

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**PRESERVAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA E
MOLECULAR DE *Plasmodiophora brassicae*, AGENTE CAUSAL DA
HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS**

JULIANA CRISTINA SODÁRIO CRUZ

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

BOTUCATU-SP
Dezembro – 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**PRESERVAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA E
MOLECULAR DE *Plasmodiophora brassicae*, AGENTE CAUSAL DA
HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS**

JULIANA CRISTINA SODÁRIO CRUZ

Orientador: Edson Luiz Furtado

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

BOTUCATU-SP
Dezembro – 2007

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

C957p Cruz, Juliana Cristina Sodário, 1975-
Preservação, caracterização patogênica e molecular de *Plasmodiophora brassicae*, agente causal da hérnia das crucíferas / Juliana Cristina Sodário Cruz. - Botucatu : [s.n.], 2007.
viii, 65 f. : il. color., tabs.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2007
Orientador: Edson Luiz Furtado
Inclui bibliografia

1. Patogenicidade. 2. Genética molecular. 3. Brassica. 5. *Plasmodiophora brassicae*. I. Furtado, Edson Luiz. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

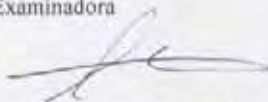
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "PRESERVAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PATOGENICA E MOLECULAR
DE *Plasmodiophora brassicae*, AGENTE CAUSAL DA HÉRNIA DAS
CRUCÍFERAS"

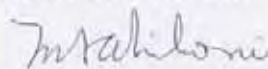
ALUNA: JULIANA CRISTINA SODÁRIO CRUZ

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

Aprovado pela Comissão Examinadora



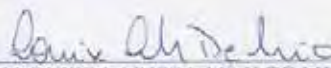
PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



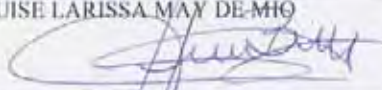
PROF. DR. MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI



DR. ROMULO FUJITO KOBORI



DR. LOUISE LARISSA MAY DE MELO



DR. CÉSAR JÚNIOR BUENO

Data da Realização: 18 de dezembro de 2007.

"Encontrar-se após momentos ou vidas é certo para os que são amigos..."

À memória do Prof. Dr. Nilton Luiz de Souza, que não passou pela vida em vão.

Seus exemplos de alegria e dedicação serão SEMPRE lembrados e seguidos por todos seus alunos que tiveram o privilégio de serem, antes de tudo, amigos e colegas de profissão.

DEDICO

Ofereço

*Aos meus pais Benedito e Ângela e meus irmãos
Rodrigo e Mariana pelo apoio e principalmente, por
valorizarem a educação e terem acreditado em meu
potencial.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Furtado, por ter me acolhido e aceitado me orientar em um momento tão delicado, e também pelas contribuições e amizade.

Ao Curso de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, da UNESP/FCA, pela oportunidade concedida e ao seu corpo docente pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao meu noivo Bolivar Pimenta Júnior, pela paciência, apoio e compreensão nos momentos de ausência.

Aos amigos Andréia, Daniel, Marco, Luciana, Lina, Cecília, Renata, Paola, Michele, César, Alnusa e Maria Júlia, pela ajuda, convívio e momentos alegres durante o curso.

Aos amigos da APTA Regional Centro Oeste: Elisangela, Glauber, Marcelo, Marcos, Valdir, Geraldo e Leriane pela compreensão.

Aos funcionários da Biblioteca da UNESP/FCA pela amizade, atenção e disposição constantes.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo durante o período inicial do curso.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1. <i>Plasmodiophora brassicae</i>	6
3.2. Principais formas de controle <i>Plasmodiophora brassicae</i>	9
3.3. Biologia molecular no estudo de <i>Plasmodiophora brassicae</i>	13
CAPÍTULO 1.....	16
Preservação de <i>Plasmodiophora brassicae</i> pelo método de congelamento.....	17
Resumo.....	17
Abstract.....	18
Referências Bibliográficas.....	23
CAPÍTULO 2.....	26
Caracterização patogênica e molecular de <i>Plasmodiophora brassicae</i>	27
Resumo.....	27
Abstract.....	28
Introdução.....	29
Material e Métodos.....	31
Resultados e Discussão.....	37
Referências Bibliográficas.....	44
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	57

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Raízes de couve-chinesa ilustrando a escala de notas utilizada na avaliação da severidade da doença causada por *Plasmodiophora brassicae*..... 54
- Figura 2. Padrão de bandas de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), com os “primers” A: OPA2 e B: OPB10, de isolados de *Plasmodiophora brassicae* causadores da hérnia das crucíferas.
..... 55
- Figura 3. Árvore filogenética não enraizada de isolados de *Plasmodiophora brassicae*, gerada pelo agrupamento UPGMA..... 56

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Mediana e semi-amplitude total da severidade de <i>Plasmodiophora brassicae</i> em <i>Brassica rapa</i> spp. <i>pekinensis</i> , cv. Pak choi, preservado em diferentes períodos (dias), pelo método de congelamento em “freezer”	25
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Descrição dos isolados de <i>Plasmodiophora brassicae</i> conforme local, data e hospedeiro coletado.....	49
Tabela 2. Análise química dos solos utilizados nos ensaios de severidade (I e II) de <i>Plasmodiophora brassicae</i> em casa de vegetação.....	50
Tabela 3. Mediana e semi-amplitude total da severidade de isolados de <i>Plasmodiophora brassicae</i> em diferentes hospedeiros (brássicas). Ensaio I (28/07/06 a 01/09/06).....	47
Tabela 4. Mediana e semi-amplitude total da severidade de isolados de <i>Plasmodiophora brassicae</i> em diferentes hospedeiros (brássicas). Ensaio II (25/09/06 a 30/10/06).....	51
Tabela 5. Severidade de isolados de <i>Plasmodiophora brassicae</i> , em diferentes hospedeiros e épocas de ensaio (I e II).....	52
Tabela 6. Similaridade genética entre os isolados de <i>Plasmodiophora brassicae</i> gerada a partir de bandas polimórficas obtidas por RAPD.....	53

PRESERVAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA E MOLECULAR DE *Plasmodiophora brassicae*, AGENTE CAUSAL DA HÉRNIA DAS CRUCÍFERAS. Botucatu, 2007. 65p. Tese (Doutorado em Agronomia / Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Autor: JULIANA CRISTINA SODÁRIO CRUZ

Orientador: EDSON LUIZ FURTADO

1. RESUMO

A doença conhecida por hérnia das crucíferas é causada pelo patógeno *Plasmodiophora brassicae* Woronin, sendo uma das mais importantes e de difícil controle em brássicas. Em virtude da dificuldade de preservação das estruturas de resistência de *P. brassicae* em condições laboratoriais, por se tratar de um parasita obrigatório, foi desenvolvido um ensaio visando a obtenção de uma técnica eficiente e prática de preservação. Para isto, raízes de diferentes brássicas naturalmente infectadas por *P. brassicae*, contendo hérnias, foram coletadas de uma mesma propriedade (município de Pardinho - SP), em diferentes períodos, e imediatamente congeladas em freezer a $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os tratamentos

foram: T1: hérnias congeladas por 389 dias, (rúcula); T2: hérnias congeladas por 242 dias (brócolis); T3: hérnias congeladas por 21 dias (couve-chinesa) e T4: testemunha (sem inóculo). Os testes de patogenicidade, após os diferentes períodos de armazenamento, foram realizados em condições controladas de casa de vegetação ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), onde em cada planta, de uma variedade suscetível de couve-chinesa (Pak choi), foi inoculado 2mL da suspensão de esporos, dos diferentes tratamentos, na concentração de 10^7 esporos.mL⁻¹. Cada tratamento contou com seis repetições distribuídas ao acaso. Passadas cinco semanas, após a inoculação, as raízes foram lavadas e avaliadas.

Houve diferença estatística significativa entre os materiais avaliados quanto aos diferentes períodos de armazenamento em “freezer”. Os materiais congelados entre 21 a 242 dias preservaram suas características infectivas, sendo este método uma boa opção para a preservação das estruturas de repouso nesse período.

Foram realizados testes de patogenicidade e análises moleculares de populações de *P. brassicae*, obtidas de raízes infectadas de várias regiões produtoras no Brasil, em algumas espécies de brássicas (couve flor, couve chinesa suscetível, couve chinesa resistente, brócolis e repolho). Os testes de patogenicidade foram realizados em condições de casa de vegetação ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) mediante inoculações no colo de cada planta de 2 mL da suspensão de esporos do patógeno na concentração de 10^7 esporos.mL⁻¹. Em laboratório ocorreu a extração de DNA dessas populações e análises de PCR-RAPD para a comparação das características genéticas.

As populações obtidas das regiões de Carandaí (Estado de Minas Gerais) e Colombo (Estado do Paraná) mostraram-se mais agressivas, manifestando sintomas até mesmo em cultivares consideradas resistentes. Entretanto, não foi observado um padrão genético específico relacionando o local de origem e as populações avaliadas, o que mostra que, mesmo se encontrando em locais distantes e apresentando diferenças quanto à patogenicidade, estas populações são geneticamente semelhantes.

Palavras chave: Patógeno de solo, Brassicaceae, congelamento, patogenicidade, características genéticas, variabilidade.

PRESERVATION, PATHOGENIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Plasmodiophora brassicae*, THE CAUSAL AGENT OF THE CLUBROOT DISEASE OF CRUCIFERS. Botucatu, 2007. 65p. Tese (Doutorado em Agronomia / Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: JULIANA CRISTINA SODÁRIO CRUZ

Adviser: EDSON LUIZ FURTADO

2. SUMMARY

Disease known as clubroot of crucifers is caused by the pathogen *Plasmodiophora brassicae* Woronin, and is one of the most important and difficult control crucifer diseases in brassicas. Because of the difficulty in preserving the resistance structures of *P. brassicae* under laboratory conditions, given that it is an obligate parasite, an assay was carried out to develop a practical and effective technique that would allow further studies to be conducted. On this proposal, roots of different brassica species naturally infected by *P. brassicae* showing clubroot symptoms were collected in the some grower (Pardinho, SP-city, Brazil) during different seasons, and were immediately frozen at approximately -

20°C±2°C. The treatments were: T1: clubroots frozen for 389 days (arugula); T2: clubroots frozen for 242 days (broccoli); T3: clubroots frozen for 21 days (Chinese cabbage), and T4: control (no inoculum). The pathogenicity tests after different storage periods were conducted under controlled greenhouse conditions (25±2°C); each plant of a susceptible variety of Chinese cabbage was inoculated with 2mL of a spore suspension of the various treatments at a concentration of 10^7 spores.mL⁻¹. Each treatment consisted of six replicates distributed at random. The roots were washed and evaluated five weeks after inoculation.

There were statistical differences between the materials evaluated with respect to different storage periods in the freezer. Materials kept frozen between 21 and 242 days retained their infective traits. Therefore, this method is a good option to preserve resting spores during this period.

In addition, pathogenicity tests and molecular analyses were conducted with *P. brassicae* populations obtained from infected roots of several production regions of Brazil, on some brassica species (cauliflower, susceptible Chinese cabbage, resistant Chinese cabbage, broccoli, and cabbage). The pathogenicity tests were conducted under greenhouse conditions (25±2°C) by inoculations (2 mL) of a spore suspension of the pathogen at a concentration of 10^7 spores.mL⁻¹, applied at the root collar of each plant. DNA extraction and PCR-RAPD analyses for these populations were conducted in the laboratory to compare genetic traits.

The isolate's populations obtained from the regions of Carandaí (State of Minas Gerais) and Colombo (State of Paraná) was more aggressive, and manifested symptoms even in cultivars considered resistant. However, no specific genetic pattern was observed that would associate place of origin with the populations evaluated, demonstrating that although they come from distant localities or show differences in pathogenicity, these populations are genetically similar.

Keywords: Soilborne pathogen, Brassicaceae, freezing, pathogenicity, genetic traits, variability.

3. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

No Brasil comercializa-se anualmente cerca de 55.740 toneladas de brássicas (AGRIANUAL, 2007) produção considerada razoável visto que, em sua grande maioria, é obtida de pequenas propriedades de todo país, que enfrentam diversos problemas políticos e sociais para se manterem. Juntando-se a esses problemas, a doença hérnia das crucíferas, causada pelo patógeno *Plasmodiophora brassicae* Woronin vem gradativamente colaborando para o declínio produtivo dessas culturas.

Relatado inicialmente por Woronin (1939), essa doença há muitos anos, vem sendo estudada em vários países de clima temperado em todo o continente, sendo disseminando em locais nunca antes encontrados, como por exemplo, o Nepal, que entre os anos de 2004 e 2006, apresentou perdas de até 40% na produção de brássicas. Nessas áreas 80% das mudas já apresentam sintomas da doença no momento do transplante para o campo (Timila et al., 2008).

Viégas e Teixeira (1943) examinaram e relataram os primeiros materiais infectados por *P. brassicae* em couve manteiga (*Brassicae oleraceae* L.) no Brasil. Este material foi coletado do Horto Florestal da Cantareira em São Paulo (SP) e já nessa época foi possível visualizar os plasmódios dentro das células do hospedeiro e esporos (chamados de soros pelos autores) hialinos. A maneira como foi introduzida no País ainda é desconhecida, mas sua adaptação, ao novo ambiente, foi rápida e eficiente.

Dalla Pria et al. (2002), avaliando a ocorrência das principais doenças em Pak choi (*Brassica rapa* spp. *pekinensis*) no Estado do Paraná, não observaram maiores danos causados por *P. brassicae*, embora já houvesse sido relatada em regiões próximas e ser, esta cultivar avaliada, considerada uma das mais suscetíveis à doença.

