

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**SELEÇÃO ARTIFICIAL PARA RESISTÊNCIA À MURCHA BACTERIANA
(*Ralstonia solanacearum*) EM FUMO (*Nicotiana tabacum* L.)**

**Cláudio Vidal de Medeiros
Biólogo**

**Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do grau de
Mestre em Fitotecnia
Área de concentração Plantas de Lavoura**

**Porto Alegre (RS), Brasil
Abril de 2005.**

FOLHA DE HOMOLOGAÇÃO

Às minhas filhas, Cláudia e Luiza

À minha esposa, Marisete

Ofereço

Ao Engenheiro Agrônomo

Horst Deeke

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao professor Luiz Carlos Federizzi, pela orientação, exemplo profissional e amizade.

À professora Sandra C. K. Milach, pelos ensinamentos, pela oportunidade de ingresso no programa de pós-graduação em Fitotecnia.

À Direção da Universal Leaf Tabacos Ltda., por ter permitido a execução desse curso, oportunizando apoio logístico para este desafio.

Ao Engenheiro Agrônomo Gerente do Departamento de Pesquisa da Universal Leaf Tabacos Ltda. Horst Deeke, pelo incentivo e oportunizando crescimento de minha formação e qualificação profissional.

A todos os colegas do Departamento de Pesquisa pelo incentivo e apoio nas horas mais difíceis.

Aos professores do Departamento de Fitossanidade, em especial a Professora Aida Terezinha Santos Matsumura pelo incentivo e amizade.

Aos amigos e colegas Celson Alexandre Weiler e Marcus André Kurtz Almança pela amizade e acolhimento em seu laboratório.

À colega Adriane Leite do Amaral pela amizade, incentivo e ajuda na realização do projeto de mestrado.

À estudante de biologia Mírian Nunes Morales, pela valiosa colaboração na elaboração e correção dessa dissertação.

Ao colega do Departamento de Pesquisa da Universal Leaf Tabacos Ltda. Sérgio Luis Lenz pela amizade e compreensão nos momentos difíceis.

Ao Dr. Márcio Ender, Engenheiro Agrônomo, pela disponibilidade, colaboração durante a elaboração dessa dissertação e ensinamentos.

Aos colegas Itamar Cristiano Nava e Luis Marcelo Tisan obrigado por compartilhar os conhecimentos nas horas de nosso grupo de estudo.

À minha família pela compreensão de minha ausência, e ao incentivo e apoio, fundamentais para a realização desse trabalho.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

SELEÇÃO ARTIFICIAL PARA RESISTÊNCIA À MURCHA BACTERIANA (*Ralstonia solanacearum*) EM FUMO (*Nicotiana tabacum* L.)¹

Autor: Cláudio Vidal de Medeiros
Orientador: Luiz Carlos Federizzi

RESUMO

O desenvolvimento de materiais tipo Burley resistente a Murcha Bacteriana é de suma importância para a fumicultura brasileira. Em fumo tipo Burley não existem variedades comerciais com boa adaptação resistentes à *R. solanacearum*. O objetivo desse trabalho foi determinar o efeito da seleção artificial para resistência à murcha bacteriana na população Burley x Virgínia em diferentes gerações segregantes. Este estudo foi realizado em um infectário de *R. solanacearum*, localizado em Santa Cruz do Sul, RS. Foi realizado cruzamento entre um cultivar tipo Burley moderadamente resistente (BY 26) e um material tipo Virgínia resistente à murcha (Oxford 207). Foram comparados quatro gerações F1, F3, F5, F7, pai moderadamente resistente (BY 26), pai resistente (OX 207) e uma testemunha suscetível (01528). O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com quatro repetições e 10 plantas em cada parcela, para uniformizar e aumentar o nível de severidade da moléstia, as plantas foram inoculadas através da deposição de 20 mL de uma suspensão (10^8 UFC/mL) de *R. solanacearum*. Para a murcha bacteriana não houve diferença significativa entre as médias das quatro gerações e nem destas com o genitor resistente, já que provavelmente a seleção efetuada em todas as gerações foi suficiente para manter os níveis de resistência observados na geração F1. Observou-se em F7 que várias linhas já estavam fixas com níveis de resistência à murcha semelhante ao genitor resistente. Portanto, os resultados finais mostraram que a seleção artificial foi eficiente para selecionar a resistência à murcha bacteriana, e que é possível transferir resistência a *R. solanacearum* de fumo Virgínia para fumo tipo Burley – mantendo as características desejadas de cor e tipo do fumo Burley com a resistência similar a do pai resistente.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil. (59p.) Abril, 2005.

ARTIFICIAL SELECTION FOR RESISTANCE TO BACTERIAL WILT (*Ralstonia solanacearum*) IN TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.)¹

Author: Cláudio Vidal de Medeiros
Adviser: Luiz Carlos Federizzi

ABSTRACT

The release of new Burley cultivars resistant to Bacterial Wilt is very important for the Brazilian tobacco production. In Burley tobacco resistance to *R. solanacearum* in adapted cultivars is rare. The goal of this study was to verify the effect of selection for resistance to Bacterial Wilt in segregating generations from a cross involving a burley and a flue cured tobacco. The population used was derived from a cross between BY 26, a moderate resistant burley cultivar, and Oxford 207, a flue cured tobacco cultivar resistant to *R. solanacearum*. The generations F1, F3, F5, F7, the parents, BY 26 and Oxford 207 and a susceptible check, 01528, were tested in the field, in a nursery naturally infested with *R. solanacearum*, located in Santa Cruz do Sul, RS. The nursery was artificially inoculated with the bacterium in order to increase and have a uniform disease pressure. It was used a Randomized Complete Block Design (RCBD), with four replications and 10 plants per plot. The four generations, F1, F3, F5 and F7 were not different regarding the disease severity and were not different compared to the resistant parent as well. Probably, the selection made in all generations was enough to maintain the high levels of resistance observed in F1 generation. Many lines in F7 were uniform in terms of high resistance to bacterial wilt, similar to Oxford 207. Therefore, the results support the strategy of transferring resistance to *R. solanacearum* from flue cured into burley tobacco, maintaining the desired plant type regarding leaf color and plant architecture of burley tobacco.

¹ Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil. (59p.) April, 2005.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 1.1 Caracterização e origem do fumo (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) | 3 |
| 1.2 Caracterização do patógeno (<i>Ralstonia solanacearum</i>)..... | 6 |
| 1.2.1 Controle | 10 |
| 1.2.2 Diversidade genética da <i>Ralstonia solanacearum</i> | 11 |
| 1.3 Melhoramento genético do fumo | 12 |
| 1.4 Resistência à <i>Ralstonia solanacearum</i> | 14 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 2.1 Método de obtenção das gerações | 17 |
| 2.2 Experimento de avaliação das diferentes gerações..... | 25 |
| 2.3 Análises estatísticas | 29 |
| 2.4 Estimativas dos parâmetros genéticos | 31 |
| 2.4.1 Médias, variâncias e herdabilidade..... | 30 |
| 2.4.2 Efeitos gênicos | 33 |
| 2.4.3 Correlações fenotípicas..... | 34 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 35 |
| 4. CONCLUSÕES | 53 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 54 |

RELAÇÃO DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| 1. Escala diagramática utilizada para avaliação do sistema radicular de fumo, infectado por Murcha Bacteriana. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 19 |
| 2. Plantas selecionadas nos diferentes anos e gerações. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 22 |
| 3. Geração, índice de seleção, plantas selecionadas e plantas totais. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 25 |
| 4. Modelo da Análise de Variância, para a severidade da Murcha Bacteriana (MB), cor e tipo. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 30 |
| 5. Modelo da Análise de Variância, para a severidade da Murcha Bacteriana (MB), cor e tipo, entre e dentro das gerações. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 30 |
| 6. Causas de variação, graus de liberdade, quadrado médio e quadrado médio esperado, entre e dentro de famílias para severidade da Murcha Bacteriana (MB). Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 31 |
| 7. Análise de variância para a severidade da moléstia (MB), ao tipo de fumo, à cor da folha para as causas de variação, médias, coeficiente de variação (CV%), de quatro gerações de fumo (F1, F3, F5 e F7) e três testemunhas (pai moderadamente resistente, pai resistente e testemunha suscetível). Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 36 |
| 8. Média da severidade da moléstia (MB), do tipo de fumo, e da cor da folha de quatro gerações de fumo (F1, F3, F5 e F7) e três testemunhas (pai moderadamente resistente, pai resistente e testemunha suscetível). Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 37 |

| | | |
|-----|---|----|
| 9. | Análise de variância para a severidade da moléstia (MB), do tipo de fumo, da cor da folha para as causas de variação, média e coeficiente de variação (CV%) de quatro gerações de fumo (F1, F3, F5 e F7). Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 41 |
| 10. | Severidade da moléstia (MB), desvio padrão (dp) do tipo de fumo, da cor da folha das linhas dentro da geração F3 de fumo. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 44 |
| 11. | Severidade da moléstia (MB), desvio padrão (dp) do tipo de fumo, da cor da folha das linhas dentro da geração F5 de fumo. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 46 |
| 12. | Severidade da moléstia (MB), desvio padrão (dp) do tipo de fumo, da cor da folha das linhas dentro da geração F7 de fumo. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 47 |
| 13. | Efeitos gênicos e valores de probabilidade do teste de quiquadrado para o ajuste do modelo para três parâmetros, para severidade de moléstia, em seis gerações de fumo F1, F3, F5, F7. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 48 |
| 14. | Estimativas das variâncias entre famílias (V^2_F), dentro das famílias (V^2_W), aditiva (V_A) e de ambiente (V_E) e herdabilidade no sentido restrito para o caráter severidade da moléstia (MB), do tipo de fumo, da cor da folha das linhas dentro das gerações F3, F5, F7 de fumo. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 50 |
| 15. | Coeficientes de correlação geral entre as características severidade da moléstia (MB), do tipo de fumo, da cor da folha. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 51 |
| 16. | Coeficientes de correlação entre as características severidade da moléstia (MB), do tipo de fumo, da cor da folha nas gerações F3, F5 e F7. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 51 |

RELAÇÃO DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| 1. Escala diagramática da severidade da moléstia utilizado e a proporção de raízes com lesões típicas de <i>R. solanacearum</i> . Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005..... | 20 |
| 2. Índice de severidade de Murcha Bacteriana em fumo das gerações F1, F3, F5, F7, do genitor moderadamente resistente KY 26, do genitor resistente OX 207 e testemunha suscetível 01528. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005..... | 40 |
| 3. Freqüência das médias de severidade da moléstia (<i>R. solanacearum</i>) das linhas dentro da geração F3. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005 | 42 |
| 4. Freqüência das médias de severidade da moléstia (<i>R. solanacearum</i>) das linhas dentro da geração F5. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005v. | 43 |
| 5. Freqüência das médias de severidade da moléstia (<i>R. solanacearum</i>) das linhas dentro da geração F7. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 43 |
| 6. Médias e desvio padrão de severidade da moléstia (<i>R. solanacearum</i>) – para as linhas dentro da geração F7. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005. | 52 |

INTRODUÇÃO

O fumo representa uma das principais atividades agrícolas no sul do país, sendo responsável por uma importante fatia do desempenho econômico dos três estados que compõem a região sul do Brasil. A fumicultura é uma atividade centenária concentrada em pequenas propriedades rurais, em média de 17 hectares, dos quais aproximadamente dois hectares são destinados para o plantio de fumo. Na safra 2004, a cultura do fumo envolveu cerca de 190 mil famílias, 407.169 hectares de área cultivada com volume de fumo de 852.488 toneladas. O setor gera divisas com exportação de fumo ao redor de 1,5 bilhão de dólares anualmente, o que representa 2,5% do total das exportações brasileiras e, considerando-se apenas volumes, o país passou a ocupar, recentemente, a liderança mundial em exportação de fumo.

Com a expansão do cultivo de fumo, aumentou o aparecimento de moléstias, destacando-se a *Ralstonia solanacearum*, que é o agente causal da murcha bacteriana em várias famílias de plantas como solanáceas, e musáceas no Brasil e no mundo. Esta bactéria é um fitopatógeno importante em áreas tropicais e subtropicais, causando grandes perdas na qualidade e produção.

No Brasil não se têm estudos que relatam a quantificação das perdas causadas pela murcha bacteriana em fumo. Entretanto, nos Estados Unidos,

estima-se que a perda na produção chegue de 1 a 7% da safra, com prejuízos de 10 a 15 milhões de dólares anuais.

Algumas moléstias, mesmo potencialmente destrutivas, podem não merecer prioridade no melhoramento de plantas, se ela puder ser controlada satisfatoriamente através de outras medidas como, por exemplo, controle químico, levando em consideração, naturalmente, o custo financeiro e o impacto ecológico deste controle. No caso da murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*, onde não há controle químico, o único caminho possível é o melhoramento genético para obtenção de genótipos resistentes.

A seleção e lançamento de genótipos resistentes terão um grande impacto econômico na fumicultura brasileira, beneficiando em primeira instância os fumicultores e conseqüentemente as indústrias fumageiras do Brasil.

Como não há um controle eficiente para murcha bacteriana e não existem variedades do fumo tipo Burley com boa adaptação e resistência a este patógeno, o desenvolvimento de variedades resistentes representa uma alternativa econômica viável, justificando investimentos para obtenção de resultados a curto e médio prazo.

Portanto, este trabalho teve como objetivo determinar o efeito da seleção artificial para resistência à *R. solanacearum* na população Burley x Virgínia em diferentes gerações segregantes.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Caracterização e origem do fumo (*Nicotiana tabacum* L.)

O fumo é uma planta anual, autógama, cultivada com fim comercial, com ciclo de vida variando entre 120 a 240 dias. O gênero *Nicotiana* tem cerca de 60 espécies conhecidas, originárias da América do Sul, América do Norte, Austrália e Ilhas do Pacífico Sul. O gênero *Nicotiana* pertence à família Solanaceae e está dividido em três subgêneros *Rustica*, *Tabacum* e *Petunioides* (Goodspeed, 1954; Narayan, 1987; Gerstel, 1979). O fumo, devido ao alcalóide nicotina era empregado pelos índios em rituais religiosos e também com fins medicinais. Atualmente, *N. rustica* tem sido utilizada também como fonte de nicotina para produção de inseticida e como fonte de ácido cítrico. Outras espécies como *N. alata*, *N. sandarae* e *N. glauca* são ornamentais. *N. tabacum* é entre as espécies a mais importante na agricultura atual e no mercado internacional (Collins & Hawks, 1993).

Desde o século XIX *Nicotiana* spp. se constituem em importante material para estudo genético devido à facilidade de manipulação das flores e o grande número de sementes produzido (Gerstel, 1979). A maioria dos fumos cultivados pertence à *N. tabacum* L., um alotetraplóide que apresenta $2n = 4x = 48$ cromossomos, distribuídos nos genomas S e T. A espécie *N. tabacum* se originou da hibridização de duas espécies diplóides, *N. sylvestris* ($2n=24$) com genoma S

(maternal), e *N. tomentosiformis* ($2n=24$), que apresenta o genoma T (parental) (Gerstel, 1979; Bland et al., 1985; Okamuro & Goldberg, 1985; Sperisen et al., 1991; Collins & Hawks, 1993). A hibridização natural entre estas espécies de *Nicotiana* ocorreu provavelmente no Nordeste da Argentina ou Sudeste da Bolívia, porque é a região onde as duas espécies convivem na natureza (Collins & Hawks, 1993).

