.8, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Rohlf, 1993). Os dados foram registrados na forma de ausência/presença de bandas no gel. Bandas de mesmo comprimento foram consideradas como idênticas. Esses dados foram codificados na forma binária (1 para a presença e 0 para a ausência).

A distância genética entre os isolados de *Plasmodiophora brassicae* foi determinada pelo coeficiente Sample Matching. A matriz de distâncias foi em seguida transformada num dendrograma utilizando-se o método SAHN Clustering (sequential agglomerative, hierarchical and nested) sob procedimento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averaging), sendo que a matriz de distancia foi utilizada também para os estudos de filogeografia.

Nas reações utilizando os primers para regiões polimórficas (SG) do DNA de *P. brassicae* descritos por Buhariwalla *et al.* (1995) foram utilizados os primers SG-HKB-17/9, HKB 17/33 e HKB 23/52 (Tabela 2).

A amplificação dos primers SG foram efetuadas em reação de PCR utilizando-se de 12,5 ng de DNA, 0,2 µL de cada primer, 100 µM de cada dNTP, mM de MgCl₂ 1,25 µL 10X Tampão de PCR (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 200 mM KCl) e 0,5 U da enzima Taq polimerase (Invitrogen, Life Technologies). As condições de amplificação foram: um ciclo inicial de denaturação de 5 minutos por 94°C seguido de 30 ciclos de 45 segundo de 94°C, 45 segundos a 58°C ou 51°C (dependendo do primer) e 45 segundos a 72°C e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Após a amplificação os produtos foram submetido à

eletroforese a 3 V/cm de gel por 3,5 a 4 horas, em gel de agarose a 4% e corados com 10 mg/ml de brometo de etídio e foram fotografados e impressos em aparelho 'Eagle Eye' em preto e branco, para análise.

Tabela 2 - Seqüência dos 'primers' a serem testados nas reações de RAPD e para regiões polimórficas para determinar similaridade genética entre isolados de *Plasmodiophora brassicae*.

Código Primer	Seqüência (5' para 3')
OPA04	AATCGGGCTG
OPA07	GAAACGGTG
OPA10	GTGATCGCAG
OPA13	CAGCACCCAC
OPJ20	AAGCGGCCTC
OPK10	GTGCAACGTG
OPK20	GTGTCGCGAG
OPL02	TGGGCGTCAA
OPL14	GTGACAGGCT
OPM14	AGGGTCGTTC
OPR02	CACAGCTGCC
OPR12	ACAGGTGCGT
OPR15	GGACAACGAG
SG-HKB 17/9	CGTGGTTCCAATG
SG-HKB 17/33	GCATCGTCTG
SG-HKB 23/52	CGTGCGTACTTAGG

6.7. Seqüenciamento da região ITS 5.8S rDNA e gene EF-1 α

O seqüenciamento da região ITS-5.8S rDNA e o gene EF-1 α foi precedido por reação de PCR específica para a região. Para a região ITS-5.8S rDNA a reação de PCR dos isolados de *P. brassicae* utilizou-se dos “primers” ITS4 e ITS5 (Whiter., 1991) para ITS (Internal Transcribed Spacers) e gene 5.8S rDNA (DNA Ribossômico). As amplificações (50 μ L) foram realizadas utilizando-se 100 ng de DNA genômico, 1,5 mM de MgCl₂, 2 U de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de cada dNTP, 50 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl e 0,2 μ M de cada “primer”. A reação foi efetuada em termociclador utilizando-se o programa: 94°C por 2 min., para denaturação inicial; 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 2 min., 35 ciclos; 5 min. à 72°C.

Para o gene EF-1 α a reação de PCR dos isolados de *P. brassicae* utilizou-se os “primers” TEF1-F (5'-AATCGTCAAGGAGACCAACG-3') e TEF1-R (5'-CGTCACCAGACTTGACGAAC-3'). As amplificações (50 μ L) foram realizadas utilizando-se 100 ng de DNA genômico, 1,5 mM de MgCl₂, 2 U de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de cada dNTP, 50 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl e 0,2 μ M de cada “primer”. A reação foi efetuada em termociclador utilizando-se o programa: 94°C por 5 min., para denaturação inicial seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min., 60°C por 1 min., 72°C por 2 min., e uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

Após a amplificação do fragmento da região ITS-5.8S rDNA e do gene EF-1 α , 7 μ L dos produtos amplificados foram submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, colorido com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de Ultravioleta (UV) para a confirmação da amplificação. Os produtos de PCR foram purificados em coluna MicroSpin S-400 HR, conforme instruções do fabricante (Amersham Pharmacia). As reações de seqüenciamento foram realizadas para um volume de 10 μ L, utilizando-se 75 ng do produto de PCR purificado, 2,0 μ L de “Big Dye Terminator” da Amersham, 3,5 μ L de água ultrapura Miliq e 1 mM de cada um dos “primers” ITS2, ITS3, ITS4, ITS5, TEF1-F e TEF1-R de acordo com o protocolo para “Amersham Premix Terminator” (Amersham Pharmacia). A reação de seqüenciamento foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ. Research, Alameda,

CA, EUA). No seqüenciamento utilizou-se gel de poliacrilamida “Long Ranger” da FMC BioProducts e este foi efetuado em seqüenciador de nucleotídeo (PE Applied Biosystems Model 377 DNA Sequencer), de acordo com instruções do fabricante. As seqüências obtidas pelos respectivos “primers” de cada região, para cada isolado, foram analisadas e alinhadas utilizando-se “Phred/Phrap/Consed” (Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1998) e a seqüência consenso obtida do alinhamento apresentou qualidade “Phred” maior que 20. As seqüências consensos obtidas dos isolados de *P. brassicae* foram alinhadas utilizando-se o software Clustal X v. 1.83. Utilizando-se o software Clustal X gerou-se uma árvore filogenética entre os isolados através do método “Neighbor-joining” (Saitou e Nei, 1987) com valores de 1000 “bootstrap”, a qual foi visualizada no programa Treeview (Page, 1996) e njplotWIN95 do kit Clustal X (Thompson *et al.*, 1997).

Utilizou-se o software PAUP* (version 4.0b5a, Swofford, 2001) para a análise de relações filogenéticas, com análise heurística de 50 replicas de “tree-bisection-reconnection” (TBR) para análise do algoritmo “branch-swapping” para relações filogenéticas.

6.8. Análises de bioinformática

Para o estudo filogeográfico dos isolados da *Plasmodiophora brassicae* foram utilizados os dados obtidos junto ao seqüenciamento das regiões escolhidas, sendo que esses dados foram tratados no formato “fasta” e analisados inicialmente no programa PAUP e em seguida as análises foram transferidas para o programa SNAP. Os dados obtidos junto ao RAPD e o microsatélite foram analisados no formato de matriz binária no programa Phylip da onde também foi transferido para o programa SNAP. No programa SNAP (Suíte of Nucleotide Analysis Programs) (Aylor *et al.*, 2006) foram efetuadas as análises não paramétricas e coalescentes e também os desenhos dos mapas filogeográficos das regiões onde foram obtidos os isolados da *Plasmodiophora brassicae*.

6.9. Efeito da temperatura sobre a severidade de *Plasmodiophora brassicae*

O experimento utilizou-se do isolado PB12, coletado em planta de brócolos na região de São José do Rio Pardo e mantido na micoteca do Laboratório de Patógenos de Solo “Nilton L. de Souza”, FCA/UNESP, Campus Botucatu. O teste do efeito da temperatura sobre a infecção de *Plasmodiophora brassicae* foi montada utilizando-se de sete temperaturas, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C, em cada temperatura utilizou-se dois tratamentos (inoculado e não inoculado) no delineamento inteiramente ao acaso, utilizou-se quinze repetições, sendo cada composta por um copo plástico de 500 mL, contendo substrato orgânico Plantimax HT, com pH ajustado para 6,0, onde foram plantadas 5 mudas germinadas, sendo que o valor da repetição é a média das cinco mudas. O processo de inoculação das plantas se deu utilizando-se 3 mL de uma suspensão de 10^6 esporo/mL distribuídos na região do colo das mudas de 5 dias de idade, esta suspensão foi obtida da trituração de 40 gramas de galhas coletadas, adicionadas a 200 mL de água destilada esterilizada, sendo triturada em um liquidificador por 30 segundos. Utilizou-se de a escala modificada de Kuginuki et al. (1999) para se verificar os efeitos da temperatura sobre a infecção, esta escala se baseia em 0= raízes sadias; 1= redução de raízes com leve intumescimento das raízes; 2= redução de raízes com a presença de galhas e 3 = presença de galhas e ausência de raízes. Avaliou-se individualmente cada muda da repetição, calculando-se um valor médio da severidade por repetição em seguida utilizou-se a formula proposta por Kuginuki et al. (1999), para calculo do Indice de Agressividade (IA) = $(1n_1 + 2n_2 + 3n_3) \times 100/3N_t$, onde n_1 ao n_3 é o número de plantas dentro das respectivas notas e N_t é o número de plantas testadas. As plantas foram mantidas por 28 dias em câmaras de germinação, do tipo BOD, com fotoperíodo de 12 horas de luz e com umidade relativa sempre acima de 80%.

Efetuuou-se também o efeito sobre o peso seco das mudas, calculando-se o peso seco das mudas infectadas e não infectadas em cada temperatura. Todos os resultados foram analisados mediante o teste estatístico de comparação entre medias, teste Tukey, com 5% de significância, sendo os resultados de severidade transformados para $(x+0,5)^{1/2}$.

6.10. Teste do efeito da *Plasmodiophora brassicae* em plantas não brassicaceas

Para análise do efeito de *P.brassicae* em plantas não brassicaceas foram utilizadas as mesmas plantas citadas no teste anterior, visto que todas são plantas de interesse agrícola e que muitas são cultivadas com as brassicaceas em áreas de produção comercial.

Para este experimento utilizou-se de 5 blocos ao acaso, em cada bloco teremos 20 tratamentos e em cada tratamento teremos 5 repetições por bloco, considerando que 2 das 5 repetições foi utilizada como controle. Cada repetição contou com uma planta, totalizando assim 20 plantas inoculadas e cinco plantas testemunhas por espécie. As plantas foram plantadas em vasos de 3 litros contendo substrato orgânico desinfestado (Plantimax), pH 6.0.

A semeadura foi feita diretamente no vaso, sendo semeado 2 sementes por vaso e depois de 5 dias da germinação foi procedido o “raleio” a fim de se deixar apenas uma planta por vaso. A opção pelo plantio direto no vaso visa evitar o transplante e seus efeitos prejudiciais ao sistema radicular. No 6º dia após a germinação foi efetuada a inoculação da *P. brassicae*, utilizando-se 2 mL de uma suspensão de 10^6 esporos.mL⁻¹ por planta e os vasos foram acondicionados em casa de vegetação a 20±2°C. Após 30 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas para aspectos morfológicos relacionado ao bom desenvolvimento e quantidade de radículas, assim como foi efetuado peso fresco seco da parte aérea e das raízes. O peso seco do material foi efetuado utilizando o método de secagem em estufa a 50°C por 24 horas. As análises dos resultados foram efetuadas mediante o teste estatístico de comparação entre medias, teste Tukey, com 5% de probabilidade. Visando verificar-se a presença ou não de *P.brassicae* no solo de cada vaso, plantou-se uma muda de couve chinesa var. Pak Choi por vaso, após a retirada da planta não brassica do vaso, e avaliou-se cada planta Pak Choi após 30 dias. Os vasos com pak choi permaneceram na casa de vegetação nas mesmas condições.

6.11. Diferenciação de raças

A determinação de raças de *P. brassicae* foi efetuada com base na reação patológica nas plantas diferenciadoras testadas como descrito por Some *et al.* (1996). Foram testadas as espécies e variedades descritas na tabela 2, variedades esta presentes no mercado nacional e de fácil acesso para outros pesquisadores.

O teste foi baseado na resposta da combinação entre hospedeiro e patógeno, sendo delineado em 5 blocos ao acaso, com duas repetições por bloco, sendo que cada repetição foi representada por um vaso contendo uma planta. A semeadura foi feita em bandeja de germinação de 128 células, contendo substrato orgânico desinfestado (Plantimax) e foram cultivadas por 30 dias, quando foram transplantadas para vasos de 3 litros contendo uma mistura de 80% de solo de barranco com pH 5,6 esterilizado + 20% de composto orgânico desinfestado (Plantimax), ajustando o pH para 6.0. Passados cinco dias do transplante as mudas foram inoculadas com 3 mL de uma suspensão de 10^6 esporo/mL dos isolados monospóricos obtidos anteriormente. Esta suspensão foi obtida pela trituração em liquidificador por 30 segundos de 40 gramas de galhas adicionadas a 300 mL de água destilada esterilizada, após 30 dias da inoculação as plantas foram coletadas, lavadas e foi efetuada a análise de manifestação patogênica do isolado.

As reações dos cultivares foram analisadas utilizando-se a escala de nota descrita por Klewer *et al.* (2000), apresentada abaixo.

Plantas sem sintoma recebem nota = 0;

Pequenas galhas nas raízes laterais e nenhuma galha na raiz principal = 1;

Pequenas galhas na raiz principal e nas raízes laterais = 2;

Galha média na raiz principal e nas raízes laterais = 3;

Galha severa na raiz principal e ausência de raízes laterais = 4.

De posse das respectivas notas, efetuou-se o cálculo do Índice de Agressividade (IA), ou Índice de Severidade (IS), com base na formula IA, ou IS, $= (1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) \times 100/4N_t$, onde n_1 ao n_4 é o número de plantas dentro das respectivas notas e N_t é o número de plantas testadas. Com base no índice de agressividade (IA, ou IS), foi possível

avaliar a patogenicidade de um isolado em relação a diversos hospedeiros e a resistência deste hospedeiro em relação aos isolados patogênicos, podendo assim, num futuro, ser utilizado para avaliar a resistência ou susceptibilidade de cultivares. Pois valores de $IS \leq 25$ pode-se considerar que a planta é resistente, valores entre $25 \geq IS \leq 50$ pode-se considerar uma resistência intermediária e valores de $IS \geq 50$ considera-se que a cultivar é susceptível, já em relação aos isolados, considerou-se que $IA \leq 10$ baixa agressividade, $10 \geq IA \leq 40$ média agressividade e $IA \geq 40$ considerou-se o isolado como agressivo (Strelkov et al., 2007).

Estas informações poderão ser utilizadas pelos melhoristas para avaliar a resistência ou susceptibilidade de cultivares, utilizando-se esta resposta para se montar uma série diferenciadora para raças, baseando-se nos seguintes referências: valores de $IA \leq 25$ considera-se que o isolado é avirulento e valores de $IA \geq 25$ que o isolado é virulento.

Baseado nesse resultado, de virulento e avirulento, foi montada uma matriz binária, onde os virulentos foram elencados com a nota 1 e os avirulentos com a nota 0, e a partir dessa matriz foi desenvolvido uma análise de agrupamento newtoniano para o agrupamento das reações muito semelhantes e com isso a montagem de uma perfil diferenciador das possíveis raças.

Tabela 3 – Espécies e variedades de brassicaceas a serem utilizadas no ensaio para a possível determinação de raças de *Plasmodiophora brassicae*.

Grupos	Variedade	Empresa
Couve Flor	Couve flor Sharon F1	Sakata
	Couve flor precoce Piracicaba	Sakata
	Couve flor híbrido Shiromaru - I	Sakata
	Couve flor híbrido Shiromaru – II	Sakata
	Couve Chinesa Pak Choi SC8-104	Sakata
Couve Chinesa	Couve Chinesa Komachi F1	Sakata
	Couve Chinesa AF66	Sakata
	Couve Chinesa Pak Choi Canton SK	Sakata
	Couve Chinesa Híbridos 80028(CR Power)	Syngenta
Brócolos	Brócolos Ramoso Santana	Sakata
	Brócolos Híbrido Florida	Sakata
	Brócolos Precoce Piracicaba Verão	Sakata
Repolho	Repolho Kenzan KY	Sakata
	Repolho Híbrido Fuyutoko	Sakata
	Repolho Fuyutoyo	Sakata
Bruxelas	Couve Bruxelas Híbrido F1 Royal Marvel	Sakata
Couve	Couve Manteiga Híbrido F1 Top Bunch	Sakata
Rúcula	Rúcula Folha Larga	Sakata
Rabanete	Rabanete Akamaru Hatsuka	Sakata
Rábano	Rábano Híbrido F1 Omny	Sakata
Ornamental	Iberis Sortido	Feltrin
	Goivos Dobrados Sortido	Feltrin

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Coleta de material, preservação e levantamento de incidência.

Obteve-se 24 isolados das regiões de coletas, cada área visitada forneceu um isolado, sendo dois isolados por município visitado (Tabela 4). Após a coleta, os materiais foram acondicionados em caixas de isopor e transportados para o Laboratório de Fungos de Solos “Nilton L. de Souza”, onde o material foi lavado e ensacado em sacos de polipropileno e acondicionados em freezer (- 20°C) para a conservação até a montagem dos experimentos seguintes (Figura 3).

No levantamento de campo, verificamos que a hérnia das crucíferas é considerada pelos produtores a principal doença nas culturas de repolho, brócolis e couve-flor, sendo que muitos produtores relatam que é comum o abandono de área ou a troca da cultura por causa da doença, principalmente nas regiões dos municípios de Piedade, São Roque, Suzano e Mogi das Cruzes. No município de Piedade é comum encontrar relatos de agricultores que perderam 100% da produção por causa da ocorrência da hérnia das crucíferas, principalmente quando essa está aliada a outros agentes patogênicos, principalmente bacterioses, que degradam a região do colo das plantas (Informações de campo). Outra

observação bastante comum no campo, principalmente em campos onde não se pratica rotação de cultura, é a ocorrência de grandes reboleira de plantas com hérnia e também o “caminhamento” da doença junto ao sistema de irrigação (Figura 4).

Essas informações corroboram com os dados de que a incidência observada no campo, no levantamento, nos municípios de Piedade, Suzano, Mogi das Cruzes e Embu Guaçu são os que apresentam maiores valores de incidência, 28,75, 26,25, 21,75 e 13 %, respectivamente (Tabela 4).



Figura 3 – Visão do sistema de armazenagem dos isolados coletadas, colocados em sacos plásticos e acondicionados em gavetas em freezer a -20°C .



Figura 4 – Visão no campo, A. distribuição em reboleira da doença em área de plantio contínuo, B. “caminhamento” da hérnia junto ao sistema de irrigação.

Tabela 4- Dados os materiais coletados, como região, número de plantas examinadas, número de plantas doentes, incidência (%), denominação das áreas e culturas encontradas nos locais.

IDENTIFICAÇÃO	REGIÃO	LOCALIZAÇÃO	N.PL. Examinadas ¹	N.PL. DOENTE ²	INCIDÊNCIA (%)	ÁREAS		CULTURA
PB13	1	Piedade	800	115	28,75	1	2	Repolho
PB14	2	São Roque	800	42	10,50	3	4	Repolho
PB15	3	Atibaia	800	51	12,75	5	6	Repolho
PB16	4	Mairiporã	800	31	7,75	7	8	Couve-flor
PB17	5	Mogi das Cruzes	800	87	21,75	9	10	Couve-flor
PB18	6	Suzano	800	105	26,25	11	12	Couve-flor
PB19	7	Embu-guaçu	800	52	13,00	13	14	Brocole
PB20	8	Ribeirão Preto	800	7	1,75	15	16	Couve
PB21	9	Cabreúva	800	30	7,50	17	18	Brócolis
PB22	10	São João da boa vista	800	4	1,00	19	20	Repolho
PB23	11	Botucatu	800	23	5,75	21	22	Repolho
PB24	12	Itapeva	800	22	5,50	23	24	Brócolis
ESTADO			9600	569	5,93			

¹ Número de plantas examinadas no campo no momento de coleta.