Lima et al. (2004) analisando sintomas macro e microscópicos, apresentaram relatos de plantas de rúcula (*Eruca sativa*), naturalmente infectadas pelo patógeno, coletadas entre os anos de 2000 a 2004, nos municípios de Vargem Grande (DF) e Quatro Barras (PR). Estes autores mostraram que mesmo em condições climáticas adversas, como as encontradas no Distrito Federal, as populações presentes no País podem causar sintomas característicos e danos econômicos. Diante disso, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de estudos mais detalhados sobre alguns isolados brasileiros de *P. brassicae* oriundos de algumas regiões brasileiras de cultivo, em decorrência das poucas informações específicas, existentes atualmente na literatura, sobre o assunto.

3.1. *Plasmodiophora brassicae*

O patógeno *Plasmodiophora brassicae* Woronin pertence ao Reino Protozoa, Classe *Plasmodiophoromycetes*, Ordem *Plasmodiophorales* e Família *Plasmodiophoraceae*, segundo Barr (1992). O patógeno enquadra-se ainda no grupo dos parasitas obrigatórios. A cerca de dez anos atrás, este patógeno ainda era classificado no reino fungi por apresentar algumas características pertencentes a este reino. *P. brassicae* é responsável pela doença conhecida como hérnia das crucíferas, considerada uma das mais

sérias em todo o mundo, por causar grandes danos econômicos e queda na produção de diversas brássicas.

O ciclo de vida de *P. brassicae* é dividido em fase primária e secundária. Na fase primária, as estruturas de repouso do patógeno, em condições favoráveis de infecção, germinam originando zoósporos biflagelados e penetram nas raízes capilares transformando-se em plasmódios contendo zoosporângios, compostos de quatro a oito zoósporos. Estes podem ser liberados no solo pelos poros do hospedeiro e alguns podem se fundir, conforme sua compatibilidade genética, formando zigotos que podem causar novas infecções (Agrios, 1997).

Na fase secundária, os plasmódios produzidos nas células do hospedeiro invadem as células adjacentes, crescendo e se dividindo, o que causa hiperplasia celular e hipertrofia radicular, e conseqüentemente, a formação de hérnias nas raízes. Plasmódios maduros produzem as estruturas de repouso, que, depois da degradação das raízes do hospedeiro, são liberadas no solo reiniciando todo o ciclo (Agrios, 1997).

As estruturas de repouso também podem permanecer no interior das células das raízes do hospedeiro. Dobson e Gabrielson (1983) observaram que, após três dias da infecção, esporângios maduros e zoósporos secundários já estão desenvolvidos, quando ocorre o início da segunda fase da infecção já que os zoósporos primários não levam à formação de hérnias.

Embora *P. brassicae* seja um parasita obrigatório, Asano et al. (1999) desenvolveram maneiras de cultivo do patógeno em condições laboratoriais, por meio da desinfestação superficial de estruturas de repouso e inoculação em raízes capilares de brássicas *in vitro*, o que permite a observação do desenvolvimento de zoósporos imaturos, zoosporângios contendo zoósporos, zoosporângios parcialmente vazios e zoosporângios completamente esvaziados por microscopia eletrônica.

Asano et al. (2000), dando continuidade nos estudo de *P. brassicae*, observaram a formação de plasmódios e zoósporos jovens após quatro dias de infecção. Também observou que plasmódios primários diferenciam-se em zoosporângios de oito a 10 dias após a infecção. Outra observação foi que o auge da infecção das raízes capilares em

nabo (*Brassica rapa* var. *rapifera*) ocorre após seis dias da inoculação. Asano e Kageyma (2006) conseguiram proporcionar o crescimento de plasmódios secundários em uma suspensão de cultivo de células de brássicas, relatando que as características desses plasmódios foram iguais às dos plasmódios encontrados em raízes naturalmente infectadas.

Algumas substâncias são produzidas durante o processo de infecção do patógeno como as relatadas por Devos et al. (2006). Estes autores observaram um aumento transitório da biossíntese de auxina aos 21 dias após a infecção e, também, maior concentração do hormônio ABA (ácido abscísico), que resulta em um afrouxamento da parede celular do hospedeiro, favorecendo a sua expansão e o desenvolvimento do patógeno. Ando et al. (2006) observaram que dois genes de couve chinesa, *BrAO1* e *BrAO2*, são estimulados quando a planta é infectada por *P. brassicae*, estando envolvidos com a biossíntese de AO (Aldehyde oxidase) e a produção de auxina durante a formação de hérnias. No entanto, o gene *BRAO2* passa a ser menos ativo no final do processo infeccioso.

O patógeno também pode infectar hospedeiros alternativos não pertencentes ao grupo das brássicas, como mamão (*Carica papaya*) afetando o desenvolvimento do hospedeiro, com aumento na concentração de glucosinolatos na planta, porém não apresentando a formação de hérnias (Ludwig-Müller et al., 1999). Alguns autores também relatam o aumento da atividade de quitinases em plantas suscetíveis a *P. brassicae* quando infectadas (Ludwig-Müller et al., 1994).

Para a realização de testes de patogenicidade de isolados de *P. brassicae*, alguns autores sugerem o uso de isolados monospóricos, em virtude da heterogenidade das populações obtidas a campo. Entretanto, a porcentagem de sucesso da obtenção desses isolados é baixa, como mostrado por Scott (1985), quando, após a inoculação de 600 mudas de couve chinesa, apenas oito desenvolveram sintomas. A mesma dificuldade também foi encontrada por Somé et al. (1996) para isolados franceses, onde de 561 mudas inoculadas, apenas 54 apresentaram sintomas. Vorrips (1995) obtiveram 2 plantas com sintomas, de 164 inoculadas com apenas um esporo do patógeno.

Em decorrência do pouco conhecimento sobre os fatores que interagem na patogenicidade de *P. brassicae* com hospedeiros, bem como sobre sua recombinação

sexual, Diederichsen et al. (1996) estudando isolados monospóricos e genes de resistência de *B. napus*, sugerem que nem sempre é possível cruzar diferentes patótipos deste patógeno e que as avaliações de resistência em hospedeiros são apenas o início da caracterização das propriedades patogênicas.

O entendimento da composição de patótipos de uma população de *P. brassicae*, bem como a interação entre os esporos de diferentes patótipos, pode contribuir para o entendimento de fatores envolvidos na expressão da doença (Jones et al., 1982).

3.2. Principais formas de controle de *Plasmodiophora brassicae*

Uma das alternativas mais recomendadas para o controle de *P. brassicae* é o uso de cultivares resistentes, por ser mais eficiente e apresentar menor custo ao produtor. Algumas cultivares com maior nível de resistência a *P. brassicae* apresenta resistência poligênica, como em nabo (*Brassica rapa* var. *rapifera*). Entretanto, segundo Suwabe et al. (2003), para que esta resistência poligênica seja eficiente, nessa espécie, é necessária a presença de dois locus homozigotos (*Crr1* e *Crr2*).

Tanaka et al. (2006) relatam que cultivares de couve chinesa (*Brassica rapa* L. sbsp. *pekinensis*) resistentes podem ser infectadas por isolados de *P. brassicae*, mas eles não conseguem desenvolver a fase secundária da infecção de forma apropriada para a formação de esporos, ou seja, não conseguem desenvolver todo o ciclo da doença e, conseqüentemente, não ocorre a formação de hérnias.

Wallenhammar et al. (2000) não recomendam o uso de cultivares resistentes de uma espécie de nabo produtora de óleo (*Brassica campestris*), não cultivada no Brasil, em rotação de cultura, em áreas com solo altamente infestado por *P. brassicae*, pois, mesmo não apresentando dano econômico, podem favorecer a multiplicação de inóculo no local. Esses mesmos autores ressaltam a importância do constante monitoramento dessas espécies resistentes para acompanhar as possíveis mudanças de patogenicidade de *P. brassicae*.

Takahashi et al. (2002) mostraram que em tecidos de nabo de cultivares resistentes, ocorre um transitório aumento da enzima PAL (Phenylalanine ammonia-lyase), quando expostos a esporos de *P. brassicae*, cuja ação pode estar diretamente relacionada com a disponibilidade de cálcio no tecido, podendo dificultar a infecção. Mas os autores não explicam de maneira consistente seu modo de ação.

Sönke et al. (1998) verificaram que plantas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas, com altos níveis de viscotoxina são mais resistentes a *P. brassicae* do que plantas convencionais. Essa constatação indica que tal substância, que faz parte do grupo das tiaminas tóxicas, é capaz de restringir a infecção primária nas raízes capilares ou atua nos primeiros passos da infecção secundária, resultando em baixas taxas infectivas.

Em *Arabidopsis thaliana* também foi observado que, a resistência à *P. brassicae* é governada pelo gene *RPB1* e que apesar de ser monogênica, depende da interação deste gene com os demais de seu DNA (Fuchs e Sacristán, 1996).

Existem outras formas de manejo que também podem colaborar para o controle de *P. brassicae*, como a aplicação de CaCN_2 (cálcio cyanamida) em pré plantio, bem como a utilização de calcário calcítico (Tremblay et al., 2005) pois esses produtos estão relacionados com o aumento de pH do solo, o que desfavorece o desenvolvimento do patógeno que melhor se desenvolve em solos com pH ácido.

Donald et al. (2004) testaram a eficiência de diferentes granulometrias de cálcio cyanamida e calcário no controle da hérnia das crucíferas e verificaram que as granulações mais finas do produto, em solos contaminados da Austrália, foram mais eficientes no controle da doença e proporcionaram aumento de produção de brócolis, quando aplicado até sete dias antes do transplante das mudas.

Esses dois autores citados acima sugerem que o aumento de pH de solo não elimina o patógeno de solos contaminados, mas interfere no processo de infecção radicular ou seja, na fase inicial da doença, e que partículas mais finas dos produtos são mais eficientes por reagirem melhor com as superfícies das partículas do solo, proporcionando um aumento de pH mais eficiente. Mas o excesso de calagem também pode prejudicar os hospedeiros, impedindo a absorção de outros nutrientes pela planta, deixando-as debilitadas.

Niwa et al. (2007) também concordam que o tamanho das partículas dos materiais adicionados ao solo, para modificar seu pH, são fundamentais para o controle da *P. brassicae*, pois partículas mais finas, promovem uma distribuição mais uniforme do produto e conseqüentemente melhor uniformização do pH do solo, não sendo o cálcio adicionado, também presente em materiais orgânicos, o maior responsável pela supressividade da doença. Esses autores também relatam que nem toda a matéria orgânica adicionada ao solo é capaz de interromper o desenvolvimento de *P. brassicae*, e que os materiais ricos em cálcio promovem maior supressividade do solo, entretanto, o efeito do cálcio pode ser melhorado na presença de pH próximo à neutralidade (7,0) ou limitado em solos de pH baixo, sendo portanto o fator pH o maior responsável pelo desenvolvimento ou não da doença.

Alguns autores também já testaram a possibilidade do uso de alguns fungicidas no controle de *P. brassicae*, como, por exemplo, flusulfamide, que se mostrou ineficiente no controle do patógeno quando já estabelecido nas células corticais do hospedeiro. Isto ocorre porque o produto atua nos estágios iniciais da infecção, presumindo-se que atue na germinação de estruturas de descanso e nos zoósporos primários liberados por essas estruturas (Tanaka et al., 1999).

Os fungicidas cyazofamid e fluazinam também foram avaliados no controle de *P. brassicae*, tendo cyazofamid se mostrado mais eficiente no controle da doença em diversas brássicas. Já o fluazinam foi fitotóxico às plantas (Towley & Fox, 2003). Mitani et al. (2003) também observaram a eficiência do fungicida cyazofamid na inibição da germinação das estruturas de repouso de *P. brassicae*, quando aplicado em pré-plantio em solos infectados.

Abbasi e Lazarovits (2006) observaram que fungicidas fosforados são eficazes no controle da hérnia das crucíferas em “Bok choy” (*Brassica rapa* var. *chinensis*), em regas em pré-plantio a 0,21% do princípio ativo. Mas esse procedimento também não é economicamente viável.

Quando as estruturas de repouso de *P. brassicae* são encontradas na água de irrigação, uma opção é a utilização de cloro para reduzir sua viabilidade. Porém,

quando utilizado na quantidade acima de 200 mg Cl/L, esse produto pode reduzir o crescimento e peso fresco do rabanete (*Raphanus sativus*) (Datnoff, 1987).

Substâncias naturais também podem ser utilizadas no controle de *P. brassicae*, como o óleo de nim (*Azadirachta indica*) a 3%, em solo infestado, atuando na destruição da quitina da parede celular das estruturas de repouso do patógeno e deixando-os mais vulneráveis ao ataque de microrganismos antagônicos de solo (Bhattacharya e Pramanik, 1998).

O uso de rotação de culturas também tem mostrado ser eficiente no controle de *P. brassicae*, como por exemplo, o plantio de espinafre (*Spinacia oleracea*) e aveia (*Avena sativa*), que após serem incorporados em solo infestado, quatro semanas antes do plantio de couve chinesa, não permitiram a reprodução de estruturas de repouso, apesar de estimularem a germinação dessas estruturas (Murakami et al., 2001).

Friberg et al. (2006) não obtiveram resultado positivo quando utilizaram algumas plantas não hospedeiras (*Allium porrum*, *Secale cereale* e *Lolium perenne*) no controle de *P. brassicae*. Apesar de estas plantas produzirem exudatos que reduzem a concentração do inóculo em condições laboratoriais, os resultados foram ineficientes em condições de cultivo a campo, provavelmente em decorrência da complexidade do sistema solo-planta, que é diferente das condições controladas de laboratório.