No Brasil são plantados os tipos de fumo Virgínia (81%), Burley (17%), Comum (0,8%) e outros (1,2%), onde se encontram os fumos para capa de charuto, oriental e fumo em corda. Na fabricação do cigarro são usados 40% de fumo Virgínia, 35% de fumo Burley, 15% de fumo Oriental e 10% de talo picado. A mistura destes tipos de fumo na composição do cigarro produz perfeito equilíbrio no sabor e aroma, atendendo a exigências do mercado consumidor (Kist et al., 2004).

O fumo Burley, originário de uma mutação, foi descoberto, em 1864, Ohio, EUA, em canteiros de muda pelos produtores de fumo. A mutação se caracteriza por ser um gene recessivo que em homozigose proporciona uma coloração diferenciada para as plantas de fumo. As características principais do Burley são: folhas arredondadas, coloração verde clara no início do ciclo à amarelada no final do ciclo vegetativo, ângulo de inserção da folha fechada ($< 45^\circ$), coloração castanha escura do fumo curado, aroma típico (forte), maior número de folhas, na composição química apresenta apenas nicotina, como alcalóide, e sistema de cura feita em galpões com temperatura ambiente (Garner, 1951; Akehurtst, 1970; Palmer & Pearce, 1999). O fumo tipo Burley foi mantido pelos agricultores americanos até 1930 quando iniciaram os primeiros trabalhos de melhoramento genético. Por ter sido descoberto e mantido em solos argilosos, férteis e em áreas

de elevada altitude, o fumo Burley é mais adaptado a estas condições (Garner,1951; Akehurtst, 1970).

A murcha bacteriana, também conhecida nos EUA como *Granville wilt*, por ter sido identificada pela primeira vez no Condado de Granville, Carolina do Norte em 1880 (Lucas, 1975; Shoemaker & Shew, 1999), ocorre somente nas áreas onde são plantados fumos do tipo Virgínia, no entanto, o tipo de fumo Burley não apresenta genes de resistência à *R. solanacearum*, fato este que pode ser justificado pela ausência do patógeno nas áreas de origem, onde não houve pressão de seleção para este caráter (Garner, 1951; Sisson & Wernsman, 1992).

Em 1893, na Carolina do Norte, EUA, dentre os fumos curados à temperatura ambiente, foi descoberto o tipo Virgínia, através de um acidente de cura. Os fumicultores utilizavam carvão para proporcionar um ambiente favorável à cura desse tipo fumo, uma elevação demasiada de temperatura, provocou alteração de cor do fumo curado, passando do castanho escuro para coloração laranja e aroma adocicado. A partir de então, produtores dessa região selecionaram e preservaram o fumo tipo Virgínia com fenótipo de coloração verde intenso, folhas estreitas, lanceoladas, ângulo de inserção da folha aberta (90°) e sistema de cura utilizando aquecimento de ar, em estufas (Palmer & Pearce 1999). Na caracterização do local de origem do fumo tipo Virgínia, pode ser considerado a adaptação a solos arenosos, de média fertilidade e baixa altitude, quase ao nível do mar. Em todos os países que produzem fumo tipo Virgínia os solos são preferencialmente arenosos, leves, de mediana fertilidade, condições ambientais essenciais para a produção de fumo com características desejáveis para o mercado consumidor (Garner, 1951; Akehurtst, 1970; Palmer & Pearce, 1999).

Com exceção de *N. rustica*, que é cultivado na Rússia, China, e em outros países, todos outros fumos comerciais (Virgínia, Burley e Oriental, etc.) são variações dentro das espécies *N. tabacum* L., sendo possível o cruzamento entre fumos Burley e Virgínia com a obtenção de híbridos férteis (Collins & Hawks, 1993).

1.2 Caracterização do patógeno (*Ralstonia solanacearum*)

A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi et al. 1995), sin. *Pseudomonas solanacearum* é considerada a principal moléstia vascular de etiologia bacteriana encontrada no mundo. O agente causal da murcha bacteriana foi descrito pela primeira vez por Smith, em 1886, como *Bacillus solanacearum* e, desde então, vem recebendo diferentes denominações. A nomenclatura dada em 1914 pelo próprio Smith, de *Pseudomonas solanacearum*, prevaleceu por quase 80 anos (Bringel, 2002). Em 1992, a bactéria foi reclassificada por Yabuuchi et al. (1992), dentro do grupo II de homologia de rRNA como *Burkholderia solanacearum* (Smith). Entretanto, menos de três anos depois, foi novamente reclassificada, com base nos dados de análise filogenética da seqüência de nucleotídeos do 16SrRNA, hibridação de rRNA-DNA, análise de lipídios celulares e de ácidos graxos e nas características fenotípicas (Yabuuchi et al., 1995). Permaneceu no grupo III, porém em um novo gênero, *Ralstonia*, para abrigar o grupo de homologia de DNA distinto do grupo da espécie *Burkholderia cepacia*. Neste novo contexto, o gênero *Pseudomonas* passou a ser apenas das espécies fluorescentes (grupo I) e as fitopatogênicas não fluorescentes ficaram distribuídas entre os gêneros *Acidovorax* no grupo III e *Burkholderia* e *Ralstonia* no grupo II. O gênero *Ralstonia* ficou abrangendo as espécies *R. pickettii* e *R. solanacearum*. Esta nova proposta de classificação foi

publicada e validada na International Journal of Systematic Bacteriology (IJSB) (Yabuuchi et al., 1992; Yabuuchi et al. 1995).

Esta bactéria tem habilidade de infectar muitos hospedeiros e está associada a mais de 200 espécies de plantas em pelo menos 50 famílias diferentes. Muitas das plantas relatadas como suscetíveis pertencem as dicotiledôneas e poucas são monocotiledôneas. A família Solanaceae tem um grande número de espécies suscetíveis (Hayward, 1995; Kelman, 1998). As espécies de importância econômica mais afetadas são principalmente batata, tomate, pimentão, berinjela e fumo (Takatsu & Lopes, 1997). Entre os gêneros com espécies hospedeiras de *R. solanacearum*, o gênero *Nicotiana* possui a maioria das espécies conhecidas como hospedeiras. Devido a este fato, as diferentes espécies do gênero *Nicotiana* têm sido intensamente testadas, no esforço de localizar fontes de resistência ao patógeno (Lucas, 1975).

Em fumo, a murcha bacteriana foi relatada pela primeira vez nos Estados Unidos em 1880, somente em 1896, Erwin F. Smith registrou a moléstia em batata, tomate e berinjela (Hayward, 1994).

No Brasil este patógeno foi relatado primeiramente no ano de 1922 por Von Parseval em fumo e batata, porém a moléstia foi confirmada somente mais tarde (Takatsu & Lopes, 1997).

French (1994) afirma que *R. solanacearum* pode ser considerado um verdadeiro patógeno de solo, por sua habilidade em sobreviver melhor em solos úmidos, diminuindo em alguns solos pela baixa capacidade de retenção de água. Também tem redução de crescimento e sobrevivência em solos com elevada atividade de antagonismo microbiano, e quando exposto à luz solar e devido à ausência de plantas invasoras hospedeiras. Além da habilidade de multiplicação rápida, a bactéria é capaz de sobreviver por longos períodos nos solos.

Ralstonia solanacearum prefere condições de altas temperaturas e umidade, é capaz de sobreviver no solo à temperatura de 17,8 °C durante meses. Entretanto, os maiores índices de moléstia ocorrem a temperaturas do solo entre 26,7 a 37,8 °C. Com temperaturas inferiores a 21 °C as solanáceas são infectadas, porém não apresentam o sintoma de murchamento (Lucas, 1975; Tokeshi & Carvalho, 1980; Buddenhagen & Kelman, 1964; Englebrech & Prinsloo, 1985; Akiew & Trevorrow, 1994; Hayward, 1994).

Na ausência de hospedeiros, algumas raças tendem a desaparecer rapidamente; assim a raça que ataca a banana pode desaparecer em 18 meses; raças patogênicas ao fumo desapareceram em Java com três meses de inundação. Em solos secos as células bacterianas são destruídas rapidamente e isto explica a sua ausência em solos desérticos, sujeitos a períodos de secas periódicas (Tokeshi & Carvalho, 1980).

A moléstia é caracterizada por murchamento, atrofiamento e amarelecimento das folhas e pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento da planta. Em plantas jovens, suculentas e suscetíveis, os sintomas iniciais são o murchamento de uma ou duas folhas durante as horas mais quentes do dia, freqüentemente seguido por recuperação no final do dia e ao amanhecer. Muitas vezes um lado da planta ou até mesmo a metade de uma simples folha fica murcha. Este murchamento unilateral é um sintoma típico de murcha bacteriana. Se a moléstia desenvolver rapidamente, as folhas não trocam de cor. Entretanto, se o murchamento ocorrer gradualmente, as folhas afetadas ficam com coloração verde claro e progressivamente tornam-se amarelas; freqüentemente áreas necróticas aparecem entre as nervuras e as margens das folhas. Com alta temperatura e tempo seco, as folhas murchas são seguidamente escaldadas (Lucas, 1975; Mariano et al., 1997; Shoemaker & Shew, 1999).

A diagnose da murcha bacteriana é bastante simples, factível a campo. Aos primeiros sintomas de murchamento nas folhas, o sistema radicular deve ser examinado: normalmente poucas raízes e freqüentemente apenas uma será encontrada em um estado adiantado de apodrecimento. Se o solo for úmido, as raízes de fumo afetadas se tornarão tenras e pouco desenvolvidas. A descoloração das raízes aparece como listras negras nas zonas próximas da casca e em pequenos pontos onde a patógeno penetrou na raiz principal (Lucas, 1975).

Outro método de fazer a diagnose é através de um corte longitudinal no caule da planta infectada onde este apresenta descoloração de marrom-clara para amarela-amarronzada no tecido vascular. Com o progresso da moléstia, grandes porções da medula e do córtex ficam com coloração marrom para preta. Finalmente, a casca interna apodrece na base do talo, a planta fica com o talo oco e o tecido vascular se torna marrom escura para preta (Lucas, 1975; Shoemaker & Shew, 1999).

Em geral, a penetração da *R. solanacearum* se dá pelas raízes desde que haja umidade para permitir a sua multiplicação. A seqüência dos eventos é a que segue: a) penetração inicial de um número pequeno de células bacterianas em alguns vasos lenhosos; b) multiplicação em áreas localizadas nos traqueídeos e sua distribuição longitudinal sem que os parênquimas do xilema ou do floema sofram alteração; c) obstrução dos vasos lenhosos em grande extensão, dificultando o fluxo de água; d) degradação das paredes e de células dos parênquimas adjacentes surgindo cavidades com a invasão do floema, medula e tecido cortical, principalmente em órgãos suculentos (Tokeshi & Carvalho, 1980).

Estudos em tomate e fumo indicam que o mecanismo de murchamento e o modo e o efeito do patógeno no hospedeiro pode ser separado em dois processos

primários: (1) a indução do murchamento e (2) quebra do tecido. Depois de uma estirpe virulenta de bactéria entrar no sistema vascular de uma planta suscetível, ela se multiplica rapidamente produzindo uma exsudação, a qual consiste de misturas de complexos polissacarídeos e um peptídeo simples. A alta polimerização da exsudação de tamanho molecular grande aumenta a viscosidade do fluxo vascular, resultando na ligação dos vasos. A massa bacteriana por si só oferece algumas obstruções para o movimento da água, porém o pus bacteriano se torna o mais importante agente. O colapso e destruição da parede celular permitem o movimento lateral da bactéria de célula para célula, desorganizando a condução de água nos tecidos, impedindo o movimento da água e aumentando a severidade do murchamento (Kelman & Sequeira, 1965).

1.2.1 Controle

O controle da murcha bacteriana é difícil, devido à complexidade de sobrevivência no solo e ao grande número de plantas hospedeiras da bactéria, principalmente quando as condições ambientais são favoráveis à moléstia (Takatsu & Lopes, 1997; Lopes & Reifschneider, 1999). As medidas a serem adotadas no controle da moléstia dependem da cultura, das estirpes do patógeno presentes, do conhecimento do seu sítio de sobrevivência e dos modos de transmissão. Dentre estas medidas, incluem-se o uso de cultivares resistentes, a rotação de culturas, a seleção de material de plantio livre do patógeno e o uso de microorganismos antagonistas (Hayward, 1994).

O controle químico da murcha bacteriana tem apresentado pouco sucesso (Lopes, 1994; Takatsu & Lopes, 1997) e a utilização de produtos químicos e

antibióticos no controle da moléstia é considerada impraticável (Eden-Green, 1994).

O uso de material isento do patógeno como medida de controle preventivo é seguramente uma forma de controle (Takatsu & Lopes, 1997). Assim a utilização de água não contaminada na irrigação previne a disseminação do patógeno (Lopes & Reifschneider, 1999), da mesma forma a eliminação de plantas invasoras suscetíveis assegura a baixa incidência da moléstia (Miranda, 1998).

O cultivo intercalado com outras culturas tem sido usado como uma medida para redução da população do patógeno. Embora a bactéria sobreviva no solo por vários anos, sua população pode ser reduzida através de rotação de culturas. Reduções da população do patógeno no solo foram obtidas após cultivo de arroz, milho e cana-de-açúcar por período igual ou superior a dois anos (Tussime et al., 1997).

1.2.2 Diversidade genética da *Ralstonia solanacearum*

O conhecimento da estrutura genética da população é importante para estudos epidemiológicos e o controle efetivo de moléstias, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de genótipos resistentes (Van der Wolf et al., 1998). Uma grande diversidade genética tem sido encontrada em bactérias de solo e a diferenciação genética destas populações pode chegar a nível microgeográfico, dependendo do solo e das propriedades da rizosfera dos hospedeiros, como demonstrado para populações de *Burkholderia cepacia* (MacArthur et al., 1988; Di Cello et al., 1997). No entanto, pouco se conhece sobre os fatores que determinam a estrutura da população de *R. solanacearum* (Jaunet & Wang, 1998).

R. solanacearum tem sido classificada em raças, com base na reação de hospedeiros, e em biovares, de acordo com a capacidade de oxidar determinados dissacarídeos e álcoois. Apesar de bastante utilizada, a classificação em raças e biovares não possuem uma divisão claramente definida e ainda não faz parte dos critérios do Código Internacional de Nomenclatura de bactérias (Silveira, 2002).

Estirpes de *R. solanacearum* foram classificadas em quatro biovares de acordo com a capacidade de oxidar os açúcares celobiose, lactose, e maltose e os álcoois dulcitol, manitol e sorbitol (Hayward, 1994). As estirpes das biovares I e II estão amplamente distribuídas, sendo que a biovar I predomina em regiões de clima quente e caracteriza-se por atacar um maior número de espécies hospedeiras. A biovar II corresponde à raça 3 e predomina em regiões de clima temperado, sendo composta por estirpe que infecta basicamente a cultura da batata. A biovar III está mais adaptada às regiões quentes dos trópicos (Hayward, 1991).

As biovares I, II e III estão presentes em diferentes culturas e regiões do Brasil. Um estudo conduzido em plantas da família solanácea mostra que a biovar I ocorre em todas as regiões brasileiras, a biovar II predomina no Sul, Sudoeste e Centro Oeste, a biovar III é mais comum no Norte e Nordeste (Mariano et al., 1997).