² Número de plantas doentes diagnosticadas no campo

Na análise de incidência, com os dados obtidos, pode-se pressupor que a incidência média no estado de São Paulo gira em torno de 5,9 %, valor esse considerado condizente com a realidade, haja vista que a grande maioria dos plantios de Brassicas, de 78 a 80% (CATI, 2008), estão situados nas regiões de coletas visitadas (Tabela 4).

7.2. Estudo da epidemiologia espacial de hérnia das crucíferas

Com o intuito de se ter melhor entendimento sobre a distribuição espacial e organização de focos da doença hérnia das crucíferas aliou-se o levantamento sistemático de condições da doença em campo no momento da coleta, visando maximizar as informações obtidas no campo.

Com base nesse intuito, em cada área de coleta efetuou-se o levantamento sistematizado da presença ou não da doença nas plantações, dentro de parcelas que continham 10X10 plantas, 100 plantas, sendo que em cada região de coleta efetuou-se a demarcação de duas áreas, distantes entre si e em cada área 4 parcelas também distantes entre si. As informações obtidas foram repassadas para mapas esquemáticos, onde plantas s drias foram numeradas como 0 e plantas doentes como 1 (Figura 5 e 6).

Com base nas informações obtidas no campo e repassadas para os mapas foi possível obter 96 mapas de incidência da hérnia em campo, e com essas informações foi possível efetuar as análises de epidemiologia espacial e distribuição de focos da hérnia das crucíferas nas diferentes regiões visitadas, e também em diferentes hospedeiros, tais como repolho, brócolis, couve e couve-flor (Tabela 5).

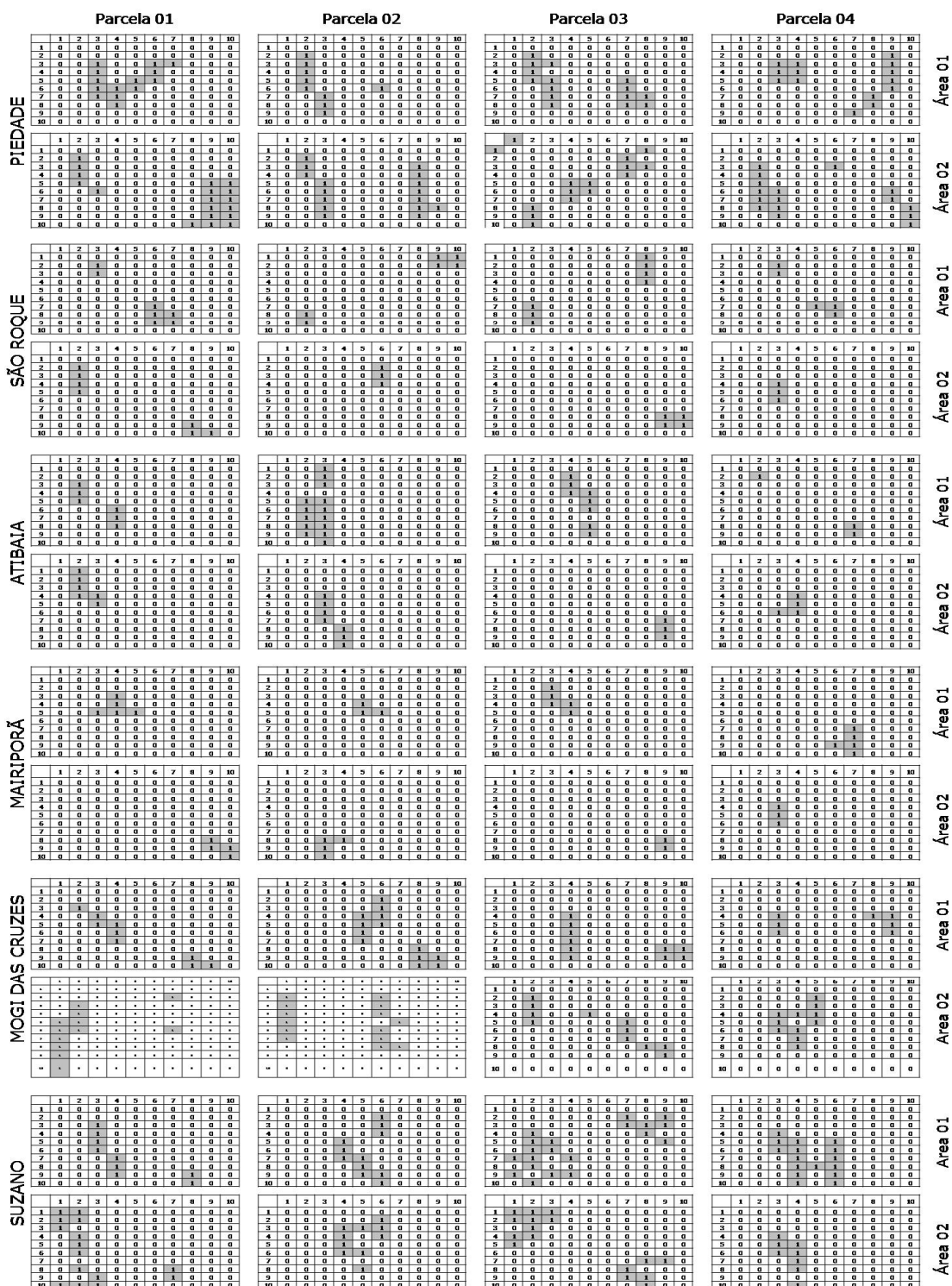


Figura 5 – Mapa de incidência da hérnia das crucíferas nas parcelas, nas áreas avaliadas, dentro de cada região visitada. Cada quadrado representa uma planta, sendo que os quadrados brancos (0) representam plantas sadias, e quadrados cinza (1) representam plantas doentes.

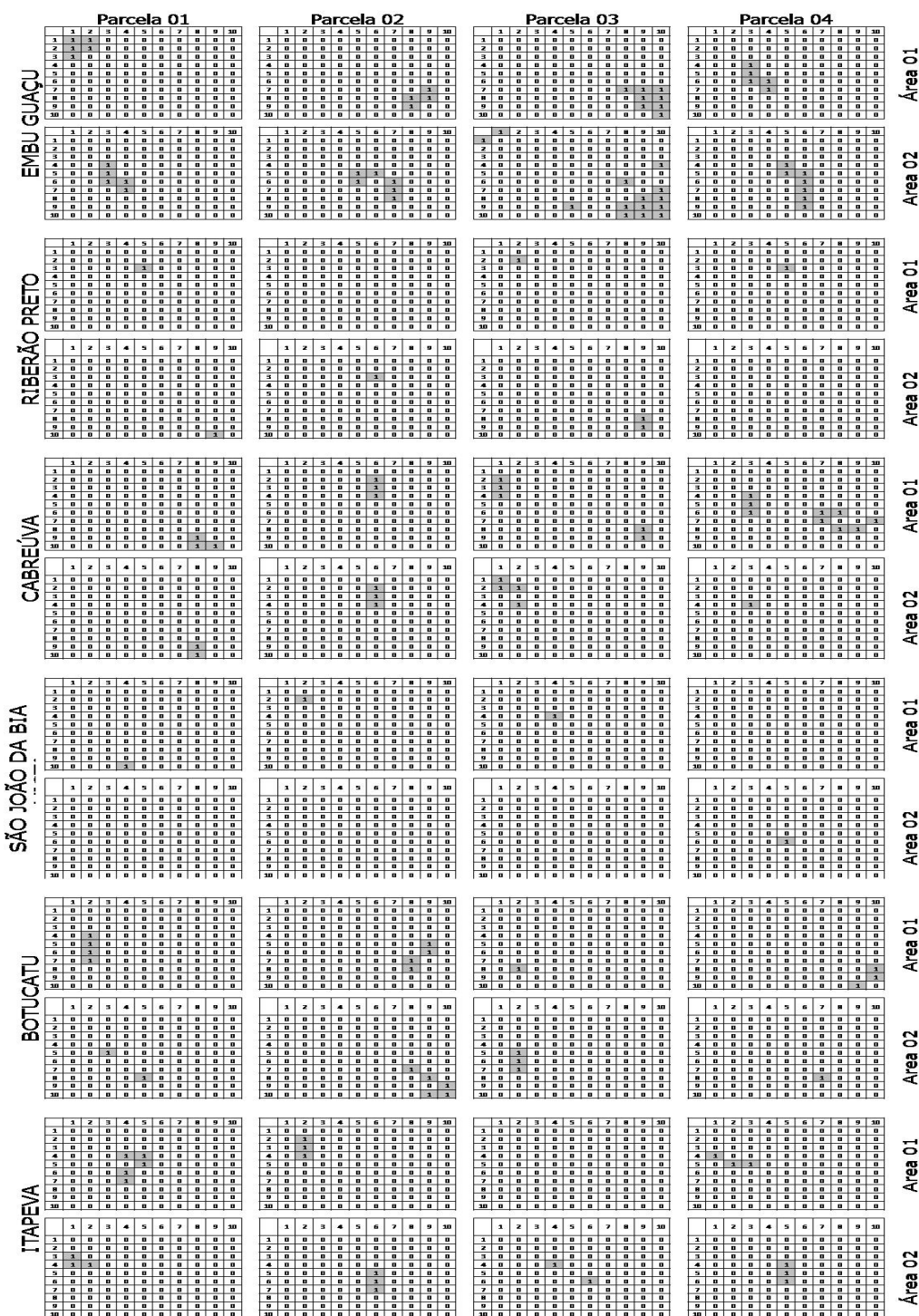


Figura 6 - Mapa de incidência da hérnia das crucíferas nas parcelas, nas áreas avaliadas, dentro de cada região visitada. Cada quadrado representa uma planta, sendo que os quadrados brancos (0) representam plantas saudáveis, e quadrados cinza (1) representam plantas doentes.

Na análise espacial verificou-se que o índice de forma de focos médio foi de 0,64 para o estado de São Paulo, variando de 0,15 em parcelas com apenas uma planta doente, como na parcela 04, da área 23, da região de Itapeva, até IFF igual a 1, como na parcela 02, da área 07, da região de Mairiporã (Tabela 5). Valores abaixo de 1 para o IFF indicam que os focos apresentam comportamento isodiamétrico, ou seja, a doença se desenvolve tanto na linha, assim como no sentido paralelo a linha de plantio, esse comportamento se deve possivelmente a proximidade das plantas, espaçamento de 30 X 30 cm, geralmente, e também pode ser aliado a forma de plantio, já que muitas propriedades utilizam-se de plantios em canteiros, tornando assim mais fácil o desenvolvimento da doença entre plantas dentro do próprio canteiro (Figura 7).

Já em relação ao índice de compactação de focos, verificou-se que o ICF médio para o estado de São Paulo foi de 0,78, variando de 0,48, como na parcela 01, da área 01, da região de Piedade, até ICF igual a 1, na parcela 02, na área 03, da região de São Roque. Focos mais compactos, com maior agregação e proximidade entre todas as plantas, pertencentes ao foco, possuem valores de ICF próximos a 1 (Nelson, 1995).

Os resultados de IFF e ICF conjuntamente indicam que a distribuição espacial da hérnia das crucíferas é uma doença de levemente a agregada a agregada, e que o crescimento da doença após a entrada do agente causal em uma nova área se dá pela infecção dos hospedeiros vizinhos, aumentando o numero de plantas por foco (Tabela 5)

O comportamento agregado da doença também é confirmando quando observa-se o Índice de Dispersão (ID), sendo que o ID médio do estado de São Paulo foi de 9,99, variando de 30,27 até 2,17, sendo que os valores de ID analisados foram para quadrats de 2x2, que totaliza 4 plantas. Optou-se por esse valor de quadrats devido a melhor adequação do modelo com a realidade em campo, visto que todas as culturas avaliadas são hortaliças e tendem ser muito adensadas, por isso quadrats menor apresenta melhor representatibilidade da cultura e da doença no campo (Tabela 5).

Com base nos ID encontrado verifica-se que a doença apresenta um padrão de fortemente agregado ($ID > 3,5$) a moderadamente agregado ($1 < ID < 3,5$). A cada valor de índice de dispersão foi aplicado o teste do qui-quadrado para verificar se os valores obtidos são diferentes ou não de 1. Observou-se que todos os valores de ID foram significativamente

diferentes de 1, pelo teste qui-quadrado, comprovando que a hérnia das crucíferas é uma doença de comportamento agregado, independente da cultura estudada e do ambiente observado, haja vista que os valores de ID da região de Piedade e da região de Ribeirão Preto foram diferentes de 1 e ambas as localidades apresentam a agregação para o comportamento da hérnia (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de Índice de Forma de Focos (IFF), Índice de Compactação de Focos (ICF), Índice de Dispersão das áreas e parcelas estudadas.

Região	Área	Parcela	IFF	ICF	ID	Área	Parcela	IFF	ICF	ID
PIEDADE	1	1	0,83	0,47	21,13	2	1	0,45	0,61	28,24
		2	0,63	0,75	12,85		2	0,50	0,82	19,02
		3	0,39	0,70	22,39		3	0,27	0,54	23,25
		4	0,52	0,67	20,95		4	0,57	0,74	23,24
SÃO ROQUE	3	1	0,58	0,92	9,77	4	1	0,63	0,87	10,09
		2	0,29	1,00	10,41		2	1,00	1,00	6,78
		3	0,75	0,98	10,38		3	0,33	1,00	5,21
		4	0,75	0,88	8,23		4	0,33	1,00	5,22
ATIBAIA	5	1	0,33	1,00	8,99	6	1	0,40	0,60	8,91
		2	0,33	0,96	20,26		2	0,33	0,97	5,21
		3	0,45	0,80	11,32		3	0,29	0,50	10,41
		4	0,75	1,00	4,49		4	0,66	0,67	7,32
MAIRIPORÃ	7	1	1,00	0,56	7,79	8	1	0,67	0,67	7,32
		2	1,00	0,75	5,21		2	0,50	1,00	3,31
		3	0,50	0,63	8,23		3	0,67	0,67	6,78
		4	0,50	0,63	7,79		4	0,33	0,97	5,21
MOGI DAS CRUZES	9	1	0,80	0,58	13,10	10	1	0,75	0,88	18,05
		2	0,58	1,00	14,38		2	0,62	0,80	15,48
		3	0,50	0,75	19,20		3	0,27	0,78	16,86
		4	0,50	0,83	10,09		4	0,43	0,53	16,12
SUZANO	11	1	0,39	0,75	13,10	12	1	0,61	0,74	22,39
		2	0,66	0,52	30,27		2	0,68	0,58	24,49
		3	0,42	0,72	16,12		3	0,80	0,80	14,61
		4	0,57	0,57	24,33		4	0,70	0,85	12,73
EMBU GUAÇU	13	1	0,67	0,83	9,55	14	1	0,50	0,63	8,22
		2	0,75	0,66	13,30		2	1,00	0,97	16,55
		3	0,66	0,66	6,23		3	0,75	0,50	9,50
		4	0,50	0,63	8,23		4	0,33	0,58	10,78
RIBEIRÃO PRETO	15	1	1,00	1,00	2,17	16	1			
		2	1,00	1,00	2,17		2			
		3					3	1,00	1,00	2,17
		4	1,00	1,00	2,17		4	0,50	1,00	3,31
CABREÚVA	17	1	1,00	0,75	5,21	18	1	0,50	1,00	4,38
		2	0,42	1,00	7,36		2	1,00	0,87	7,38
		3	0,33	1,00	5,21		3	0,33	1,00	5,21
		4	0,83	0,75	13,10		4	1,00	1,00	2,17
SÃO JOÃO DA BOA VISTA	19	1	1,00	1,00	2,17	20	1	-	-	-
		2	1,00	1,00	2,17		2	-	-	-

BOTUCATU	21	3	1,00	1,00	2,17	22	3	-	-	-
		4	-	-	-		4	1,00	1,00	2,17
		1	1,00	1,00	2,17		1	1,00	1,00	3,31
		2	0,50	0,50	6,78		2	0,75	0,41	8,23
	23	3	0,50	0,50	6,78	24	3	0,33	1,00	5,21
		4	0,66	0,50	5,21		4	1,00	1,00	2,16
		1	0,50	0,63	6,91		1	1,00	0,75	6,64
		2					2	1,00	1,00	3,32
ITAPEVA	23	3	0,33	1,00	5,21	24	3	0,33	1,00	5,21
		4	0,15	0,50	4,49		4	0,33	1,00	5,22



Figura 7 – Vista geral de uma parcela com a presença de *Plasmodiophora brassicae*, com o sintoma típico de hérnia das crucíferas (detalhe), em plantas de repolho em sistema de plantio em canteiro, na região de Piedade – SP.

A lei de potência binária indica o padrão geral de agregação de uma doença. Os valores de b e A , da equação de regressão linear, assim como os coeficientes de

determinação (R^2), são apresentados juntos as figuras 8, 9 e 10. Estimativas de b e de A , estatisticamente diferentes de 1 ($P < 0,05$), indicam um padrão geral de agregação de plantas sintomáticas em todas as áreas. Excluindo áreas que não obtivemos um número de plantas doentes suficiente para a análise de regressão, como no caso de Ribeirão Preto, no qual localizou-se poucas plantas doente, apenas 7, apresentando um valor muito baixo de incidência, 1,75 (Tabela 5), e com isso não foi possível a análise de regressão dos valores, evento esse também identificado na região de São João de Boa Vista, onde apenas 4 plantas doente foram identificadas, tendo um número muito baixo de focos, gerando valores idênticos no log de V_{bin} e V_{obs} , sendo impraticável a regressão linear (Figura 8).

Valores de b superiores a 1 indicam que o grau de agregação é função da incidência (Taylor, 1961). Pode-se observar que todas as regiões analisadas, excluindo Ribeirão Preto e São João da Boa Vista, apresentaram valores de b maiores de 1, sendo que essa diferença foi significativa, no teste F (5% de significância), variando de $b=9,23$ para a área 02, da região de São Roque, até $b=1,57$ para a área 02 na região de Atibaia, esses valores demonstram que a doença apresenta um padrão de fortemente agregado a levemente agregado, respectivamente (Figura 9).