O pré-plantio de algumas plantas medicinais pode reduzir significativamente o potencial ativo de inóculo de *P. brassicae* no solo, principalmente quando se utiliza alfavaca (*Ocimum basilicum* L.), menta (*Mentha piperita* L.) e salsa (*Petroselinum hortense* Hoffm), antes do cultivo de rúcula (*Eruca sativa*), em rotação de culturas (Hasse et al., 2007).

Murakami et al. (2000a) obtiveram redução de 71% no número de estruturas de repouso de *P. brassicae* em solo quando pré cultivado com *Raphanus sativus* var. *longipinnatus*, pois esta planta funcionou como “planta isca”, ou seja, as raízes capilares deste hospedeiro foram infectadas pelas estruturas de repouso do patógeno, mas não desenvolveram sintomas, resultando na redução de produção dessas estruturas e seu retorno

ao solo e conseqüentemente, na redução do desenvolvimento da doença em planta suscetíveis de couve-chinesa cultivadas.

A possibilidade do uso de algumas técnicas alternativas no controle de *P. brassicae* também é possível, como o uso do fungo *Heteroconium chaetospira* em pré-tratamento em raízes de mudas de couve-chinesa. Esse fungo é capaz de penetrar nos tecidos da epiderme do hospedeiro, sendo independente das interações microbianas do solo que ocorrem do lado de fora desses tecidos. Entretanto, a técnica somente será eficiente quando a concentração do patógeno no solo for aproximadamente 10^5 esporos. g^{-1} (Narisawa, et al., 2005). Narisawa et al. (2000) também obtiveram bons resultados com a utilização de *Heteroconium chaetospira* no controle do patógeno, tendo obtido redução de até 97% no índice de severidade da doença em couve-chinesa, em um ensaio de campo no Japão.

O fungo *Phoma glomerata*, extraído da superfície foliar de *Viola* sp. também se mostrou eficiente na supressão de *P. brassicae*, em decorrência da produção e ação da substância epoxydon, que possui propriedades antitumorais em plantas, atuando como uma substância anti-auxina, e dessa forma, impedindo o desenvolvimento da doença mesmo em plantas que possuem grandes quantidades dessa substância em seus tecidos (Arie et al., 1998).

Tome et al. (2007) testando a ação da esterilização de solos quanto à severidade de *P. brassicae* em Brazlândia (DF), verificaram que solos esterilizados apresentaram maior peso fresco de hérnias e que a comunidade biológica, presente em solos não esterilizados e destruída durante a esterilização, é importante no controle deste patógeno. Murakami et al. (2000b) ressaltam que os fatores envolvidos na supressividade de *P. brassicae* variam conforme a concentração de inóculo e não dependem somente de fatores bióticos, mas também abióticos de solo.

3.3. Biologia molecular no estudo de *Plasmodiophora brassicae*

Alguns trabalhos relatam a viabilidade do uso de técnicas da biologia molecular na tentativa de se obterem maiores informações sobre o ciclo de vida de *P.*

brassicae, visto que se trata de um parasita obrigatório, de difícil multiplicação em laboratório, o que muitas vezes dificulta a realização de trabalhos mais detalhados sobre o patógeno.

Ito et al. (2001), por meio da análise de PCR-RAPD (Random amplified polymorphic) e diferentes primers, bem como a análise de RNA de *P. brassicae*, verificaram que alguns genes podem ser expressos diferenciadamente em períodos durante o processo de respostas de suscetibilidade e resistência em couve chinesa. Bulman et al. (2006) também relataram a identificação de genes específicos que atuam no processo de infecção do patógeno, através da análise do RNA de *Plasmodiophora brassicae*.

Com o uso do PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism), Föhling et al. (2004) detectaram a habilidade de *Plasmodiophora brassicae* rearranjar seus cromossomos sem realizar uma recombinação sexual em isolados monospóricos, durante o ciclo de infecção no hospedeiro. Graf et al. (2004), avaliando isolados monospóricos de *P. brassicae* observou que é possível a diferenciação de patótipos de vários isolados do patógeno, mediante a hibridização de específicos fragmentos do DNA em combinação com marcadores moleculares de RFLP.

A amplificação de bandas de DNA de *P. brassicae* com primers arbitrários e com a utilização da técnica de PCR-RAPD tem dificultado a interpretação dos resultados obtidos, em razão da possível contaminação do DNA de estruturas de descanso do patógeno com o DNA do hospedeiro. Mas com a técnica desenvolvida por Buhariwalla e colaboradores (1995), mediante digestão química das paredes das estruturas de descanso, a contaminação foi minimizada e, juntamente com a utilização de primers específicos, podem proporcionar melhor entendimento sobre os genes de virulência do patógeno.

Deste modo, em decorrência das poucas informações existentes sobre as populações brasileiras de *P. brassicae*, o presente trabalho tem por objetivo obter maiores informações que colaborem para o controle da doença hérnia das crucíferas no país. Para tanto, a tese foi dividida em dois capítulos, redigidos conforme as normas da revista *Summa Phytopathologica*, sendo o primeiro deles intitulado “Preservação de *Plasmodiophora*

brassicae pelo método de congelamento” e o segundo capítulo com o título “Caracterização patogênica e molecular de *Plasmodiophora brassicae*”.

CAPÍTULO 01

Preservação de *Plasmodiophora brassicae* pelo método de congelamento

Preservação de *Plasmodiophora brassicae* pelo método de congelamento

Juliana Cristina Sodário Cruz¹, Nilton Luiz de Souza², Carlos Roberto Padovani³, Edson Luiz Furtado²

¹APTA Pólo Centro Oeste, Rodovia SP 304, Km 304, CP 66, CEP 17201-970, Jaú, SP, cruzjcs@apta.sp.gov.br; ²Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, CP 237, CEP 18603-970, Botucatu, SP, Bolsista do CNPq; ³Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, UNESP, CEP 18618-600, Botucatu, SP. Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

Autor para correspondência: Juliana Cristina Sodário Cruz

Data de chegada: / /2007. Aceito para publicação em: / /

RESUMO

Cruz, J.C.S.; Souza, N.L.; Padovani, C.R.; Furtado, E.L. Preservação de *Plasmodiophora brassicae* pelo método de congelamento. *Summa Phytopathologica*, v. , n. , p. , 2007.

A preservação das estruturas de repouso de *Plasmodiophora brassicae*, em condições laboratoriais, é dificultada pelo fato de se tratar de um parasita obrigatório. Diante deste impasse, foi testado o método de congelamento com o objetivo de viabilizar a sobrevivência e a preservação de suas características infectivas para a realização de outros estudos. Desta forma, raízes de diferentes brássicas naturalmente infectadas por *P. brassicae*, contendo sintomas típicos de hérnia, de uma mesma propriedade (região de Pardinho-SP), foram coletadas em diferentes épocas e imediatamente congeladas em “freezer” a aproximadamente -20°C. Os tratamentos foram divididos da seguinte maneira: T1: hérnias congeladas por 389 dias (rúcula); T2: hérnias congeladas por 242 dias (brócolis); T3: hérnias congeladas por 21

dias (couve chinesa) e T4: testemunha (plantas sem inóculo). Os testes de patogenicidade foram realizados em condições de casa de vegetação ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), onde cada planta, de uma variedade suscetível de couve-chinesa (Pak choi), foi inoculada com 2mL da suspensão de esporos de cada tratamento na concentração de 10^7 esporos mL^{-1} . Cada tratamento contou com seis repetições distribuídas em blocos ao acaso. Passadas cinco semanas após a inoculação, as raízes foram lavadas e avaliadas. Houve diferença estatística entre os tratamentos, onde os materiais congelados no período de 21 a 242 dias preservaram suas características patogênicas, mostrando que o método de congelamento em freezer é uma boa opção para a preservação das estruturas de repouso deste patógeno.

Palavras chave adicionais: Hérnia das crucíferas, patógeno de solo, patogenicidade

ABSTRACT

Cruz, J.C.S.; Souza, N.L.; Padovani, C.R.; Furtado, E.L. Preservation of *Plasmodiophora brassicae* by freezing method. *Summa Phytopathologica*, v. , n. , p. , 2007.

The preservation of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* under laboratory conditions is difficult to achieve, since this is an obligate parasite. In order to resolve this impasse, the freezing method (using an ordinary household freezer) was tested to ensure the pathogen's survival and the preservation of its infective traits, allowing the conduction of other studies. Thus, roots of different brassica species naturally infected by *P. brassicae*, showing typical clubroot symptoms, sampled in the same property (region of Pardinho, SP, Brazil), were collected during different seasons and were immediately frozen at approximately -20°C . The treatments were divided as follows: T1: clubroots frozen for 389 days (arugula); T2: clubroots frozen for 242 days (broccoli); T3: clubroots frozen for 21 days

(Chinese cabbage), and T4: control (plants without inoculum). The pathogenicity tests were conducted under greenhouse conditions ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$); each plant of a susceptible variety of Chinese cabbage (Pak choi) was inoculated with 2mL of a spore suspension of each treatment at a concentration of 10^7 spores.mL⁻¹. Each treatment consisted of six replicates distributed in random blocks. The roots were washed and evaluated five weeks after inoculation. There were statistical differences between treatments. The frozen materials preserved their pathogenic traits over a period of 21 to 242 days, demonstrating that the freezing method is a good option to preserve the resting spores of this pathogen.

Additional key words: Clubroot, soilborne pathogen, pathogenicity

A utilização de cultivares resistentes é uma das técnicas mais eficientes no controle de *Plasmodiophora brassicae*, patógeno responsável pela doença conhecida como Hérnia das Crucíferas, causadora de grandes prejuízos em diversas áreas cultivadas, principalmente em regiões de clima temperado. Os danos estão relacionados à formação de hérnias radiculares, decorrente da infecção, que acaba por impedir a absorção de água e nutrientes pela planta.

Alguns trabalhos relatam que a patogenicidade de *P. brassicae* não é muito prejudicada quando suas estruturas de resistência (esporos de descanso) são expostas a altas temperaturas, seja através da solarização (6), durante o processo de compostagem (3), ou em testes laboratoriais (9). Entretanto, apesar de ser um patógeno que se desenvolve bem em climas mais frios, pouco se sabe sobre seu comportamento após longos períodos de exposição a baixas temperaturas.

Por se tratar de um patógeno biotrófico, sua manipulação em laboratório é dificultada, embora alguns raros trabalhos relatem a possibilidade de seu desenvolvimento em condições

laboratoriais *in vitro* (2), o que permite a observação e melhor entendimento de suas estruturas de resistência, que geralmente são mantidas em hospedeiros (*in vivo*), em programas de melhoramento vegetal.

Quando o patógeno é armazenado *in vivo*, uma das grandes dificuldades enfrentadas por fitopatologistas e melhoristas de brássicas, são as condições climáticas adversas encontradas no cultivo dos hospedeiros, visto que as condições ambientais tropicais brasileiras e os manejos realizados nas culturas, como alteração de pH do solo, nem sempre permitem o desenvolvimento da doença.

O ciclo de vida de *P. brassicae* é dividido em fase primária e secundária. Na primária, estruturas de repouso do patógeno penetram nas raízes capilares transformando-se em plasmódios contendo zoosporângios, compostos por quatro a oito zoósporos. Esses zoósporos podem ser liberados pelos poros do hospedeiro e alguns se fundem, formando zigotos que podem causar novas infecções. Na fase secundária, os plasmódios produzidos nas células do hospedeiro invadem as células adjacentes, crescendo e se dividindo, o que causa hipertrofia e formação de hérnias. Plasmódios maduros produzem as estruturas de repouso que, depois da degradação do sistema radicular são liberados no solo, reiniciando o ciclo (1).

Em virtude da complexidade do ciclo de vida do patógeno, uma alternativa prática e viável seria o armazenamento de hérnias coletadas, que veiculam as estruturas de repouso, sob condições especiais de armazenamento, como o congelamento em “freezer”, por apresentar maior praticidade e por ter sido eficiente na preservação de outros fitopatógenos (4, 5).

Diante disso, com o objetivo de determinar o período de congelamento mais adequado para a preservação das estruturas de resistência de *P. brassicae*, mudas de couve-chinesa

(*Brassica rapa* spp. *pekinensis*), de uma cultivar suscetível ao patógeno (Pak choi), com quatro semanas de semeadura, foram transplantadas para vasos individuais contendo solo esterilizado e mantidos em condições parcialmente controladas de casa de vegetação ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), nas dependências do Departamento de Produção Vegetal/Defesa Fitossanitária da FCA-UNESP, Botucatu (SP).

Os isolados utilizados foram obtidos de diferentes hospedeiros (rúcula, brócolis e couve-chinesa) naturalmente infectados, de uma mesma propriedade no município de Pardinho (SP), porém coletados em diferentes épocas.

Neste teste de patogenicidade, foram utilizadas hérnias contendo as estruturas de repouso do patógeno, submetidos a diferentes períodos de congelamento em freezer comum (-20°C), definindo os seguintes tratamentos: T1: hérnias congeladas por 389 dias (rúcula); T2: hérnias congeladas por 242 dias (brócolis); T3: hérnias congeladas por 21 dias (couve-chinesa) e T4: testemunha (plantas sem inoculação).

Após o período de congelamento, as raízes contendo as hérnias foram trituradas em liquidificador, por um minuto, com água destilada. Entre as triturações dos diferentes isolados, o copo do liquidificador foi desinfestado superficialmente mediante lavagem em água corrente, com detergente comum, depois em solução de álcool a 70%, por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio a 2%, por 1 minuto, e finalmente, enxaguado em água corrente.

As suspensões obtidas foram filtradas em camadas de gaze para a retirada de fragmentos de raízes, e a concentração ajustada com o auxílio de hemacitômetro. Em seguida foram feitas inoculações no colo de cada planta, com 2 mL da suspensão de esporos de *P. brassicae* na concentração de 10^7 esporos mL^{-1} .