1.3 Melhoramento genético do fumo

Atualmente, o principal objetivo dos programas de melhoramento de fumo é desenvolver cultivares que satisfaçam tanto os agricultores quanto as empresas fabricantes de fumo. Em geral, os fumicultores estão interessados nos atributos que aumentem características tais como: resistência a moléstias, altos rendimentos de folha, melhorias na qualidade, facilidade de colheita e cura. Por

outro lado, as indústrias de fumo desejam alta produção de lâmina e diminuição de talo, composição química e física equilibrada necessárias para a produção de misturas com aroma e sabor apropriado (Leeg & Smeeton, 1999).

O fumo é uma clássica espécie autógama, onde a polinização cruzada é inferior a 3%. As variedades de fumo desenvolvidas pelos programas de melhoramento são predominantemente linhas puras. Em menor escala, o desenvolvimento de híbridos tem sido utilizado especialmente quando o objetivo é resistência à moléstia. Como exemplo específico de cultivares híbridos podem ser citadas as cultivares de fumo resistentes à TMV (Tabacco Mosaic Virus) (Leeg & Smeeton, 1999).

No melhoramento de fumo muitos são os métodos utilizados. A seleção massal foi responsável pelo desenvolvimento dos principais tipos de fumo usados pelas indústrias fumageiras (Matzinger & Wernsman, 1979).

Quando o objetivo é combinar características desejáveis encontradas em duas ou mais cultivares, o método genealógico é o procedimento mais adequado. Entretanto, quando alguma característica ou resistência à moléstia se encontra em outra espécie do gênero *Nicotiana* ou tipo de fumo o método retrocruzamento é o mais indicado (Leeg & Smeeton, 1999).

Com o refinamento da técnica de cultura de tecidos, haplóides e duplo haplóides têm sido utilizados no melhoramento de fumo. Os recentes avanços na engenharia genética também oferecem grande potencial para o aumento de variabilidade genética através da introdução de genes de qualquer organismo vivo (Wernsman, 1999).

1.4 Resistência à *Ralstonia solanacearum*

O meio mais efetivo de controle da murcha bacteriana em diversas culturas tem sido a utilização de resistência genética, através dos programas de melhoramento a este patógeno (Lopes & Quezado-Soares, 1994). Entretanto, o desenvolvimento de variedades resistentes tem sido dificultado porque o exato padrão genético de resistência para as várias estirpes do patógeno não foi ainda definido para nenhuma cultura (Takatsu & Lopes, 1997; Grimault et al., 1994).

O conhecimento existente com relação à murcha bacteriana em fumo, permite descrevê-la como uma resistência quantitativa, onde a severidade da moléstia apresenta variação contínua desde muito baixa (alta resistência) até extremamente alta (alta suscetibilidade) (Sisson & Wernsman, 1992). Neste tipo de herança vários genes de pequeno valor individual no genótipo e que sofrem grande influência do ambiente compõem a resistência. Além disso, a resistência quantitativa se caracteriza por não apresentar especificidade ao patógeno, o que geralmente proporciona uma resistência de amplo espectro mais durável do que a resistência monogênica, específica para a raça do patógeno (Johal et al., 1995).

A resistência à murcha bacteriana é predominantemente de ação gênica aditiva, assim como a maioria dos genes de resistência às moléstias em fumo (Jack & Robertson, 1997).

A literatura indica que variedades resistentes à *R. solanacearum* em um país são suscetíveis em outro. Isto pode ser explicado pela ocorrência de estirpes distintas entre ambientes e também pela interação estirpe versus gene de resistência. Como exemplo de gene maior para a resistência é citadas a variedade KOKUBU que determina alta resistência no Zimbábue e Malásia, baixa resistência no Brasil e EUA, e susceptibilidade na África do Sul. O que reforça a ocorrência de interação entre gene maior de resistência com diferentes estirpes

de bactéria. De outra forma, a variedade NC 95, com resistência poligênica, que apresenta resistência em todos os locais estudados, reforça a tese de resistência não específica à raça (Jack, 2002).

De acordo com Lucas (1975) a resistência à murcha bacteriana em fumo apresenta a possibilidade de ter mecanismo de reação de hipersensibilidade (RH), que consiste na morte rápida de um número limitado de células em torno do sítio inicial da infecção. Esse mecanismo pode funcionar individualmente ou sinergisticamente, incluindo acúmulo de fitoalexinas, fenóis e proteínas PR – proteínas relacionadas com a patogênese (quitinases e glucanases, por exemplo) (Johal et al., 1995).

Em batata, de acordo com Rowe & Sequeira (1970), a resistência é controlada por três genes dominantes e independentes. Posteriormente, Rowe et al. (1972) concluíram que era evidente o fato de que relativamente poucos genes estavam envolvidos na resistência, em um sistema pelo menos parcialmente inter-relacionado, ainda que aparentemente específico para certas estirpes do patógeno. Segundo Tung et al. (1990a, 1990b) e Tung (1992), a resistência em batata é poligênica e são necessários genes de adaptação ao ambiente para a expressão efetiva da resistência à murcha bacteriana. Programas de melhoramento estão sendo implementados com genes de resistência de diversas espécies diplóides de *Solanum*, incluindo *S. phureja*, *S. sparsipilum*, *S. chacoense*, *S. microdontum* e *S. raphanifolium*. É provável que a base genética para resistência seja diferente em cada espécie, possibilitando que a resistência nas novas linhagens possa ser controlada poligenicamente. Entretanto, não há informações sobre os padrões de herança da resistência das espécies individuais.

As bases genéticas da resistência à murcha bacteriana em fumo, ainda não estão bem elucidadas, no entanto, alguns estudos permitem afirmar que a

resistência pode ser de herança simples ou complexa (Wernsman, 2004, com. pes.).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado em casa de vegetação no Centro Agrônômico da Universal Leaf Tabacos Ltda, localizada em Rincão Del Rey, Rio Pardo, RS, em lavoura (infectário) na localidade de Linha Andrade Neves, Santa Cruz do Sul, RS, e no laboratório de Clínica Vegetal - Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

2.1 Método de obtenção das gerações

As gerações utilizadas neste estudo são provenientes do cruzamento KY 26 x Oxford 207.

Como fonte de resistência poligênica à *R. solanacearum* foi utilizada a variedade americana Oxford 207, fumo tipo Virgínia, lançado comercialmente na década de 1990. Esta variedade tem como fonte de resistência à murcha bacteriana a variedade K 399, lançada na década de 1980, que por sua vez descende da variedade NC 95, da década de 1960. Todas estas variedades descendem de uma variedade originária da América Central, introduzida nos EUA em 1934, a T.I. 448-A (T.I. – Tobacco Introduction), a qual é considerada a fonte primária para resistência à *R. solanacearum* em fumo (Sisson, 1999).

Como pai suscetível utilizou-se uma variedade tipo burley KY 26 oriunda dos Estados Unidos, introduzida na década de 1950 pela Companhia de Fumos Souza Cruz, que desde então vem sendo empregada pelas empresas fumageiras instaladas no Brasil (Deeke, 2002, com. pes.).

Ao longo dos anos observou-se que a variedade KY 26 apresentava um comportamento moderadamente resistente à murcha bacteriana. Técnicos de empresas fumageiras e agricultores começaram a selecionar plantas que sobreviveram em ambientes que estavam contaminados com a bactéria *R. solanacearum*, portanto, este cultivar passou por um processo de seleção massal por várias gerações, de onde foram selecionadas linhagens que apresentaram melhor desempenho para a característica de resistência à murcha bacteriana.

A geração F1 foi conduzida em casa de vegetação. Das plantas F1 foram colhidas seis cápsulas das quais retiraram-se as sementes para a geração F2.

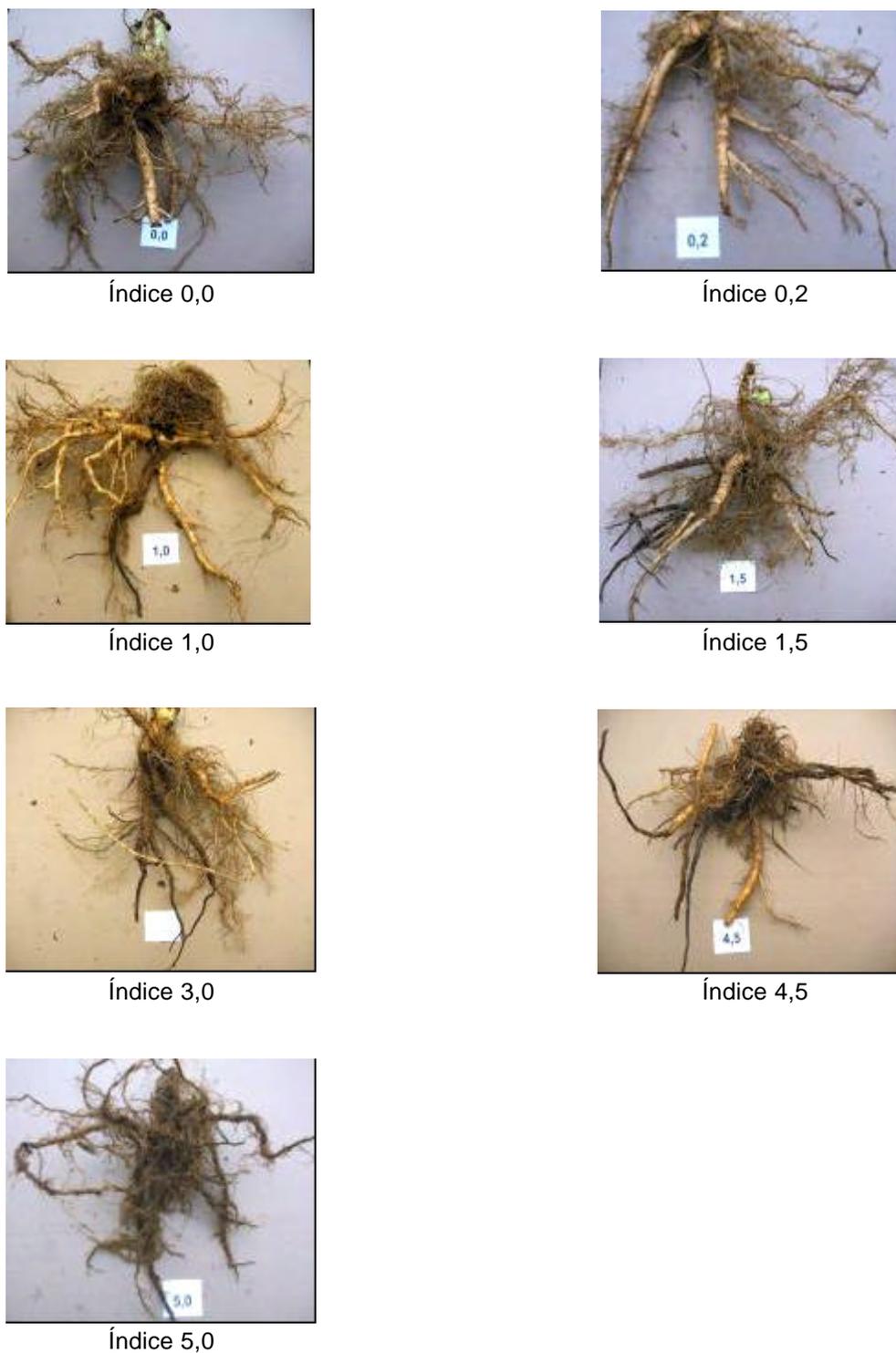
As gerações F2, F3, F4, F5 e F7 foram conduzidas em enfermaria de murcha bacteriana, na localidade de Andrade Neves, Santa Cruz do Sul. Para uniformizar e aumentar o nível de severidade da moléstia, 35 a 40 dias após o transplante foram colocados 20 mL de uma suspensão (10^8 UFC/mL) de *R. solanacearum* junto ao colo da planta (Moore et al., 1963, Akiew & Trevorrow, 1994). Como critério de seleção foram avaliados os seguintes aspectos: plantas resistentes à murcha bacteriana e fenótipo do fumo tipo Burley. Foram selecionadas algumas plantas com fenótipo intermediário (folha tipo Burley, ou seja com forma mais arredondada e coloração verde clara). Quando as plantas selecionadas estavam em estágio de florescimento, foi colocada uma capa protetora do fabricante NOVOTEX AGRO® para proteção da inflorescência, com o objetivo de evitar a contaminação com pólen proveniente de outras plantas. Ao final do ciclo de desenvolvimento das plantas, cerca de 120 dias após o

transplântio, foi feita a seleção de resistência através da visualização do sistema radicular, utilizando-se a escala diagramática de zero a cinco, onde zero corresponde a raízes sem sintomas e cinco a raízes completamente atacadas pela bactéria. Esta escala diagramática foi desenvolvida pelo Departamento de Pesquisa da Universal Leaf Tabacos Ltda., e vem sendo utilizada por muitos anos na avaliação de sistema radicular de fumo infectado pela bactéria *R. solanacearum* (Tabela 1 e Figura 1). Foram selecionadas as plantas que obtiveram ndice severidade do sistema radicular inferior a 1.

TABELA – 1 Escala diagramática utilizada para avaliação do sistema radicular de fumo, infectado por *R. solanacearum*. Porto Alegre, RS, UFRGS, 2005.

| Severidade da Moléstia | Raiz com sintomas (%) |
|------------------------|-----------------------|
| 0,0 | 0 |
| 0,5 | 10 |
| 1,0 | 20 |
| 1,5 | 30 |
| 2,0 | 40 |
| 2,5 | 50 |
| 3,0 | 60 |
| 3,5 | 70 |
| 4,0 | 80 |
| 4,5 | 90 |
| 5,0 | 100 |

Na geração F2 transplantaram-se 1.200 plantas provenientes da geração F1, no infectário de murcha bacteriana, de onde foram selecionadas 43 plantas (Tabela 2).



* Zero corresponde a raízes saudáveis e 5 a raízes completamente danificadas pela bactéria

FIGURA 1 – Escala diagramática da severidade da moléstia utilizada e a proporção de raízes de fumo com lesões típicas de *Ralstonia solanacearum*. Porto Alegre, RS, UFRGS, 2005.

O critério de seleção foi o mesmo em todas as gerações selecionadas. Da geração F2 até a F4, cada planta selecionada deu origem a uma linha na geração seguinte. Cada linha consistia de 15 plantas, espaçadas 0,45 m. entre si. O espaçamento entre linhas foi de 1,20 m. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com três repetições.

Na geração F5 cada planta selecionada em F4 deu origem a uma linha com 10 plantas. O espaçamento dentro e entre linhas foi de 0,45 m. e 1,20 m., respectivamente. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com quatro repetições.