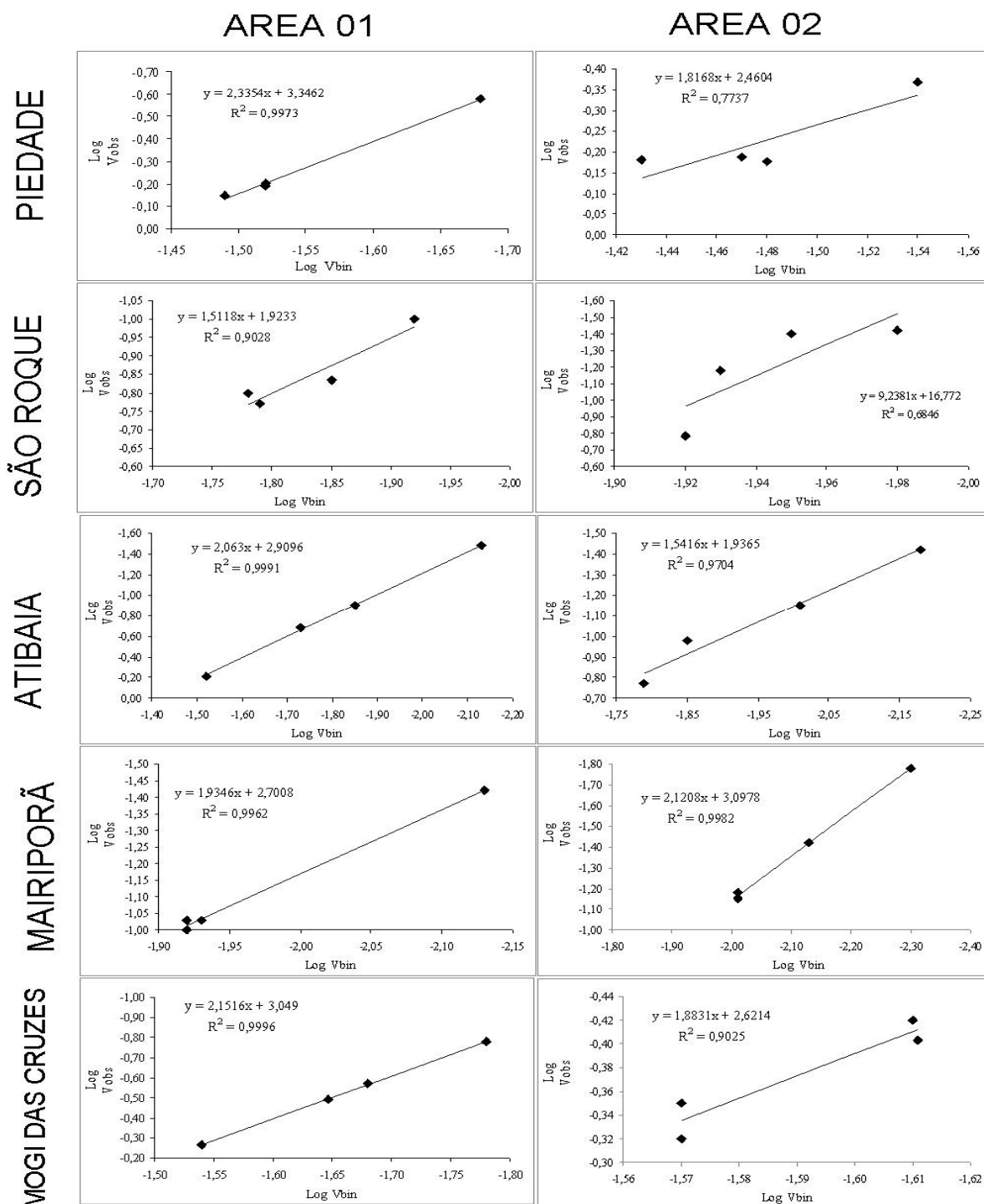


Figura 8 Relação entre logaritmo da variância observada e o logaritmo da variância binomial de plantas de Brassicas com hérnia das crucíferas. Cada ponto representa uma parcela de 100 plantas, nas quais avaliou-se a incidência no quadrat 2X2. A linha de tendência representa a equação $\log(V_{obs}) = \log(A) + \log(V_{nin})$ ajustado aos dados.

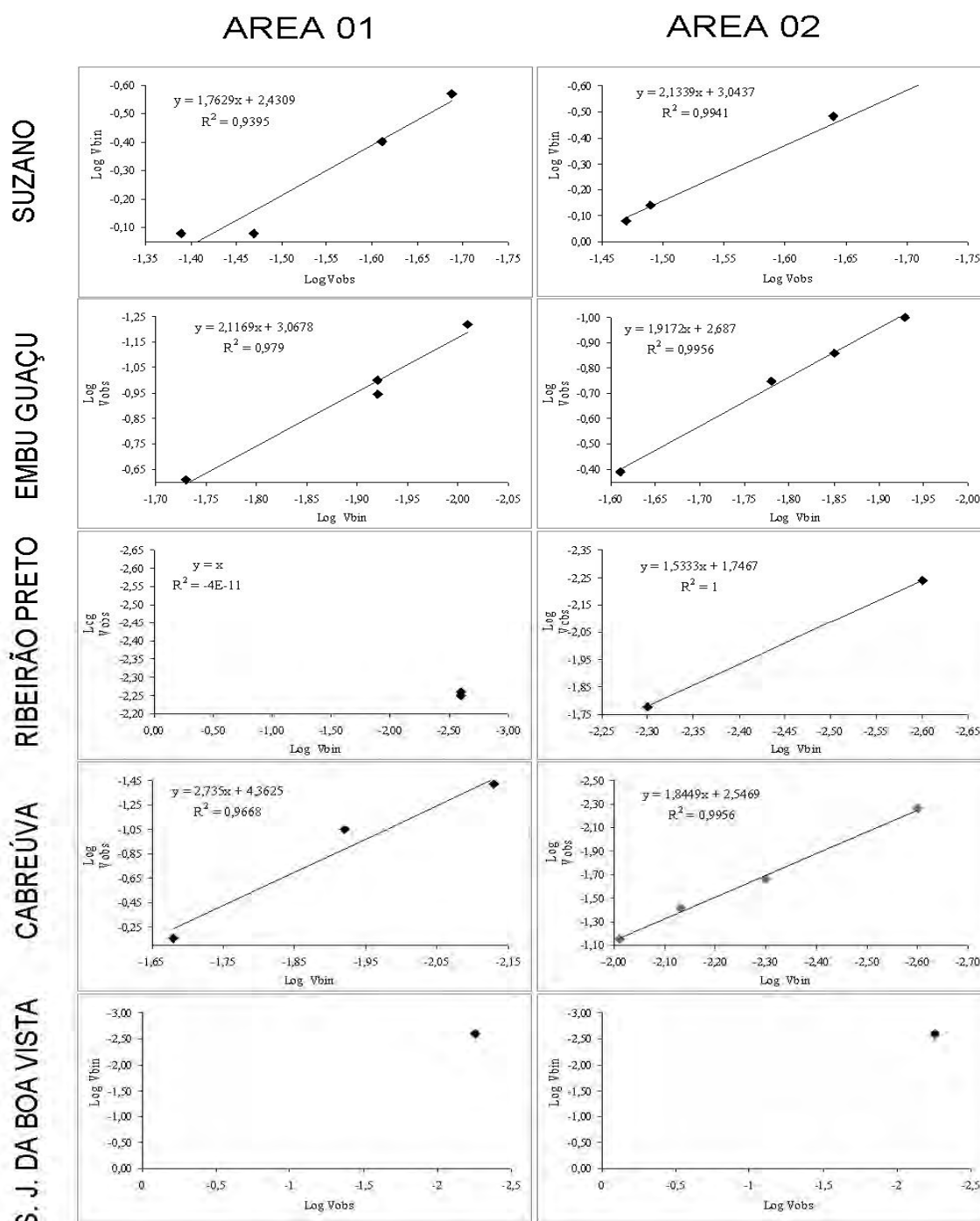


Figura 9 - Relação entre logaritmo da variância observada e o logaritmo da variância binomial de plantas de Brassicas com hérnia das crucíferas. Cada ponto representa uma parcela de 100 plantas, nas quais avaliou-se a incidência no quadrat 2X2. A linha de tendência representa a equação $\log(V_{obs}) = \log(A) + \log(V_{bin})$ ajustado aos dados.

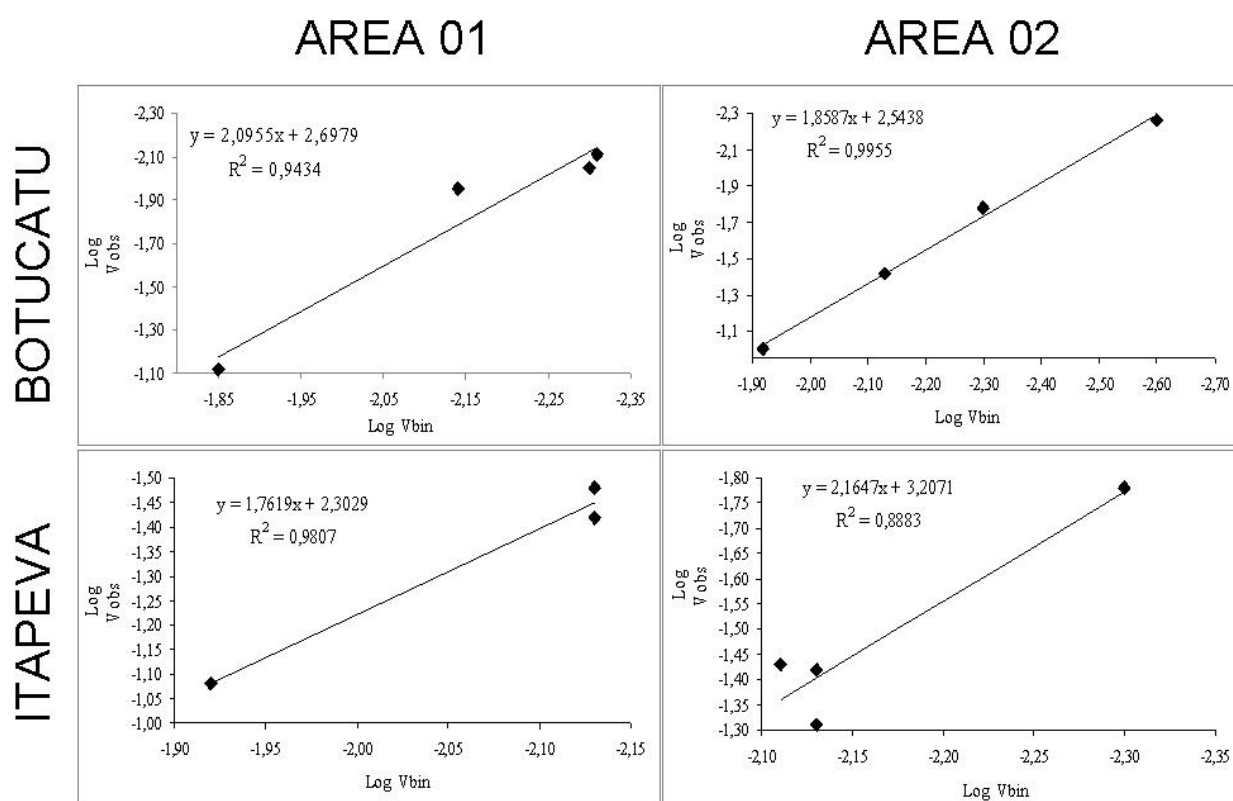


Figura 10 - Relação entre logaritmo da variância observada e o logaritmo da variância binomial de plantas de Brassicas com hérnia das crucíferas. Cada ponto representa uma parcela de 100 plantas, nas quais avaliou-se a incidência no quadrat 2X2. A linha de tendência representa a equação $\log(V_{obs}) = \log(A) + \log(V_{bin})$ ajustado aos dados.

7.3. Isolamento monospórico

7.3.1. Obtenção dos esporos de *Plasmodiophora brassicae*

Com o intuito de obter os esporos de *Plasmodiophora brassicae* procedeu-se a trituração das hérnias obtidas nas regiões de coletas, efetuando-se filtrações com gazes, seguida da diluição da suspensão obtida, visando obter uma suspensão menos concentrada, haja vista que a suspensão obtida com a trituração da hérnia em água, geralmente, apresenta uma concentração de $2,5 \times 10^8$ esporo/mL de suspensão (Figura 11).



Figura 11 – Visão do liquidificador utilizado para a trituração das raízes com sintomas de hérnia (A); Visão das raízes doentes (B); Suspensão obtida sem filtração, suspensão filtrada e suspensões diluídas 10 e 100 vezes, da direita para esquerda (C).

As suspensões, tanto as diluídas, assim como a sem diluir foram submetidas a centrifugação para concentração dos esporos. Após a centrifugação, e do descarte do sobrenadante, verificou-se que a diluição de 100 vezes, da suspensão original, apresentou-se com menor concentração de resíduo, como terra e fragmento vegetais, e apresentava uma concentração de $2,7 \times 10^6$ esporo/mL, que foi submetida a purificação em gradiente.

Na purificação das suspensões obtidas utilizaram-se dois métodos, sendo o primeiro baseado em gradiente de Ficoll 400 e o segundo método em gradiente de sacarose. Após a aplicação da suspensão de esporo nos gradientes, verificou-se que no gradiente de sacarose a formação de diversas bandas, sendo que em todas as bandas verificou-se a existência de esporos de *P.brassicae*, encontrando-se dentre as bandas, apenas uma de maior concentração $3,2 \times 10^2$ esporos/mL.

Na purificação com Ficoll, verificou-se a formação de uma banda junto ao gradiente de 36%, a qual apresentou uma concentração de $2,5 \times 10^3$ esporos/mL. Considerando que a suspensão inicial apresentava uma concentração de $2,7 \times 10^6$ esporo/mL, verificou-se que o método do Ficoll apresentou 0,09% de recuperação, contra 0,01% de recuperação com o método da glicose, sendo o Ficoll 87,2% mais eficiente. Com base nesse resultado optou-se pela utilização do método do Ficoll 400 para purificação dos esporos de *P. brassicae*.

7.3.2. Obtenção dos isolados monospóricos de *Plasmodiophora brassicae*

A obtenção dos isolados monospóricos de *P. brassicae* utilizou-se de três métodos, sendo o primeiro método o de bloco de Agar, proposto por Buczacki (1977), o segundo, método do borrifo, proposto por Manzónares et al., (1994) e o terceiro utiliza-se de cultivo axênico de raízes, proposto por Graveland et al., (1992).

O procedimento técnico das três metodologias apresentou-se vantagens e desvantagens, sendo a principal desvantagem dos métodos dois e três o alto índice de contaminação das raízes e do meio de cultura, respectivamente, por algas, fungos e bactérias, fato esse que contribuiu para a não efetividade do método.

O método 1 apresentou-se mais eficiente, em comparação com os outros métodos, mas se mostrou com baixa efetividade, visto que das quatro repetições, apenas 10%, ou seja, de 40 plantas inoculadas, apenas 4 plantas desenvolveram galhas (Tabela 6).

Tabela 6 – Efetividade dos três métodos utilizados para a produção de isolados monospóricos de *Plasmodiophora brassicae*

Métodos	Repetições				Total	Média
	(Plantas sintomáticas/total de plantas)					
	1	2	3	4		
1	1/10	1/10	2/10	0/10	4/40	1/10
2	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40	0/10
3	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40	0/10

Com base nos testes preliminares objetivou-se obter 2 isolados monospóricos por isolado selvagem coletado, totalizando assim 48 isolados monospóricos. Devido ao grande numero de isolados monospóricos optou-se por efetuar a multiplicação dos isolados monospóricos em plântulas de couve chinesa, cv. Pak Choi, com 10 dias, em condições controladas, em BOD, a 20°C, com fotoperíodo de 12/12 horas (Figura 12).



Figura 12 – Visão geral das plântulas inoculadas com os isolados monospóricos utilizadas na multiplicação.

A fim de utilizar os isolados já coletados e armazenados no laboratório, efetuou-se a produção dos isolados monospóricos proveniente também dos municípios de Vargem grande Paulista (PB1), Pardinho (PB2 e PB11), Divinolândia (PB9) e São José do Rio Pardo (PB12). Ao final das inoculações com os esporos de *P. brassicae* em plântulas de couve chinesa, cv. Pak Choi, utilizando-se do método de bloco de Agar, obteve-se 52 isolados monospóricos dos 27 isolados selvagens, sendo que dos isolados de Ribeirão Preto e de São João da Boa Vista obteve-se apenas um isolado monospórico (Tabela 7).

Tabela 7 – Isolados selvagens utilizados e isolados monospóricos obtidas de cada região

REGIÕES	ISOLADO SELVAGEM	ISOLADO MONOSPÓRICO	
VARGEM GRANDE PAULISTA	PB1	PB1-01	PB1-02
PARDINHO	PB2	PB2-01	PB2-02
	PB11	PB11-01	PB11-02
DIVINOLANDIA	PB9	PB9-01	PB9-02
SÃO JOSÉ DO RIO PARDO	PB12	PB12-01	PB12-02
PIEDADE	PB13-01	PB13-01-01	PB13-01-02
	PB13-02	PB13-02-01	PB13-02-02
SÃO ROQUE	PB14-01	PB14-01-01	PB14-01-02
	PB14-02	PB14-02-01	PB14-02-02
ATIBAIA	PB15-01	PB15-01-01	PB15-01-02
	PB15-02	PB15-02-01	PB15-02-02
MAIRIPORÃ	PB16-01	PB16-01-01	PB16-01-02
	PB16-02	PB16-02-01	PB16-02-02
MOGI DAS CRUZES	PB17-01	PB17-01-01	PB17-01-02
	PB17-02	PB17-02-01	PB17-02-02
SUZANO	PB18-01	PB18-01-01	PB18-01-02
	PB18-02	PB18-02-01	PB18-02-02
EMBU GUAÇU	PB19-01	PB19-01-01	PB19-01-02
	PB19-02	PB19-02-01	PB19-02-02
RIBEIRÃO PRETO	PB20-01	PB20-01-01	----
CABREÚVA	PB21-01	PB21--01-01	PB21-01-02
	PB21-02	PB21-02-01	PB21-02-02
SÃO JOÃO DA BOA VISTA	PB22-01	PB22-01-01	----
BOTUCATU	PB23-01	PB23-01-01	PB23-01-02
	PB23-02	PB23-02-01	PB23-02-02
ITAPEVA	PB24-01	PB24-01-01	PB24-01-02
	PB24-02	PB24-02-01	PB24-02-02

7.4. Teste de agressividade

No teste de agressividade dos isolados de *Plasmodiophora brassicae* em cinco variedades de couve chinesa foi efetuado em casa de vegetação, onde utilizou-se do modelo experimental de blocos ao acaso para o delineamento experimental (Figura 13).



Figura 13 – Visão geral do ensaio de agressividade em couve chinesa efetuado com os isolados de *Plasmodiophora brassicae* coletados

O teste de agressividade foi efetuado utilizando-se de uma escala de notas (Figura 14), as quais foram transformadas para Índice de Agressividade, ou Severidade, sendo que este índice pode ser utilizado tanto para a avaliação da agressividade dos isolados perante um hospedeiro em comum, ou ainda, este índice pode ser utilizado como um índice de severidade perante o hospedeiro, podendo assim utilizar esses valores para comparação entre os hospedeiros testados, fato esse efetuado neste trabalho também.



Figura 14 – Raízes de couve chinesa infectadas por *Plasmodiophora brassicae* representando a escala adotada neste trabalho (Fonte: Cruz, 2007).

Na tabela 8 observamos os valores do índice de severidade (IS) dos diversos isolados perante as cinco variedades testadas, verifica-se que a variedade Híbrida Pak choi SC8-104 vem sendo relatada como uma referencia de padrão de susceptibilidade para doença, enquanto que a variedade híbrida Komachi é referido como padrão de resistência.

Quando avaliamos o valor médio de cada variedade perante todos os isolados, verificamos que a variedade híbrida Pak choi SC8-104 se mostra como a mais susceptível, apresentando um IS igual a 63,5%, distante do valor médio da variedade híbrida

Komachi, com um IS igual a 30% (Figura 14), sendo que as outras variedades se apresentam intermediárias, sendo que o híbrido 80028(CR Power) apresentou um IS igual a 54%, o híbrido Pak choi canton SK com IS igual a 52,9% e o híbrido AF66 com IS igual a 44,8% (Figura 14).