Cada tratamento contou com seis repetições distribuídas em blocos ao acaso. Passadas cinco semanas da inoculação, as raízes foram lavadas e avaliadas. Para tanto foi utilizada uma escala visual de notas variando de 0 a 4 (0=0%, 1=25%, 2=50%, 3=75% e 4=100%) conforme a porcentagem da área radicular afetada (8). Os dados obtidos foram analisados mediante análise de variância não – paramétrica de Kruskal-Wallis, complementada com o respectivo teste de comparações múltiplas (10).

O método de congelamento em “freezer” (-20°C) para a preservação de hérnias de *Plasmodiophora brassicae* mostrou-se prático e eficiente, concordando com Garcia et al. (3), que observaram a viabilidade do uso deste mesmo método para urediniospóros liofilizados de *Puccinia melanocephala*, sugerindo a adoção desta preservação em laboratórios de instituições de pesquisa, pois permite o desenvolvimento de estudos em épocas do ano que apresentam escassez das estruturas de resistência em condições naturais.

Utilizando esta mesma técnica, com algumas modificações, as populações avaliadas de *P. brassicae* também mantiveram a capacidade de formação de hérnias e foram preservadas por maior tempo, quando comparado ao método de preservação em plantas hospedeiras (“*in vivo*”), que geralmente ocorre durante o período do ciclo de vida do hospedeiro (aproximadamente 70 dias), proporcionando maior independência aos futuros trabalhos a serem desenvolvidos.

Passados 389 dias de congelamento, a formação de hérnias de *P. brassicae* foi consideravelmente afetada, entretanto, para os tratamentos nos quais as hérnias foram congeladas por 21 e 242 dias, a formação de hérnias não foi afetada na cultivar de couve-chinesa suscetível (Pak choi), discordando de Miller, relatado por Scott (7), que relatou a

viabilidade de estruturas de repouso diminuída quando estocadas a -10°C e -15°C, por 90 dias, e também pela possível redução de sua viabilidade quando armazenados a -20°C por 56 dias.

Desta forma, como mostra a Tabela 1, onde estão apresentados os resultados obtidos de medianas e semi-amplitude da severidade de *P. brassicae*, o período de congelamento ideal para a preservação das estruturas de repouso de *P. brassicae* deve estar por volta de 242 dias, para que as formações de hérnias, em futuros testes de severidade e resistência genética de brássicas, não sejam afetados.

Inserir Tabela 1

O congelamento das raízes infectadas por *Plasmodiophora brassicae* apresentando hérnias, é uma boa opção para a conservação das estruturas de resistência do patógeno. O período ideal de congelamento é de 21 a 242 dias, para que as características infectivas não sejam prejudicadas, devido a constatação da praticidade da técnica e do fato das características originais das populações serem preservadas, quando armazenadas a -20°C, durante o período citado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agrios, G.N. Plant diseases caused by fungi. In: **Plant Pathology**. 4. ed. São Diego: Academic Press, 1997, p. 245-406.
2. Asano, T.; Kodama, A.; Kageyama, K. Susceptibility of hairy rot lines of *Brassica* species to *Plasmodiophora brassicae* and in an in vitro subculture system. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.7 2, n. 2, p. 85-91, 2006.

3. Fayolle, L.; Noble, R.; Coventry, E.; Aime, S.; Alabouvette, C. Eradication of *Plasmodiophora brassicae* during composting of wastes. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 553-558, 2006.
4. Garcia, E.O.; Casagrande, M.V.; Rago, A.M.; Massola-Júnior, N. S. Preservação de urediniósporos de *Puccinia melanocephala*, agente causal de ferrugem em cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 152-156, 2007.
5. Kirk, W.W. Tolerance of Mycelium of different genotypes of *Phytophthora infestans* to freezing temperature for extended periods. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 11, p. 1400-1406, 2003.
6. Myers, D.F.; Campell, R.N.; Greathead, A. Thermal inactivation of *Plasmodiophora brassicae* Woron. and its attempted control by solarization in the Salinas Valley of California. **Crop Protection**, London, v. 2, n. 3, p. 325-333, 1983.
7. Scott, E.S. Production and characterization of single-spore isolates of *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 34 n. 2, 1985.
8. Takahashi, H.; Cebrian, I.T.; Souza, N.L. Inoculação de *Plasmodiophora brassicae* agente causal da “hérnia das crucíferas”. In: XXVIII Congresso Paulista de Fitopatologia, 2005, São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, suplemento, p. 17-18.
9. Takahashi, H.; Cebrian, I.T.; Souza, N.L. Inoculação e sensibilidade térmica de *Plasmodiophora brassicae* agente causal da “hérnia das crucíferas”. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2006, Salvador-BA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, suplemento, p. 138.

10. Zar, J.H. **Biostatistical analysis**, 4. ed. Paentice Hall, New Jersey, 1999, 663p.

Tabela 1. Mediana e semi-amplitude total da severidade de *Plasmodiophora brassicae* em *Brassica rapa* spp. *pekinensis*, cv. Pak choi, preservado em diferentes períodos (dias), pelo método de congelamento em “freezer”.

Dias de congelamento	389	242	21	Testemunha
Severidade da doença ⁽²⁾	0,0±0,5a ⁽¹⁾	3,0±1,0b	3,5±1,5b	0,0±0,0a

¹ Medianas seguidas pela mesma letra não diferem entre si, segundo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (P<0,001).

⁽²⁾ 0= 0% do sistema radicular afetado, 1= aproximadamente 25% do sistema radicular afetado, 2= aproximadamente 50% do sistema radicular afetado, 3= aproximadamente 75% do sistema radicular afetado e 4= 100% do sistema radicular afetado.

CAPÍTULO 02

Caracterização patogênica e molecular de

Plasmodiophora brassicae

Caracterização patogênica e molecular de *Plasmodiophora brassicae*

Juliana Cristina Sodário Cruz¹, Nilton Luiz de Souza², Andreia Kazumi Nakatani², Daniel Dias Rosa², Marco Antonio Basseto², Carlos Roberto Padovani³, Edson Luiz Furtado²

¹APTA Pólo Centro Oeste, Rodovia SP 304, Km 304, CP 66, CEP 17201-970, Jaú, SP;

²Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, CP 237, CEP 18603-970, Botucatu, SP, Bolsista do CNPq; ³Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, UNESP, CEP 18618-600, Botucatu, SP. E-mail: cruzjcs@apta.sp.gov.br. Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

Autor para correspondência: Juliana Cristina Sodário Cruz

Data de chegada: / /2007. Aceito para publicação em: / /

RESUMO

Cruz, J.C.S.; Souza, N.L.; Nakatani, A.K.; Rosa, D.D.; Basseto, M. A.; Padovani, C.R.; Furtado, E.L.; Caracterização patogênica e molecular de *Plasmodiophora brassicae*. **Summa Phytopathologica**, v. , n. , p. , 2007.

A doença conhecida por hérnia das crucíferas é causada pelo patógeno *Plasmodiophora brassicae*, sendo uma das mais importantes e de difícil controle em brássicas. Em virtude dos poucos estudos desenvolvidos sobre o assunto em condições brasileiras, foram realizados testes de patogenicidade de diferentes populações do patógeno em espécies de brássicas (couve flor, couve chinesa suscetível, couve chinesa resistente, brócolis e repolho). As populações de *P. brassicae* foram obtidas de raízes infectadas de algumas regiões produtoras no Brasil. Os testes de patogenicidade foram realizados em condições de casa de vegetação (25±2°C) mediante inoculações, no colo de cada planta com 2

mL da suspensão de esporos do patógeno, na concentração de 10^7 esporos mL^{-1} . As avaliações da severidade da doença foram realizadas 35 dias após a inoculação. Em laboratório foi realizado a extração de DNA dessas populações e análises de PCR-RAPD para a comparação das características genéticas. As populações obtidas nas regiões de Carandaí (Estado de Minas Gerais) e Colombo (Estado do Paraná) mostraram-se mais agressivas, manifestando patogenicidade até mesmo em cultivar considerada resistente. Entretanto, não foi observado um padrão genético específico quanto ao local de origem das populações avaliadas, mostrando que mesmo em locais distantes e com diferenças quanto à patogenicidade, tais populações são geneticamente semelhantes.

Palavras chave adicionais: Hérnia das crucíferas, PCR, patógeno de solo, Brassicaceae

ABSTRACT

Cruz, J.C.S.; Souza, N.L.; Nakatani, A.K.; Rosa, D.D.; Basseto, M.A.; Padovani, C.R.; Furtado, E.L. Pathogenic and molecular characterization of *Plasmodiophora brassicae*. *Summa Phytopathologica*, v. , n. , p. , 2007.

Disease known as clubroot of crucifers is caused by the pathogen *Plasmodiophora brassicae*, being one of the most important and hard to control crucifer diseases in brassicas. Under Brazilian conditions few studies have been conducted. Because of this, pathogenicity tests using different populations were carried out with the pathogen in brassica species (cauliflower, susceptible Chinese cabbage, resistant Chinese cabbage, broccoli, and cabbage). *P. brassicae* populations were obtained from infected roots at several commercial production regions in Brazil. The pathogenicity tests were conducted under greenhouse conditions ($25\pm 2^\circ\text{C}$) with inoculations (2 mL) of spore suspension of the pathogen at 10^7 spores. mL^{-1}

concentration, applied in the collar root of each plant. Disease evaluations were performed 35 days after inoculation. DNA extraction and PCR-RAPD analyses for these populations were conducted in the laboratory to compare genetic traits. The populations obtained from the regions of Carandaí (State of Minas Gerais) and Colombo (State of Paraná) was more aggressive, and causing pathogenicity even in cultivar considered resistant. However, no specific genetic pattern was observed as to the place of origin of the evaluated populations, demonstrating that they are genetically similar even coming from distant localities or showing differences in pathogenicity.

Additional keywords: Clubroot of crucifers, PCR, Soilborne pathogen, Brassicaceae.

INTRODUÇÃO

Plasmodiophora brassicae Woronin é o patógeno responsável pela doença popularmente conhecida como hérnia das crucíferas, uma das mais importantes nas regiões produtoras de brássicas no mundo. Esta doença, característica de regiões de temperaturas amenas, em torno de $\pm 20^{\circ}\text{C}$, vem ganhando significativa expressão em áreas agrícolas brasileiras tradicionalmente cultivadas com brássicas. Uma vez presente no solo, suas estruturas de resistência podem sobreviver por mais de 15 anos (27), o que dificulta seu controle.

Em decorrência da dificuldade de seu isolamento, por se tratar de um parasita obrigatório, pouco se sabe sobre sua expansão em condições brasileiras de cultivo, o que provavelmente explica o desenvolvimento de mais trabalhos que avaliam o comportamento de populações de *P. brassicae*, como os realizados por Ito et al. (12) e Murakami et al. (19) no

Japão, quando comparados aos que utilizam isolados monospóricos, como o realizado por Manzanares – Dauleux, et al. (18) na França.

Alguns trabalhos relatam a existência de populações heterogêneas em uma mesma área, podendo algumas estruturas de repouso ser patogênicas e outras não, sendo este um dos maiores problemas com quem trabalha com *P. brassicae* (3).

A forma mais recomendada de controle de *P. brassicae* é a utilização de cultivares de brássicas com maior nível de resistência, pois é considerada a maneira mais eficiente e econômica. Mas para que essa resistência seja mantida, é fundamental o entendimento da diversidade do fitopatógeno e dos fatores que interferem na sua patogenicidade em condições brasileiras.

Pouco se sabe sobre os mecanismos de variabilidade patogênica das populações brasileiras de *P. brassicae*, mas alguns trabalhos realizados em outros países já trazem algumas importantes informações, principalmente em virtude da observação de diferenças significativas de patogenicidade em populações heterogêneas de *P. brassicae* obtidas da Austrália (2), Japão (17) e Escócia (13), bem como de isolados monospóricos, realizados por Somé et al. (24) na França e Klever et al. (16) na Alemanha.

Para complementar as informações obtidas a campo sobre *P. brassicae* a utilização de métodos moleculares pode permitir tanto a detecção precoce do fitopatógeno no hospedeiro como no solo, bem como a diferenciação de patótipos. Além de possibilitar melhor compreensão da relação entre *P. brassicae* e os hospedeiros, visando o desenvolvimento de estratégias apropriadas de controle.

Parsons et al. (22) e Faggian et al. (8) conseguiram extrair o DNA das estruturas de repouso de *P. brassicae* de isolados encontrados em solos australianos, utilizando análise de PCR. Desta maneira, obtiveram uma metodologia de detecção antes do cultivo do hospedeiro. Entretanto, os autores ressaltam que a técnica não é viável quando existem baixas concentrações das estruturas de repouso no solo. Ito et al. (11) também demonstraram a viabilidade do uso da técnica de PCR para o estudo genético de *P. brassicae* extraídos de estruturas de resistência presentes em solos e de estruturas presentes nos tecidos de hospedeiros (12).

Dessa forma, considerando-se que o desenvolvimento de cultivares resistentes é uma das principais práticas utilizadas no controle da hérnia das crucíferas, bem como a utilização de manejos das culturas envolvidas, este trabalho tem como objetivo a avaliação da diversidade patogênica de alguns isolados brasileiros de *P. brassicae*, coletados a campo, bem como a caracterização molecular desses materiais, na tentativa de se obterem maiores informações que possam favorecer o controle da doença e o desenvolvimento de novas cultivares.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de *Plasmodiophora brassicae*

Raízes de brássicas apresentando sintomas de hérnias, naturalmente infectadas por *P. brassicae*, foram coletadas de algumas áreas agrícolas brasileiras e encaminhadas ao laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Departamento de Produção Vegetal / Defesa Fitossanitária, UNESP, Botucatu, SP, para serem congeladas em freezer comum (-20°C) antes de serem utilizadas. Destes materiais, onze isolados foram

selecionados e catalogados conforme local, data de coleta e hospedeiro, como mostra a Tabela 1.