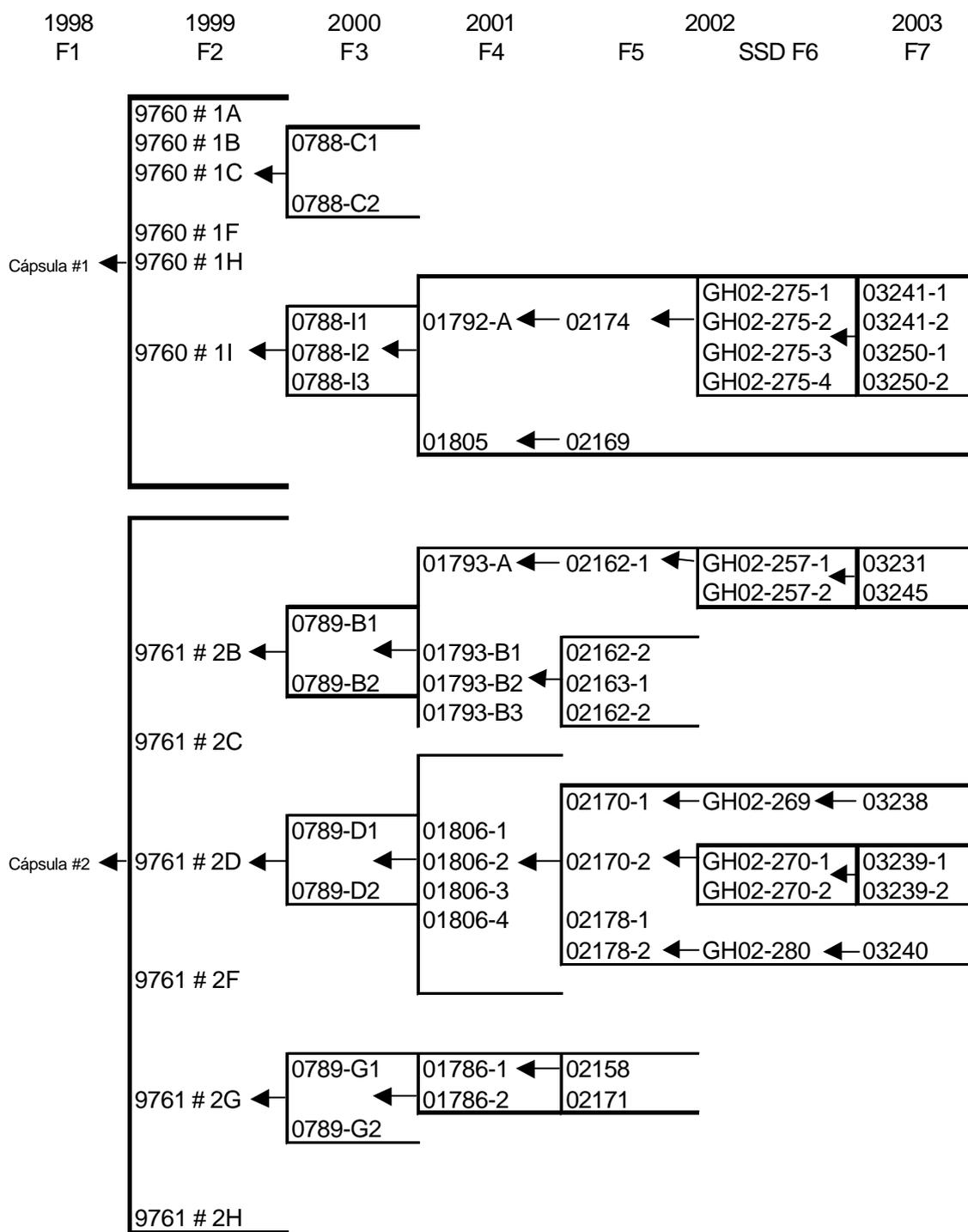
Com o objetivo de avançar uma geração de F5 para F6, as 28 plantas selecionadas na F5 foram plantadas na casa de vegetação em vasos (Tabela 2). Utilizaram-se sementes oriundas de uma cápsula de onde foi escolhida, ao acaso, apenas uma planta para esse avanço de geração.

As 28 plantas F7 foram conduzidas a campo na enfermaria de murchadeira. Cada planta F6 deu origem a uma linha F7 com 10 plantas e quatro repetições (Tabela 2). Trinta e sete plantas F7 foram selecionadas, colhidas individualmente e as sementes mantidas separadas (Tabela 3).

A seleção foi realizada com base no desempenho de plantas individuais dentro de cada linha. Não foram consideradas as médias de cada linha individual ou as médias de cada genótipo, considerando todas as repetições.

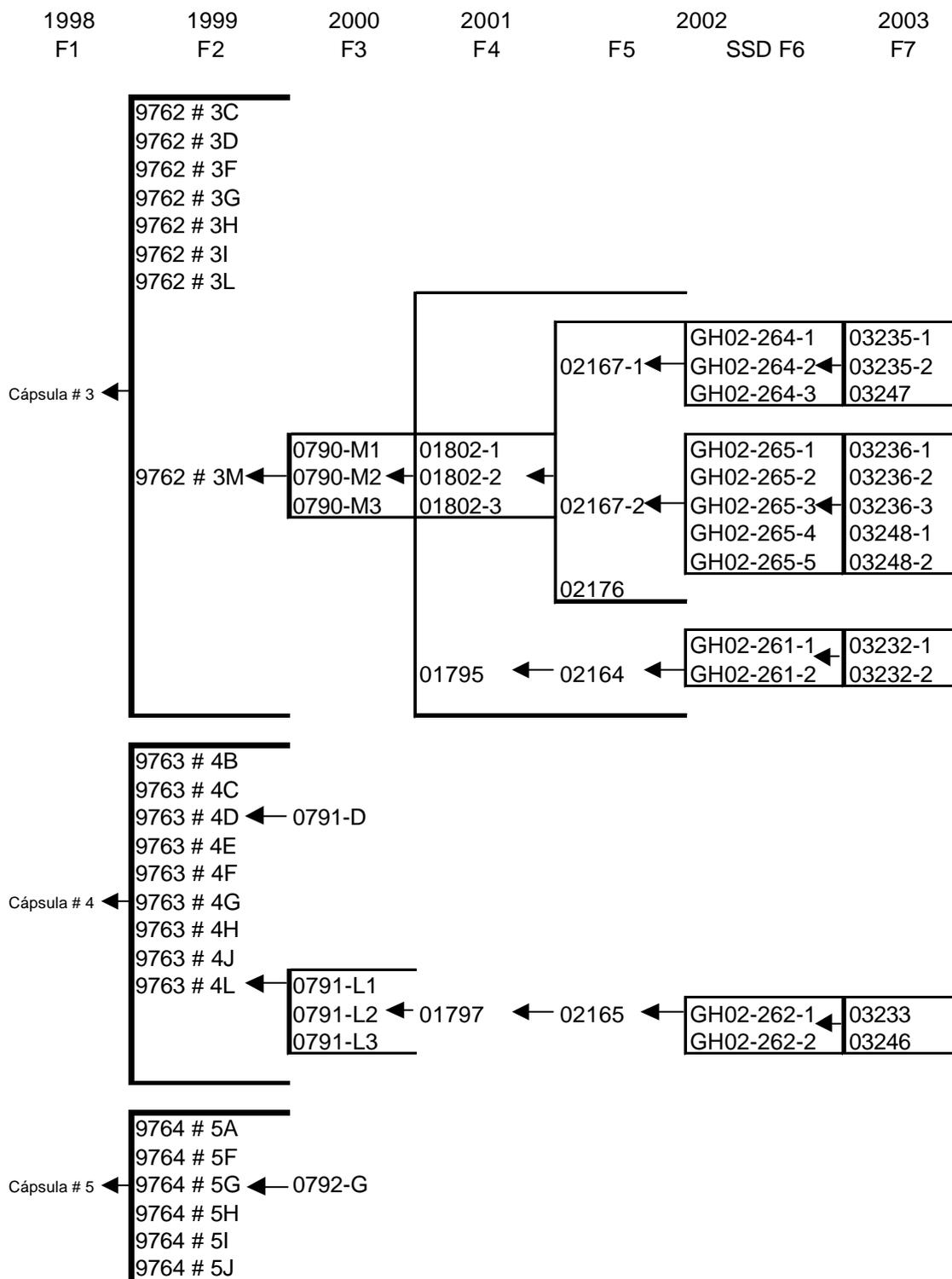
Um esquema do processo de seleção aplicado nas diferentes gerações é apresentado (Tabela 2), bem como a intensidade de seleção aplicados em cada geração (Tabela 3).

TABELA 2. Plantas selecionadas nos diferentes anos e gerações. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.



← Indicam a planta de origem na geração anterior das progênes selecionadas

Continuação TABELA 2. Plantas selecionadas nos diferentes anos e gerações.
Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS.
2005.



← Indicam a planta de origem na geração anterior das progênies selecionadas

TABELA 3. Geração, intensidade de seleção, plantas selecionadas e plantas totais. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

| Geração | Plantas totais | Plantas selecionadas | Intensidade de seleção |
|---------|----------------|----------------------|------------------------|
| F2 | 1200 | 43 | 0,036 |
| F3 | 1935 | 26 | 0,013 |
| F4 | 1170 | 28 | 0,024 |
| F5 | 1120 | 28 | 0,025 |
| F6 | - | - | - |
| F7 | 1120 | 37 | 0,033 |

2.2 Experimento de avaliação das diferentes gerações

A área escolhida como enfermaria de murcha bacteriana (localidade de Andrade Neves, Santa Cruz do Sul, RS) foi selecionada devido ao longo histórico de ocorrência da moléstia. Realizaram-se coletas de amostras de solo e plantas e foram enviadas para o Laboratório de Clínica Vegetal – Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, UFRGS. De acordo com laudos de análises, a bactéria foi identificada como *Ralstonia solanacearum*, classificada como biovar I.

Para o isolamento da *R. solanacearum*, os caules de fumo com sintoma da moléstia foram desinfestados através da imersão consecutiva em álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%, por 30 s, e lavadas em água destilada esterilizada (ADE). Segmentos de 1 a 2 cm foram então colocados em tubos de centrífuga (1,5 mL) contendo 500 µL de ADE para coleta do fluxo bacteriano. A suspensão de células foi diluída em série (10X) por transferência para novos tubos com ADE. Vinte microlitros das diferentes diluições foram colocados e espalhados na superfície do meio de cultura SPA (sacarose 20 g/L⁻¹; peptona 5 g/L⁻¹; K₂HPO₄ 0,5 g/L⁻¹; MgSO₄. 7H₂O 0,25 g/L⁻¹; Agar 15 g/L⁻¹) pH 7,2, mais 0,05 de cloreto de trifênil

tetrazólio (CTT) (2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride, Sigma) em placa de Petri. Colônias fluídas com vermelho e bordas brancas foram transferidas para novas placas e, após 48 horas a 28 °C, submetidas aos testes de gram, oxidase e DAS-ELISA, com anti-soro policlonal reativo à *R. solanacearum*, fornecido pela EMBRAPA-CPACT (Castro et al., 1993). Para determinação do biovar foram utilizados testes bioquímicos, onde as culturas bacterianas foram crescidas em meio SPA à 28 °C, por 24 h, e transferidas com um palito de dente previamente esterilizado, para a superfície de 150 µL de meio Ayers pH 7,2 ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 g/L⁻¹; KCl 0,2 g/L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L⁻¹; Agar 6 g/L⁻¹), acrescido de 1 mL/L⁻¹ de azul de bromotimol 1,6% e sorbitol, na concentração final de 1%, contido em cada um dos 96 orifícios de uma placa de microtitulação. O meio sem fontes de carbono serviu de controle negativo. Cada isolado foi cultivado em três placas diferentes com cada uma das fontes de carbono. Após sete dias à 28 °C, a capacidade do isolado oxidar a fonte de carbono foi considerada positiva quando a cor do meio mudou de verde para amarela (Schaad, 1988).

Como teste de confirmação da biovar foi feito um teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) das células de *R. solanacearum*, cultivadas em SPA por 24 h à 28 °C, foram transferidas com alça para 100 µL de ADE, contidos em tubos de centrífuga (1,5 mL). A suspensão foi mantida em banho-maria à 95-98 °C por 5 min e constitui-se na amostra. A PCR foi feita em 25 µL de tampão (10 mM Tris-HCl [pH 8,3] a 25 °C, 50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0,001 % de gelatina [peso/vol], 0,05% de Nonidet P-40 [vol/vol], 0,05% de Tween 20 [vol/vol], 0,2 mM de cada dNTP, 1,25 U de polimerase Ampli Taq (Gibco-BRL). 1µM de oligonucleotídeos indicadores T3A (5'-GGG GGT TCG AAT TCC CCG CCG GCC CCA-3') (Cybersyn), identificador da biovar 1 (Welsh & McClelland, 1991; Seal et al., 1992). As amplificações foram conduzidas em termociclador MJ Research

(Minicycler TM) nas seguintes condições: 96 °C, 2 min; (94 °C, 30 s; 50 °C, 15 s, 72 °C, 1 min) 35 vezes; 72 °C, 10 min. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 2% (Gibdo-BRL), submetidos a eletroforese à 4V/cm por 2 horas, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz de ultravioleta e fotografados com sistema computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 1 D).

Esta estirpe foi isolada e está sendo mantida neste laboratório, em ADE à 5 °C e em glicerol-água (15:85) à -80 °C, de onde foi reproduzida e utilizada para uniformizar e aumentar a pressão do inóculo na enfermaria.

A semeadura das gerações F1, F3, F5, F7 e dos genitores BY 26, OX 207 e da testemunha suscetível (01528) foi realizada em casa de vegetação, em bandejas plásticas de 25 células com substrato Mecplant ® (à base de casca de pinus, inoculado com *Trichoderma* sp. e com adubação recomendada para cultura do fumo). A densidade de semeadura foi de duas sementes por célula. Após a germinação realizou-se o desbaste, mantendo-se uma planta por célula. Os tratamentos fitossanitários e a poda da parte aérea das mudas foram feitos conforme orientação geral dos produtores de mudas da Universal Leaf Tabacos Ltda.

O preparo do solo seguiu as orientações do manual de técnicas para cultura do fumo, fornecido pela Universal Leaf Tabacos Ltda.

Como adubação de base na lavoura foram aplicados 600 Kg de N-P-K por hectare da fórmula 10-18-20. Após a adubação preparou-se um camalhão com as dimensões de 0,45 m. de largura por 0,20 m. de altura. Na adubação de cobertura foram utilizados 480 Kg de salitre de potássio por hectare da fórmula 15-0-14.

O delineamento experimental utilizado neste experimento foi de blocos ao acaso, com quatro repetições e 10 plantas em cada parcela, sendo que a cada

oito linhas foram transplantadas além dos genitores, uma testemunha suscetível, para melhor visualização da pressão de inóculo no infectário.

O espaçamento utilizado no transplante foi de 1,20 m. entre linhas e 0,45 m. entre plantas, perfazendo uma densidade de 18.518 plantas por hectare. As técnicas culturais foram às recomendadas para cultura.

Foram avaliadas as gerações F1, F3, F5 e F7 do cruzamento KY 26 x OX 207, além das linhagens genitoras KY 26, OX 207, e um controle suscetível (01528). Estes genótipos foram dispostos em linhas com 10 plantas por linha. A geração F1 foi semeada em seis linhas, a F3 em 43 linhas, a F5 em 28 linhas e a F7 em 37 linhas, totalizando 6.100 plantas.

O transplante ocorreu no dia 11/09/2003, quando as mudas apresentavam desenvolvimento de 15 cm de altura e 0,5 cm de diâmetro do caule.

Para manter a umidade do solo a fim de permitir um ambiente favorável ao desenvolvimento da murcha bacteriana, utilizou-se sistema de irrigação por aspersão sempre que necessário, assim o ensaio foi irrigado quatro vezes durante o ciclo da cultura.

A inoculação da bactéria realizou-se quando a temperatura média do ambiente elevou-se, mantendo-se próxima dos 26 °C por alguns dias, com menos possibilidades de ocorrência de temperaturas médias desfavoráveis ao crescimento da bactéria (em torno de 22-23 °C). Foi aplicado 20 mL de suspensão de células (10^8 UFC/mL) de *R. solanacearum* que foi depositado junto ao colo da planta. Como fonte de inóculo utilizou-se a estirpe da bactéria *Ralstonia solanacearum* que foi isolada do infectário e classificada como biovar I, a qual foi reproduzida no laboratório de Clínica Vegetal do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia, UFRGS.