Com base na escala de resistência utilizada, pode-se verificar que as variedades testadas se apresentaram graus de resistência indo de intermediária a suscetível, haja vista que não se verificou-se valores de IS abaixo de 25, que conferiria a classificação de resistente as variedades testada (Tabela 8, Figura 15).

Já em relação ao comportamento dos diversos isolados, verificou-se que esses variaram de IA igual a 67%, para o isolado PB14-01 até IA igual a 27% para o isolado PB19-01, ou seja, a agressividade dos isolados variou de média a alta (Tabela 8).

Observa-se que os isolados provenientes de região de Piedade e de São Roque apresentam IA maiores que de outras regiões do estado, entorno de 60%, os isolados da região de Embu-guaçu, Ribeirão Preto e Cabreúva são os que apresentaram os menores índices de agressividade do estado, variando de 33, 36,5 e 37%, respectivamente (Tabela 8)

Strelkov et al., (2007) utilizando as linhas diferenciadoras européias demonstra claramente a existência de variabilidade da agressividade de isolados coletados em regiões distintas e também na mesma região, demonstrando que o isolados selvagem, ou o isolado nativo, que é composto de um mix de genótipos do patógeno, apresenta grande diversidade internamente e externamente a região estudada. Fato esse também observado aqui, haja vista que isolados da mesma região, como PB19-01 e PB19-02, provenientes da região de Embu-guaçu apresentaram até 30% de diferença dos IA entre os isolados (Tabela 8).

Wit e van de Weg (1964) relatam que no teste de agressividade de isolados de selvagens, perante três variedades de rabanete, a existência de isolados polipatotipos, ou seja, poli-raças. Esse evento se dá pelo cultivo de hospedeiros susceptíveis a todas as raças, atuando como uma propagação maciça das raças ali existentes, evento esse que pode ser observado nas regiões de intenso cultivo e com hospedeiros suscetíveis, tais como as regiões de Piedade e São Roque, já no caso de áreas onde existam poucas raças, essas são selecionadas possivelmente, devido ao uso de hospedeiros resistentes, ou por causa de um cultivo mais ameno ou moderado, como no caso de Embu-guaçu, Ribeirão Preto e Cabreúva.

Tabela 8 – Índice de severidade e de agressividade de isolados de *Plasmodiophora brassicae* perante cinco variedades de couve chinesa (*Brassica rapa* var. *pekinenses*) (1 - híbrido 80028(CR Power); 2 - híbrido Pak choi SC8-104; 3 - híbrido Komachi; 4 - híbrido AF66; 5 - híbrido Pak choi canton SK

Isolados	Cultivares de Couve chinesa					Média	C.V.(%)
	1	2*	3#	4	5	IA	
PB13-01	70 Aa	65 Aa	20 Cb	70 Aa	75 Aa	60,0	5,7
PB13-02	80 Aa	80 Aa	35 Bc	65 Ab	65 Ab	65,0	6,2
PB14-01	80 Aa	80 Aa	40 Ac	60 Ab	75 Ab	67,0	6,4
PB14-02	50 Bb	65 Aa	40 Ab	50 Ab	50 Ab	51,0	4,9
PB15-01	45 Bb	75 Aa	45 Ab	55 Ab	55 Ab	55,0	5,2
PB15-02	70 Aa	80 Aa	35 Bb	65 Aa	60 Aa	62,0	5,9
PB16-01	65 Aa	80 Aa	30 Bb	60 Aa	70 Aa	61,0	5,8
PB16-02	45 Bb	60 Aa	35 Bb	45 Bb	55 Aa	48,0	4,6
PB17-01	55 Bb	75 Aa	45 Ab	50 Ab	80 Aa	61,0	5,8
PB17-02	50 Bb	85 Aa	30 Bc	20 Cc	80 Aa	53,0	5,0
PB18-01	45 Bb	30 Cc	25 Cc	25 Cc	75 Aa	40,0	3,8
PB18-02	55 Ba	65 Aa	25 Cb	35 Cb	65 Aa	49,0	4,7
PB19-01	25 Cb	55 Aa	10 Cb	20 Cb	25 Cb	27,0	2,6
PB19-02	40 Ba	50 Aa	20 Cb	45 Ba	40 Ba	39,0	3,7
PB20-01	45 Bb	25 Cc	15 Cc	50 Aa	65 Aa	40,0	3,8
PB20-02	30 Cb	60 Aa	15 Cc	30 Cb	30 Cb	33,0	3,1
PB21-01	45 Ba	50 Aa	25 Cb	35 Ca	15 Cc	34,0	3,2
PB21-02	45 Ba	65 Aa	25 Cb	35 Cb	30 Cb	40,0	3,8
PB22-01	55 Ba	70 Aa	30 Bb	50 Aa	55 Aa	52,0	5,0
PB22-02	70 Ab	65 Aa	25 Cb	60 Aa	60 Aa	56,0	5,3
PB23-01	60 Aa	65 Aa	55 Aa	25 Cb	30 Cb	47,0	4,5
PB23-02	75 Aa	70 Aa	35 Bb	20 Cb	25 Cb	45,0	4,3
PB24-01	55 Ba	40 Ba	30 Ba	40 Ba	45 Ba	42,0	4,0
PB24-02	40 Ba	70 Aa	30 Bc	65 Aa	45 Ba	50,0	4,8
Média IS	54,0	63,5	30,0	44,8	52,9		
C.V (%)	7,41	7,78	5,26	8,02	9,69		

* Padrão de susceptibilidade a *P.brassicae* em *Brassica rapa* var. *pekinenses*

Padrão de resistência a *P. brassicae* em *Brassica rapa* var. *pekinenses*

Letras maiúsculas iguais na coluna não diferem estatisticamente a 5% de significância no Teste de Tukey, Letras minúsculas iguais na linha não diferem estatisticamente a 5% de significância no Teste de Tukey.

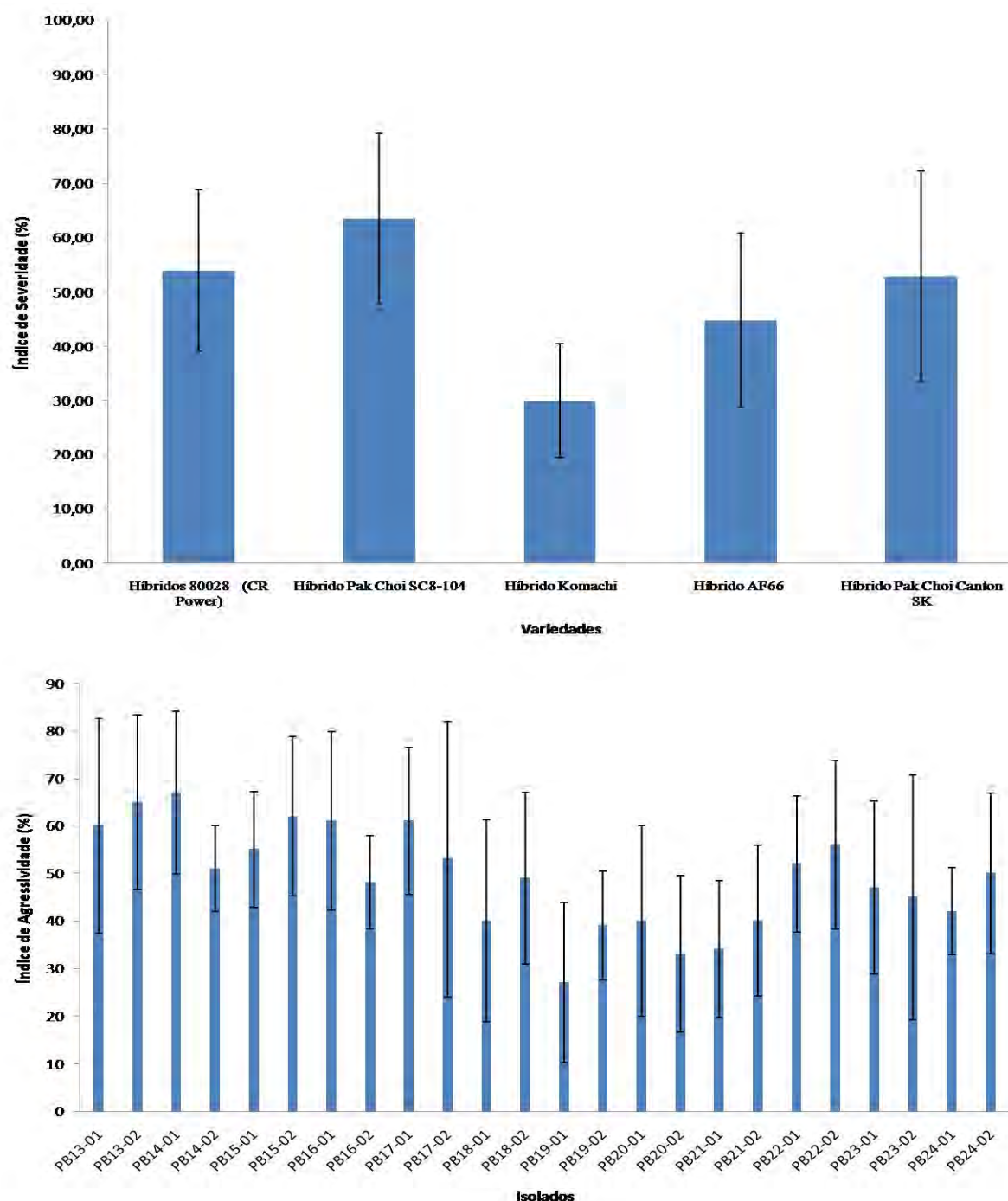


Figura 15 – Comportamento de cinco variedades de couve chinesa perante 24 isolados de *Plasmodiophora brassicae* provenientes do estado de São Paulo, na figura acima observa-se o grau de resistência das variedades utilizadas, no gráfico abaixo observa-se a agressividade dos isolados perante as variedades.

7.5. Teste do efeito de exsudatos radiculares de plantas não brassicaceas na germinação de esporos de *Plasmodiophora brassicae*

No ensaio de estudo do efeito dos exsudados radiculares de plantas não Brassicas sobre a germinação de esporos de resistência de *P. brassicae* verificou-se que das 21 plantas testadas apenas 3 plantas proporcionaram uma germinação maior que o controle negativo, apenas água destilada, a partir do 3 dias (Figura 16).

Inicialmente as avaliações estavam prevista até o oitavo dia, mas a partir do sexto dia o índice de contaminação com algas e bactérias afetou diretamente a germinação dos esporos, além de causarem degradação dos esporos, por isso optou-se efetuar leituras até o sexto dia e utilizar os dados da ultima leitura para a análise estatística do efeito.

Verificou-se que das 21 plantas estudadas 8 plantas diferiram estatisticamente do controle negativo, água destila, demonstrando a existência de alguma substancia estimulante a germinação dos esporos de resistência de *P. brassicae* (Tabela 9). As espécies que agruparam-se junto ao controle negativo, água destilada, proporcionaram uma germinação média de 4,8%.

Dentre as oito plantas que diferiram, observou-se que cinco espécies proporcionaram um nível 1,5 vezes maior que o controle negativo, com uma germinação média de 7,6%, já duas espécies proporcionaram uma germinação média de 12,5%, ou seja, 2,6% maior que o controle negativo. Este resultado indica que a presença de alguma substância exsudada pelas raízes dessas espécies deve induzir a germinação dos esporos de resistência, este efeito fica mais evidente quando se avaliou-se a germinação dos esporos junto os exsudados liberados pela espécie *Coriandrum sativum*, coentro, onde se verificou que 17,6% dos esporos germinaram em seis dias, ou seja, uma germinação de 3,6 vezes maior que o controle negativo, mas ainda abaixo da germinação observada com exsudados provenientes de couve chinesa, que apresentou uma germinação média de 23,6% (Tabela 9).

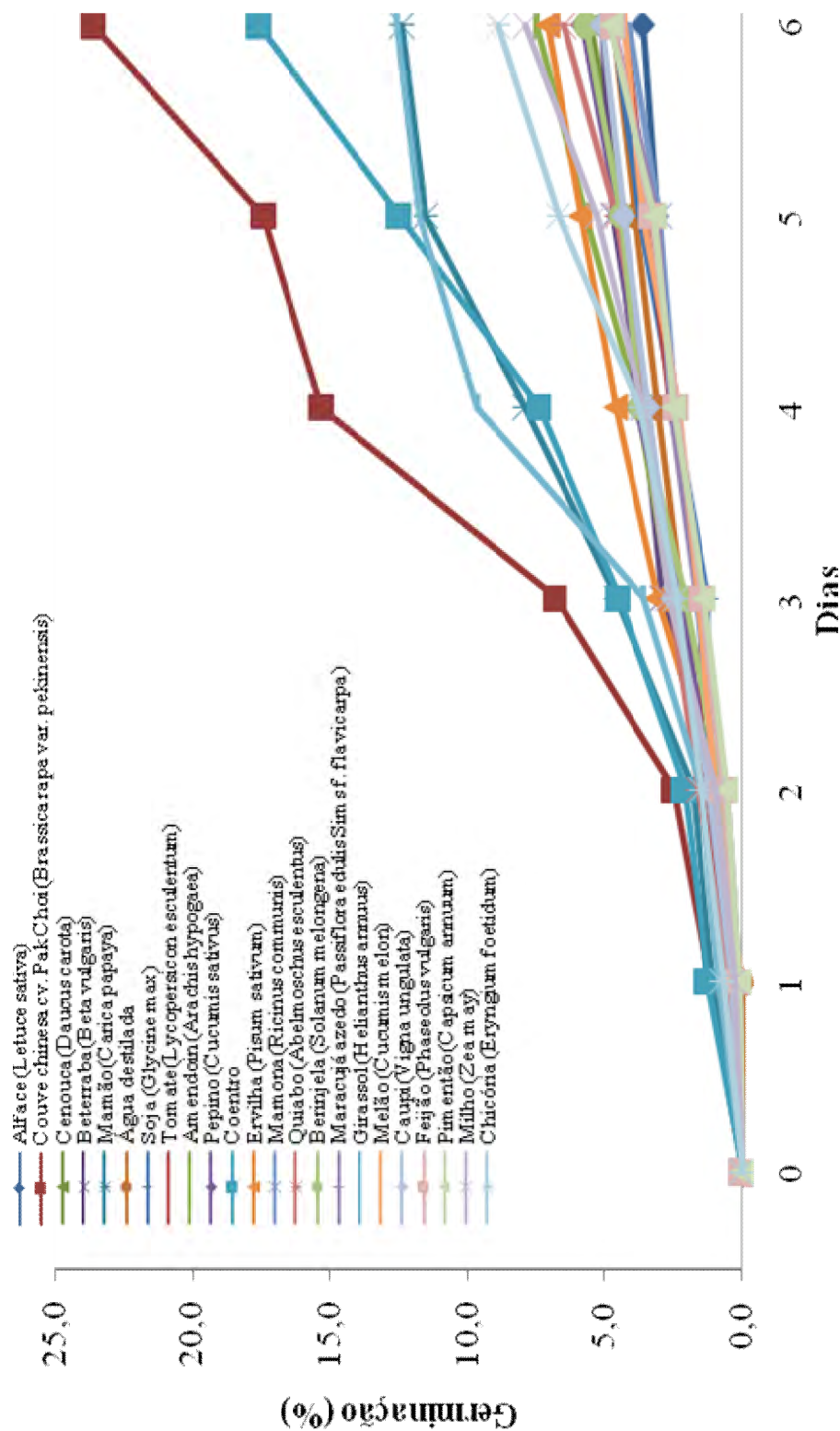


Figura 16. Germinação dos esporos de *Plasmodiophora brassicae* perante exsudatos radiculares de diversas espécies vegetais, avaliado durante 6 dias.

Tabela 9 Germinação dos esporos de *Plasmodiophora brassicae* junto a exsudados radiculares de diversas espécies vegetais, avaliado no sexto dia de incubação.

Tratamentos	Germinação (%)
Alface (<i>Lettuce sativa</i>)	3,6 a*
Cenouca (<i>Daucus carota</i>)	5,5 a
Beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)	5,1 a
Mamão (<i>Carica papaya</i>)	12,4 c
Soja (<i>Glycine max</i>)	4,7 a
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	4,3 a
Amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>)	7,5 b
Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	5,8 a
Ervilha (<i>Pisum sativum</i>)	7,1 b
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	4,1 a
Quiabo (<i>Abelmoschus esculentus</i>)	6,5 b
Berinjela (<i>Solanum melongena</i>)	5,7 a
Maracujá azedo (<i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i>)	4,7 a
Girassol (<i>Helianthus annuus</i>)	12,6 c
Melão (<i>Cucumis melon</i>)	4,3 a
Caupi (<i>Vigna unguolata</i>)	5,1 a
Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	4,7 a
Pimentão (<i>Capsicum annum</i>)	4,8 a
Milho (<i>Zea may</i>)	7,9 b
Chicória (<i>Eryngium foetidum</i>)	8,9 b
Coentro (<i>Coriandrum sativum</i>)	17,6 d
Couve chinesa cv. Pak Choi (<i>Brassica rapa</i> var. <i>pekinensis</i>)	23,6 e
Água destilada	4,7 a
C.V (%)	4,87

* Letras iguais na coluna não difere estatisticamente a 5% de probabilidade no teste de Scott-Knott.

7.6. Extração de DNA

Utilizando-se da metodologia proposta por Manzanares-Dauleux et al., (2001) extraíram-se DNA de galhas, tanto de isolados selvagens, assim como de isolados monospóricos de *P. brassicae*. Após a extração, cada amostra de DNA teve sua concentração e pureza determinadas através das leituras de absorbância em 260 nm (Concentração do DNA em $\mu\text{g/mL} = \text{Abs} \times 100 \times 50$) (Sambrook ET al., 1989) e em 280 nm (quantificação de proteínas), no espectrofotômetro GenQuant (Amershan Pharmacia Biotech). A razão entre as leituras em 260 nm e 280 nm foi utilizada como um indicativo da pureza do DNA obtido (Tabela 10 e 11). Na análise do DNA por espectrofotometria mostrou uma boa qualidade deste, sendo que a razão média das extrações ficou em 1,6672, variando de 1,79 até 1,40. Em relação a quantidade, verificou-se que a concentração média dos DNA extraídos ficou em 958,3 $\mu\text{g/mL}$, variando de 542,7 a 1142,8 $\mu\text{g/mL}$, valores dentro da faixa aceitável para a sua utilização nas técnicas a serem empregadas. Baseado nos valores da razão da absorbância de 260nm/280nm mostrou que o DNA obtido estava de boa qualidade e com baixas concentrações de proteínas e de RNA (Tabela 10).

7.7. Reações de RAPD e Microsatélite

Procedeu-se as reações de RAPD e de Microsatélite como descrito no material e métodos. Para a reação de RAPD utilizou-se 13 oligonucleotídeos randômicos, sendo que estes geraram 73 bandas polimórficas e 34 monomórficas, produzindo em média 6 bandas polimórficas e 3 bandas monomórficas por oligonucleotídeos utilizados. A melhor rentabilidade de bandas polimórficas foi com a utilização de OPA10, o qual gerou 12 bandas polimórficas e 5 bandas monomórficas, resultado totalmente contrario quando utilizou-se o oligonucleotídeos OPM14, que gerou apenas 1 bandas polimórficas, mas em geral, as reações de RAPD produziram géis com bastante informação genética utilizável para os estudos de diversidade genéticas dos isolados selvagens e monospóricos (Figura 17). Já para os três oligonucleotídeos de microsatélite utilizados, verificou-se a produção de 9 bandas utilizáveis. Os fragmentos de DNA variaram de 0,3 a 2,2 Kpb.

