

Ocorrência de Pectobactérias em Tubérculos de Batata-Semente no Estado do Rio Grande do Sul

Samira O. M. El Tassa & Valmir Duarte

Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Cx. Postal 15100, CEP 90001-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, fax: (51) 3316-6016, e-mail: valmir@ufrgs.br

(Aceito para publicação em 17/06/2004)

Autor para correspondência: Valmir Duarte

EL TASSA, S.O.M. & DUARTE, V. Ocorrência de pectobactérias em tubérculos de batata-semente no Estado do Rio Grande do Sul. Fitopatologia Brasileira 29:620-625. 2004.

RESUMO

Tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*)-semente, pré-básica, básica, registrada e certificada, de oito cultivares, oriundos de 21 lavouras localizadas nos municípios de Vacaria, Canguçu, Piratini e Ibiraiaras, no Rio Grande do Sul, foram coletados nos meses de maio a agosto de 2002. Cada tubérculo foi lavado em água corrente, deixado secar à temperatura ambiente, perfurado com palitos em dez lenticelas, coberto com fina camada de óleo de soja, colocado individualmente em cima de folha de papel toalha umedecida dentro de saco plástico transparente e incubado a 23 °C por quatro dias. A incidência de podridão mole a partir das lenticelas variou de 20–100% entre as cultivares. *Pectobacterium* sp. foi constatada em tubérculos das 21 lavouras. Duzentos e vinte e três isolados de *Pectobacterium* sp. foram obtidos em meio CPG, a partir das lenticelas

com podridão mole, e identificados por testes bioquímicos, fisiológicos e PCR em nível de subespécie. Cento e dezenove isolados foram identificados como *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e e 96 com o *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Oito isolados não se enquadraram na classificação bioquímica. *Pectobacterium carotovorum* subsp. estavam presentes em tubérculos de batata-semente, independente da cultivar, classe ou município de origem. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, a principal responsável por causar canela preta em batata em outros países, não foi detectada.

Palavras-chave adicionais: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *Solanum tuberosum*.

ABSTRACT

Occurrence of pectobacteria in potato seed tubers in Rio Grande do Sul

Seed potato (*Solanum tuberosum*) tubers from eight cultivars of 21 fields in Vacaria, Canguçu, Piratini and Ibiraiaras, all in the state of Rio Grande do Sul, were harvested from May to August of 2002. Each tuber was washed in running water, left to dry at environment temperature (23 °C), stabbed with toothpicks in ten lenticels, covered with a thin layer of soybean oil, put individually on a wet paper towel inside a transparent plastic bag and incubated at 23 °C for four days. The incidence of soft rot in lenticels ranged from 20-100% among the cultivars. *Pectobacterium* sp. was found in tubers

from every field. Two hundred and twenty three isolates of *Pectobacterium* sp. were obtained on CPG medium, from lenticels showing soft rot symptoms, and identified by biochemical and physiological tests and PCR, at subspecies levels. One hundred and nineteen and 96 strains were identified as *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* and *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, respectively. Eight strains did not fit in the biochemical classification. *P. carotovorum* subsp. were present in seed tubers potato, regardless of the cultivar, seed class or county. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, the major agent associated with blackleg on potato in other countries, was not found.

INTRODUÇÃO

As maiores áreas de plantio de batata (*Solanum tuberosum* L.), no Brasil, localizam-se no Rio Grande do Sul, no entanto, a produtividade média é bastante baixa (9 t/ha) quando comparada a de outros Estados que chega a quase 30 t/ha (IBGE, 2003). Este baixo rendimento deve-se, em grande parte, pelo uso de batata-semente de baixa qualidade fitossanitária. A batata é uma cultura que se propaga por tubérculos, embora existam “sementes verdadeiras”. Esta forma de propagação favorece a disseminação de vários patógenos, entre eles as pectobactérias, cuja principal característica é a produção de enzimas pectolíticas em grande quantidade (Colmer & Keen, 1986; Pirhonen *et al.*, 1991;