As avaliações da sanidade do sistema radicular, tipo e cor de fumo foram feitos em três etapas, sendo que a primeira repetição foi avaliada no dia 12/01/04, a segunda e terceira no dia 13/01/04 e a quarta no dia 15/01/04. Estas avaliações foram realizadas no final do ciclo da cultura, ou seja, ao redor de 120 dias após o transplântio.

Avaliou-se a condição sanitária da raiz por visualização direta de podridões ou lesões típicas da *R. solanacearum*. A quantificação do dano no sistema radicular foi realizada através da escala diagramática de zero a 5, apresentada na Tabela 1 e Figura 1. Foram avaliadas 50% das plantas da parcela, ou seja, cinco plantas, escolhidas ao acaso, perfazendo um total de 3.050 plantas.

Para avaliação de cor da folha utilizou-se a seguinte escala: 1 para verde, 2 verde clara, 3 cor burley (amarela) e 4 para linhas que apresentavam segregação. Para a característica tipo de fumo utilizou-se a escala para fenótipo tipo Virgínia 1, para fenótipo intermediário 2, para fenótipo tipo Burley 3 e para linhas que estavam segregando 4.

2.3 Análises Estatísticas

Foi realizada a análise de variância para as características de severidade da moléstia (MB), para cor e tipo conforme seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_k + \pi_i + e_{ijk},$$

Onde:

Y_{ijk} = a severidade da moléstia; μ = média geral do experimento; β_k = efeito aleatório da repetição; π_i = efeito da geração; e e_{ijk} = erro $\sim N(0, \sigma^2)$.

As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5%.

TABELA 4. Modelo da Análise de Variância, para a severidade da murcha bacteriana (MB), cor e tipo em fumo. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

| CAUSAS DA VARIAÇÃO | GL | QM | F |
|--------------------|----|-------|-----------|
| BLOCOS | 3 | QMR | QMR/QME |
| TRATAMENTOS | 6 | QMT | QMT/QME |
| Testemunhas | 2 | QMTes | QMTes/QME |
| Gerações | 3 | QMG | QMG/QME |
| Resíduo | 1 | QMTxT | QMTxT/QME |
| Erro Experimental | 18 | QME | |
| Total | 27 | | |

Como havia um grande número de linhas (famílias) dentro de cada geração uma nova análise de variância foi utilizada (Tabela 5).

TABELA 5. Modelo da Análise de Variância, para a severidade da murcha bacteriana (MB), cor e tipo, entre e dentro das gerações em fumo. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

| CAUSAS DA VARIAÇÃO | GL | QM | F |
|--------------------|------|-------|-----------|
| Blocos | 3 | QMR | QMR/QME |
| Entre geração | 3 | QMG | QMG/QME |
| Linha dentro de F3 | 42 | QMDF3 | QMDF3/QME |
| Linha dentro de F5 | 27 | QMDF5 | QMDF5/QME |
| Linha dentro de F7 | 36 | QMDF7 | QMDF7/QME |
| Erro Experimental | 2163 | QME | |

As análises foram realizadas com o auxílio do programa Genes (Cruz, 2001), aplicativo Microsoft Excel, e do programa estatístico SAS.

Os dados da variável “severidade da murcha bacteriana” (MB) por apresentarem números que variavam entre zero e cinco, coeficiente de variação muito alto, e conseqüentemente não apresentando uma distribuição normal, foram transformados utilizando-se a raiz quadrada de $(x + 0,5)$, segundo Steel & Torrie (1980).

2.4 Estimativas dos parâmetros genéticos

Os parâmetros genéticos foram estimados para a severidade da murcha bacteriana no sistema radicular (MB), tipo e cor de fumo, de acordo com as seguintes metodologias.

2.4.1 Médias, variâncias e herdabilidade

A partir dos valores individuais de cada planta foram estimadas as médias e as variâncias para cada uma das gerações.

As estimativas das variâncias entre famílias (V^2_F) e dentro de famílias (V^2_W), foram obtidas das equações propostas por Kearsley & Pooni (1996), conforme o modelo abaixo (Tabela 6).

TABELA 6. Causas de variação, graus de liberdade, quadrado médio e quadrado médio esperado, entre e dentro de famílias para a severidade da murcha bacteriana (MB), cor e tipo, em fumo. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

| FONTE | GL | QM | QME |
|-----------------|----------|--------|--------------------|
| Repetições | r-1 | - | - |
| Entre famílias | (f-1) | QM_F | $V^2_W + rn V^2_F$ |
| Dentro famílias | f (rn-1) | QM_E | V^2_W |

Onde:

r = repetições.

f = número de famílias dentro de cada geração.

n = número de plantas avaliadas por repetição e por família.

V^2_W = Variância dentro de famílias.

V^2_F = Variância entre famílias.

Estas foram estimadas pelas seguintes fórmulas:

$$V^2_{F=} = \frac{(QM_F - QM_E)}{rn}$$

$$V^2_{W=} = QM_E$$

Para a geração F3:

A variância dentro (V_W) contém tanto a V_E como as variâncias de aditividade ($1/2 V_A$) e dominância ($1/4 V_D$).

$$V_W = V_E + 1/2 V_A + 1/4 V_D$$

Já a variância entre famílias (V_F) estima $1/2 V_A + 1/4 V_D$ de modo que :

$$V_F = 1/2 V_A + 1/4 V_D$$

No entanto, neste trabalho a variância entre famílias foi considerada como $1/2 V_A$ ($V_F = 1/2 V_A$) desprezando-se o valor da dominância.

A variância devido ao ambiente (V_E) foi determinada através da seguinte fórmula:

$$V_E = V_W + 1/2 V_A$$

A herdabilidade no sentido restrito foi calculada com a seguinte fórmula:

$$h^2_r = \frac{V_A}{V_A + V_E}$$

Para as gerações F5 e F7 o modelo utilizado foi o mesmo utilizado da Tabela 6. Onde :

$$V_F = \frac{(QM_F - QM_E)}{rn} = V_A$$

$$V_W = QM_E = V_E$$

2.4.2 Efeitos gênicos

Os efeitos gênicos, em cada tratamento, foram estimados para o caráter índice de severidade da moléstia pelo método dos mínimos quadrados generalizados ponderados, conforme proposto por Cavalli (1952), onde:

$$\bar{P}_1 = m + a$$

$$\bar{P}_2 = m - a$$

$$\bar{F}_1 = m + d$$

$$\bar{F}_3 = m + 0,25d$$

$$\bar{F}_5 = m + 0,0625d$$

$$\bar{F}_7 = m + 0,0156d$$

Considerando-se:

$\bar{P}_1, \bar{P}_2, \bar{F}_1, \bar{F}_3, \bar{F}_5, \bar{F}_7$ – média de cada uma das seis gerações.

e

m = média geral

a = efeito de aditividade

d = efeito de dominância

Foi realizado um teste de X^2 (qui-quadrado) para avaliar o ajuste dos dados observados ao modelo de três parâmetros (média, aditividade e dominância).

2.4.3 Correlações fenotípicas

As correlações fenotípicas entre os caracteres avaliados no trabalho foram estimadas conforme Stell & Torrie (1980).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença significativa entre blocos para nenhum dos caracteres, indicando presença uniforme do inóculo na área do experimento (Tabela 7).

As diferenças nas médias entre tratamentos foram altamente significativas para todos os caracteres. No entanto, quando os tratamentos foram decompostos em gerações e testemunhas, somente as médias das testemunhas tiveram diferenças significativas para a incidência da moléstia, enquanto as gerações não mostraram diferenças. Já, para os demais caracteres (tipo e cor), tanto as gerações quanto as testemunhas apresentaram diferenças significativas (Tabela 7).

A testemunha suscetível foi, como o esperado, a mais atacada pela murcha bacteriana (Tabela 8), revelando a presença da doença em toda a área experimental. Os dois genitores também foram diferentes, mostrando que os níveis observados no pai moderadamente resistente ainda estão distantes do genótipo resistente. A média da severidade da doença da geração F1 foi mais próxima da média observada no genitor mais resistente, indicando a existência de dominância parcial para a resistência à murcha bacteriana. Entretanto, não houve diferenças entre as médias das diferentes gerações, e nem destas para o pai de maior resistência à *Ralstonia solanacearum*. Provavelmente, a pressão de

seleção aplicada (Tabela 3) em todas as gerações foi suficiente para manter os níveis observados na geração F1.

TABELA 7. Análise de variância para a severidade da murcha bacteriana (MB), ao tipo de fumo, à cor da folha para as causas de variação, médias, coeficiente de variação (CV%), de quatro gerações de fumo (F1, F3, F5 e F7) e três testemunhas (pai moderadamente resistente, pai resistente e testemunha suscetível). Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

| Causas de variação | GL | Quadrado médio | | |
|--------------------|----|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | MB | Tipo | Cor |
| Bloco | 3 | 0,0255 ^{ns} | 0,0031 ^{ns} | 0,0148 ^{ns} |
| Tratamento | 6 | 1,0194* | 2,7960* | 2,6447* |
| Geração | 3 | 0,0063 ^{ns} | 0,4846* | 0,4041* |
| Testemunha | 2 | 1,9742* | 5,3333* | 5,3333* |
| Resíduo | 1 | 2,1490* | 4,6557* | 3,9892* |
| Erro | 18 | 0,0067 | 0,0030 | 0,0117 |
| CV (%) | - | 6,92 | 2,56 | 5,15 |

* : Efeito significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F;

^{ns}: Efeito não significativo pelo teste F.

Nas características tipo de folha e cor os resultados demonstram diferenças significativas entre tratamentos, gerações e testemunha (Tabela 8). O genitor moderadamente resistente tipo Burley (tipo desejado) difere de todos os demais tratamentos, já o genitor resistente e a testemunha suscetível não diferem significativamente entre eles, porém diferem dos demais tratamentos, por serem ambos do tipo Virgínia. Na geração F1 obtém-se exatamente o tipo e cor de fumo intermediário (folha tipo Burley mais arredondada e de coloração verde clara), o que era esperado devido ao contraste existente entre os tipos de fumo envolvidos nesse cruzamento (Burley x Virgínia).

TABELA 8. Média da severidade da moléstia (MB), do tipo de fumo, e da cor da folha de quatro gerações de fumo (F1, F3, F5 e F7) e três testemunhas (pai moderadamente resistente KY 26, pai resistente OX 207 e testemunha suscetível 01528). Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

| Tratamentos | MB ⁽¹⁾ | Tipo ⁽¹⁾ | Cor ⁽¹⁾ |
|-------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| F1 | 0,33 c | 2,00 d | 2,00 c |
| F3 | 0,52 c | 2,58 c | 2,48 b |
| F5 | 0,52 c | 2,82 b | 2,77 a |
| F7 | 0,38 c | 2,55 c | 2,47 b |
| KY 26 | 1,76 b | 3,00 a | 3,00 a |
| OX 207 | 0,17 c | 1,00 e | 1,00 d |
| 01528 | 4,44 a | 1,00 e | 1,00 d |

⁽¹⁾ Médias de tratamentos seguidas por mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O fumo tipo Burley é determinado por um gene recessivo e se caracteriza pela cor amarela da folha e folhas arredondadas, que em homozigose propicia uma coloração e tipo diferenciado para as plantas de fumo que o possuem. Em contraste, o tipo Virgínia é determinado pelo alelo dominante do mesmo loco e se caracteriza por ter folhas de cor verde e tipo lanceolada conforme já descrito por Garner, 1951; Akehurtst, 1970; e Palmer & Pearce, 1999.

Na geração F3 observa-se que a média 2,58 obtida para tipo e 2,48 para cor de fumo (Tabela 8) se deve ao critério de seleção definido para esta população, onde primeiramente foi selecionado o tipo de fumo Burley ou intermediário. A característica tipo Burley tem menor freqüência que o intermediário devido a herança do tipo Virgínia ser dominante (Sisson & Wernsman, 1992). Se tivesse sido selecionado somente o tipo Burley já na geração F3, tanto o tipo quanto a cor de folha teriam média muito próxima a 3.

Na geração F5 houve um aumento na média para tipo aproximando-se mais para o Burley 2,82 e 2,77 para Cor (Tabela 8), o que pode-se inferir que nesta geração houve um ganho maior desta característica associada à resistência

a murcha bacteriana pela diminuição dos tipos intermediários nas gerações mais avançadas.

Na geração F7 ocorreu uma redução significativa no tipo e na cor em relação à geração F5, o que não era esperado (Tabela 8). É provável que na geração F5 algumas linhas foram selecionadas com fenótipo Burley, e com bom índice de resistência, entretanto podem ter apresentado vigor abaixo da média estabelecida e foram eliminadas, diminuindo desta forma os valores observados para estes caracteres na geração F7.

A seleção de indivíduos com característica intermediária pode ser justificada pelo interesse em obter-se um novo tipo de fumo com característica de folhas do tipo Burley associado com coloração mais verde, que poderia produzir, após o processo de cura, um fumo de cor castanha mais escura. No entanto, verificou-se que após ensaios de qualidade, o tipo de fumo intermediário não apresentava aroma característico do fumo Burley, sendo então rejeitado por não atender esta importante condição da indústria fumageira. Entretanto, este tipo de fumo pode ser utilizado como fonte de resistência tanto para o fumo tipo Virgínia quanto para Burley.

Como já discutido por Sisson & Wernsmann (1992), a resistência à murcha bacteriana pode ser descrita como quantitativa, onde o ataque da moléstia apresenta variação desde alta resistência até extrema suscetibilidade, dependendo das condições de ambiente. Esta afirmação vem ao encontro dos resultados da Figura 2, onde observa-se o comportamento instável do cultivar BY 26, e este é o mesmo comportamento observado pelos agricultores a campo, já que quando o cultivar KY 26 é submetido a uma maior pressão do ataque da moléstia demonstra suscetibilidade. No Brasil, o cultivar KY 26 vem sendo utilizado como alternativa de resistência em áreas com infestação moderada de

R. solanacearum. Entretanto, a razão da escolha desse cultivar para este trabalho se deve ao fato de possuir características agronômicas desejáveis, como produtividade, qualidade e equilíbrio químico, sendo os dois últimos critérios muito importantes para a indústria.

Como havia diferentes linhas (famílias) dentro de cada geração, foi determinado se havia diferenças significativas entre elas (Tabela 9).

Para a característica resistência a murcha bacteriana, foram detectadas diferenças significativas entre as linhas dentro de todas as gerações (Tabela 9). Em todas as gerações somente as plantas mais resistentes à murcha foram selecionadas, sendo que nas gerações F3 e F5 as plantas ainda apresentam heterozigose, o que pode resultar em linhas com níveis variáveis de resistência na geração seguinte.

Em F3 o fumo tipo intermediário com resistência à murcha bacteriana foi fixado, não havendo segregação posterior e provavelmente indicando que poucos genes estão determinando este caráter.

Da geração F7 era esperado que as linhas não apresentassem diferenças significativas quanto à resistência à *R. solanacearum*. Como a fonte de resistência é poligênica em OX 207 (Sisson,1999) é provável que as linhas tenham fixados diferentes alelos para a resistência combinando os alelos presentes nos dois genitores. Quanto a tipo e cor, observa-se que a diferença dentro das gerações estudadas (F3, F5) são significativas devido ao critério de seleção adotado de selecionar linhas com características intermediárias, portanto heterozigotos, que ainda tinham variações genéticas, visto que estes materiais apresentavam boa resistência, entretanto sem o tipo e cor ideal (Tabela 9).