Tabela 10 – Valores de concentração e da relação da Abs 260/280 nm relativo às extrações de DNA dos isolados de *Plasmodiophora brassicae*.

Isolados	Concentração de DNA (µg/mL)	Relação (Abs 260 nm/Abs 280 nm)
PB1	837	1,7900
PB1-01	927	1,6200
PB1-02	950	1,5900
PB11	1000	1,7800
PB11-01	882,0	1,7050
PB11-02	985,4	1,6050
PB12	1023,8	1,6850
PB12-01	988,1	1,7425
PB12-02	980,4	1,6550
PB13-01	1054,8	1,6450
PB13-01-01	1056,2	1,7138
PB13-01-02	1033,4	1,6988
PB13-02	1068,5	1,6500
PB13-02-01	1108,3	1,6794
PB13-02-02	890,0	1,7063
PB14-01	1103,5	1,6744
PB14-01-01	1142,8	1,6647
PB14-01-02	1049,1	1,6928
PB14-02	1046,6	1,7500
PB14-02-01	978,0	1,7400
PB14-02-02	854,0	1,6788
PB15-01	978,0	1,7214
PB15-01-01	1062,9	1,7450
PB15-01-02	961,8	1,7094
PB15-02	961,8	1,7001
PB15-02-01	1071,5	1,7332
PB15-02-02	1063,0	1,7272
PB16-01	1009,9	1,7047
PB16-01-01	1067,5	1,7166
PB16-01-02	1120,6	1,7302
PB16-02	1088,3	1,7160
PB16-02-01	1090,6	1,7107
PB16-02-02	910,0	1,7234
PB17-01	852,0	1,7231
PB17-01-01	876,0	1,7133
PB17-01-02	1050,3	1,7171
PB17-02	925,1	1,7232
PB17-02-01	907,2	1,7182
PB17-02-02	1011,3	1,7152
PB18-01	1037,1	1,7201
PB18-01-01	961,9	1,7207
PB18-01-02	1007,2	1,7167
PB18-02	1075,4	1,7177

Tabela 11 – Valores de concentração e da relação da Abs 260/280 nm relativo as extrações de DNA dos isolados de *Plasmodiophora brassicae*

Isolados	Concentração de DNA (µg/mL)	Relação (ABS 260 nm/ABS 280 nm)
PB18-02-01	1033,8	1,7187
PB18-02-02	1093,4	1,7172
PB19-01	564,6	1,5588
PB19-01-01	542,7	1,5594
PB19-01-02	1116,8	1,7179
PB19-02	870,4	1,6380
PB19-02-01	581,4	1,5591
PB19-02-02	871,2	1,6386
PB2	1043,3	1,6780
PB2-01	762,2	1,5986
PB2-02	762,6	1,5989
PB20-01	1005,1	1,6583
PB20-01-01	947,9	1,6383
PB21-01	800,5	1,5987
PB21--01-01	928,1	1,6286
PB21-01-02	1025,3	1,6483
PB21-02	917,9	1,6185
PB21-02-01	907,5	1,6137
PB21-02-02	1025,5	1,6384
PB22-01	974,0	1,6334
PB22-01-01	958,3	1,6161
PB23-01	829,0	1,6260
PB23-01-01	867,0	1,6359
PB23-01-02	798,0	1,6247
PB23-02	938,4	1,6211
PB23-02-01	890,4	1,6310
PB23-02-02	874,1	1,6303
PB24-01	911,6	1,6229
PB24-01-01	960,1	1,6260
PB24-01-02	926,4	1,6306
PB24-02	937,5	1,6266
PB24-02-01	982,6	1,6245
PB24-02-02	990,4	1,6283
PB9	978,5	1,6286
PB9-01	1008,1	1,6255
PB9-02	1035,8	1,6264

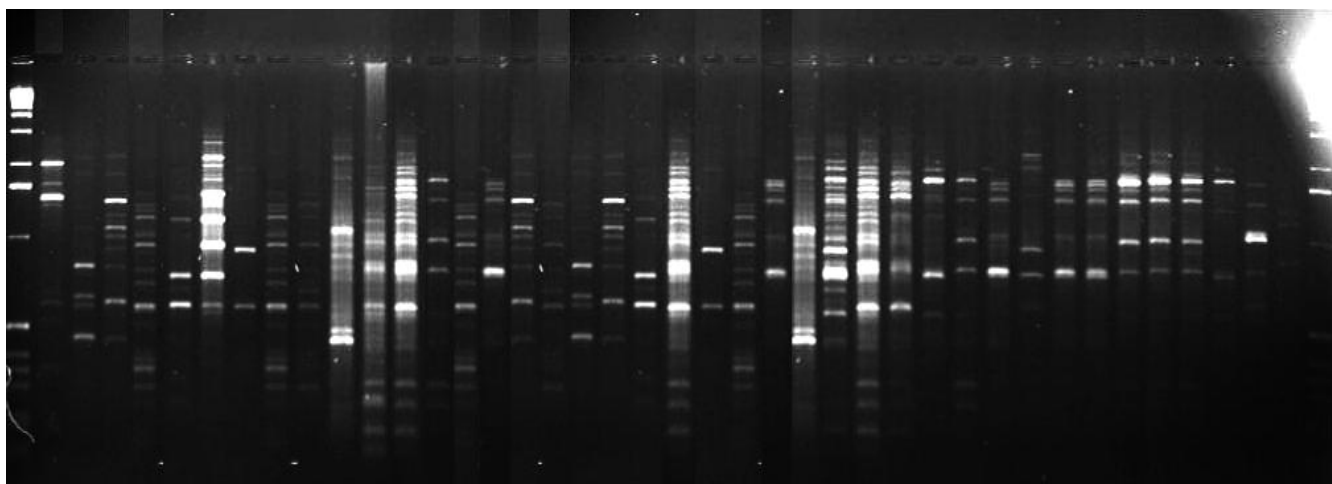


Figura 17 – Visão geral de um gel de agarose a 1,5% de 40 isolados de *Plasmodiophora brassicae*, utilizando oligonucleotídeo OPK10

Utilizando-se dos dados obtidos junto ao RAPD e ao Microsatélite efetuou-se a construção do dendrograma filogenético, verificou-se que em geral os isolados monospóricos ficaram agrupados juntos aos isolados de origem (Figura 18).

Os resultados obtidos junto ao RAPD e ao microsatélite demonstram que a população de *P. brassicae* é altamente heterogênea, sendo que muitas vezes os isolados monospóricos não apresentam, necessariamente, grande similaridade com o isolado selvagem, o provedor, isso possivelmente deve-se a baixa frequência destes isolados junto ao mix de genótipos presentes no isolados selvagem, como já observado por Crute et al.,(1980) e Somé et al., (1996).

Neste estudo observa-se que os isolados monospóricos apresentaram a tendência a agrupar-se junto aos isolados selvagens provedores deles, isso indica que os isolados monospóricos obtidos estão presentes, em uma frequência relativamente alta, junto aos isolados selvagens e por isso foi possível detectar as regiões genéticas similares.

Na análise do dendrograma obtido verifica-se que os isolados provenientes de Varem grande paulista (PB-01), Pardinho (PB-11), São Jose do Rio Pardo (Pb-12), Piedade (Pb-13) e São Roque (PB-14) agruparam-se em um clade com mais de 60% de similaridade entre eles (Figura 18).

Ao mesmo tempo que alguns isolados monospóricos agrupam-se aos seus isolados selvagens, como no caso do isolado Pb-14-02 e os isolados monospóricos Pb-14-02-02 e o Pb-14-02-01, provenientes de São Roque, com mais de 70% de similaridade (Figura 18), outros isolados monospóricos se distanciam de seus provedores, como no caso do isolado Pb-9 e seus monospóricos Pb-9-01 e Pb-9-02, sendo todos provenientes de Divinolândia, verificando-se que entre eles há somente 50% de similaridade genética, ficando eles dispostos longinquamente no dendrograma (Figura 18).

De posse dessas informações é possível inferir sobre a diversidade genética de *P. brassicae* de cada região, podendo com isso efetuar uma adequação de materiais resistentes ou suscetíveis para cada área estudada, necessitando para isso informações importantes relativas ao comportamento patogênico dos isolados monospóricos perante diversas variedades e espécies de Brassicas.

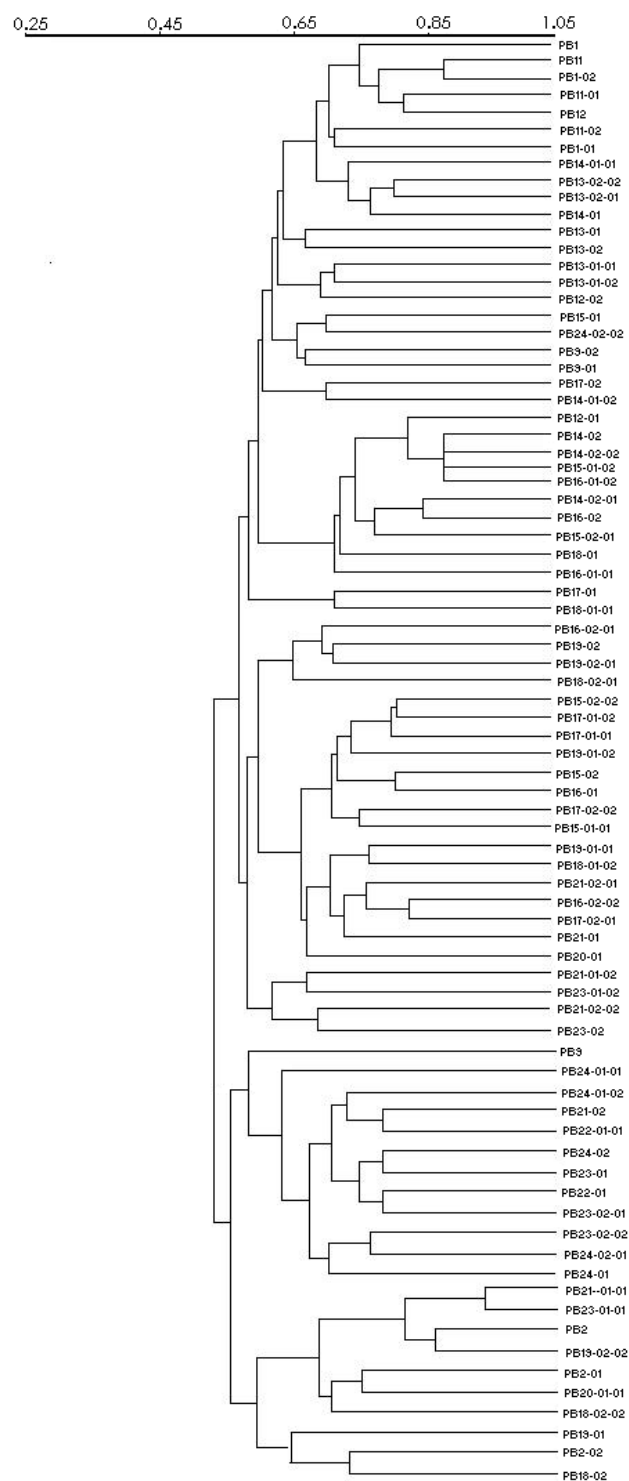


Figura 18 – Dendrograma dos 79 isolados de *Plasmodiophora brassicae* estudados baseado nos dados de RAPD e microsatélite, utilizando o método de UPGMA, no programa PHYLIP. Dendrograma baseado nos valores de similaridade obtidos.

7.8. Seqüenciamento de regiões genômicas

Nos últimos anos a utilização de técnicas moleculares vem sendo o padrão de referencia para estudos relacionados à identificação de espécies e também para estudos relacionados à diversidade genética das espécies estudadas, com base nisso, muitas regiões genômicas e mitocondriais são referencias básicas para os estudos, mas como verificaremos a seguir, muitas regiões de referencias não se aplicam a todos os organismos.

No estudo genético da população de *Plasmodiophora brassicae* utilizou-se duas regiões bastante utilizadas para esse fim em muitos organismos, desde protozoários e fungos, a organismos superiores, como algas, plantas, vermes e insetos. As regiões foram o ITS-5.8S rDNA, região bastante conservada devido a proximidade aos genes ribossomais, e também a região do gene responsável pela alongação das hifas de fungos, mas também responsável pela alongação de células em outros organismos, como insetos e vermes (Nadia et al., 2006), o gene EF-1 α .

Na região ITS-5.8S rDNA verificou-se uma grande homogeneidade nos isolados, com base na comparação entre as seqüências, verificando-se que os isolados apresentam mais de 90% de homologia entre eles. Esta grande similaridade, apesar de ser esperada, surpreende devido ao alto valor, haja vista que apesar de ser a mesma espécie, historicamente sabe-se da existência de raças de *P.brassicae*, evento esse que indica uma existência de variabilidade genética, fato que foi comprovado na utilização da técnica de RAPD, mas os resultados obtidos a partir do seqüenciamento não corroboram com os dados obtidos com o RAPD.

Esta constatação, possivelmente, é devida a uma grande estabilidade nesta região conservada, fato esse também já observado para *Rhizoctonia solani*, um basidiomiceto, que apresenta uma grande variabilidade genética quando analisado via RAPD, mas com relativa baixa variabilidade quando se utiliza a região ITS-5.8S rDNA.

Observando-se o dendrograma (Figura 19) verifica-se que a maioria dos isolados são 98% idênticos, sendo somente os isolados PB17-01, PB02-01 e PB10-01 são mais distantes, ficando 96% idênticos ao restante.

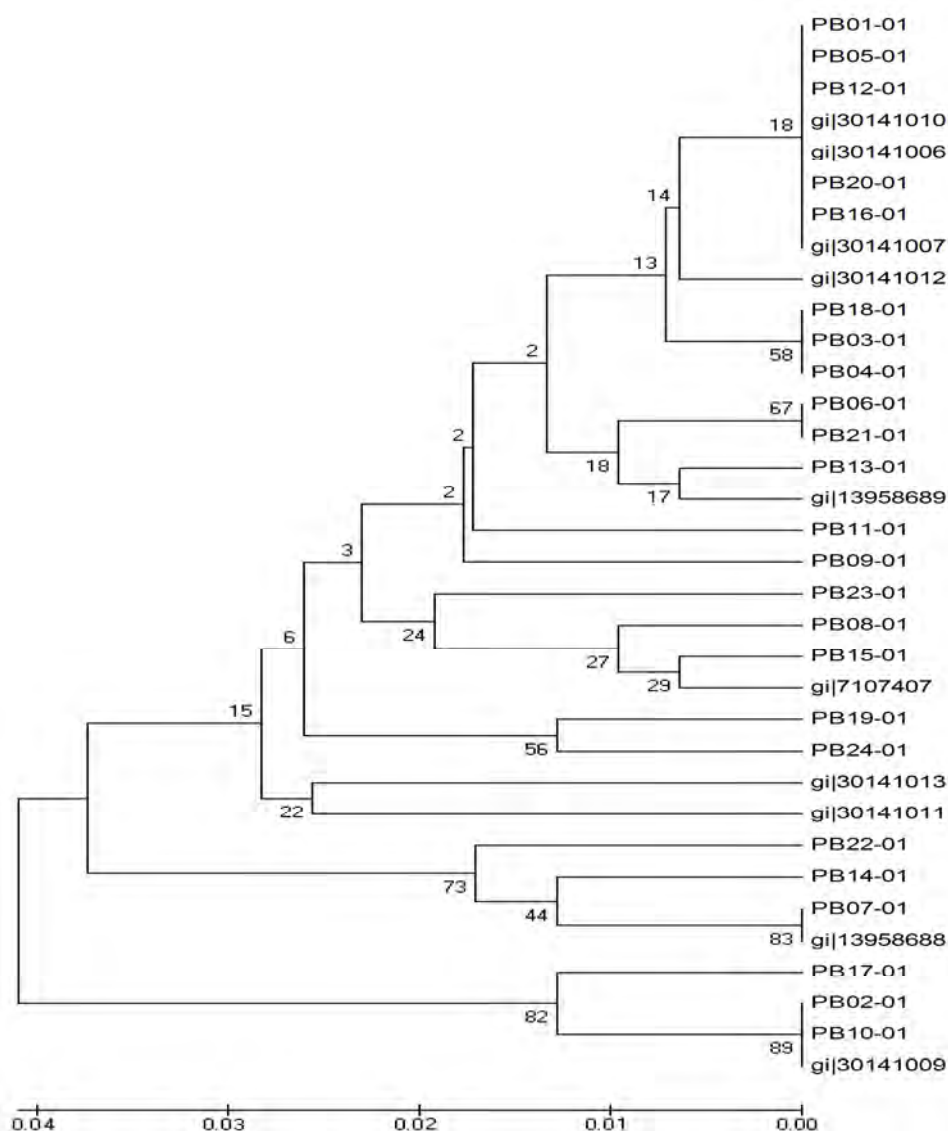


Figura 19 – Dendrograma filogenético da região ITS – 5.8S rDNA de 24 isolados de *Plasmodiophora brassicae* proveniente do Brasil, juntamente com seqüências de isolados de *P.brassicae* provenientes do GeneBank.

A análise do gene EF-1 α revelou informações bastante interessante, haja vista que mesmo utilizando-se de 3 grupos diferentes de oligonucleotídeos para o gene, nenhum gerou amplificação do gene, mesmo com alterações junto ao protocolo, não obteve-se nenhuma amplificação (Figura 20).

Utilizaram-se os oligonucleotídeos descritos por Schillberg, Gross, Tiburzy (1995) (TEF1-F–AAT CGT CAA GGA GAC CAA CG TEF1–R CGT CAC CAG ACT TGA CGA AC); Morehouse et al (2003) (ef1 F TAC AAR TGY GGT GGT ATY GAC A ef1 R ACN GAC TTG ACY TCA GTR GT) e O'Donnell et al. (1998) (Ef1: ATG GGT AAG GA(A/G) GAC AAG AC Ef2 GGA (G/A) GTA CCA GT(G/C)ATC ATG TT).

A não amplificação do gene EF-1 α em *P.brassicae* abre um evento bastante interessante sobre esse organismo, tecendo novas dúvidas relativas ao funcionamento genético e fisiológico deste, dúvidas principalmente relacionadas ao sistema de elongação e divisão celular de *P.brassicae*, haja vista a provável ausência do gene responsável por esse mecanismo.