Inserir Tabela 1

Teste de Patogenicidade

Dois ensaios foram conduzidos em condições parcialmente controladas de casa de vegetação nos períodos de junho a setembro (ensaio I) e agosto a outubro (ensaio II) de 2006. Para tanto, os onze isolados foram multiplicados em mudas de couve chinesa (*Brassica rapa* var. *pekinensis*), de uma cultivar suscetível ao patógeno (Pak choi) , para que suas estruturas de repouso fossem ativadas após os períodos de armazenamento em freezer (aproximadamente -20°C).

Mudas de couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), cultivar Sharon; brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) cultivar Ramoso Santana; repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cultivar Kenzan; couve chinesa – cultivar suscetível (*Brassica rapa* var. *pekinensis*) cultivar Pak choi; couve chinesa – cultivar resistente (*Brassica rapa* var. *pekinensis*), cultivar Komachi, com quatro semanas de semeadura foram transplantadas para vasos com capacidade de 1,7L, contendo solo estéril, inoculadas e cuidadosamente irrigadas, quando necessário.

As características químicas dos solos utilizados nos ensaios I e II estão demonstradas na Tabela 2. Os ensaios foram mantidos em condições parcialmente controladas de casa de vegetação ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), nas dependências do Departamento de Produção Vegetal/Defesa Fitossanitária da FCA-UNESP, Botucatu (SP).

Inserir Tabela 2

Para a inoculação, 10 gramas de amostras das raízes, contendo sintomas típicos de hérnias foram trituradas em liquidificador, por um minuto, com 200 mL de água destilada. Entre as triturações dos diferentes isolados, o copo do liquidificador foi desmontado e desinfestado por lavagem em água corrente com detergente comum, depois em solução de álcool a 70%, por 1 minuto, Solução de hipoclorito de sódio a 2% por 1 minuto, e finalmente, enxaguado em água corrente.

As suspensões obtidas foram filtradas em camadas de gaze para a retirada de fragmentos de raízes e a concentração ajustada com o auxílio de hemacitômetro. Em seguida foram feitas inoculações no colo de cada planta, com 2 mL da suspensão de esporos de *P. brassicae*, na concentração de 10^7 esporos mL^{-1} .

Cada tratamento contou com seis repetições distribuídas em blocos ao acaso e cinco semanas após a inoculação, as raízes foram lavadas e avaliadas. Para tanto foi utilizada uma escala visual de notas (Figura 1) variando de 0 a 4 (0=0%, 1=25%, 2=50%, 3=75% e 4=100%), conforme a porcentagem da área radicular afetada (26).

Os dados foram submetidos à análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis, para o modelo com dois fatores em blocos completos, sendo os tratamentos distribuídos de forma casual, quanto ao hospedeiro e local de origem, complementada com o respectivo teste de comparações múltiplas (29). Os hospedeiros que apresentaram nota igual ou acima de 1 (aproximadamente 25% da área radicular afetada) foram considerados suscetíveis aos isolados testados.

Inserir Figura 1

Extração de DNA

O DNA dos isolados de *P. brassicae* foi obtido mediante suspensões de esporos, onde 10g de raízes contendo sintomas de hérnias de cada isolado foram trituradas em liquidificador, com 50 mL de água destilada esterilizada por 1 minuto, para que a suspensão ficasse concentrada. Posteriormente, essa suspensão foi filtrada em dez camadas de gaze e acondicionado em microtubos com capacidade de 1000 μ l, sendo então precipitados por centrifugação a 2.500g, durante 10 minutos, repetindo a operação quatro vezes.

O sobrenadante obtido foi descartado das amostras. Adicionaram-se, em seguida, 700 μ L da solução I (100mM MgCl₂; 200mM Tris-HCl pH 7,4; 30 μ g mL⁻¹ DNase) que foi incubada a 37°C em “banho maria” por 3 horas, para eliminação do DNA do hospedeiro. Em seguida, efetuou-se a centrifugação por 2.500g, durante cinco minutos e o descartando-se o sobrenadante. Os precipitados foram então ressuspensos em 700 μ L da solução II (5mM EDTA; 0,5% SDS; 10mM Tris-HCl pH 7,8; 20 μ g mL⁻¹ de proteinase K) e incubado a 37°C, por 30 minutos, e novamente centrifugado por 2.500g durante cinco minutos e o sobrenadante novamente descartado (18).

O DNA foi extraído de acordo com o protocolo CTAB modificado (7) adicionado-se 300 μ L de tampão de extração (2% CTAB; 1,4M NaCl; 20mM EDTA; 100mM Tris-Cl pH 7,8; 0,2% mercaptoetanol) e incubado por 30 minutos, a 65°C. O material obtido foi centrifugado a 1.100g por 1 minuto, e o sobrenadante, transferido para um novo tubo.

O mesmo volume (300 μ L) da mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (CIA 24:1) foi adicionado e homogeneizado em vortex, em seguida, centrifugou-se a 1.100g por 2 minutos. A fase superior, aproximadamente 500 μ L, foi transferida para novo tubo. O DNA foi

precipitado com 2/3 do volume de isopropanol gelado e mantido no gelo por 30 minutos, então submetido à centrifugação por 15 minutos, a 1.100g.

O sobrenadante foi descartado e, ao precipitado, adicionado 1 mL de álcool etanol 70% e centrifugado por 10 minutos a 1.100g. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado permaneceu secando a temperatura ambiente, por aproximadamente 15 minutos. Depois esse precipitado foi dissolvido em 20 µL de TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA) e 20 µg mL⁻¹ de RNase sendo, em seguida, deixado a 37°C, por 12 horas.

PCR-RAPD

Para as reações de PCR-RAPD, segundo Manzanares-Dauleux et al. (18) modificado, o DNA de cada material foi quantificado em espectrofotômetro “Gene Quant” (Pharmacia), determinando-se a razão A_{260}/A_{280} de todas as amostras de DNA para verificar a pureza dos ácidos nucleicos. A solução estoque de DNA foi diluída em uma concentração final de 5ng/µL e estocada em freezer a -20°C, para que o DNA não fosse degradado, sendo posteriormente descongelada para a realização das análises de RAPD.

Em testes preliminares foram selecionados 12 primers arbitrários, obtidos da Operon Technologies Inc. (Alameda, CA, USA), sendo eles: OPB-10 (CTGCTGGGAC), OPA-2 (TGCCGAGCTG), OPP-7 (GTCCATGCCA), OPP-10 (TCCCGCCTAC), OPA-3 (AGTCAGCCAC), OPG-13 (CTCTCCGCCA), OPA-7 (GAAACGGGTG), OPP-13 (GGAGTGCCTC), OPF-13 (GGCTGCAGAA), OPA-10 (GTGATCGCAG), OPA-13 (CAGCACCCAC) e OPC-16 (CACACTCCAG), que permitiram a melhor visualização do padrão de fragmentos gerados pela amplificação de DNA de *P. brassicae*.

Cada reação de PCR-RAPD foi composta de 7,5 µL de DNA genômico (1ng/µL) e 22,5 µL de solução mix de reação [(7,45 µL de água ultra pura esterilizada, 3,0 µL de solução tampão, 2,4 µL de dNTP, 9,2 µL de cada um dos “primers” descritos acima e 0,45 unidades de *Taq* polymerase (Invitrogen, Groningen, The Netherland)], totalizando 30 µL em tubos de PCR com capacidade de 200 µL. O DNA foi substituído pelo mesmo volume de água ultra pura esterilizada para servir como controle.

A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., Waterown, MA), programado para iniciar o ciclo de desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguido de 45 ciclos de 30 segundos a 92°C, 1 minuto a 35°C e 2 minutos e 30 segundos a 72°C, com extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos de RAPD foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e TBE 1X (22), a 4V/cm de gel, onde foram utilizados 10 µL do material da reação misturados com 5 µL de tampão de carregamento (0,25 % de azul de bromofenol e 40% de sacarose) (23) e 5 µL de marcador 1kb (Amershan), também misturados com 5 µL de tampão de carregamento. Posteriormente, os materiais foram visualizados sob luz ultravioleta em EAGLE EYE II (Stratagene).

Os dados foram registrados na forma de ausência/presença das bandas no gel. Bandas de mesmo comprimento foram consideradas como idênticas. Estes dados foram codificados na forma binária (1 para presença e 0 para ausência). A distância genética entre os isolados de *P. brassicae* foi determinada pelo coeficiente de similaridade de Nei & Li (20).

A matriz de similaridade foi, em seguida, transformada em uma árvore filogenética não enraizada, utilizando-se o método SAHN Clustering (Sequential Agglomerative,

Hierarchical and Nested) sob procedimento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averaging), no programa PAUP* (version 4.0b5a) (25).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Patogenicidade dos diferentes isolados de *Plasmodiophora brassicae*

Dos 11 isolados analisados, nove foram patogênicos à cultivar de couve-chinesa suscetível (Pak choi) no ensaio I, realizado no período de junho a setembro de 2006, com exceção dos isolados 3 (Piedade-SP) e 6 (Colombo 2-PR). No ensaio II todos os isolados apresentaram severidade alta para esta cultivar, como apresentado nas Tabelas 3, 4 e 5. O isolado 3 também não apresentou alta severidade a em nenhum outro hospedeiro avaliado no ensaio I. Entretanto, no ensaio II este isolado foi patogênico para couve-flor, couve-chinesa suscetível e repolho, e o 6, somente para a cultivar de couve-chinesa suscetível.

Inserir Tabela 3, 4 e 5

Os diferentes resultados podem ser atribuídos ao efeito do ambiente e adaptação dos isolados às condições climáticas de cultivo ocorridas no ensaio II (meses de agosto a outubro de 2006), provavelmente, devido ao maior comprimento do dia e intensidade luminosa encontrada nessa época do ano quando comparado ao ensaio I, fatores ambientais não controlados na casa de vegetação utilizada, o que pode ter deixado os hospedeiros mais propensos à infecção para esses isolados.

A patogenicidade de *P. brassicae* é resultado da interação do genótipo do hospedeiro com o genótipo do patógeno e condições de cultivo, onde plantas altamente suscetíveis que estão em condições de cultivo adversas, podem ser altamente atacadas por um isolado que não é altamente patogênico, reforçando o conceito clássico de doenças.

Em contraste, um hospedeiro altamente resistente requer um isolado altamente patogênico e condições de campo ótimas para o desenvolvimento do patógeno para conseqüentemente desenvolver a doença. Esta é a possível explicação para as diferentes reações patogênicas nas duas épocas de desenvolvimento do ensaio, visto que os hospedeiros apresentaram menor severidade da doença no ensaio II, onde o clima pode ter favorecido o desenvolvimento do hospedeiro e prejudicado o patógeno.

O efeito contrário foi observado no ensaio I, cultivado nos meses de junho a setembro, onde *P. brassicae* foi mais patogênico, pois o patógeno provavelmente foi favorecido pelo ambiente de cultivo, embora o solo utilizado neste ensaio tenha apresentado maiores índices médios de matéria orgânica (163) e cálcio (109) que o solo utilizado no ensaio II, o que poderia ter favorecido a supressividade ao patógeno (21).

Os isolados 1 (Carandaí-MG), 8 (Colombo 4-PR) e 9 (Colombo 5-PR) mostraram-se patogênicos para a cultivar de couve-chinesa considerada resistente (Komachi) nos dois ensaios, mostrando que esses isolados foram capazes de quebrar a resistência inicial dessa cultivar independentemente do ambiente de cultivo, e os isolados 5 (Colombo 1-PR) e 7 (Colombo 3-PR) somente foram patogênicos em condições climáticas encontradas no ensaio I. Isto mostra que não seria prudente a indicação da referida cultivar para o plantio na região de Colombo-PR, independentemente da época de cultivo, e para a região de Carandaí-MG, no período de inverno brasileiro, pois pressupõe-se que nestas regiões de cultivo existam isolados que apresentem alta severidade da doença para essa cultivar de couve-chinesa .

Para os demais hospedeiros, a patogenicidade dos isolados não foi uniforme, já que para couve-flor, no ensaio I foram patogênicos os isolados 1, 8 e 9, já no ensaio II, apenas o

isolado 3 causou sintomas, que não havia se mostrado patogênico no ensaio anterior. Estas variações são compreensíveis, visto que cada planta infectada pode produzir um número diferente de raças (28) e cada população pode apresentar estruturas de resistência com diferentes graus de patogenicidade, que podem manifestar seu potencial conforme as condições ambientais presentes em determinados momentos.

No ensaio I, mais isolados mostraram-se patogênicos para repolho, como por exemplo, os 1, 2 5, 7, 8 e 9, diferindo dos dados obtidos no ensaio II, onde apenas os isolados 3 e 11 foram capazes de promover a formação de hérnias. O mesmo também foi observado para a cultivar utilizada de brócolis, no ensaio I, onde os isolados 1, 5, 8, 9 e 10 provocaram a formação de hérnias. Já no ensaio II, apenas o isolado 9 mostrou-se patogênico, indicando ser o hospedeiro altamente suscetível ao isolado 9 (Colombo 5-PR). Portanto não deve ser recomendado para o cultivo na região de Colombo-PR. Isto demonstra, de maneira geral, que os isolados de Carandaí-MG e os da região de Colombo-PR apresentaram maior severidade, dentro dos ensaios desenvolvidos e para os diferentes hospedeiros, que os isolados coletados do Estado de São Paulo.