A não ocorrência de segregação dentro das linhagens F7 para tipo de fumo indica que existe pelo menos dois locos controlando este caráter, ao contrário do

que diz a literatura (Garner, 1951; Akehurst, 1970, e Palmer & Pearce, 1999). Em outras palavras se o caráter fosse controlado por apenas um loco, plantas intermediárias teriam que ser heterozigotas e suas progênes deveriam segregar para tipo Burley, Virginia e intermediário.

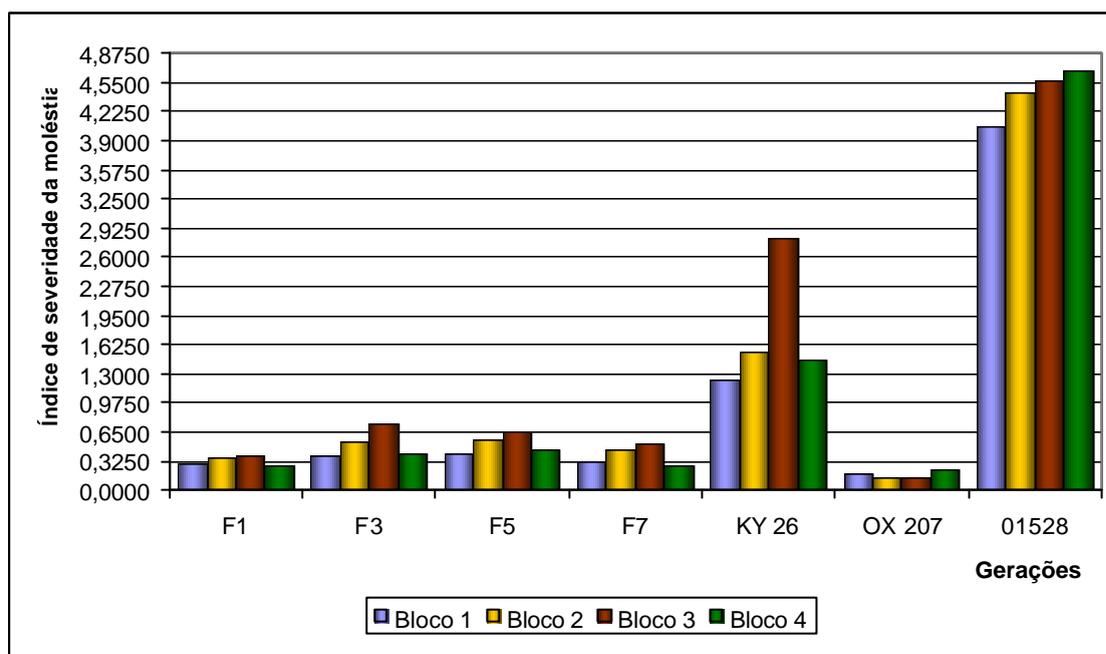


FIGURA 2 – Índice de severidade da Murcha Bacteriana em fumo das gerações F1, F3, F5, F7, do genitor moderadamente resistente KY 26, do genitor resistente OX 207 e testemunha suscetível 01528. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

Não existe variedade comercial com boa adaptação e resistência poligênica à *R. solanacearum* em fumo do tipo Burley (Garner, 1951; Sisson & Wernsman, 1992). Nos EUA não ocorre essa moléstia em área de produção de Burley, e em outros países, a murcha bacteriana não causa grandes prejuízos (Jack, 2002).

Portanto, o objetivo principal desse trabalho de melhoramento foi atingir ao final dos ciclos de seleção um material homozigoto do tipo de fumo Burley, de cor

amarela e resistente à *R. solanacearum*, ou seja, a severidade da moléstia abaixo de 1, combinando com tipo de fumo 3 e cor 3.

TABELA 9. Análise de variância para a severidade da moléstia (MB), ao tipo de fumo, à cor da folha, média e coeficiente de variação (CV%) de quatro gerações de fumo (F1, F3, F5 e F7). Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

| Causas de variação | GL | Quadrado médio | | |
|--------------------|------|----------------|-----------|----------|
| | | MB | Tipo | Cor |
| Bloco | 3 | 1,6162* | 2,1747* | 11,4437* |
| Entre geração | 3 | 0,6188* | 118,5934* | 27,6843* |
| Linha dentro de F3 | 42 | 0,4308* | 15,8292* | 5,9889* |
| Linha dentro de F5 | 27 | 0,3730* | 16,8056* | 4,0257* |
| Linha dentro de F7 | 36 | 0,1764* | 18,6430* | 7,5544* |
| Erro | 2163 | 0,0452 | 0,2495 | 0,1817 |
| CV(%) | - | 22,38 | 23,8 | 16,94 |

* : Efeito significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F;

Conforme os resultados apresentados na Tabela 10 na geração F3 várias linhas apresentam incidência de moléstia abaixo de 1 (Figura 3), porém, a grande maioria das linhas estava segregando ou apresentavam fenótipo intermediário para os caracteres tipo e cor. Das 43 linhas testadas 40 apresentaram índice da moléstia inferior a 1, porém, somente 6 apresentaram também o tipo e cor desejado (Figura 3 e Tabela 10). A seleção de tão poucas linhas na geração F3 poderia inviabilizar a seleção para outros caracteres de importância nas gerações mais avançadas.

Na geração F5 a maioria das linhas teve severidade da moléstia abaixo de 1,0 (Figura 4), sendo que das 28 linhas avaliadas nesta geração 18 apresentaram

fenótipo Burley (Tabela 11), entretanto, 14 combinaram baixo índice de moléstia com tipo e cor desejados.

Na geração F7 a maioria das linhas apresentou índice de dano da moléstia abaixo de 1,0 (Figura 5) e das 37 linhas avaliadas 20 apresentaram fenótipo Burley (Tabela 12), sendo que 19 linhas apresentaram baixos valores da moléstia associadas a baixo desvio padrão, cor e tipo desejados (Figura 6), demonstrando estar uniformes com as características desejadas.

O resultado final desse trabalho gerou 14 linhas selecionadas do tipo e cor Burley e duas linhas com fenótipo intermediário, com índice de dano ao sistema radicular abaixo de 0,60, que servirão como fonte de materiais resistentes ao programa de melhoramento da Universal Leaf Tabacos Ltda. para o desenvolvimento de linhas puras e de linhas macho estéreis para produção de híbridos comerciais.

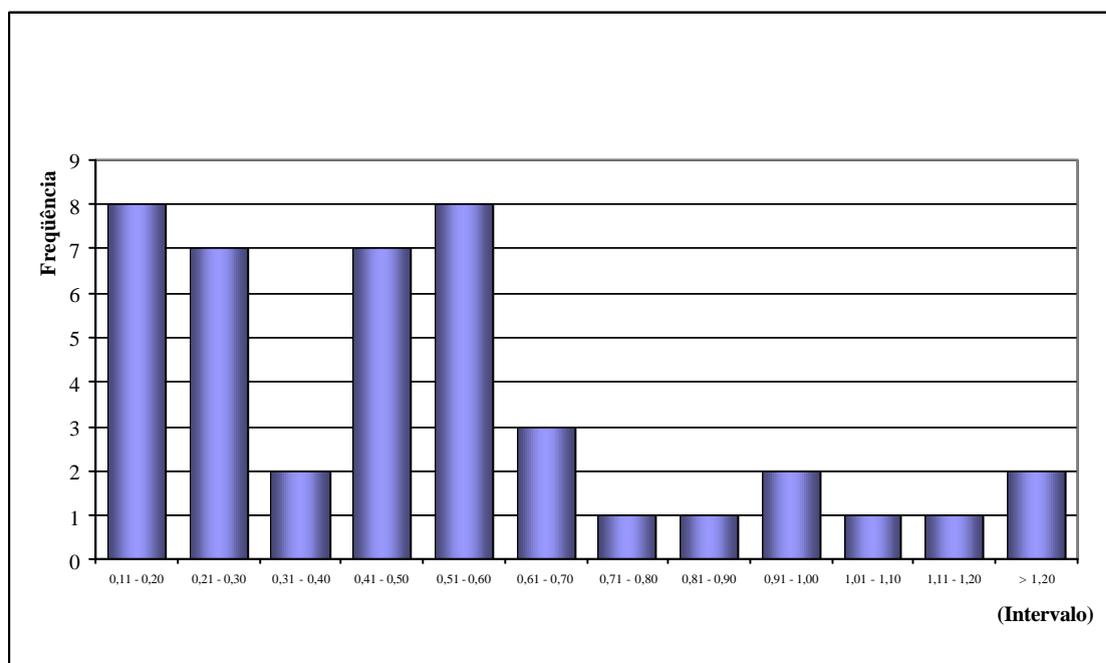


FIGURA 3 – Frequência das médias de severidade da moléstia (*Ralstonia solanacearum*) das linhas dentro da geração F3 em fumo. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

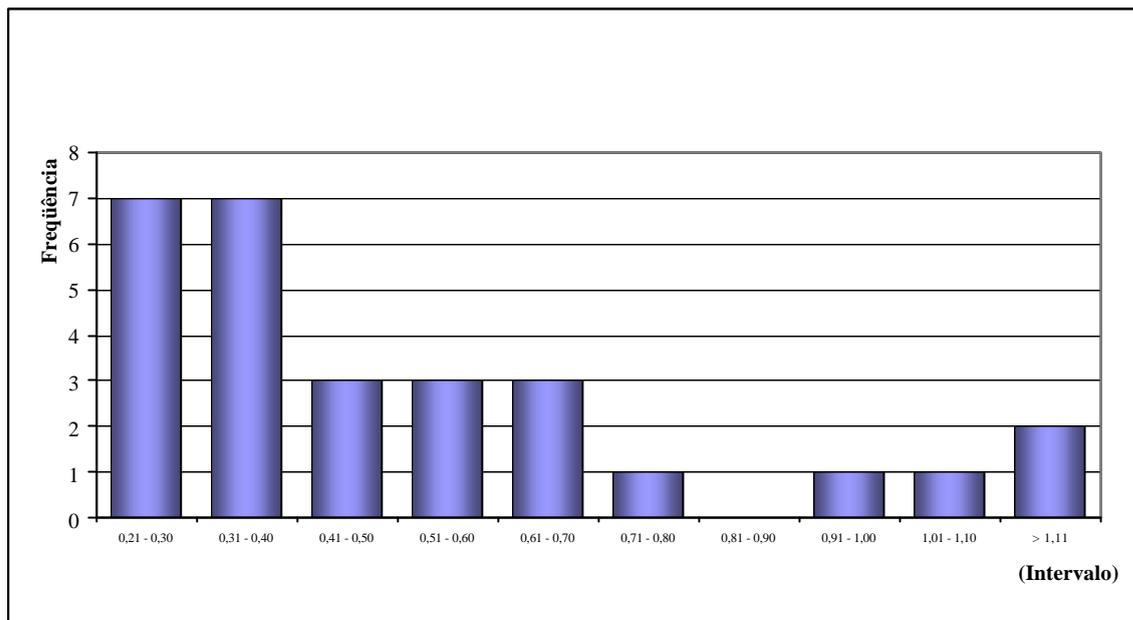


FIGURA 4 – Frequência das médias de severidade da moléstia (*Ralstonia solanacearum*) das linhas dentro da geração F5 em fumo. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

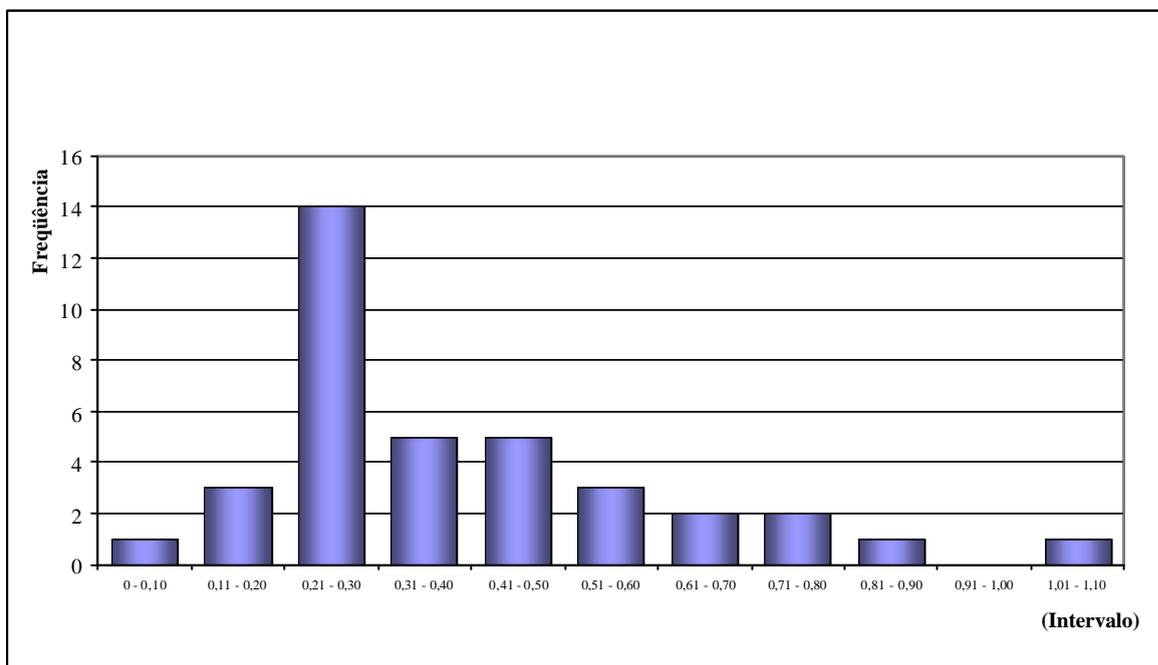


FIGURA 5 – Frequência das médias de severidade da moléstia (*Ralstonia solanacearum*) das linhas dentro da geração F7 em fumo. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