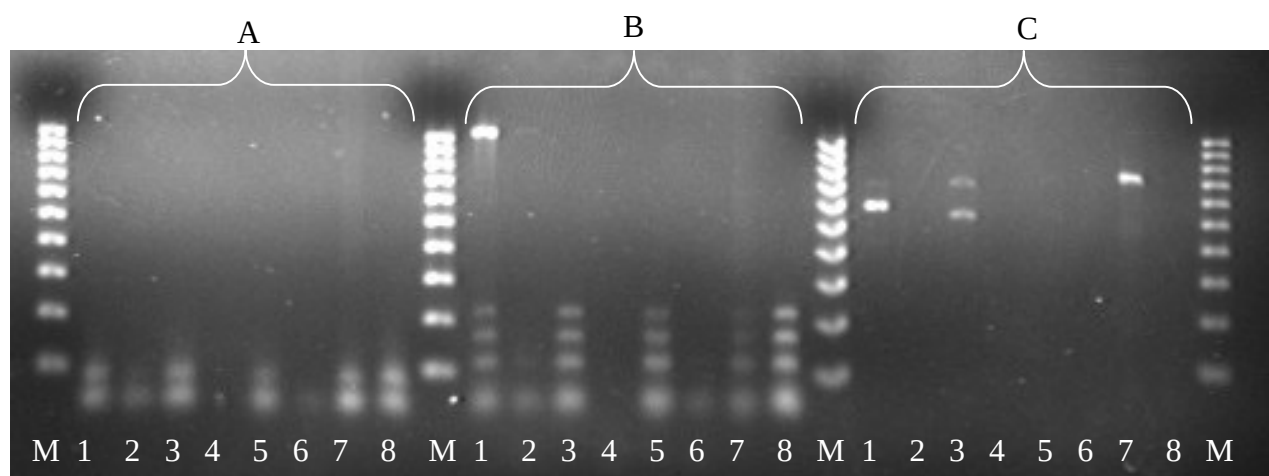


Figura 20 – Amplificação do gene EF-1 α utilizando três grupos de oligonucleotídeos diferentes, sendo A: Schillberg, Gross, Tiburzy (1995); B: Morehouse *et al.*, (2003); C: O'Donnell et al. (1998). M – Marcador lambda 1Kb, 1 DNA do fungo *Ceratocystis fimbriata*, amostras 2 a 7 Isolados de *Plasmodiophora brassicae* e 8 controle negativo (água milliQ).

7.9. Efeito da temperatura sobre a severidade de *Plasmodiophora brassicae*

Podemos observar a ocorrência de interferência da severidade da *Plasmodiophora brassicae* sobre as plantas de couve chinesa Pak Choi nas temperaturas extremas, ou seja, temperaturas acima de 35°C, onde é possível constatar diferenças significativas na doença, que ocasiona uma diminuição nos sintomas observados, este fato também é observado nas temperaturas de 10 e 30°C, em valores absolutos, mas não apresentando significância estatística (Tabela 12).

Tabela 12 – Índice de Agressividade, em porcentagem, de *Plasmodiophora brassicae* em plantas de couve chinesa mantidas em diferentes temperaturas de desenvolvimento e peso seco médio das plantas cultivadas nessas temperaturas, inoculadas e não inoculadas com o patógeno.

Temperatura	Índice de Agressividade (%) ^{*,#}	Peso seco (g) ⁺	
		Inoculado	Não Inoculado
10	24,4 b	0,58 A	0,75 A
15	28,8 b	1,11 A	1,48 B
20	51,1 c	1,36 A	1,85 B
25	44,4 bc	0,90 A	1,30 B
30	40,0 b	0,77 A	1,01 B
35	13,3 a	0,37 A	0,55 A
40	6,6 a	0,18 A	0,33 A
CV (%)	4,72	6,21	5,80

* Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente no nível de 5% de significância.

+ Letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente no nível de 5% de significância. Peso seco de plantas com 28 dias após germinação.

Índice de agressividade médio, baseado em 15 repetições, com 5 plantas em cada repetição, com base na escala de notas, onde a nota 0= raízes sadias; 1= redução de raízes com leve intumescimento das raízes; 2= redução de raízes com a presença de galhas e 3 = presença de galhas e ausência de raízes.

Nas temperaturas de 10, 15, 25 e 30°C não observa-se diferença significativa nos sintomas, mas em valores absolutos verificam-se que a doença é favorecida nas temperaturas em torno de 20°C, fato comprovado, visto a diferença significativa no valor do índice de agressividade da doenças na temperatura em 20°C, a qual se mostrou mais propicia para o desenvolvimento da doença, obtendo um IA de 51,1% (Tabela 12). Quando analisa-se o efeito da severidade da doença no peso seco das plantas, neste caso mudas de couve chinesa Pak Choi, verifica-se que a faixa de temperatura mais propicias ao desenvolvimento de doença, de 15 a 30°C, é justamente onde observa-se diferenças significativas entre o peso seco das muda infectadas ao das não infectadas, verificando-se uma diminuição média de aproximadamente 27% do peso seco da mudas nesta faixa (Tabela 12), fato esse que faz com que haja uma grande quebra de produção em áreas infestadas, levando o agricultor a grandes perdas, visto que mesmo havendo um nível razoável de crescimento das plantas, esta plantas, possivelmente, estarão mais susceptíveis a outras doenças, elevando o custo de produção.

Na análise dos valores absolutos, verifica-se uma diminuição expressiva no peso seco das mudas infectadas contra as mudas não infectadas, em média 29,3% (Tabela 12), sendo que o peso seco nas temperaturas 10, 35 e 40°C não diferiram estatisticamente, mas manteve-se o mesmo comportamento de diminuição do peso seco das mudas infectadas.

Nas temperaturas mais propicias ao desenvolvimento da doença, de 15 e 20°C, foi possível observar o intumescimento das radículas e a presença de pequenas galhas (Figura 21), demonstrando assim que estas temperaturas podem ser consideradas ideais para o desenvolvimento da doença, visto que também é a faixa onde se observa o maior peso seco das plantas, tanto infectadas, com não infectadas, apresentando diferenças significativas entre elas, e com uma diminuição de 26,3% do peso seco das mudas infectadas, para as não infectadas (Tabela 12), este fato podem contribuir na facilidade de avaliações visuais na procura por plantas resistentes a doença nos programas de melhoramento.

O fator ambiente é um dos alicerces do processo doença, sendo neste incluído a temperatura com uma das mais importantes variáveis para que haja o

estabelecimento da relação entre o patógeno e o hospedeiro, e com isso ocorra o processo doença, com base nesta observação, Gabrielson e Robak (1988) relatam que a temperatura também é um fator imprescindível a ser considerado no processo de melhoramento das brassicas a resistência a *Plasmodiophora brassicae*, haja vista a grande diversidade de raças fisiológicas deste patógeno, das quais muitas são sensíveis a temperaturas elevadas, levando a uma hipovirulência destas raças devido a temperatura não ideal para elas, fazendo com que, em muitos casos, o processo de melhoramento não seja devidamente avaliado perante a infecção destas raças, devido ao fato de não se adequar o ambiente a temperatura mais propícias para a infecção destas raças mais sensíveis a temperatura.

Este fato também pode ser observado empiricamente em alguns campos de produção de regiões mais quente ou em anos agrícolas mais quentes, verificando-se uma diminuição da severidade da doença no campo, aliado a isto, Dobson et al.(1982) relatam que fatores na mistura de solo também influenciam muito sobre o processo, principalmente os valores de teor de água no solo, fator esse que tem correlação direta com a temperatura radicular das plantas, fazendo que haja uma diminuição nos valores de severidade nas plantas presentes em solos com uma menor carga de água.

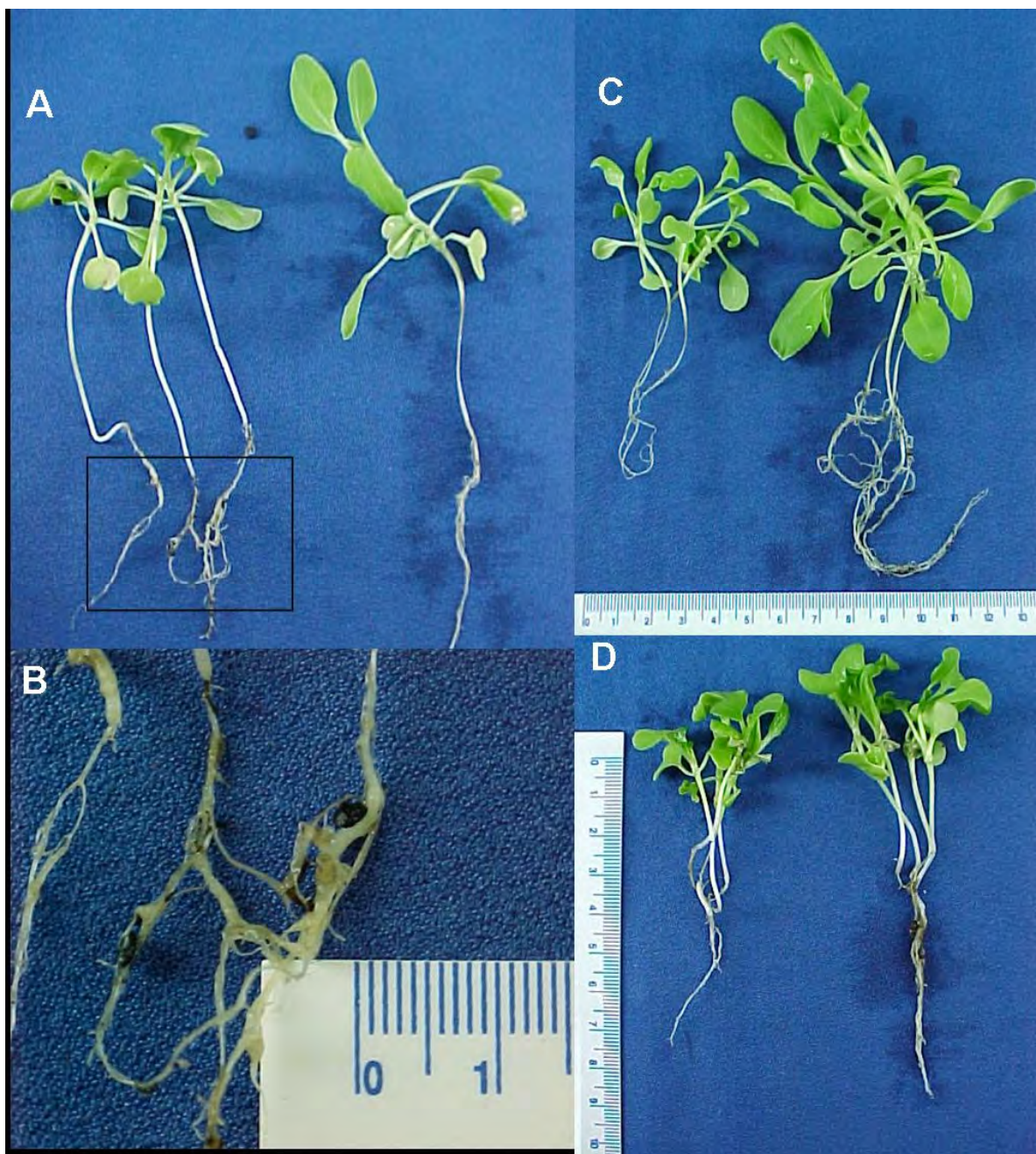


Figura 21– Plantas de Couve chinesas inoculadas e não inoculadas com *Plasmodiophora brassicae*; A – Plantas mantidas a 15°C, por 28 dias, presença de galhas nas raízes e redução de raízes na plantas inoculada (esquerda) e raízes saudáveis na planta não inoculadas (direita); B – Presença de pequenas galhas e intumescimentos radiculares nas plantas inoculadas mantidas a 15°C; C - Plantas mantidas a 20°C, por 28 dias, redução de raízes e de massa na plantas inoculada (esquerda) e planta sadia não inoculada (direita); D - Plantas mantidas a 30°C, por 28 dias, redução de raízes e de massa na planta inoculada (esquerda) em comparação a planta sadia não inoculada (direita).

Asano et al.,(2006), em estudos de infecção da *Plasmodiophora brassicae* em raízes cultivadas *in vitro*, correlacionado às três temperaturas, 15, 20 e 25°C, verificaram que a temperatura de 20°C foi a mais propícia para a formação de galhas, formação de esporos de resistência e também foi a temperatura onde obteve-se galhas de maior peso fresco, fatos esses que corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, onde verifica-se o maior valor de severidade da doença a 20°C. As informações apresentadas neste trabalho têm como intuito ajudar em futuros programas de melhoramento visando à resistência a *Plasmodiophora brassicae*, doença que vem crescendo e ganhando cada vez mais importância perante o setor produtivo, mostrando de forma clara que fatores ambientais são importantes pontos a serem considerados quando se almeja efetuar trabalhos visando resistência a fitopatógenos habitantes do solo.

Observando-se o comportamento gráfico das notas medias de severidades, do peso seco das mudas inoculadas e não inoculadas, verifica-se comportamento semelhante entre as curvas (Figura 22), sendo que a regressão dos valores médios de severidade, em notas, com as temperaturas de infecção, observa-se um comportamento explicado por uma polinomial de segunda ordem, sendo que expressa por $Y = - 0,0048X^2 + 0,2118X - 0,7381$, onde Y corresponde a severidade média da doença, em nota, e X corresponde a temperatura de infecção e desenvolvimento da doença, em °C, sendo que a equação apresentou um coeficiente de determinação, $r^2=0,8862$, ou seja, a equação corresponde por 88,62% dos pontos obtidos (Figura 22).

Com base na polinomial de regressão, calculou-se a temperatura ótima de infecção e desenvolvimento da hérnia das crucíferas obtendo que 22°C é a temperatura ótima de infecção e desenvolvimento para *Plasmodiophora brassicae* junto a plantas de couve chinesa cv. Pak choi, nas condições testadas e com o isolado testado (Figura 22).

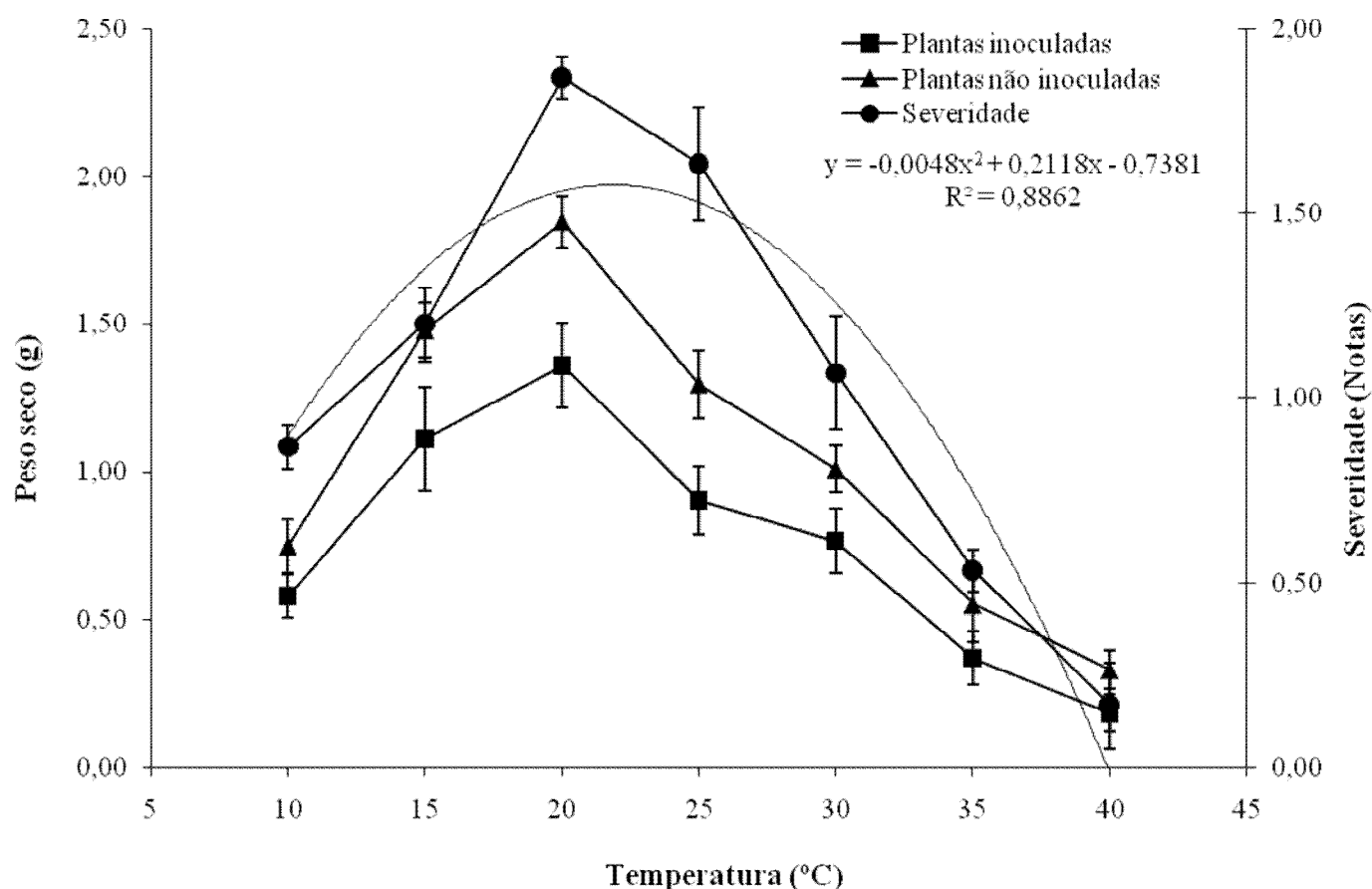


Figura 22 – Comportamento gráfico da severidade média, em notas, e do peso seco das mudas infectadas e não infectadas de couve chinesa cv. Pak Choi por *Plasmodiophora brassicae*, em diversas temperaturas.

7.10. Efeito de culturas não Brassicas sobre a sobrevivência de *P. brassicae*

Por muitos anos acreditou-se que a *Plasmodiophora brassicae* respondia fisiologicamente somente a exsudados radiculares provenientes de plantas brassicas. Esta característica sempre fez com que a utilização de rotação de cultura, ou outras técnicas envolvendo cultura não brassicas, fosse abandonada ou evitada, mas recentemente Ludwig-Müller *et al.* (1999) demonstraram que *P. brassicae* respondeu a estímulos provenientes de

Carica papaya, demonstrando assim que é possível a utilização de plantas não brassicas para o desenvolvimento de um controle alternativo de *P. brassicae*.

O uso de plantas não brassicas para o desenvolvimento de um controle alternativo para a hérnia das crucíferas faz com que uma nova linha de pesquisa seja aberta para esta doença bastante agressiva e até então sem controle algum. Ao mesmo tempo que um grande esperança nasce junto a possibilidade de controle dessa doença, alguns pontos também são dignos de preocupação, sendo o principal deles é a capacidade do patógeno, *P.brassicae*, conseguir infectar e de se reproduzir na planta utilizada para rotação. Para que esse evento não ocorra, estudos como este devem ser feitos com uma gama maior de possíveis plantas rotacionais, considerando que a planta rotacional deve apresentar como principais características a capacidade de estimular a germinação do esporo de resistência de *P.brassicae*, mas não pode ser infectar, e muito menos servir de hospedeiro alternativo para o patógeno.

Na tabela 13 pode-se observar que a única planta testada que apresenta algum poder de redução do potencial de inóculo dos esporos de resistência de *P.brassicae* é a planta de coentro (*Coriandrum sativum*).

Tabela 13 – Comportamento de plantas não brassicaceas perante *Plasmodiophora brassicae*. Aspecto visual relativo a sintomas, Peso seco da parte aérea e radicular das plantas inoculadas e não inoculadas, e nota média de sintoma radicular da couve-chinesa cv. Pak Choi cultivada posteriormente no solo de cada planta estudada.