Salmond, 1994) que ocasiona a rápida maceração dos tubérculos (podridão mole) ou dos tecidos da haste (canela preta e podridão da haste). Em batata, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (van Hall) Hauben *et al.*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben *et al.* e *P. chrysanthemi* (Bulkholder *et al.*) Brenner *et al.* emend. Hauben *et al.* são predominantes (Pérombelon & Kelman, 1987). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* é considerada a única capaz de causar sintomas típicos de canela preta a partir de tubérculos infetados (Pérombelon & Kelman, 1980), mas qualquer uma das três pode estar presente no tecido infetado, dependendo principalmente da temperatura. No Rio Grande do Sul, a coleta de plantas com sintomas de canela preta resultou na obtenção de 408 isolados (Oliveira *et al.*,

2003). Dentre estes, 55, 42 e 1% foram identificados com base em características bioquímicas como *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. chrysanthemi*, respectivamente, e 2% apresentaram características que não corresponderam ao padrão bioquímico e fisiológico de nenhuma espécie ou subespécie. Entretanto, oligonucleotídeos iniciadores específicos para *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (De Boer & Ward, 1995; Fréchon *et al.*, 1998) amplificaram o DNA da estirpe controle de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, mas não das estirpes identificadas como *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Oliveira *et al.*, 2003). Estudos posteriores mostraram que as estirpes brasileiras, identificadas como *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, apresentam perfis genético, bioquímico, fisiológico e sorológico diferentes, gerando a proposta de uma nova subespécie: *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* Duarte *et al.* (Duarte *et al.*, no prelo). Dessa forma, o sintoma de canela preta presente em plantas de batata cultivadas no Rio Grande do Sul pode não ser causado por *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, mas por outras espécies e/ou subespécies. Além disso, assim como observado para canela preta em batata no Rio Grande do Sul (Oliveira *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2004), podem existir outras subespécies, ou mesmo espécies de *Pectobacterium*, ainda não identificadas, envolvidas na podridão mole de tubérculos, podendo resultar em canela preta, além de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*. Este novo fato pode ter implicações epidemiológicas importantes, ainda não conhecidas, podendo refletir nas estratégias de controle a serem aplicadas. Dessa forma, este trabalho teve o objetivo de identificar e verificar a incidência de espécies e subespécies de pectobactérias presentes em tubérculos de batata-semente, produzidos no Rio Grande do Sul, visto a importância deste material na disseminação de patógenos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e incubação

As amostras de tubérculos de batata-semente foram obtidas após a colheita da safra outono/inverno de 2002, nos meses de maio a agosto, em 21 lavouras nos municípios de Canguçu, Ibiraiaras, Piratini e Vacaria. A amostra constou de 30 tubérculos, por cultivar (Asterix, Baraka, Baronesa, Bintje H., Elvira, Macaca, Monalisa, Pérola), das classes pré-básica, básica, registrada e certificada, coletados aleatoriamente, acondicionada em sacos plásticos e identificada. Cada tubérculo foi lavado em água corrente, deixado secar à temperatura ambiente (23 °C), perfurado com palitos em dez lenticelas, mergulhado em óleo de soja, deixado escorrer, colocado individualmente em cima de folha de papel toalha umedecida dentro de saco plástico transparente e incubado a 23 °C por quatro dias. A avaliação constou da contagem de tubérculos macerados, isolamento e identificação de pectobactérias.

Isolamento de pectobactérias

Palitos de madeira esterilizados foram encostados nas extremidades das lesões dos tubérculos macerados e

introduzidos em frutos de pimentão verde (*Capsicum annuum* L.), previamente desinfestados (álcool 70%, 30 s; NaOCl 1%, 30 s; e lavado com água destilada esterilizada (ADE) (Takatsu *et al.*, 1981). Os pimentões foram colocados em bandeja, contendo papel umedecido no fundo, coberta com saco plástico e incubados a 28 °C por 24-48 h. Palitos submersos em ADE e introduzidos nos pimentões foram o controle negativo. Após, a epiderme do fruto no local da lesão foi retirada, a alça de platina encostada no tecido de transição entre a parte sintomática e a sadia, riscada em diluições sucessivas em meio CPG (casamino ácido, 1; peptona, 10; glicose, 10; ágar, 18 g/l) (De Boer & Kelman, 2001) e incubada a 28 °C por 24 h. Colônias de coloração creme, com bordos irregulares, opacas, com característica de “vidro quebrado” (Duarte & El Tassa, 2003) quando observadas ao microscópio estereoscópico com iluminação oblíqua, foram repicadas para meio nutriente ágar (Merck, Darmstadt) para aumento do inóculo. Os isolados foram armazenados em ADE a 4 °C e glicerol-água (15:85) a -20 °C.