TABELA 10. Severidade da moléstia (MB), desvio padrão (dp) do tipo de fumo, da cor da folha das linhas dentro da geração F3, do genitor moderadamente resistente (KY 26) e do genitor resistente (OX 207). Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

| Número da linha | MB | dp | MB ⁽¹⁾ | Tipo ⁽¹⁾ | Cor ⁽¹⁾ |
|-----------------|-------------|---------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| 7 | 0,48 | ± 0,82 | cdefg | 3,50a | 3,00ab |
| 8 | 0,64 | ± 0,90 | cdefg | 3,25ab | 3,00ab |
| 9 | 0,54 | ± 0,35 | cdefg | 3,00abc | 3,25a |
| 10 | 0,34 | ± 0,31 | defg | 3,25ab | 3,00ab |
| 11 | 0,16 | ± 0,13 | fg | 3,00abc | 3,00ab |
| 12 | 0,89 | ± 0,92 | bcdefg | 2,80bc | 3,00ab |
| 13 | 0,21 | ± 0,26 | efg | 2,00d | 1,75de |
| 14 | 0,45 | ± 0,48 | cdefg | 3,00abc | 3,00ab |
| 15 | 0,94 | ± 1,03 | bcdef | 3,00abc | 3,00ab |
| 16 | 0,51 | ± 0,83 | cdefg | 3,25ab | 3,00ab |
| 17 | 0,18 | ± 0,29 | fg | 3,00abc | 3,00ab |
| 18 | 1,83 | ± 1,53 | a | 3,00abc | 3,00ab |
| 19 | 0,26 | ± 0,22 | defg | 3,00abc | 3,00ab |
| 20 | 0,45 | ± 0,37 | cdefg | 3,00abc | 3,00ab |
| 21 | 1,45 | ± 1,44 | ab | 2,80bc | 3,25a |
| 22 | 0,60 | ± 0,59 | cdefg | 2,00d | 1,75de |
| 23 | 0,57 | ± 0,46 | cdefg | 2,00d | 2,00cde |
| 24 | 0,73 | ± 0,57 | bcdefg | 2,50cd | 1,75de |
| 25 | 0,67 | ± 0,50 | bcdefg | 2,50cd | 3,00ab |
| 26 | 0,17 | ± 0,17 | fg | 2,00d | 3,00ab |
| 27 | 1,19 | ± 1,06 | abc | 2,50cd | 2,00cde |
| 28 | 0,14 | ± 0,14 | g | 2,00d | 2,65abc |
| 29 | 0,49 | ± 0,71 | cdefg | 2,50cd | 2,00cde |
| 30 | 0,14 | ± 0,16 | g | 3,00abc | 2,50bc |
| 31 | 0,52 | ± 0,29 | cdefg | 2,00d | 1,75de |
| 32 | 0,20 | ± 0,17 | efg | 2,50cd | 2,50bc |
| 33 | 0,44 | ± 0,46 | cdefg | 3,50a | 3,00ab |
| 34 | 0,59 | ± 0,58 | cdefg | 2,00d | 1,75de |
| 35 | 0,21 | ± 0,22 | efg | 2,00d | 2,00cde |
| 36 | 0,35 | ± 0,27 | defg | 2,00d | 2,25cd |
| 37 | 0,20 | ± 0,18 | efg | 2,80bc | 2,50bc |
| 38 | 0,19 | ± 0,19 | fg | 2,50cd | 2,00cde |
| 39 | 0,19 | ± 0,16 | fg | 2,00d | 1,75de |
| 40 | 0,27 | ± 0,21 | defg | 2,00d | 1,75de |
| 41 | 0,61 | ± 0,49 | cdefg | 2,00d | 2,50bc |
| 42 | 0,47 | ± 0,36 | cdefg | 2,50cd | 2,00cde |

Continuação TABELA 10. Severidade da moléstia (MB), desvio padrão (dp) do tipo de fumo, da cor da folha (Cor) das linhas dentro da geração F3, do genitor moderadamente resistente (KY 26) e do genitor resistente (OX 207). Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

| Tratamento (linha) | MB | dp | MB ⁽¹⁾ | Tipo ⁽¹⁾ | Cor ⁽¹⁾ |
|--------------------|------|--------|-------------------|---------------------|--------------------|
| 43 | 0,51 | ± 0,59 | cdefg | 2,50cd | 2,50bc |
| 44 | 0,24 | ± 0,19 | defg | 2,00d | 1,50e |
| 45 | 0,51 | ± 0,60 | cdefg | 2,00d | 2,50bc |
| 46 | 0,99 | ± 1,10 | bcde | 2,50cd | 1,75de |
| 47 | 0,42 | ± 0,30 | cdefg | 2,00d | 2,25cd |
| 48 | 1,02 | ± 1,29 | bcd | 3,25ab | 2,50bc |
| 49 | 0,24 | ± 0,36 | defg | 3,50a | 3,25a |
| OX 207 | 0,17 | | | 1,00 | 1,00 |
| KY 26 | 1,76 | | | 3,00 | 3,00 |

⁽¹⁾ Médias de tratamentos seguidas por mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

TABELA 11. Severidade da moléstia (MB), desvio padrão (dp) do tipo de fumo, da cor da folha das linhas dentro da geração F5, do genitor moderadamente resistente (KY 26) e do genitor resistente (OX 207). Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

| Tratamento (linha) | MB | dp | MB ⁽¹⁾ | Tipo ⁽¹⁾ | Cor ⁽¹⁾ |
|--------------------|-------------|---------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| 50 | 1,15 | ± 0,77 | ab | 3,00b | 3,00a |
| 51 | 0,61 | ± 0,42 | bcde | 3,00b | 3,00a |
| 52 | 0,27 | ± 0,41 | e | 3,00b | 3,00a |
| 53 | 0,45 | ± 0,46 | cde | 2,00c | 1,85c |
| 54 | 0,23 | ± 0,22 | e | 3,25ab | 3,00a |
| 55 | 0,35 | ± 0,25 | de | 2,00c | 2,00c |
| 56 | 0,56 | ± 0,32 | bcde | 3,00b | 3,00a |
| 57 | 1,63 | ± 1,17 | a | 3,00b | 3,00a |
| 58 | 0,35 | ± 0,56 | de | 2,00c | 2,00c |
| 59 | 0,30 | ± 0,33 | e | 3,00b | 3,00a |
| 60 | 0,31 | ± 0,40 | de | 3,00b | 3,00a |
| 61 | 0,44 | ± 0,22 | cde | 3,00b | 2,50b |
| 62 | 0,25 | ± 0,27 | e | 2,00c | 1,75c |
| 63 | 1,04 | ± 1,12 | abc | 3,00b | 3,00a |
| 64 | 0,31 | ± 0,28 | de | 3,00b | 3,00a |
| 65 | 0,30 | ± 0,25 | e | 3,25ab | 3,00a |
| 66 | 0,63 | ± 0,80 | bcde | 3,50a | 3,00a |
| 67 | 0,52 | ± 0,45 | cde | 3,00b | 3,00a |
| 68 | 0,80 | ± 0,66 | bcde | 3,00b | 3,00a |
| 69 | 0,55 | ± 0,66 | bcde | 3,00b | 3,00a |
| 70 | 0,61 | ± 0,58 | bcde | 3,00b | 3,00a |
| 71 | 0,35 | ± 0,43 | de | 3,00b | 3,00a |
| 72 | 0,23 | ± 0,20 | e | 2,00c | 2,00c |
| 73 | 0,23 | ± 0,21 | e | 3,00b | 3,00a |
| 74 | 0,41 | ± 0,21 | de | 2,00c | 2,00c |
| 75 | 0,34 | ± 0,32 | de | 3,00b | 3,00a |
| 76 | 0,93 | ± 0,68 | bcd | 3,00b | 3,00a |
| 77 | 0,36 | ± 0,22 | de | 3,00b | 3,00a |
| OX 207 | 0,17 | | | 1,00 | 1,00 |
| KY 26 | 1,76 | | | 3,00 | 3,00 |

⁽¹⁾ Médias de tratamentos seguidas por mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

TABELA 12. Severidade da moléstia (MB), desvio padrão (dp) do tipo de fumo, da cor da folha das linhas dentro da geração F7, do genitor moderadamente resistente (KY 26) e do genitor resistente (OX 207). Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

| Tratamento (linha) | MB | dp | MB ⁽¹⁾ | Tipo ⁽¹⁾ | Cor ⁽¹⁾ |
|--------------------|-------------|-------------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| 78 | 0,43 | \pm 0,28 | bcde | 3,00a | 3,00a |
| 79 | 0,51 | \pm 0,57 | abcde | 3,00a | 3,00a |
| 80 | 0,40 | \pm 0,26 | bcde | 3,00a | 3,00a |
| 81 | 0,43 | \pm 0,46 | bcde | 3,00a | 3,00a |
| 82 | 0,85 | \pm 1,00 | ab | 3,00a | 3,00a |
| 83 | 0,26 | \pm 0,27 | cde | 2,00c | 1,50d |
| 84 | 0,25 | \pm 0,23 | cde | 2,00c | 1,75cd |
| 85 | 0,38 | \pm 0,43 | bcde | 3,00a | 3,00a |
| 86 | 0,30 | \pm 0,27 | bcde | 2,00c | 1,75cd |
| 87 | 0,26 | \pm 0,26 | cde | 2,00c | 2,00bc |
| 88 | 0,40 | \pm 0,24 | bcde | 3,00a | 3,00a |
| 89 | 0,22 | \pm 0,23 | cde | 3,00a | 3,00a |
| 90 | 0,34 | \pm 0,42 | bcde | 2,00c | 2,25b |
| 91 | 0,09 | \pm 0,11 | e | 2,00c | 1,75cd |
| 92 | 0,31 | \pm 0,38 | bcde | 1,50d | 1,75cd |
| 93 | 0,24 | \pm 0,28 | cde | 2,00c | 1,75cd |
| 94 | 0,21 | \pm 0,20 | cde | 2,00c | 1,75cd |
| 95 | 0,73 | \pm 1,08 | abc | 3,00a | 3,00a |
| 96 | 0,21 | \pm 0,16 | cde | 2,50b | 2,75a |
| 97 | 0,58 | \pm 0,52 | abcde | 3,00a | 3,00a |
| 98 | 0,68 | \pm 0,81 | abcd | 3,00a | 3,00a |
| 99 | 0,73 | \pm 0,77 | abc | 3,00a | 3,00a |
| 100 | 0,11 | \pm 0,17 | de | 2,00c | 2,00bc |
| 101 | 0,34 | \pm 0,29 | bcde | 2,00c | 2,00bc |
| 102 | 0,29 | \pm 0,24 | bcde | 3,00a | 3,00a |
| 103 | 0,62 | \pm 0,72 | abcde | 3,00a | 3,00a |
| 104 | 0,42 | \pm 0,31 | bcde | 3,00a | 3,00a |
| 105 | 0,30 | \pm 0,25 | bcde | 3,00a | 3,00a |
| 106 | 0,13 | \pm 0,17 | de | 3,00a | 3,00a |
| 107 | 0,31 | \pm 0,30 | bcde | 3,00a | 3,00a |
| 108 | 0,19 | \pm 0,13 | cde | 3,00a | 3,00a |
| 109 | 0,29 | \pm 0,38 | bcde | 2,00c | 1,75cd |
| 110 | 0,57 | \pm 0,40 | abcde | 2,00c | 1,50d |
| 111 | 0,27 | \pm 0,28 | cde | 2,00c | 1,50d |
| 112 | 1,07 | \pm 1,15 | a | 3,00a | 3,00a |
| 113 | 0,29 | \pm 0,25 | bcde | 2,00c | 1,75cd |
| 114 | 0,24 | \pm 0,19 | cde | 2,00c | 2,00bc |
| OX 207 | 0,17 | | | 1,00 | 1,00 |
| KY 26 | 1,76 | | | 3,00 | 3,00 |

⁽¹⁾ Médias de tratamentos seguidas por mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Todas as análises genéticas neste trabalho ficaram influenciadas pela forte pressão de seleção exercida sobre todas as gerações conforme tabela 3.

Quando os efeitos gênicos foram testados pelo modelo aditivo dominante este foi aceito (Tabela 13). Entretanto os efeitos aditivos e dominância foram não significativos. Provavelmente isto tenha ocorrido pela eficiência da seleção aplicada em todas as gerações segregantes. Existem evidências neste trabalho que tanto a dominância como aditividade tem papel relevante na expressão da resistência *R. solanacearum* (Tabela 8).

TABELA 13. Efeitos gênicos e valores de probabilidade do teste de quiquadrado para o ajuste do modelo para três parâmetros, para severidade da moléstia, em seis gerações de fumo Pai 1 (BY 26), Pai 2 (OX 207) F1, F3, F5 e F7. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

| | Média | | dp |
|-------------|---------|---|-------------|
| Pai 1 | 1,76 | ± | 1,23 |
| Pai 2 | 0,17 | ± | 0,27 |
| F1 | 0,33 | ± | 0,26 |
| F3 | 0,51 | ± | 0,72 |
| F5 | 0,52 | ± | 0,61 |
| F7 | 0,38 | ± | 0,58 |
| m | 0,62 | ± | 0,14 |
| a | 0,46 | ± | 0,17 |
| d | 0,29 | ± | 0,18 |
| $X^2_{(3)}$ | 0,48497 | | P = 0,92218 |

Na tabela 14 estão as estimativas das variâncias fenotípicas, aditivas e do ambiente, bem como a estimativa da herdabilidade para cada caráter avaliado e para cada geração.

A herdabilidade no sentido restrito (Tabela 14) está um pouco superestimada por possuir uma parte da variância de dominância, conforme descrito em “material e métodos”. Entretanto, com o avanço das gerações, as herdabilidades foram diminuindo diferente do esperado para plantas autofecundação, onde a variância aditiva vai aumentando com o passar das gerações. Provavelmente, com a seleção e eliminação de parte da população as variâncias ficaram diminuídas.

Entre os caracteres avaliados severidade da murcha bacteriana (MB), tipo e cor, a herdabilidade para o caráter severidade da murcha bacteriana foi muito menor que os outros caracteres estudados, provavelmente devido o tipo de herança envolvida, e às maiores dificuldade de avaliação de *R. solanacearum* quando comparada com as outras características avaliadas. Na resistência à murcha bacteriana a herança envolvida é poligênica (Sisson, 1999), no entanto, os outros caracteres estudados são provavelmente monogênicos ou oligogênicos, onde é mais fácil obter o fenótipo desejado.

Os valores da herdabilidade da severidade da murcha bacteriana foram relativamente baixos em todas as gerações, entretanto, foi possível selecionar a campo indivíduos com baixo nível de ataque da moléstia (Tabela 14).

TABELA 14. Estimativas das variâncias entre famílias (V_F^2), dentro das famílias (V_W^2), aditiva (V_A) e de ambiente (V_E) e herdabilidade no sentido restrito para o caráter severidade da moléstia (MB), do tipo de fumo, da cor da folha das linhas dentro das gerações F3, F5, F7. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

| Caráter | V_F^2 | V_W^2 | V_A | V_E | h_r^2 |
|---------|---------|---------|--------|--------|---------|
| F3 | | | | | |
| MB | 0,0187 | 0,0558 | 0,0187 | 0,0465 | 0,29 |
| Tipo | 0,7710 | 0,4100 | 0,7710 | 0,0245 | 0,95 |
| Cor | 0,2847 | 0,2949 | 0,2847 | 0,1516 | 0,65 |
| F5 | | | | | |
| MB | 0,0164 | 0,0458 | 0,0164 | 0,0458 | 0,26 |
| Tipo | 0,8294 | 16,5879 | 0,8294 | 0,2177 | 0,79 |
| Cor | 0,1978 | 3,9556 | 0,1978 | 0,0710 | 0,74 |
| F7 | | | | | |
| MB | 0,0700 | 0,0370 | 0,0070 | 0,0370 | 0,19 |
| Tipo | 0,9268 | 0,1065 | 0,9268 | 0,1065 | 0,87 |
| Cor | 0,3735 | 0,0845 | 0,3735 | 0,0845 | 0,82 |

A correlação observada na média de todas as gerações entre severidade de murcha bacteriana (MB) e Tipo (tipo de fumo) ($r = -0,0004$), e MB e Cor ($r = 0,0373$), foram não significativas (Tabela 15), podendo-se inferir que não há associação entre resistência, tipo de fumo e Cor. Esse resultado indica que é possível selecionar genótipos com o mesmo nível de resistência do genótipo resistente e com o tipo e cor do genótipo suscetível. Observa-se, entretanto, que correlação positiva entre cor e tipo ($r = 0,6605$) indica que pode ser selecionado, de forma indireta com alguma eficiência, o tipo de fumo através da cor.

TABELA 15. Coeficientes de correlação geral entre as características severidade da moléstia (MB), do tipo de fumo, da cor da folha. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

| Característica | Tipo | Cor |
|----------------|-----------------------|----------------------|
| MB | -0,0004 ^{ns} | 0,0373 ^{ns} |
| Tipo | | 0,6605* |
| Cor | | |

* : Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste t.

^{ns} : Não significativo.