Embora alguns isolados não tenham apresentado diferença estatística quanto à severidade nos ensaios I e II (Tabela 3 e 4), algumas repetições dentro de cada tratamento apresentaram sintomas de maneira isolada, indicando que embora os resultados não apresentem diferenças estatisticamente significativas, estes isolados apresentam potencial de desenvolvimento da doença, dependendo do ambiente de cultivo utilizado, como mostram os isolados: 10 para couve-flor; 4 para repolho e os 2 e 7 para brócolis no ensaio I e os isolados

1, 4, 6, 7, 9, 10 e 11 para couve-flor; 5 e 7 para couve-chinesa Komachi (resistente); 2, 4, 6, 7, 8 e 9 para repolho e os 3, 4, 6 e 7 para brócolis no ensaio II apresentados na Tabela 5.

Muitos estudos desenvolvidos com *P. brassicae* utilizam algumas linhas de hospedeiros diferenciais da European Clubroot Differential (ECD) como referenciais em trabalhos similares a este. Entretanto, Kuginuki et al. (17) comparando os hospedeiros da ECD e os utilizados por Williams (28) em algumas cultivares japonesas, com relação a populações de *P. brassicae*, verificaram que esses hospedeiros diferenciais (ECD) não classificaram claramente 36 populações japonesas quanto à patogenicidade.

Esses autores relatam que os resultados dependem da pureza genética das cultivares e que o ideal, para este tipo de estudo, ainda são os materiais oriundos de isolamentos monospóricos, que apresentam maior homogeneidade genética.

Este tipo de isolamento, entretanto, pode apresentar baixa porcentagem infectiva, provavelmente em decorrência da variabilidade genética do isolado coletado a campo, como no trabalho desenvolvido por Somé et al. (24), que obteve aproximadamente 10% das mudas inoculadas monosporicamente com sintomas e Jones et al. (14) que também depararam-se com a mesma problemática, pois apenas três plantas de *Brassica campestris* var *pekinensis* cv Granaat (suscetível) apresentaram a formação de galhas quando inoculadas monosporicamente, considerando-se as 450 inoculadas, ou seja menos de 1% de sucesso utilizando esta técnica.

Donald et al. (6) também observaram a interferência das condições climáticas de cultivo no desenvolvimento de sintomas, em linhas diferenciadoras da ECD, infectadas por esporos produzidos em hospedeiros pertencentes a ECD na Austrália.

Essas linhas diferenciadoras (ECD) mostraram reações intermediárias de patogenicidade em função das diferentes condições climáticas (luz, matéria orgânica, temperatura, pH) encontradas nesse país, que diferem das condições de cultivo européias. Isto indica a necessidade de uma reformulação das linhas diferenciadoras ECD, como já relatado por Dixon (4) e Kuginuki et al. (17). Recentemente muitos estudos têm indicado o uso de métodos moleculares para a separação de patótipos de *P. brassicae*, na tentativa de acelerar o desenvolvimento de brássicas resistentes a hérnia das crucíferas em larga escala.

Hatakayema et al. (10) também não utilizaram as plantas diferenciadoras de Williams (1966) e ECD, por não mostrarem resultados muito claros quanto à patogenicidade, para isolados japoneses, mas esses autores conseguiram fazer um agrupamento, conforme o comportamento patogênico, o que também poderia ser feito para os isolados 2 e 10 deste trabalho, pois apresentaram características patogênicas semelhantes nos dois ensaios, para os mesmos hospedeiros, podendo ser considerados pertencentes a um mesmo grupo, embora tenham sido coletados em locais e em espécies diferentes dentro do Estado de São Paulo.

Os resultados obtidos nas análises moleculares, entretanto mostram que são possivelmente originários de um mesmo patótipo, mas pertencem a grupos geneticamente diferentes, como mostra a Figura 2.

Uma sugestão para um próximo trabalho seria a repetição dos ensaios nas mesmas épocas, porém em anos seqüentes. Entretanto, Dixon & Robinson (5) também observaram o efeito das condições climáticas na patogenicidade de isolados, em diferentes hospedeiros testados em quatro anos seguidos na Escócia, mesmo não ocorrendo nenhuma anormalidade climática entre esses anos. Tal resultado sugere que o mecanismo de formação de hérnias é

mais influenciado pelo metabolismo hormonal do hospedeiro e, conseqüentemente, pelo crescimento da planta e seu vigor.

Na Figura 2 encontram-se os padrões de fragmentos gerados pela amplificação de DNA de *P. brassicae*, com os “primers” OPA-02 (TGCCGAGCTG) e OPB-10 (CTGCTGGGAC), mostrando o alto grau de polimorfismo do DNA das populações de *P. brassicae*, o que era esperado, por não se tratar de isolados homogêneos.

Inserir Figura 2

Mesmo com estes resultados, obteve-se 81,6% de similaridade entre as populações, como mostra a Figura 3 e a Tabela 6, onde observamos a formação de três grandes grupos geneticamente similares, sendo eles: Grupo 1: isolados 1, 2, 5, 10; Grupo 2: 3 e 7 e Grupo 3: 4, 6, 8, 9 e 11. Esses isolados não apresentaram um padrão genético específico quanto ao local de origem das populações avaliadas, mostrando que, mesmo em locais distantes e com diferenças quanto à patogenicidade, tais populações são geneticamente semelhantes.

Estes resultados mostram que populações coletadas de um mesmo local, em períodos e hospedeiros diferentes, como os isolados 10 e 11, são geneticamente diferentes, o que provavelmente é resultante dos cruzamentos entre os possíveis distintos patótipos existentes dentro de uma mesma área e população de *P. brassicae* (14). E isso nos leva a crer que hospedeiros resistentes, a uma determinada população de uma região, não devem ser cultivados em outra não muito distante, pois cada população é um universo, com suas características patogênicas peculiares.

Inserir Figura 3 e Tabela 6

Em virtude da alta variabilidade e a não correlação entre os resultados de campo e os moleculares sugere-se, para um próximo trabalho, a adaptação de análises moleculares mais refinadas para a utilização em isolados brasileiros, como por exemplo, os desenvolvido por Kageyama et al. (15) que utilizaram a região ITS do DNA de populações coletadas de solos japoneses, juntamente com primers específicos para estudos similares ao desenvolvido. Faggian et al. (9) também utilizaram a região ITS do DNA ribossomal (DNAr) e a técnica de nested PCR, por se tratar de uma região mais preservada.

Outro fator que deve ser levado em consideração é a pequena quantidade de DNA coletado dos esporos de *P. brassicae*, que acabam por mascarar os padrões de fragmento de polimorfismo. Cao et al. (1) relatam que o patógeno pode ser detectado em tecidos do hospedeiro, após 3 dias da inoculação, por meio de PCR, mesmo não ocorrendo a formação de hérnias antes de 24 dias, mostrando a viabilidade desta técnica para detecções precoces, podendo ser utilizados em análises rotineiras de laboratório.

Parson et al. (22) descrevem que a técnica de PCR é capaz de detectar estruturas de repouso de *P. brassicae* viáveis e não viáveis de solo, mas que, para os não viáveis, a detecção decai com o passar do tempo de vida destas estruturas, o que também deve ser levado em consideração, pois somente nos interessa a detecção de materiais viáveis, o que ainda não é possível com o uso dessa técnica.

Manzanares-Dauleux et al. (18) conseguiram, através da análise do DNA de nove populações de *Plasmodiophora brassicae* e 37 isolados monospóricos, e do uso de primers específicos e PCR- RAPD, diferenciar 8 patótipos franceses.

Esses trabalhos reforçam o potencial de uso desta técnica, bem como a necessidade de aprimoramento de estudos voltados para a caracterização de possíveis patótipos de *Plasmodiophora brassicae* no Brasil, utilizando técnicas de PCR e espécies de brássicas cultivadas no País, juntamente com algumas linhas diferenciadoras de ECD, para que informações mais conclusivas sejam obtidas, visando o controle da doença.

AGRADECIMENTOS

À empresa Sakata Seed Sudamérica LTDA, pela doação de sementes de brássicas e alguns isolados de *Plasmodiophora brassicae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cao, T.; Tewari, J.; Strelkov, S.E. Molecular Detection of *Plasmodiophora brassicae*, causal agent of clubroot of crucifers, in plant and soil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, n. 1, p. 80-87, 2007.
2. Crute, T.R.; Phelps, K.; Barner, A.; Buczacki, S.T.; Crisp, P. The relationship between genotypes of three *Brassica* species and collections of *Plasmodiophora brassicae*, **Plant Pathology**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 405-420, 1983.
3. Diederichsen, E.; Wagenblatt, B.; Schallehns, V.; Deppe, U.; Sacristán, M.D. Transfer of clubroot resistance from resynthesised *Brassica napus* into oilseed rape- Identification of race-specific interactions with *Plasmodiophora brassicae*. In: Brassica Symposium-IX Crucifer Genetics Workshop. 1996, **Acta Horticulturae (ISHS)**, Lisboa, v. 407, p. 423-429.

4. Dixon, G.R. International clubroot working group-clubroot 2000. **Cruciferae Newsletter**, Domaine de la Motte, v. 23, p. 91-92, 2001.
5. Dixon, G.R.; Robinson, D.L. The susceptibility of *Brassica oleracea* cultivars to *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). **Plant Pathology**, Oxford, v. 35, n. 1, p.101-107, 1986.
6. Donald, E.C.; Cross, S.J.; Lawrence, J.M.; Porter, I.J. Pathotypes of *Plasmodiophora brassicae*, the cause of clubroot, in Australia. **Annals of Applied Biology**, Welllesbourne, v. 148, n. 3, p.239-244, 2006.
7. Doyle, J.J.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
8. Faggian, R.; Parsons, S.; Donald, E.C.; Lawrie, A.C.; Porter, I.J. Molecular detection and quantification of *P. brassicae*. In: **Abstracts of Offered Papers**, 8th International Congress of Plant Pathology, 2003, Christchurch, New Zeland, p. 82.
9. Faggian, R.; Bulman, S.R.; Lawrie, A.C.; Porter, I.J. Specific polymerase reaction primers for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil and water. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 5, p. 392-397, 1999.
10. Hatakayema, K.; Fujimura, M.; Ishida, M.; Suzuki, T.; Sato, T. Classification of pathogenicity of *Plasmodiophora brassicae* field isolates in Japan based on resistance of F1 cultivars of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* L.) to clubroot. In: IV International Symposium in Brassicas and XIV Crucifer Genetics Workshop. 2006, **Acta Horticulturae (ISHS)**, Daejon, v. 706, p. 317-322.

11. Ito, S.; Machara, T.; Maruno, E.; Tanaka, S.; Kameya-Iwaki, M.; Kishi, F. Development of a PCR-based Assay for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, n. 2, p. 83-88, 1999a.
12. Ito, S. Ichinose, H.; Yanagi, C.; Tanaka, S.; Kameya-Iwaki, M.; Fishi, F. Identification of an *in planta*-induced mRNA of *Plasmodiophora brassicae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, n. 2, p. 79-82, 1999b.
13. Jones, D.R.; Ingram, D.S.; Dixon, G.R. Factors affecting tests for differential pathogenicity in populations of *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 229-238, 1982a.
14. Jones, D.R.; Ingram, D.S.; Dixon, G.R. Characterization of isolates derived from single resting spores of *Plasmodiophora brassicae* and studies of their interaction. **Plant Pathology**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 239-246, 1982b.
15. Kageyama, K.; Komatsu, T.; Haruhisa, S. Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 69, n. 3, p. 153-160, 2003.
16. Klever, A.; Luerben, H.; Graf, H; Siemens, J. Restriction fragment length polymorphism markers to characterize *Plasmodiophora brassicae* single-spore isolates with different virulence patterns. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, n. 34, p. 121-127, 2001.
17. Kuginuki, Y.; Yoshikawa, H.; Hirai, M. Variation in virulence of *Plasmodiophora brassicae* in Japan tested with clubroot-resistant cultivars of chinese cabbage (*Brassica rapa* L. spp. *pekinensis*). **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 105, n. 4, p. 327-332, 1999.

18. Manzanarez-Daulex, M.J.; Divaret, I.; Baron, F.; Thomas, G. Assessment of biological and molecular variability between and within field isolates of *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 165-173, 2001.
19. Murakami, H.; Tsushima, S.; Akimoto, T.; Murakami, K.; Goto, I.; Sishido, Y. Effects of growing leafy daikon (*Raphanus sativus*) on populations of *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, n. 5, p. 584-589, 2000.
20. Nei, M. and W. H. Li. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**, v 76, p. 5269- 5273, 1979.
21. Niwa, R. et al. Increase in soil pH due Ca-rich organic matter application causes suppression of the clubroot disease of crucifers. **Soil Biology & Biochemistry**, St. Louis, v. 39, n.3, p. 778-785, 2007.
22. Parsons, S.; Faggian, R.; Lawrie, A.C. The relationship between PCR and the viability of *Plasmodiophora brassicae* resting spores. In: **Abstracts of Offered Papers**, 8th International Congress of Plant Pathology, 2003, Christchurch, New Zeland, p. 83.
23. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniats, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor**, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987.
24. Somé, A.; Manzanares, M.J.; Baron, F.; Thomas, G. Variation for virulence on *Brassica napus* amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. **Plant Pathology**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 432-439, 1996.
25. Swofford. D.L. PAUP*. **Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b5a**. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

26. Takahashi, L.M.; Cebrian, I.T., Souza, N.L. Inoculação de *Plasmodiophora brassicae* agente causal da “hérnia das crucíferas”. In: XXVIII Congresso Paulista de Fitopatologia, 2005, São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, suplemento, p. 17-18.
27. Wallenhammar, A.C. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation level. **Plant Pathology**, Oxford, v. 45, n. 4, p.710-719, 1996.
28. Williams, P.H. A System for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga. **Phytopathology**, St. Paul, v. 56, n. 6, p. 624-625, 1966.
29. Zar, J.H. **Biostatistical analysis**, 4. ed. Paentice Hall, New Jersey, 1999, 663p.