Identificação bioquímica e fisiológica

Os isolados obtidos foram identificados através dos seguintes testes: gram, atividade pectolítica em batata, oxidase, catalase, fermentação de glicose (oxidação/fermentação), crescimento a 37 °C, utilização de α -metil glicosídeo (estirpes positivas formam colônias com centro vermelho), sensibilidade à eritromicina, produção de substâncias redutoras de sacarose, produção de ácidos a partir de maltose D(+), lactose e sorbitol (Hyman *et al.*, 1998; De Boer & Kelman, 2001). As estirpes utilizadas como referência foram: *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Pca 31), cedida por S. H. De Boer (CFIA, Canadá), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (IBSBF 1442), *P. chrysanthemi* (IBSBF 920), *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum* (Thomson *et al.*) Hauben *et al.* (IBSBF 787) e *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* (Goto & Matsumoto) Hauben *et al.* (IBSBF 803) cedidas por J. Rodrigues Neto (Instituto Biológico, SP) e *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, estirpes Pcbr 8 (ATCC BAA-416), Pcbr 212^T (ATCC BAA-417), Pcbr 213 (ATCC BAA-418) e Pcbr 371 (ATCC BAA-419).

A capacidade dos isolados em utilizar diferentes açúcares foi testada em placas de microtitulação (96 amostras/placa) (Silveira *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003) contendo 150 μ l de meio de cultura (peptona, 10 g; púrpura de bromocresol 1,5%, 0,7 ml; ágar, 0,3 g; açúcar 10%, 100ml/l, pH 6,8) (Dickey & Kelman, 1988). Culturas com 24-48 h de crescimento foram transferidas para o meio com o auxílio de um palito de madeira esterilizado, e incubadas a 28 °C por 48 h. A mudança de cor de púrpura para amarela foi considerada positiva. Os testes foram conduzidos pelo menos duas vezes.

Identificação pelo sistema BIOLOG

Isolados bacterianos, cultivados em meio nutriente ágar a 28 °C por 24 h, foram transferidos para meio BUGM (Biolog Universal Growth Medium) e incubados nas mesmas

condições. Posteriormente, foi feita uma suspensão bacteriana em solução tampão salina (NaCl 0,15%). A suspensão (150 µl) foi adicionada em cada um dos 96 orifícios das placas do sistema BIOLOG gram-negativa (Biolog, Inc., Hayward, CA, EUA), contendo 95 diferentes fontes de carbono, incubadas por 24 h a 28 °C, e a densidade óptica (405 nm) obtida em leitor de placas de microtitulação (Titertek Multiskan Plus). A análise dos resultados e a identificação dos isolados foram realizadas pelo programa MicroLog (Biolog, Inc., Hayward, CA, EUA).

Identificação por PCR

Culturas bacterianas, com 24-48 h, foram transferidas para 250 µl de tampão de extração de DNA (100mM tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA; 1% SDS e 5 µg de proteinase K), com o auxílio de um palito de dente e incubadas por 3 h a 56 °C em banho-maria. Posteriormente, 250 µl de acetato de amônio 7,5 M foi adicionado, misturado e centrifugado a 14.000 g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, um volume de isopropanol foi adicionado e incubado por cerca de 16 h a -20 °C. O precipitado foi obtido através de centrifugação por 25 min a 14.000 g a 4 °C, lavado com etanol 70%, seco, dissolvido em 50 µl de água ultra pura e armazenado a -20 °C (De Boer & Ward, 1995).