No entanto, a correlação entre os caracteres vai aumentando com o passar das gerações. Esta correlação demonstra o grande efeito da seleção, onde na geração F7 já apresenta valores significativos entre os três caracteres. Estes dados demonstram que é possível selecionar genótipos com elevado nível de resistência à *R. solanacearum* associada a cor e tipo de fumo desejado (Burley) (Tabela 16) como os obtidos neste trabalho (Tabela 12).

TABELA 16. Coeficientes de correlação entre as características severidade da moléstia (MB), do tipo de fumo, da cor da folha nas gerações F3, F5 e F7. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2005.

| Característica | Tipo | Cor |
|----------------|-----------------------|----------------------|
| | | F3 |
| MB | -0,0191 ^{ns} | 0,0781 ^{ns} |
| Tipo | | 0,4631* |
| | | F5 |
| MB | 0,1871* | 0,1030 ^{ns} |
| Tipo | | 0,7318* |
| | | F7 |
| MB | 0,2642* | 0,2434* |
| Tipo | | 0,8102* |

* : Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste t.

^{ns} : Não significativo.

De acordo com estudos de Takatsu & Lopes, (1997); Grimault et al., (1994), o desenvolvimento de variedades resistentes à murcha bacteriana para as mais diversas espécies tem sido dificultado devido à falta de conhecimento sobre o controle genético da resistência à murcha bacteriana, no entanto, os resultados desse estudo indicam que foi possível transferir resistência poligênica à murcha bacteriana de um fumo tipo Virgínia para um fumo tipo Burley, mantendo as características desejadas.

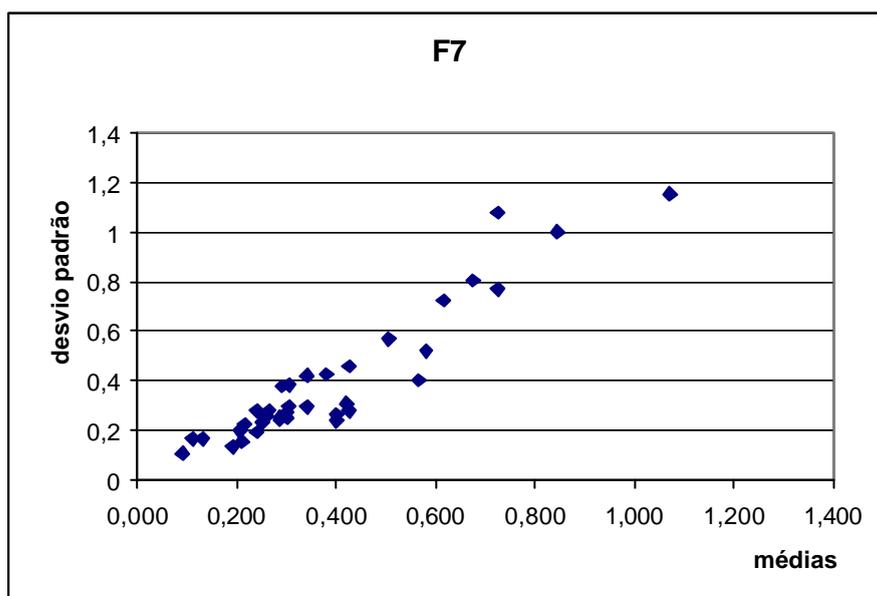


FIGURA 6 – Médias e desvio padrão de severidade da moléstia (*Ralstonia solanacearum*) – para as linhas dentro da geração F7 em fumo. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

4. CONCLUSÕES

1- A seleção artificial realizada a campo é eficiente para obter linhas puras com resistência à murcha bacteriana.

2- A herdabilidade estimada para a severidade da moléstia (murcha bacteriana) é baixa, enquanto que é alta para o fenótipo do tipo de planta e cor da folha.

3- É possível incorporar os genes de resistência a *R. solanacearum* de fumo tipo Virgínia para fumo tipo Burley – mantendo as características de tipo e cor desejadas.

4- É possível obter linhas praticamente homozigotas (F7) e com resistência à murcha bacteriana similar ao genitor resistente e cor do tipo Burley.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKEHURST, B.C. **Tobacco**. London : [s.l.], 1970. p.55-56.

AKIEW, E.; TREVORROW, P.R. Management of bacterial wilt of tobacco. In. . In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN,G.L. (Eds.). **Bacterial wilt: the disease and causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994. p. 179-198.

BLAND, M.M.; MATZINGER, D.F.; LEVINGS, C.S. Comparison of the mitochondrial genome of *Nicotiana tabacum* with its progenitor species. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 69, p. 535-541, 1985.

BRINGEL, J.M.M. **Caracterização bioquímica, patogênica e molecular de isolados de *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 de batata e berinjela**. São Paulo: ESALQ, 2002. 103f. Tese (Doutorado em Agronomia - Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo, 2002.

BULDDENHAGEN. I.; KELMAN A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.2, p.203-230, 1964.

CASTRO, L.A.S.; DANIELS, J.; COUTO, M.E.O. Utilização do teste de ELISA na diagnose de *Pseudomonas solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n.3, p.296, 1993. Resumo.

CAVALLI, L.L. An analysis of linkage in quantative inheritance, in: QUANTATIVE inheritance. London : HMSO , 1952. p. 135-44.

COLLIS, W. K.; HAWKS, S.N. **Principles of Flue-Cured Tobacco Production**. Raleigh: N. C. State University, 1993. 301 p.

CRUZ, C.D. **Programa Genes**: versão Windows, aplicativo computacional em genética e melhoramento. Viçosa: UFV, 2001.648p.

DI CELLO, F.; BEVENINO, A.; CHIARINI, L.; FANI, R.; PATTETTI, D.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Biodiversity of *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n.11, p. 4485-4493, 1997.

ELGEBRECHT, M. C.; PRINSLOO, G.C. *Pseudomonas solanacearum* on tobacco in South Africa. **Phytophylactica**, Pretoria, p.171-172, 1985.

EDEN-GREEN, S. J. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* and related bacterial in South East Asia: new direction of "Moko" disease. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN,G.L. (Eds.). **Bacterial wilt: the disease and causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994. p. 25-34.

FRENCH, E.R. Control integrado de la marchitez bacteriana de la papa causada por el biovar 2-raza 3 de *Pseudomonas solanacearum*. In: TALLER SOBRE ENFERMIDADES BACTERIANAS DE LA PAPA, 1993, Brasilia. **Memórias...** Brasilia: EMBRAPA/CNPH, 1994. p.39-41.

GARNER, W.W. **The production of TOBACCO**. Philadelphia: Blakiston, 1951. 551 p.

GERSTEL, D. U. Tobacco. *Nicotiana tabacum*. (Solanaceae) In: SIMMONS, N. W. (Ed.) **Evolution of Crop Plants**. New York: Longman, 1979. p. 273-277.

GOODSPEED, T.H. **The genus *Nicotiana***. Waltham, Massachusetts : Chronica Botanica Co, 1954. 536p.

GRIMAUULT. V.; ANAIS, G.; PRIOR, P. Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, p. 633-668, 1994.

HAYWARD, A.C. *Pseudomonas solanacearum*. In: SING, U.; SINGH, R.; KOHMOTO, K. (Eds.) **Pathogenesis and host specificity in plant diseases: Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases**. Oxford: Pergamon, 1995. v.1, p. 139-151.

HAYWARD, A.C. Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. (Eds.) **Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford, UK: CAB International, 1994. p.123-135.

HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.29, p.65-87, 1991.

JACK, A.; ROBERTSON, A. **The CORESTA collaborative study on Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum*)**. Montreux : Cooperation Center for Scientific Research Relative to Tobacco, 1997. p. 59-73. (Report. Information Bulletin)

JACK, A. **The CORESTA collaborative study on Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum*)**. New Orleans : Cooperation Center for Scientific Research Relative to Tobacco, 2002. 17p. (Report. Information Bulletin)

JAUNET, T.; WANG, J.F. Population structure of *Ralstonia solanacearum* from a disease nursery and tomato production fields in Taiwan. In: PRIOR, P.H.; ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J. (Eds.) **Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects**. Berlin: Springer Verlag, 1998. p-83-88.

JOHAL, G. S.; GRAY, J.; GRUIS.; BRIGGS, S.P. Convergent insights into mechanisms determining disease and response in plant-fungal interaction. **Canadian Journal Plant Pathology**, Fredericton, v.73, p. 468-474, 1995.

KELMAN, A. One hundred and one years of research on bacterial wilt. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2., 1997, Guadalupe. **Reports...** Paris, 1998. p.1-5

KELMAN, A.; SEQUEIRA, L. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, St.Paul, v.55, 304-309,1965.

KEARSEY, J. M.; POONI, H.S. The genetical analysis of quantitative traits. London: Chapman & Hall, 1996. 381p.

KIST, B. B.; SANTOS, C.; REETZ, E.; BELING, R. R.; CORRÊA, S.; RIGON, L.; MÜLLER, I. **Anuário Brasileiro do Fumo**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Grupo de Comunicações, 2004. 160p.

LEGG, P.D.; SMEETON, B.W. Breeding and genetics. In: DAVIS, D.L.; NIELSEN, M. (Ed.). **Tobacco, Production, Chemistry and Technology**. [S.l.:s.n.], 1999. p.32-48.

LOPES, C. A. Ecologia de *Pseudomonas solanacearum* In: TALLER SOBRE ENFERMEDADES BACTERIANAS DE LA PAPA, Brasília, 1994. **[Anais...]** Brasília: EMBRAPA/CNPH.CIP, 1994. p.17-22.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. Evidence of the stability of the resistance of the potato cultivar Achat to bacterial wilt in Brazil. **Bacterial Wilt Newsletter**, s.l., v. 11, p.6-7, 1994.

LOPES, C.A.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Manejo integrado das moléstias da batata. **Informe Agropecuário**, Porto Alegre, v.20, p. 56-60, 1999.

LUCAS, G.B. **Granville Wilt: Diseases of Tobacco**. 3 ed. New York: North Carolina State College: The Scarecrow Press, 1975. p. 365-382.

McARTHUR, J.V.; KOVACIS, D.A.; SMITH, M. Genetic diversity in natural population of soil bacterium across a landscape gradient. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, p.9621-9624, 1988.

MARIANO, R.L.T.; SILVEIRA, N.S.S.; MICHEREFF, S.J. Bacterial wilt in Brazil: current status and control Methods. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2., 1997, Guadalupe. **Reports...** Paris: INRA, 1998. p. 386-393.

MATZINGER; D.F.; WERNSMAN, E.A. Population improvement in self-pollinated crops. In: WORD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 2., 1979, Boulder. **Resumos...** Boulder, 1979.p.191.

MIRANDA, E.F.O. **Colonização de raízes de plantas daninhas por *Ralstonia solanacearum* in vitro e em casa de vegetação.** Brasília: UnB, 1997. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 1998.

MOORE, E.L.; KELMAN, A.; POWELL, N.T.; BUNN, B.H. Inoculation Procedures for detecting resistance of tobacco to *Pseudomonas solanacearum* in the field. **Tobacco Science**, New York, v.7, p.17-22, 1963.

NARAYAN, R.K. Nuclear DNA changes, genoma differentiation and evolution in *Nicotiana* (Solanaceae). **Plant Systematic and Evolution**, Vienna, v.157, p. 161-180. 1987.

OKAMURO, J.; GOLDBERG, B. Tobacco single-copia DNA is highly homologous to sequences present in the genomes of its diploid progenitors. **Molecular General Genetics**, New York, v. 198, p. 290-298, 1985.

PALMER, G.K.; PEARCE, R.C. Light Air-cured Tobacco. In: DAVIS, D.L.; NIELSEN, M. (Eds.). **Tobacco, Production, Chemistry and Technology.** [S.l.:s.n.], 1999. p. 195-196.

ROWE, P. R.; SEQUEIRA, L. Inheritance of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in *Solanum phureja*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 10, p.1499-1501, 1970.

ROWE, P. R.; SEQUEIRA, L.; GONZALE, L.C. Additional genes for resistance to *Pseudomonas solanacearum* in *Solanum phureja*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 62, n. 9, p. 1093-1094, 1972.

SCHAAD, N.W. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.** St. Paul: APS Press, 1988. v2, 146p.

SEAL, E.S.; JACKSON, L.A.; DANIELS, M.J. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reation amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58,n.11,p.3759-3761, 1992.

SHOEMAKER, P. B.; SHEW. H.D. Fungal and Bacterial Disease. In: DAVIS, D.L.; NIELSEN, M. (Eds.). **Tobacco, Production, Chemistry and Technology.** [S.l.:s.n.], 1999. p.195-196.

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

SISSON, V.A.; WERNSMAN, E.A. Current U.S. breeding efforts for improving bacterial wilt resistance in flue-cured tobacco. In: HAYWARD, A.C.; HARTMAN, G.L. (Eds.). **Bacterial wilt: the disease and causative agent *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1992. p. 199-205.

SISSON, V.A. Registration of "OX 201" flue-cured tobacco. **Crop Science**, Madison, v.39, p. 292, 1999.

SPERISEN, C.; RYALS, J.; MEINS, F. Comparison of clones genes provides evidence for intergenomic exchange of DNA in the evolution of a tobacco glucan endo-1.3- β -glucosidase gene family. **Proceeding of National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 88, p. 1820-1824, 1991.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics**. 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1980. 633 p.

TAKATSU, A.; LOPES, C.A. Murcha Bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.15 p. 170-177, 1997. Suplemento.

TOKESSHI, H.; CARVALHO, P.C.T. Moléstias do tomateiro. In: GALLI, F. et al **Manual de Fitopatologia: Moléstias de Plantas Cultivadas**. São Paulo: Ceres, 1980. V.2, p. 511-513.

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

TUNG, P.X.; RASCO, E.T.; ZAAG, P.V.; SCHMIEDICHE, P. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato: II Aspects of host-pathogen-environment interaction. **Euphytica**, Alexandria, v.45, n.3, p.211-215, 1990b.

TUNG, P.X. Genetic variation for bacterial wilt resistance in population tetraploid potato. **Euphytica**, Alexandria, v.61, n.1, p.73-80, 1992.

TUSSIME, G.; ADIPALA, E.; OPIO, F.; BHAGSARI, A. S. Weeds as latent host of *Ralstonia solanacearum* in highland Uganda: Implication for lowland potato bacterial wilt control. In: INTERNATIONAL WILT SIMPOSIUM, Guadaloupe, 1997. **Proceedings...** Guadaloupe: ACIAR, 1997. p.87.

VAN DER WOLF, J.M.; BONANTS, P.J.; SMITH, J.J.; HAGENAAR, M.; NIJHUIS, E.; VAN BECKHOVEN, J.R.C.M.; SADDLER, G.S.; TRIGALET, A.; FEUILLADE, R. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* race 3 in western Europe determined by AFLP, RC-PFGE and Rep-PCR. In: INTERNATIONAL BACTERIAL WILT SYMPOSIUM, 2., 1997, Guadaloupe. **Reports...** Paris: INRA, 1998. p.44-49.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Genomic fingerprints produced by PCR with *consensus* tRNA gene primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, n. 4, p.861-866. 1991.

WERNSMAN, E.A. An overview of tobacco breeding: past, present and future. In: CONFERENCE OF TOBACCO SCIENCE RESEARCH, 53., 1999, [Montreal]. [Anais...]. [Montreal], 1999. p.5-35.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Bulkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Bulkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1891) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.36, n.12, p. 1251-1275, 1992.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burckholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, Palleroni and Duodoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 39, n.11, p.897 – 904, 1995.