Tabela 1. Descrição dos isolados de *Plasmodiophora brassicae* conforme local, data e hospedeiro coletado.

Código	Local de origem	Data de coleta	Hospedeiro
1	Carandaí (MG)	25/08/05	Repolho
2	Divinolândia (SP)	21/07/03	Brócolis
3	Piedade (SP)	29/08/05	Repolho
4	São José do Rio Pardo (SP)	21/07/03	Brócolis
5	Colombo 1 (PR)	18/11/05	Couve-chinesa
6	Colombo 2 (PR)	18/11/05	Couve-chinesa
7	Colombo 3 (PR)	18/11/05	Couve-chinesa
8	Colombo 4 (PR)	18/11/05	Couve-chinesa
9	Colombo 5 (PR)	18/11/05	Couve-chinesa
10	Pardinho 1 (SP)	28/08/05	Rúcula
11	Pardinho 2 (SP)	19/01/06	Brócolis

Tabela 2. Análise química dos solos utilizados nos ensaios de severidade (I e II) de *Plasmodiophora brassicae* em casa de vegetação.

Ensaio ⁽¹⁾	pH CaCl ₂	M.O. g dm ⁻³	P resina mg dm ⁻³	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V
I	6,4 ⁽²⁾	163	593	17	25,5	109	50	184	201	91
II	6,2	60	550	18	19,6	98	46	164	183	89

⁽¹⁾ Ensaios conduzidos em diferentes períodos: I: 28/07/06 a 01/09/06; II: 25/09/06 a 30/10/06.

⁽²⁾ Médias de três repetições.

Tabela 3. Mediana e semi-amplitude total da severidade de isolados de *Plasmodiophora brassicae* em diferentes hospedeiros (brássicas). Ensaio I (28/07/06 a 01/09/06).

Código dos isolados	Hospedeiros				
	CF ⁽¹⁾	CCS	CCR	RE	BR
1	2,0±1,5bA ⁽²⁾	4,0±0,5bB	2,0±1,0bA	3,5±2,0bAB	2,5±1,5bA
2	0,0±0,5abA	2,5±2,0aA	0,0±0,0aA	1,0±0,5abA	0,0±1,0abA
3	0,0±0,0aA	0,0±0,0aA	0,0±0,0aA	0,0±0,0aA	0,0±0,0aA
4	0,0±0,5abA	2,5±2,0bA	0,0±0,0aA	0,0±2,0abA	0,5±0,5abA
5	0,0±0,0aA	1,5±2,0abA	1,5±2,0abA	2,0±2,0abA	1,0±0,5abA
6	0,0±0,0aA	0,0±0,0aA	0,0±0,0aA	0,0±0,5abA	0,0±0,5abA
7	0,0±0,0aA	4,0±1,5bB	2,0±2,0bA	2,0±0,5bA	0,5±2,0abA
8	1,0±1,5abA	4,0±1,5bA	3,0±2,0bA	1,5±2,0abA	1,0±1,0abA
9	1,0±2,0abA	4,0±2,0bA	3,0±2,0bA	1,5±2,0abA	2,5±2,0bA
10	0,5±1,5abA	2,0±1,5bB	0,0±0,5abA	0,0±0,5abA	1,0±2,0abA
11	0,0±0,0aA	1,0±2,0abA	0,0±0,0aA	0,0±0,5abA	0,0±0,0aA
Testemunha	0,0±0,0aA	0,0±0,0aA	0,0±0,0aA	0,0±0,0aA	0,0±0,0aA

⁽¹⁾ CF: Couve-flor, CCS: Couve-chinesa, cultivar, suscetível; CCR: Couve-chinesa, cultivar resistente; RE: Repolho, BR: Brócolis.

⁽²⁾ Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde letras minúsculas representam as comparações de origens das populações fixados hospedeiros (coluna) e letras maiúsculas representam as comparações de hospedeiros dentro de origem (linha).

Tabela 4. Mediana e semi-amplitude total da severidade de isolados de *Plasmodiophora brassicae* em diferentes hospedeiros (brássicas). Ensaio II (25/09/06 a 30/10/06).

Código dos isolados	Hospedeiros				
	CF ⁽¹⁾	CCS	CCR	RE	BR
1	0,0±2,0aA ⁽²⁾	2,0±2,0bcA	1,0±1,5abA	0,0±0,5aA	0,0±0,5aA
2	0,0±0,5aA	4,0±2,0cA	0,0±0,0aA	0,5±1,0abA	0,0±0,5aA
3	1,5±2,0aA	4,0±0,5cB	0,0±0,0aA	3,0±2,0bA	0,0±2,0aA
4	0,5±2,0aA	4,0±2,0cB	0,0±0,0aA	0,0±1,5aA	0,0±1,0aA
5	0,0±0,0aA	1,0±2,0abA	0,0±1,0aA	0,0±0,0aA	0,0±0,0aA
6	0,0±1,0aA	4,0±0,0cB	0,0±0,0aA	0,5±1,0abA	0,0±1,0aA
7	0,0±1,5aA	3,5±1,5cB	0,5±2,0abA	0,0±1,5aA	0,5±1,0aA
8	0,0±0,5aA	4,0±0,0cB	1,0±2,0abA	0,0±1,0aA	0,0±0,5aA
9	0,0±2,0aA	4,0±1,5cB	3,0±2,0bAB	0,5±1,0abA	1,0±2,0aA
10	0,5±1,0aA	2,5±1,5bcB	0,0±0,0aA	0,5±1,5abA	0,0±0,5aA
11	0,0±1,5aA	4,0±2,0cB	0,0±0,0aA	2,5±2,0bAB	0,0±0,5aA
Testemunha	0,0±0,0aA	0,0±0,0aA	0,0±0,0aA	0,0±0,0aA	0,0±0,0aA

⁽¹⁾CF: Couve-flor, CCS: Couve-chinesa cultivar, suscetível; CCR: Couve-chinesa, cultivar resistente; RE: repolho; BR: Brócolis.

⁽²⁾Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde letras minúsculas representam as comparações de origens das populações fixados hospedeiros (coluna) e letras maiúsculas representam as comparações de hospedeiros dentro de origem (linha).

Tabela 5. Severidade de isolados de *Plasmodiophora brassicae*, em diferentes hospedeiros e épocas de ensaio (I e II).

Isolados ⁽²⁾	Hospedeiros									
	CF ⁽¹⁾		CCS		CCR		RE		BR	
	I ⁽³⁾	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1	+(4)	- (+)	+	+	+	+	+	-	+	-
2	-	-	+	+	-	-	+	-(+)	-(+)	-
3	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-(+)
4	-	-(+)	+	+	-	-	-(+)	-(+)	-	-(+)
5	-	-	+	+	+	-(+)	+	-	+	-
6	-	-(+)	-	+	-	-	-	-(+)	-	-(+)
7	-	-(+)	+	+	+	-(+)	+	-(+)	-(+)	-(+)
8	+	-	+	+	+	+	+	-(+)	+	-
9	+	-(+)	+	+	+	+	+	-(+)	+	+
10	-(+)	-(+)	+	+	-	-	-	-(+)	+	-
11	-	-(+)	+	+	-	-	-	+	-	-

⁽¹⁾Hospedeiros: CF: Couve-flor; CCS: Couve-chinesa cultivar suscetível; CCR: Couve-chinesa, cultivar resistente; RE: Repolho; BR: Brócolis.

⁽²⁾ Isolados: 1-Carandaí (MG); 2-Divinolândia (SP); 3-Piedade (SP); 4-São José do Rio Pardo (SP); 5-Colombo 1(PR); 6-Colombo 2(PR); 7-Colombo 3(PR); 8-Colombo 4(PR); 9-Colombo 5(PR); 10-Pardinho 1(SP); 11-Pardinho 2(SP).

⁽³⁾ Ensaios conduzidos em diferentes períodos: I: 28/07/06 a 01/09/06; II: 25/09/06 a 30/10/06.

⁽⁴⁾ Patogenicidade de diferentes isolados de *Plasmodiophora brassicae*: (+) patogênico; (-) não patogênico; -(+) não patogênico, mas com algumas repetições apresentando sintomas, segundo nota maior ou igual a 1.

Tabela 6. Similaridade genética entre os isolados de *Plasmodiophora brassicae* gerada a partir de bandas polimórficas obtidas por RAPD. Valores baseados no coeficiente de similaridade Nei & Li (20).

Isolados ⁽¹⁾	Isolados ⁽¹⁾									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	84,0									
3	78,4	76,0								
4	82,6	79,8	72,1							
5	84,4	83,3	74,4	76,7						
6	81,9	79,2	78,5	81,8	76,4					
7	83,6	82,1	76,0	82,6	72,5	79,5				
8	83,5	82,2	77,0	80,5	83,7	83,7	76,6			
9	81,2	77,1	72,5	84,1	77,8	78,0	74,0	81,2		
10	83,1	83,6	74,4	78,5	84,8	72,2	77,2	77,9	84,5	
11	82,6	79,1	77,0	84,5	79,4	82,8	82,6	80,7	85,7	84,0

⁽¹⁾Isolados:1-Carandaí (MG); 2-Divinolândia (SP); 3-Piedade (SP); 4-São José do Rio Pardo (SP); 5-Colombo 1(PR); 6-Colombo 2(PR); 7-Colombo 3(PR); 8-Colombo 4(PR); 9-Colombo 5(PR); 10-Pardinho 1(SP); 11-Pardinho 2(SP).



Figura 1. Raízes de couve-chinesa ilustrando a escala de notas utilizada na avaliação da severidade da doença causada por *Plasmodiophora brassicae*. *0= 0% do sistema radicular afetado, 1= aproximadamente 25% do sistema radicular afetado, 2= aproximadamente 50% do sistema radicular afetado, 3= aproximadamente 75% do sistema radicular afetado e 4= 100% do sistema radicular afetado.

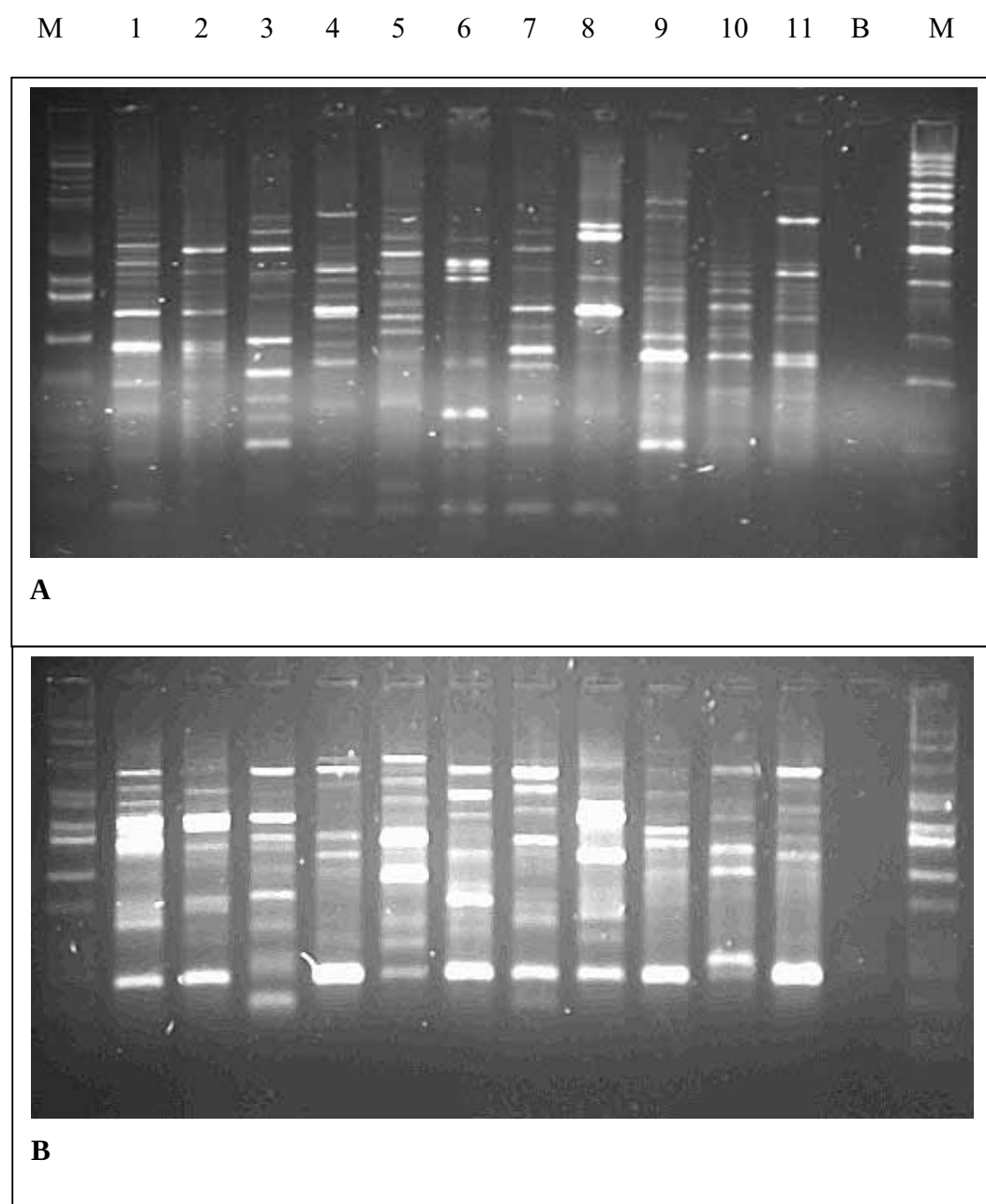


Figura 2. Padrão de bandas de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), com os “primers” **A: OPA2** e **B: OPB10**, de isolados de *Plasmidiophora brassicae* causadores da hérnia das crucíferas. Isolados: 1- Carandaí (MG); 2-Divinolândia (SP); 3-Piedade (SP); 4-São José do Rio Pardo (SP); 5-Colombo 1(PR); 6-Colombo 2(PR); 7-Colombo 3(PR); 8-Colombo 4(PR); 9-Colombo 5(PR); 10-Pardinho 1(SP); 11-Pardinho 2(SP), M= marcador molecular 1kb (Amershan) e B= água ultra pura esterilizada.