O DNA extraído dos isolados foi submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os seguintes oligonucleotídeos iniciadores (5' - 3'): ECA1f (CGGCATCAT AAAAACACG)/ECA2r (GCACACTTCATCCAGCGA) (De Boer & Ward, 1995) que produzem um fragmento de 690 pb, específico para *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*; 1491f (GAAGTCGTAACAAGGTA)/L1RA (CAAGGCATCCACCGT)/L1RG (CAGGGCATCCACCGT) da região espaçadora intergênica (IGS) diferenciando *P. carotovorum* (fragmentos de ≈ 510 pb e ≈ 550 pb) de *P. chrysanthemi* (um fragmento adicional de 480 pb) (Fessehaie *et al.*, 2002); e Br1f (GCGTG CCGGGTTTATGACCT) /L1RA/L1RG que produzem um fragmento de 322 pb e diferencia *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e algumas estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* das demais pectobactérias (Duarte *et al.*, 2004).

As reações foram feitas em um volume final de 10 µl, sendo que com ECA1f/ECA1r (94 °C/5 min (94 °C/30 s, 65 °C/45 s, 72 °C/45s) 25X, 72 °C/5 min) foi usado 1 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; tampão de reação (10 mM Tris pH 8,3; 50 mM KCl); 2,0 mM de MgCl₂; 0,1 mM de cada dNTP (Invitrogen); 0,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e aproximadamente 100 ng de DNA (De Boer & Ward, 1995). Para PCR da região IGS (94 °C/2 min (94 °C/45 s, 66 °C/45 s, 72 °C/1,5 min) 30X, 72 °C/10 min) foi usado 1 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, tampão de reação (10 mM Tris pH 8,3; 50 mM KCl); 2,5 mM de MgCl₂; 0,1 mM de cada dNTP (Invitrogen); 0,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e aproximadamente 100 ng de DNA (Fessehaie *et al.*, 2002). A PCR contendo Br1f/L1RA/L1RG teve as mesmas condições da PCR da região IGS com as seguintes alterações: foi usado 1 µM do primeiro oligonucleotídeo iniciador e 0,5 µM dos outros dois e 2,0

mM de MgCl₂ (Duarte *et al.*, 2004)

Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídeo, visualizado sob luz ultra-violeta e fotografado através do sistema de análise de gel computadorizado (Kodak Digital Science 1D).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A incidência de podridão mole associada a bactérias pectolíticas na batata-semente das cultivares avaliadas variou de 20 a 100% (Tabela 1). A presença de *P. carotovorum* subsp. foi constatada em todas as amostras, independente da cultivar, classe ou município de origem. Este fato ressalta a importância dos tubérculos de batata-semente como principal fonte de inóculo das pectobactérias (Pérombelon & Kelman, 1980). As bactérias sobrevivem na forma latente nas lenticelas e ferimentos suberizados ou nos tecidos vasculares de tubérculos que aparentemente estão livres do patógeno quando são colhidos. Quando as condições favorecem a multiplicação do patógeno e a produção de enzimas pectolíticas, o tubérculo apodrece e a bactéria se dissemina (Elphinstone, 1993). No entanto, a presença de pectobactérias em tubérculos-semente de diferentes classes, principalmente pré-básica, pode ser um indicativo da persistência destas bactérias no solo e/ou na água de irrigação. As sementes pré-básicas são as de mais alta qualidade fitossanitária e, na maioria das vezes, são oriundas de cultura de tecidos. Pectobactérias não foram isoladas de alguns tubérculos com podridão mole. Este fato pode ser devido à presença de outras bactérias pectolíticas (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e/ou outras) que poderiam estar causando o mesmo sintoma (Campos *et al.*, 1982), mas sua identificação não foi objetivo do presente estudo. Outra razão poderia ser a baixa seletividade do meio de cultura CPG. Embora o meio de cultura CVP (cristal-violeta-pectato) (Cuppels & Kelman, 1974) seja considerado mais eficiente, permitindo a formação de cavidades na superfície, para o isolamento de pectobactérias, esta eficiência depende do tipo de polipectato (Pierce & McCain, 1992). O polipectato adequado (Bulmer, Slendid & Sunkist) é de difícil aquisição no Brasil e mesmo no exterior. No entanto, a utilização de fruto de pimentão verde como meio parcialmente seletivo (Takatsu *et al.*, 1981) mostrou-se eficiente no processo de isolamento destas bactérias.