Tratamentos	Sintoma visual	Peso Seco Médio (g)		CV (%)	Nota Média em Pak Choi	
		Controle	Inoculada		Controle	Inoculada
Alface (<i>Lettuce sativa</i>)	-	2,5 a	2,4 a	5,4	0	2,3
Cenouca (<i>Daucus carota</i>)	-	3,1 a	2,9 a	6,4	0	2,0
Beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)	-	2,7 a	2,5 a	7,3	0	2,5
Mamão (<i>Carica papaya</i>)	-	2,9 a	2,7 a	4,9	0	1,5
Soja (<i>Glycine max</i>)	-	3,4 a	3,2 a	7,0	0	2,5
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	-	3,2 a	3,0 a	3,0	0	3,0
Amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>)	-	2,6 a	2,4 a	7,5	0	3,0
Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	-	2,8 a	2,6 a	8,6	0	2,5
Ervilha (<i>Pisum sativum</i>)	-	4,3 a	4,0 a	6,7	0	2,5
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	-	4,2 a	3,9 a	5,6	0	2,5
Quiabo (<i>Abelmoschus esculentus</i>)	-	2,3 a	2,2 a	4,7	0	3,0
Berinjela (<i>Solanum melongena</i>)	-	2,4 a	2,3 a	7,5	0	3,0
Maracujá azedo (<i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i>)	-	2,6 a	2,5 a	7,2	0	3,0
Girassol (<i>Helianthus annuus</i>)	-	2,7 a	2,5 a	9,7	0	3,0
Melão (<i>Cucumis melon</i>)	-	3,2 a	3,0 a	4,5	0	3,0
Caupi (<i>Vigna unguolata</i>)	-	2,5 a	2,4 a	6,7	0	3,0
Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	-	3,1 a	2,9 a	6,2	0	2,5
Pimentão (<i>Capsicum annum</i>)	-	2,6 a	2,4 a	4,6	0	3,0
Milho (<i>Zea may</i>)	-	2,1 a	2,0 a	5,8	0	2,5
Chicória (<i>Eryngium foetidum</i>)	-	4,5 a	4,2 a	5,4	0	3,0
Coentro (<i>Coriandrum sativum</i>)	-	4,2 a	3,9 a	4,2	0	1,0
Couve chinesa cv. Pak Choi (<i>Brassica rapa</i> var. <i>pekinensis</i>)	+	3,6 a	1,3 b	5,7	0	4,0

O coentro é uma planta condimentar aromática muito utilizada na gastronomia nordestina e que no estado de São Paulo vem sendo bastante cultivado visando atender o mercado consumidor de imigrantes nordestino..

A redução do potencial de inóculo do solo cultivado com coentro (Tabela 13) pode ser correlacionada com a hipótese de que plantas que apresentam alta concentração de isotiocianato ou glucosinolatos, que estimulam a germinação dos esporos de resistência de *P. brassicae*, compostos químicos esses que podem ser encontrados em altas concentrações nas plantas da Família Umbelliferae, a família do coentro (Lorenzi, 2002). Esta hipótese ganha mais força quando compara-se o resultado obtido com as plantas de coentro com as de mamão, planta não brassicae referencia de redução de inóculo, segundo Ludwig-Müller *et al.* (1999). Observa-se que a nota obtida em ambos os casos foi bastante reduzido da obtida no cultivo sucessivo com brassicas, corroborando com a hipótese de plantas armadilhas por causa do isotiocianato ou glucosinolatos.

Podemos verificar que existe uma leve redução do potencial de inóculo de *P.brassicae* quando utiliza-se uma planta não brassicae como rotação, haja vista a redução das notas, diferente do que ocorre quando utiliza-se de cultivos sucessivos de brassicas, como a couve-chinesa (Tabela 13), nesse caso o potencial de inóculo mantem-se em alta.

Verifica-se também que as plantas não brassicas quando cultivadas na presença de *P.brassicae* apresentam uma leve redução do peso seco, diferença essa não estatística, mas que possivelmente pode sinalizar um estresse causado pela possível tentativa de infecção do sistema radículas das plantas por parte da *P.brassicae*, mesmo não ocorrendo infecção ou sintoma visual (Tabela 13).

7.11. Diferenciação de raças

A análise dos isolados selvagens e dos isolados monosporicos perante a agressividade as diversas plantas utilizadas como diferenciadoras apresentou resultados bastante corroborativos para a identificação de raças em *Plasmodiophora brassicae*.

Verificou-se que os isolados selvagens e os monosporicos apresentaram maior agressividade em plantas do genero *Brassica*, sendo que esse

comportamento não foi observado em plantas dos outros generos pertencentes à família Brassicaceae.

Entre os isolados, pode-se verificar a existência de diferença na agressividade perante o mesmo hospedeiro, tendo algumas situações que a diferença entre a agressividade foi tão evidente, caracterizando a presença de isolados especializadas, ou seja, raças.

Entre os isolados o índice de agressividade médio variou de 35,2 % para o isolado PB15-01 até 53,4% para o isolado PB18-01, sendo que dentre os 79 isolados, temos 3 que ficaram com índice de agressividade acima 50%, 58 isolados ficaram entre 40 a 50% de IA e 18 isolados ficaram abaixo de 40% de IA (Tabela 14).

Entre os hospedeiros verifica-se que o repolho Fuyotoio foi o mais suscetível, apresentando um índice de suscetibilidade de 78,4%, mas observou-se também que entre os hospedeiros testados encontrou-se alguns que aparentemente são resistentes a *P.brassicae* e suas raças, Rábano Hibrido F1 Omny e Goivos Dobrados Sortido não foram infectados por nenhum dos isolados testados (Tabela 14).

Utilizando-se das 22 plantas diferenciadoras (Tabela 14), obteve-se que os isolados selvagens e os monosporicos de *P.brassicae* formam 10 formas distintas de infecção destas plantas, utilizando o parâmetro de índice de agressividade (I.A) abaixo de 25% como isolado não patogênico. Com base nessa regra pode-se dividir os isolados em 10 classes de infecção (Tabela 15), podendo também denominar essas classes como raças patogênicas (Figura 23).

Na raça R1 ficaram agrupados os isolados PB1, PB12, PB13-01, PB13-02-01, PB14-01 e PB16-01-01, verificando-se que o agrupamento não apresentou necessariamente correlação com local de origem ou com perfil genético expresso pelo RAPD. Fato esse também verificado para as outras raças, não encontrando um denominador comum a ocorrência delas, além da maior agressividade em determinados hospedeiros.

Como pode-se verificar na dendrograma de raças, o único ponto em comum entre eles foi as características patológicas, agrupamento comum entre raças patogênicas, e novamente isso demonstra que realmente uma única planta infectada no campo pode ser portadora de inúmeras raças patogênicas de *Plasmodiophora brassicae*.

Tabela 14 – Reação de diferentes espécies e cultivares de planta da família Brassicaceae perante diversos isolados selvagem e monospóricos de *Plasmidiophora brassicae*, expressa em Índice de Agressividade (IA) e Índice de Severidade (IS).

N.	Isolados	Couve flor Sharon F1	Couve flor precoce Piracicaba	Couve flor híbrido Shiromaru - I	Couve flor híbrido Shiromaru – II	Couve Chinesa Pak Choi SC8-104	Couve Chinesa Komachi F1	Couve Chinesa AF66	Couve Chinesa Pak Choi Canton SK	Couve Chinesa Híbridos 80028(CR Power)	Brócolos Ramoso Santana	Brócolos Híbrido Florida	Brócolos Precoce Piracicaba Verão	Repolho Kenzan KY	Repolho Híbrido Fuyutoko	Repolho Fuyutoyo	Couve Bruxelas Híbrido F1 Royal Marvel	Couve Manteiga Híbrido F1 Top Bunch	Rúcula Folha Larga	Rabanete Akamaru Hatsuka	Rábano Híbrido F1 Omny	Iberis Sortido	Goivos Dobrados Sortido	IA Médio
1	PB1	67,0	56,0	56,0	75,0	65,0	34,0	58,0	57,0	49,0	87,0	86,0	78,0	34,0	65,0	67,0	17,0	67,0	2,0	0,0	0,0	5,0	0,0	46,6
2	PB1-01	78,0	45,0	54,0	36,0	78,0	14,0	34,0	67,0	54,0	65,0	65,0	35,0	14,0	46,0	79,0	0,0	78,3	0,0	0,0	0,0	6,0	0,0	38,6
3	PB1-02	89,0	44,0	78,0	68,5	46,5	12,0	67,5	45,0	76,5	67,0	45,0	70,0	12,0	66,0	67,5	24,0	62,3	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	43,0
4	PB11	58,0	64,0	73,0	41,5	35,5	10,0	80,0	56,0	71,5	40,0	34,0	41,0	10,0	62,5	65,0	31,0	85,3	0,0	0,0	0,0	7,0	0,0	39,3
5	PB11-01	69,0	35,0	68,5	58,5	46,4	21,0	58,4	75,0	67,0	57,0	45,0	76,0	21,0	66,8	71,3	24,0	55,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	41,6
6	PB11-02	66,0	38,0	47,5	54,0	42,9	22,0	51,7	63,0	46,0	52,5	41,5	65,0	22,0	63,8	73,5	16,0	78,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	38,3
7	PB12	58,0	78,0	58,4	57,0	46,2	26,0	60,3	47,0	57,0	55,5	44,7	58,0	26,0	69,0	73,1	22,0	71,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	41,2
8	PB12-01	39,0	68,0	55,2	53,0	36,2	15,0	59,7	56,0	53,7	51,5	34,7	84,0	15,0	68,6	70,3	36,0	63,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	39,1
9	PB12-02	68,0	85,0	52,8	69,5	43,7	24,0	61,1	38,0	51,4	68,0	42,2	79,0	24,0	71,1	73,1	41,0	67,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	43,6

Tabela 15 – Reação de diferentes espécies e cultivares de planta da família Brassicaceae perante diversos isolados selvagem e monospóricos de *Plasmiodiophora brassicae*, expressa em Índice de Agressividade (IA) e Índice de Severidade (IS). - *Continuação*

10	PB13-01	57,0	83,7	38,3	77,5	36,5	25,0	54,7	76,0	36,9	76,0	35,1	93,0	25,0	69,4	78,6	23,0	79,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	43,9
11	PB13-01-01	96,0	89,9	56,6	83,5	39,9	36,0	59,8	47,0	55,1	82,0	38,4	57,0	36,0	72,1	82,5	27,0	80,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	47,2
12	PB13-01-02	65,2	96,1	47,5	89,8	33,1	27,0	59,0	37,0	46,0	88,4	31,7	54,0	27,0	74,0	76,3	25,0	82,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	43,6
13	PB13-02	57,3	74,0	68,7	74,9	47,7	43,0	62,6	48,0	67,2	73,5	46,3	63,0	43,0	77,3	80,3	26,0	65,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	46,3
14	PB13-02-01	58,5	56,0	49,9	76,5	38,7	15,0	56,2	56,0	48,4	75,1	37,2	63,7	15,0	75,2	76,2	16,0	65,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0
15	PB13-02-02	46,6	86,0	53,2	70,0	57,3	36,0	65,4	70,0	51,8	68,5	55,8	65,0	36,0	78,8	78,6	3,0	66,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	44,9
16	PB14-01	46,2	45,0	49,3	61,3	33,9	43,0	58,9	68,0	47,9	59,9	32,4	85,0	43,0	75,7	71,6	24,0	61,6	0,0	5,7	0,0	8,0	0,0	41,8
17	PB14-01-01	44,9	57,0	52,7	77,0	46,1	13,0	69,4	57,0	51,2	75,5	44,6	74,0	13,0	78,7	66,3	36,0	71,4	0,0	0,0	0,0	3,0	0,0	42,3
18	PB14-01-02	41,2	50,1	40,8	66,5	47,6	34,0	54,2	41,0	39,3	65,0	46,2	91,0	34,0	73,6	73,3	41,0	65,2	0,0	3,4	0,0	1,0	0,0	41,3
19	PB14-02	32,1	45,6	46,2	67,0	34,3	26,0	57,6	52,0	44,8	65,5	32,8	75,6	26,0	72,5	76,7	32,0	71,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	39,0
20	PB14-02-01	40,0	41,1	45,1	72,0	38,8	20,5	61,9	65,5	43,7	70,6	37,4	55,2	20,5	73,5	82,6	29,0	59,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	39,0
21	PB14-02-02	46,2	36,6	33,9	62,1	37,6	27,5	56,9	66,5	32,4	60,6	36,1	34,0	27,5	74,6	79,8	39,0	53,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	36,6
22	PB15-01	67,7	32,1	40,2	49,6	34,3	12,5	62,2	57,5	38,7	48,2	32,8	46,0	12,5	78,0	81,3	36,0	45,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	35,2
23	PB15-01-01	63,3	27,6	42,6	36,8	32,1	28,5	60,1	56,5	41,2	35,3	30,7	76,0	28,5	77,2	84,9	42,0	62,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	37,5
24	PB15-01-02	57,4	23,1	51,7	40,5	27,8	32,5	59,2	39,5	50,3	39,1	26,3	65,0	32,5	79,7	84,2	27,0	75,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	36,9
25	PB15-02	55,2	56,0	48,4	53,3	37,0	19,5	60,0	64,0	47,0	51,8	35,6	64,0	19,5	81,1	89,0	28,0	67,0	0,0	0,0	0,0	3,7	0,0	40,0
26	PB15-02-01	48,5	75,0	43,3	45,5	43,6	24,5	57,4	56,3	41,9	44,1	42,1	57,0	24,5	81,9	81,1	29,0	65,4	0,0	0,0	0,0	4,0	0,0	39,3
27	PB15-02-02	45,1	64,0	46,8	61,5	35,4	25,0	64,4	51,8	45,4	60,0	34,0	58,0	25,0	85,0	84,0	37,0	58,5	0,0	0,0	0,0	7,0	0,0	40,4
28	PB16-01	42,9	53,0	46,7	67,5	35,4	22,8	63,8	52,8	45,3	66,0	33,9	86,0	22,8	81,5	80,5	31,0	57,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,4
29	PB16-01-01	40,0	42,0	41,0	62,5	37,4	31,8	61,2	56,3	39,5	61,0	35,9	89,0	31,8	84,5	86,0	19,0	70,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,4
30	PB16-01-02	34,3	45,0	39,8	71,0	36,2	19,8	59,4	54,8	38,4	69,5	34,7	83,0	19,8	81,0	81,3	23,0	70,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	39,1

Tabela 16 – Reação de diferentes espécies e cultivares de planta da família Brassicaceae perante diversos isolados selvagem e monospóricos de *Plasmodiophora brassicae*, expressa em Índice de Agressividade (IA) e Índice de Severidade (IS). - *Continuação*

31	PB16-02	35,4	47,0	39,4	67,0	37,8	35,8	63,1	66,0	38,0	65,5	36,4	48,0	35,8	85,2	78,0	43,0	64,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,3
32	PB16-02-01	38,9	54,0	36,0	65,5	31,2	23,8	60,2	56,6	34,5	64,0	29,8	46,0	23,8	81,1	77,6	36,0	47,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	36,7
33	PB16-02-02	50,8	37,0	37,3	49,0	39,0	27,8	59,4	46,4	35,9	47,5	37,6	48,0	27,8	81,6	86,0	37,0	48,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	36,2
34	PB17-01	54,3	67,0	35,8	51,5	31,3	33,8	55,9	52,4	34,3	50,0	29,9	85,0	33,8	79,4	82,3	52,0	55,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,2
35	PB17-01-01	45,0	57,0	45,6	48,0	43,0	19,0	67,0	79,0	85,0	78,0	76,0	74,0	19,0	34,0	53,0	19,0	75,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	41,7
36	PB17-01-02	47,7	73,0	43,5	77,5	36,2	28,4	58,3	60,6	65,0	73,0	87,0	69,0	28,4	77,6	76,9	36,0	65,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,6
37	PB17-02	45,8	87,0	62,0	67,0	33,8	28,9	49,5	61,8	38,3	56,8	34,6	44,0	28,9	78,5	81,3	25,5	64,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,3
38	PB17-02-01	43,3	378,0	68,8	72,5	37,4	20,1	58,0	56,6	37,8	49,7	30,2	32,0	20,1	77,2	82,0	26,0	50,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	51,8
39	PB17-02-02	39,2	48,0	41,6	67,0	46,9	31,6	59,0	42,9	43,1	43,3	32,0	43,0	31,6	79,9	78,9	41,0	43,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	36,9
40	PB18-01	36,0	95,0	38,2	206,5	45,9	18,1	61,1	85,0	86,0	87,0	88,0	67,0	18,1	79,6	79,5	36,0	46,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	53,4
41	PB18-01-01	32,0	78,0	37,0	47,0	38,1	28,1	64,3	67,6	63,4	61,0	59,1	84,0	28,1	79,4	85,5	39,5	57,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	43,2
42	PB18-01-02	30,6	47,0	63,4	82,5	29,6	36,8	64,1	65,0	65,0	65,0	65,0	75,0	33,1	79,5	83,2	39,5	63,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	44,9
43	PB18-02	31,6	58,0	47,0	82,5	34,0	21,4	63,2	94,0	94,0	94,0	94,0	77,0	19,3	57,5	71,0	23,5	58,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	46,4
44	PB18-02-01	37,4	69,0	49,3	62,5	49,7	29,4	57,9	56,4	38,7	55,3	33,1	72,0	26,4	79,7	79,0	32,5	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,4
45	PB18-02-02	41,7	74,0	64,2	69,0	34,6	29,9	53,9	48,8	40,7	56,4	33,4	23,0	26,9	81,8	82,7	31,3	60,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	38,8
46	PB19-01	39,4	85,0	36,7	72,0	39,3	23,8	65,8	95,0	96,0	97,0	98,0	80,0	21,4	79,4	81,2	28,5	38,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	48,9
47	PB19-01-01	39,6	67,0	39,0	50,0	47,0	35,2	60,1	62,1	49,0	62,5	44,4	84,0	31,7	82,2	82,5	30,0	65,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,3
48	PB19-01-02	38,8	37,0	70,2	84,0	30,5	21,0	61,7	55,7	50,4	56,3	51,3	58,0	18,9	80,3	80,4	29,5	67,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,5
49	PB19-02	37,3	50,0	43,5	77,0	36,8	35,5	66,2	73,2	64,2	72,0	61,9	75,0	31,9	82,3	81,7	41,3	54,2	0,0	0,0	0,0	8,0	0,0	45,1
50	PB19-02-01	34,8	38,0	46,5	49,0	46,0	33,6	56,9	67,7	61,8	66,7	54,5	64,0	28,4	80,3	80,4	37,8	61,9	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	41,4
51	PB19-02-02	32,2	84,0	51,1	64,0	39,1	27,3	60,7	54,7	52,9	64,7	60,2	79,0	23,5	69,6	78,5	30,3	55,1	0,0	0,0	0,0	8,0	0,0	42,5

Tabela 17 – Reação de diferentes espécies e cultivares de planta da família Brassicaceae perante diversos isolados selvagem e monospóricos de *Plasmidiophora brassicae*, expressa em Índice de Agressividade (IA) e Índice de Severidade (IS). - *Continuação*