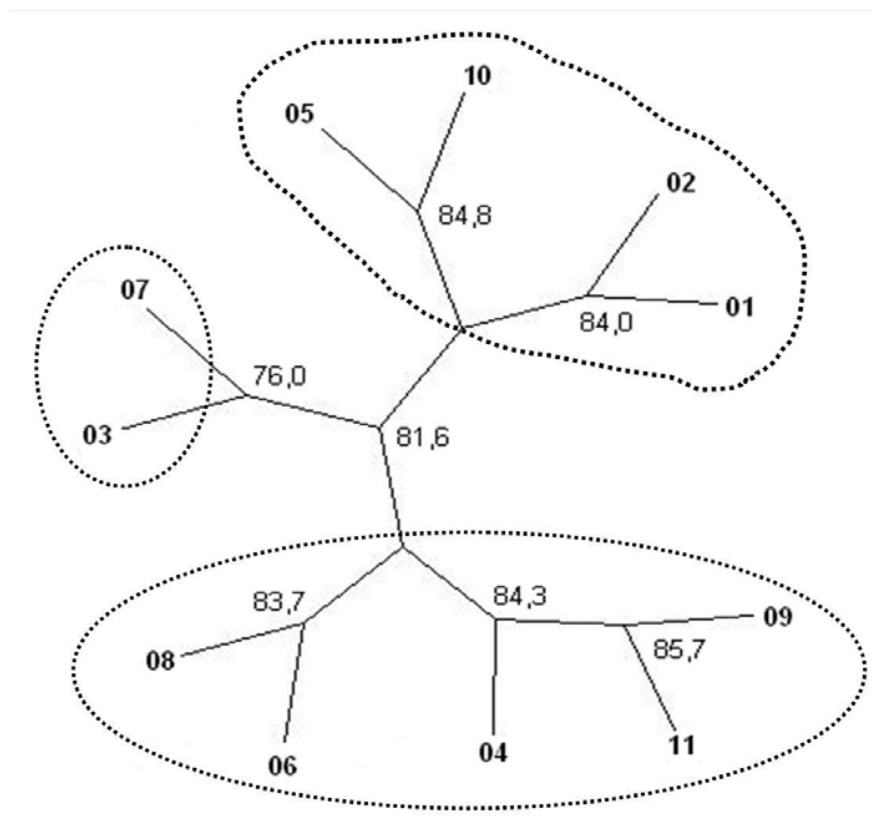


Figura 3. Árvore filogenética não enraizada de isolados de *Plasmodiophora brassicae*, gerada pelo agrupamento UPGMA. Os valores presentes nos nós internos representam a similaridade genética dos isolados.

4. CONCLUSÕES GERAIS

- O método de congelamento de hérnias em *freezer*   prático e eficiente para a preservação de estruturas de repouso de *Plasmodiophora brassicae*.
- O período de congelamento ideal para a preservação de *Plasmodiophora brassicae* varia 21 a 242 dias.
- As populações brasileiras analisadas de *Plasmodiophora brassicae* são geneticamente similares, porém apresentam diferentes comportamentos patogênicos, sendo os isolados de Carandaí (MG) e Colombo (PR) os mais agressivos.
- As análises realizadas por PCR-RAPD não foram eficientes para a separação de patótipos brasileiros de *Plasmodiophora brassicae*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, P. A.; LAZAROVITS, G. Effect of soil application of AG3 phosphonate on the severity of clubroot of bok choy and cabbage caused by *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, n. 12, p. 1517-1522-736, 2006.

ARIE, T. et al. Control of soilborne clubroot disease of cruciferous plants by epoxydon from *Phoma glomerata*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 47, n. 6, p. 743-748, 1998.

AGRIANUAL – HORTIFRUTIS. **Fnp Consultoria & Agroinformativos**, p. 345-356, 2007.

AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by fungi. In: **Plant Pathology**. 4.ed. São Diego: Academic Press, 1997, p. 245-406.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Faculdade de Ciências Agrônômicas. **Normas para elaboração de dissertação e tese**. Botucatu, 2002. 25 p.

ANDO, S. et al. Increase in *BrAO1* gene expression and aldehyde oxidase activity during clubroot development in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 7, n. 4, p. 223-234, 2006.

ASANO, T.; KAGEYAMA, K. Growth and movement of secondary plasmodia of *Plasmodiophora brassicae* in turnip suspension culture cells. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n.1, p. 145-151, 2006.

ASANO, T.; KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Germination of surface-disinfected resting spores of *Plasmodiophora brassicae* and their root hair infection in turnip hairy roots. **Mycoscience**, v. 41, n. 1, p. 49-54, 2000.

ASANO, T.; KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Surface desinfestation of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* used to infect hairy roots on *Brassica* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 4, p. 314-317, 1999.

BARR, D. J. S. Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. **Mycologia**, Lawrence, v. 84, n. 1, p. 1-11, 1992.

BHATTACHARYA, I.; PRAMANIK, M. Effect of different antagonist rhizobacteria and neem products on clubroot of crucifers. **Indian Phytopathology**, Nova Delhi, v. 5, n. 1, p. 87-90, 1998.

BULMAN, S. et al. Identification of genes from the obligate intracellular plant pathogen *Plasmodiophora brassicae*. **FEMS Microbiology Letter**, St. Louis, v. 264, n. 2, p. 198-204, 2006.

BUHARIWALLA, H. et al. Development of specific PCR primers for the amplification of polymorphic DNA from the obligate root pathogen *Plasmodiophora brassicae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, St. Louis, v. 47, n. 2, p. 83-94, 1995.

DALLA PRIA, M. et al. Ocorrência de doenças do Pak Choi no Estado do Paraná, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 316-318, 2002.

DATNOFF, L. E. Efficacy of chloride for decontaminating water infested with resting spores of *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 71, n. 8, p. 734-736, 1987.

DEVOS, S. et al. Infection of chinese cabbage by *Plasmodiophora brassicae* leads to a stimulation of plant growth: impacts on cell wall metabolism and hormone balance. **New Phytologist**, Sheffield, v. 166, n. 1, p. 241-250, 2005.

DIEDERICHSEN, E. et al. Transfer of clubroot resistance from resynthesized *Brassica napus* into oilseed rape-identification of race-specific interactions with *Plasmodiophora brassicae*. **Acta Horticulturae**, Lisboa, v. 407, p. 423-429, 1996.

DOBSON, R. L.; GABRIELSON, R. L. Role of primary and secondary zoospores of *Plasmodiophora brassicae* in the development of clubroot in chinese cabbage. **Ecology and Epidemiology**, St. Paul, v. 73, n. 4, p. 559-561, 1983.

DONALD, E. C.; LAWRENCE, J. M.; PORTER, I. J. Influence of particle size and application method on the efficacy of calcium cyanamide for control of clubroot of vegetable brassicas. **Crop Protection**, London, v. 23, n. 4, p. 297-303, 2004.

FÄHLING, M.; GRAF, H.; SIEMENS, J. Characterization of a single-spore isolate population of *Plasmodiophora brassicae* resulting from a single club. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n.7, p. 438-444, 2004.

FRIEBERG, H.; LAGERLÖF, J.; RÄMERT, B. Usefulness of nonhost plants in managing *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n. 5, p. 690-695, 2006.

FUCHS, H.; SACRISTÁN, M. D. Identification of a gene in *Arabidopsis thaliana* controlling resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) and characterization of resistance response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 9, n. 2, p. 91-97, 1996.

GRAF, H.; FÄHLING, M.; SIEMENS, J. Chromosome polymorphism of the obligate biotrophic parasite *Plasmodiophora brassicae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 2, p. 86-91, 2004.

HASSE, I.; MAY DE MIO, L. L.; LIMA-NETO, V. C. Efeito de pré-plantio com plantas medicinais e aromáticas no controle de *Plasmodiophora brassicae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 74-79, 2007.

JONES, D.R.; INGRAM, D.S.; DIXON, G.R. Factors affecting tests for differential pathogenicity in populations of *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 229-238, 1982.

ITO, S. et al. Identification of differentially expressed genes in susceptible and resistant responses of chinese cabbage to *Plasmodiophora brassicae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, n. 3-4, p. 227-231, 2001.

LIMA, M. L. P. et al. First report of clubroot of *Eruca sativa* caused by *Plasmodiophora brassicae* in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 5, p. 573, 2004.

LUDWIG-MULLER, J. et al. The host range *Plasmodiophora brassicae* and its relationship to endogenous glucosinolate content. **New Phytologist**, Sheffield, v. 141, n. 3, p.443-458, 1999.

LUDWIG-MULLER, J. et al. Peroxidase and chitinase isoenzyme activities during root infection of chinese cabbage with *Plasmodiophora brassicae*. **Physiologia Plantarum**, London, v. 90, n. 4, p.661-670, 1994.

MITANI, S. et al. Effects of cyazofamid against *Plasmodiophora brassicae* Woronin in chinese cabbage. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 59, n. 3, p. 287-293, 2003.

MURAKAMI, H. et al. Reduction of spore density of *Plasmodiophora brassicae* in soil by decoy plants. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 67, n. 1, p. 85-88, 2001.

MURAKAMI, H. et al. Effects of growing leafy daikon (*Raphanus sativus*) on populations of *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, n. 5, p. 584-589, 2000a.

MURAKAMI, H. et al. Soil suppressiveness to clubroot disease of chinese cabbage caused by *Plasmodiophora brassicae*. **Soil Biology & Biochemistry**, St. Louis, v. 32, n. 11-12, p. 1637-1642, 2000b.

NARISAWA, K. et al. Effects of pathogen density, soil moisture and soil pH on biological control of clubroot in chinese cabbage by *Heteroconium chaetospora*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 9, n. 3, p.285-290, 2005.

NARISAWA, K.; OHKI, K. T.; HASHIBA, T. Suppression of clubroot and Verticillium yellows in chinese cabbage in the Field by the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospora*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, n.1, p. 141-146, 2000.

NIWA, R. et al. Increase in soil pH due Ca-rich organic matter application causes suppression of the clubroot disease of crucifers. **Soil Biology & Biochemistry**, St. Louis, v. 39, n.3, p. 778-785, 2007.

SCOTT, E. S. Production and characterization of single-spore isolates of *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 34, n.2, p. 287-292, 1985.

SOME, A. et al. Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassica* collections from France and derived single-spore isolates, **Plant Pathology**, Oxford, v. 45, n.3, p. 432-439, 1996.

SÖNKE, H. et al. High-level expression of a viscotoxin in *Arabidopsis thaliana* gives enhanced resistance against *Plasmodiophora brassicae*. **Plant Molecular Biology**, Belgium, v. 36, n. 5, p.673-680, 1998.

SUWABE, K. et al. Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 107, n.6, p. 997-1002, 2003.

TANAKA, S.; HIROAKI, M.; ITO, S. Colonization by two isolates of *Plasmodiophora brassicae* with differing pathogenicity on a clubroot-resistant cultivar of chinese cabbage (*Brassica rapa* L. sbsp. *pekinensis*), **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 72, n. 4, p. 205-209, 2006.

TANAKA, S. et al. Biological mode of action of the fungicide, flusulfamide, against *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 105, v. 6, p. 577-584, 1999.

TAKAHASHI, H. et al. Ca^{2+} is required by clubroot resistant turnip cells for transient increases in PAL activity that follow inoculation with *Plasmodiophora brassicae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.150, n.10, p.529-535, 2002.

THILA, R.D.; CORRELL, J.C.; DUWADI, V.R. Severe and widespreas clubroot epidemics in Nepal. **Plant Disease**, v. 92, n.2, p.317-317, 2008.

TOME, A.T.; TOMITA, C.K.; UESUGI, C.H. Efeito da esterilização de solos na severidade da hérnia das crucíferas, sob condições da casa de vegetação. XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Maringá-PR. Agosto. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32 (suplemento), p.304, 2007.

TOWLEY, D.; FOX, R. T. V. Control of clubroot disease using cyazofamid and fluazinam fungicides. In: **Abstracts of Offered Papers**, 8th International Congress of Plant Pathology, 2003, Christchurch, New Zeland, p. 72.

TREMBLAY, N. et al. Evaluation of calcium cyanamide and liming for control of clubroot disease in cauliflower. **Crop Protection**, London, v. 24, n. 9, p. 798-803, 2005.

VIÉGAS, A. P.; TEIXEIRA, A. R. Alguns fungos do Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 3, n. 8, p. 223-245, 1943.

VOORRIPS, R. E. Production, characterization and interaction of single-spore isolates of *Plasmodiophora brassicae*. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 102, v. 4, p. 377-383, 1996.

WALLENHAMMAR, A.C.; JOHNSON, L.; GERHANRDSON, B. Agronomic performance of partly clubroot-resistant spring oilsees turnip rape lines. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.148, n. 7-8, p. 495-499, 2000.

WORONIN, M. *Plasmodiophora brassicae* the cause of cabbage hernia. **Phytopathological classics**, v.4, p.1-32, 1939.