52	PB2	29,1	58,0	46,1	52,5	38,9	35,1	64,7	78,4	67,2	76,9	66,3	90,0	30,1	79,6	80,7	42,3	61,3	0,0	0,0	0,0	6,0	0,0	45,6
53	PB2-01	27,2	48,0	47,6	83,0	38,7	27,2	60,3	59,3	43,4	56,1	37,3	39,0	23,0	57,9	67,8	25,1	65,3	0,0	0,0	0,0	4,0	0,0	36,8
54	PB2-02	26,7	57,0	49,2	75,5	39,5	29,0	61,2	49,3	46,8	49,8	41,6	45,0	24,9	78,5	79,1	32,3	38,8	0,0	0,0	0,0	3,7	0,0	37,6
55	PB20-01	29,1	39,0	33,7	45,0	36,7	35,6	54,7	79,1	75,1	79,5	75,0	86,0	30,3	80,4	81,9	27,8	41,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,3
56	PB20-01-01	32,2	85,0	35,6	52,5	38,5	22,9	60,8	67,7	62,6	63,8	56,8	85,0	19,5	78,8	81,2	27,8	63,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,4
57	PB21-01	32,5	74,0	53,5	64,0	33,4	37,3	60,8	59,9	58,9	64,8	62,6	74,0	31,8	81,1	80,3	41,1	64,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	44,3
58	PB21--01-01	32,8	85,0	45,9	86,5	29,0	28,8	61,3	86,2	80,6	85,5	80,1	69,0	23,3	80,0	80,0	36,9	59,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	47,7
59	PB21-01-02	32,6	74,0	49,0	75,5	44,1	30,8	58,3	57,9	41,1	55,7	35,2	58,0	25,8	74,5	82,0	34,9	56,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,3
60	PB21-02	31,8	85,0	57,9	78,5	36,1	39,9	55,9	49,1	43,7	53,1	37,5	94,0	31,6	79,6	81,9	40,9	51,0	12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	43,6
61	PB21-02-01	30,2	73,0	35,3	67,5	38,9	27,0	64,5	87,0	85,5	88,3	86,5	58,0	21,1	57,7	69,4	24,3	68,6	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,0
62	PB21-02-02	28,4	58,0	36,1	91,0	46,2	32,4	60,5	64,9	55,8	63,2	50,6	69,7	25,7	79,1	79,0	32,4	49,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	41,9
63	PB22-01	26,1	54,0	59,8	67,0	29,7	36,4	55,6	57,8	54,7	60,5	56,9	84,0	28,6	81,1	82,3	29,5	54,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	41,8
64	PB22-01-01	24,2	64,0	40,9	65,3	32,3	25,9	64,1	79,7	72,4	78,7	71,0	93,0	20,5	79,1	81,2	28,1	60,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	44,6
65	PB23-01	23,2	73,0	43,0	70,5	45,7	40,3	57,4	62,8	51,4	61,2	44,9	75,7	31,7	81,7	81,4	35,6	64,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,9
66	PB23-01-01	23,8	68,0	49,1	80,0	32,2	27,7	58,2	51,9	48,3	58,9	48,8	84,6	21,1	80,1	80,2	33,2	55,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	41,0
67	PB23-01-02	37,8	49,0	35,5	75,8	38,8	36,8	65,0	82,7	76,4	82,6	76,4	67,0	28,9	78,4	81,8	38,1	59,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,9
68	PB23-02	60,3	85,0	37,8	77,8	36,5	40,9	57,6	62,1	49,6	59,6	44,0	85,0	30,0	79,9	81,2	39,3	58,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	44,8
69	PB23-02-01	61,2	74,0	58,6	59,5	33,6	30,2	61,8	53,5	50,7	55,2	49,3	75,0	22,3	63,6	73,9	27,3	78,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,2
70	PB23-02-02	57,4	73,0	53,6	86,5	35,3	37,5	60,3	79,4	73,7	79,1	73,0	63,0	27,9	79,3	79,8	37,3	73,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	48,6
71	PB24-01	68,4	47,0	56,7	76,0	41,9	35,3	55,2	65,2	57,0	62,5	50,8	46,0	25,8	69,5	75,0	27,3	65,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,1
72	PB24-01-01	66,8	56,0	66,6	69,5	42,2	30,5	59,0	55,9	53,6	61,9	55,7	36,0	22,7	78,8	80,1	30,2	62,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,2
73	PB24-01-02	61,3	58,0	61,1	48,0	42,7	42,2	59,9	84,4	78,5	84,0	78,3	25,0	31,0	81,0	81,6	31,7	57,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,7

Tabela 18 – Reação de diferentes espécies e cultivares de planta da família Brassicaceae perante diversos isolados selvagem e monosporicos de *Plasmodiophora brassicae*, expressa em Índice de Agressividade (IA) e Índice de Severidade (IS). - *Continuação*

74	PB24-02	72,9	68,0	62,7	47,5	46,1	28,1	62,6	81,2	81,2	81,2	81,2	42,0	20,3	79,5	80,7	30,5	48,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	46,1
75	PB24-02-01	77,0	49,0	71,3	43,0	47,5	41,2	63,6	70,0	70,0	70,0	70,0	35,0	30,3	79,8	81,1	39,6	63,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,5
76	PB24-02-02	73,5	75,0	78,5	56,5	43,0	38,7	64,8	83,2	79,6	83,7	79,7	86,0	26,7	80,0	80,6	38,1	61,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	51,3
77	PB9	44,2	86,0	75,0	43,5	52,2	33,9	65,7	65,1	56,4	62,8	50,7	74,0	24,1	69,1	78,0	31,1	85,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,3
78	PB9-01	37,3	95,0	78,1	82,0	54,0	43,0	63,2	56,8	54,2	61,2	56,3	56,0	29,7	79,4	80,9	39,1	64,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	46,9
79	PB9-02	44,4	78,0	48,9	81,5	51,0	34,6	66,6	82,1	75,4	81,4	74,7	31,0	23,4	63,6	72,2	25,8	52,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	44,9
	IS médio	46,9	65,9	50,5	66,9	40,3	28,8	60,3	62,5	55,7	65,4	51,2	65,5	25,7	75,2	78,4	31,0	62,2	0,3	0,1	0,0	1,0	0,0	

Tabela 15 – Grupos patogênicos e seus respectivos isolados.

Grupo	Isolados
01	1; 7; 10; 15; 16; 29
02	11; 78; 67; 63; 59; 57; 55; 49; 39; 37; 62; 68; 34; 33; 42; 31; 70; 71; 44; 27; 50; 41; 47; 23; 52; 21; 36; 19; 18; 60; 73; 75; 12; 13
03	45
04	24
05	51; 69; 74; 53; 79; 77; 72; 58; 54
06	61
07	64; 66
08	65
09	2; 3; 5; 6; 14; 30; 35; 43
10	4; 8; 9; 17; 20; 22; 25; 56; 26; 28; 32; 48; 46; 38; 40

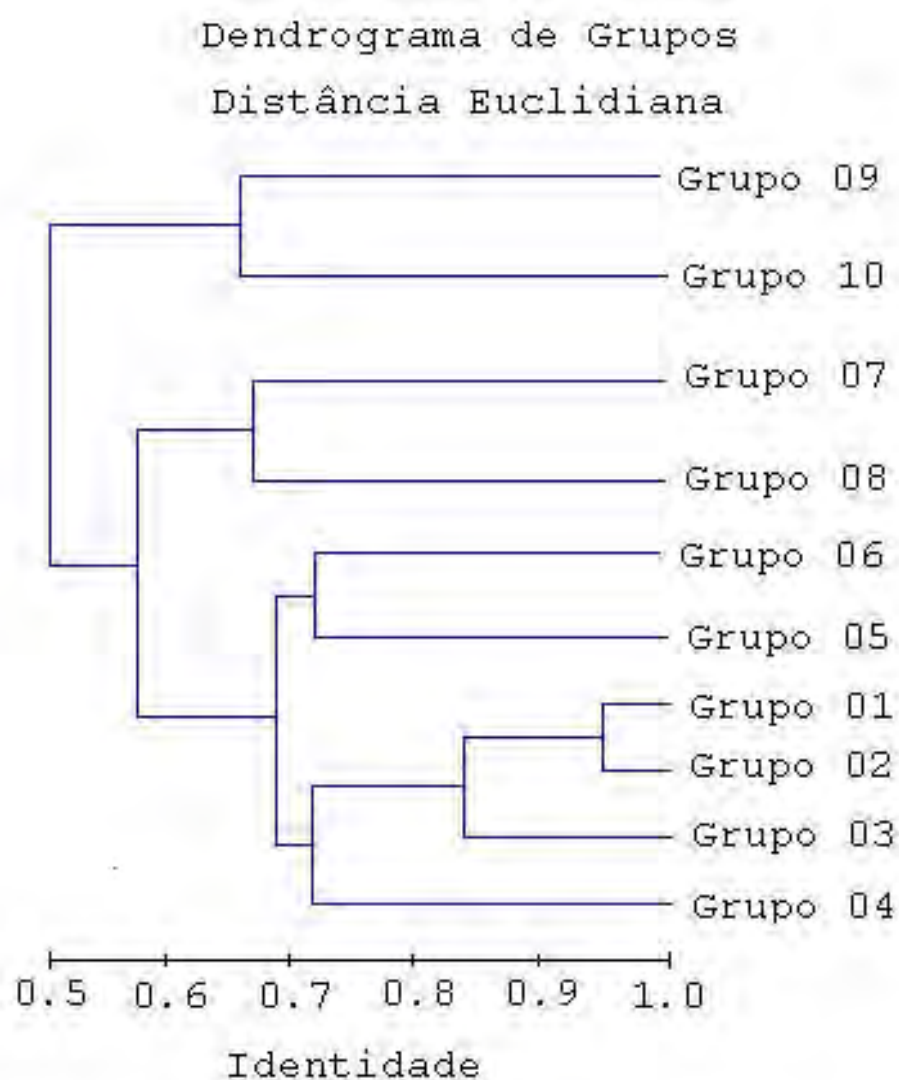


Figura 23 – Dendrograma de grupos patogênicos, gerado a partir do agrupamento dos Índices de agressividade dos isolados de *Plasmodiophora brassicae* perante as diferentes espécies e cultivares de plantas da família Brassicaceae.

8. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos para verificação dos específicos gerais e específicos do projeto, pode-se concluir que:

- Existem raças patogênicas de *Plasmodiophora brassicae* no Estado de São Paulo;
- A utilização de variedades comerciais se mostrou eficientes para a diferenciação das raças de *Plasmodiophora brassicae* encontradas no Estado de São Paulo;
- Existe grande variabilidade genética inter e intra populacional em *P. brassicae* verificada via RAPD;
- A região ITS-5.8S rDNA de *P.brassicae* é altamente conservada e com baixíssima variabilidade entre isolados isolados;
- O gene EL-1 α não é indicado para uso em *P.brassicae*;
- Exsudatos radiculares de 8 espécies de plantas, não brassicas, estimulam a germinação do esporo de resistência de *P.brassicae*, sendo o maior estímulo proveniente da planta de coentro.
- Existem espécies de plantas não brassicacea que estimula a germinação dos esporos de resistência de *P.brassicae* e que pode ser utilizada para futuros estudos em rotação de cultura, visando um controle sobre o patógeno, sendo uma delas o Coentro (*Coriandrum sativum*);
- O levantamento sistematico demonstrou que a doença esta em maior incidencia no Estado de São Paulo do que a literatura citava, apresentando uma média para o estado de 5,93% de incidência.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL 2009: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comercio, 504p., 2009.

ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York, John Wiley & Sons, Inc. 869p. (4th. Edit.), 1996.

ANDRADE, J. F.; LIMA, MILTON L. PAZ; NOGUEIRA, N. L. *Plasmodiophora brassicae* Wor. um novo patógeno infectando Eruca sativa Millcruciferae. In: **Anais** do XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia & XI Congresso Latino-Americano de Fitopatologia, 2001, São Pedro - SP. Fitopatologia Brasileira, v. 26. p. 446-446, 2001.

ASANO, T.; KODAMA, A.; KAGEYAMA, K. Susceptibility of hairy root lines of Brassica species to *Plasmodiophora brassicae* and in an in vitro subculture system **J Gen Plant Pathol** 72:85–91, 2006.

BUCZACKI, S. T., H. TOXOPEUS, P. MATTUSCH, T. D. JOHNSTON, G. R. DIXON, L. A. HOBOLTH: Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: proposals for attempted rationalization through an international approach. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 65, 295–303. 1975.

BUHARIWALLA, H., S. GREAVES, R. MAGRATH, R. MITHEN: Development of specific PCR primers for amplification of polymorphic DNA from the obligate root pathogen *Plasmodiophora brassicae*. **Physiol. Mol. Plant-Path.** 47, 83–94. 1995.

CHEN, D., R.S. ZEIGLER, H. LEUNG, AND R.J. NELSON. Population structure of *Pyricularia grisea* at two screening sites in the Philippines. **Phytopathology** 85: 1011-1020., 1995.

CRUTE, I. R., A. R. GRAY, P. CRISP, S. T. BUCZACKI: Variation in *Plasmodiophora brassicae* and resistance to clubroot disease in Brassicas and allied crops – a critical review. **Plant Breed. Abstracts** 50, 91–104. 1980.

CRUTE, I., D. A. C. PINK: The characteristics and inheritance of resistance to clubroot in *Brassica oleracea*. **Aspects Appl. Biol.** 23, 57–60. 1989.

CRUZ, J.C.S. **Preservação, caracterização patogênica e molecular de *Plasmodiophora brassicae*, agente causal da hérnia das crucíferas.** Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 2007.

DOBSON, R.; GABRIELSON, R.L.; BAKER, A.S.. Soil water matric potential requirements for root-hair and cortical infection of Chinese cabbage by *Plasmodiophora brassicae*, *Phytopathology* 72, pp. 1598–1600. 1982.

DYLEWSKI, D.P. Phylum Plasmodiophoromycota.. In Margulis, L., Corliss, J., Melkonian, M. & Chapman, C.J. eds. **Handbook of Protoctista**. Boston, Jones & Bartlett Pubs., 399-416, 1990.

EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M.C, GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research** 8:175-185. 1998.

FAGGIAN R, BULMAN SR, LAWRIE AC, PORTER IJ. Specific polymerase chain reaction primers for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil and water. **Phytopathology**. 89: 392–397. 1999.

FÄHLING, M. H. GRAF, J. SIEMENS Pathotype Separation of *Plasmodiophora brassicae* by the Host **Plant Journal of Phytopathology** 151 (7-8), 425–430. 2003.

FÄHLING, M.H. GRAF AND J. SIEMENS. (2004) Characterization of a Single-Spore Isolate Population of *Plasmodiophora brassicae* Resulting from a Single Club. **Journal of Phytopathology** 152:7, 438–444

FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. 412 p.

GEMTCHÚJNICOV, I. D. 1976. **Manual de taxonomia vegetal: plantas de interesse econômico**. São Paulo, Agronômica Ceres. 368 p.

GORDON, D., C. ABAJIAN, AND P. GREEN. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**. 8:195-202 1998.

GOTTWALD, T. R.; CAMBRA, M; MORENO, P; CAMARASA, E; PIQUER, J. Spatial and temporal analyses of citrus tristeza virus in eastern Spain. **Phytopathology** 86:45-55, 1996.

GRAVELAND, R, DALE, P, MITHEN, R (1992) Gall development in hairy root cultures infected with *Plasmodiophora brassicae* **Mycol Res** 96: 225-228

HARDING,M.W. HOWARD,R.J. NEESER,C. STRELKOV,S.E. TEWARI, J.P. . LISOWSKI,S.L.I SLOMP,D.L. XUE, S. AND SPENCER. R.C.J. 2005. Incidence of clubroot on cruciferous vegetables in Alberta in 2005. **Can. Plant Dis. Surv.** 85:98-99.

JONES, D. R., D. S. INGRAM, G. R. DIXON (1982a): Factors affecting tests for differential pathogenicity in populations of *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Path.** 31, 229–238.

JONES, D. R., D. S. INGRAM, G. R. DIXON (1982b): Characterization of isolates derived from single resting spores of *Plasmodiophora brassicae* and studies of their interaction. **Plant Path.** 31, 239–246.

KLEWER, A., H. LUERßEN, H. GRAF, J. SIEMENS (2001): Restriction fragment length polymorphism markers to characterize *Plasmodiophora brassicae* single-spore isolates with different virulence patterns. **J. Phytopath.** 149, 121–127.

KROLL, TK, LACY, GH, MOORE, LD (1984) A quantitative description of the colonization of susceptible and resistant radish plants by *Plasmodiophora brassicae* **Phytopathol Z** 108: 97-105

KUGINUKI, Y.; YOSHIKAWA, H.; HIRAI, M. (1999) Variation in virulence of *Plasmodiophora brassicae* in Japan tested with clubroot-resistant cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) **Eur J Plant Pathol** 105: 327-332

LUDWIG-MÜLLER, J, BENNETT, RN, KIDDLE, G, IHM IG, S, RUPPEL, M, HILGENBERG, W (1999) "The host range of *Plasmodiophora brassicae* and its relationship to endogenous glucosinolate content" **New Phytologist** 141: 443-458

MACFARLANE, I (1952) "Factors affecting the survival of *Plasmodiophora brassicae* Wor. in the soil and its assessment by a host test" **Annals of Applied Biology** 39: 239-256

MADDEN L.V.; NAULT, L.R.; MURRAL, D.J; APELT, M.R. Spatial pattern analysis of the incidence of aster yellows disease in lettuce. **Res. Popul. Ecol.** 37:279-89., 1995.

MANZANARES-DAULEUX, M. J., I. DIVARET, F. BARON, G. THOMAS (2001): Assessment of biological and molecular variability between and within field isolates of *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Pathol.** 50, 165–173.

MANZANARES-DAULEUX, M. J., P. BARRET, G. THOMAS (2000): Development of a pathotype specific SCAR marker in *Plasmodiophora brassicae*. **Eur. J. Plant Pathol.** 106, 781–787.

MARINGONI, A. C. Doenças das crucíferas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Org.). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4ed ed. São Paulo: Editora agronômica Ceres, 2005, v. v2, p. 285-291.

NAIKI, T, DIXON, GR, IKEGAMI, H (1987) "Quantitative estimation of spore germination of *Plasmodiophora brassicae*" **Transactions of the British Mycological Society** 89: 569-609

ROHLF, F. J. NTSYS-PC version 1.7. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter Software Publ. Setauket, New York. 1993

SAITOU, N.; NEI, M.. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Mol. Biol. Evol.**, 4(4), 406-425, 1987.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, T. MANIATIS (1989): Molecular Cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press. .

TAYLOR, L.R. Aggregation, variance and the mean. **Nature** 189:732-735, 1961

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n.24, p.4876-4882, 1997.

TOMMERUP, IC, INGRAM, DS (1970) The life cycle of *Plasmodiophora brassicae* Wor. in Brassica tissue cultures and in intact roots **New Phytol** 70: 327-332

WALLENHAMMAR, A-C (1996) "Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation level" **Plant Pathology** 45: 710-719

WHITER, T. J. Amplification and direct sequencing of fungal ribossomical RNA gene for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., White, T. J. PCR protocols, a guide to methods and applications. San Diego: Academics Press, p. 315-322, 1990.

WILLIAMS, P. H. (1966): A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga. **Phytopathol.** 56, 624-626.

YAMAGISHI, H, YOSHIKAWA, H, ASHIZAWA, M, HIDA, K, YUI, S. Effects of resistant plants as a catch crop on the reduction of resting spores of clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Worn.) in soil **J Japan Soc Hort Sci** 54: 460-466, 1986.