Colônias jovens de pectobactérias apresentaram aspecto de "vidro quebrado" (Duarte & El Tassa, 2003) após 24-48 h de incubação a 28 °C. Esta característica da colônia, distingue as pectobactérias de *pseudomonas* e de outras bactérias comuns em solos (Kelman & Dickey, 1989).

Duzentos e vinte e três isolados foram obtidos de tubérculos de batata-semente (Tabela 1). Dentre estes, 119 foram identificados como *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e 96 como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Tabela 1). Oito isolados apresentaram características que não corresponderam a nenhuma espécie ou subespécie, não sendo possível identificá-los. *Pectobacterium carotovorum* subsp.

TABELA 1 - Incidência de bactérias pectolíticas e *Pectobacterium* spp. em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*)-semente de oito cultivares em quatro municípios do Rio Grande do Sul e identificação bioquímica dos isolados

Município	Variedade de batata	Classe ¹	Bactérias pectolíticas (%)	<i>Pectobacterium</i> sp. (%)	<i>Pectobacterium</i> spp. e subsp. ²					Total
					Pcbr	Pcc	Pca	Pch	ND	
Canguçu	Baronesa	R	73	40	10	01	0	0	0	11
		C	100	57	16	01	0	0	0	17
	Macaca	R	83	13	03	01	0	0	0	04
		C	93	70	20	00	0	0	0	20
	Média (%)		87	45	-	-	0	0	-	-
Total		-	-	49	03	0	0	0	52	
Ibiraiaras	Asterix	C	20	17	0	02	0	0	03	05
	Elvira	C	50	20	01	03	0	0	02	06
	Macaca	C	93	13	01	03	0	0	0	04
	Média (%)		54	17	-	-	0	0	-	-
Total		-	-	02	08	0	0	05	15	
Piratini	Asterix	B	77	17	05	0	0	0	0	05
	Baronesa	B	93	77	19	04	0	0	0	23
		R	100	37	03	07	0	0	0	10
	Macaca	B	97	57	04	13	0	0	0	17
		R	83	37	02	09	0	0	0	11
	Monalisa	B	77	53	05	11	0	0	0	16
	Pérola	R	100	37	09	02	0	0	0	11
	Média (%)		90	45	-	-	0	0	-	-
Total		-	-	47	46	0	0	0	93	
Vacaria	Asterix	PB	63	40	03	09	0	0	0	12
	Baraka	PB	100	12	03	02	0	0	0	05
		B	87	53	0	13	0	0	03	16
	Binje H.	PB	83	40	01	11	0	0	0	12
	Elvira	PB	90	20	05	01	0	0	0	06
	Monalisa	PB	73	7	09	01	0	0	0	10
		B	73	33	0	02	0	0	0	02
Média (%)		81	30	-	-	0	0	-	-	
Total		-	-	21	39	0	0	03	63	
Total					119	96	0	0	08	223
Porcentagem					53	43	0	0	4	100

¹ PB, pré-básica; B, básica; R, registrada; C, certificada

² Pcbr, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*; Pcc, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*; Pca, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*; Pch, *P. chrysanthemi*; ND, não determinada

atrosepticum, considerada o principal agente causal da canela preta em outros países e *P. chrysanthemi* não foram detectadas.

Todos os isolados maceraram batata e apresentaram resultado positivo para O/F e catalase e negativo para oxidase. Das estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, 99% não produziram ácido a partir de maltose (Tabela 2), inclusive a estirpe de referência IBSBF 1442. Este resultado corrobora com os obtidos por Oliveira *et al.* (2003), onde 79% das estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* foram negativas para este açúcar. Segundo Lelliot & Dickey (1984), 21-79% das estirpes de *P. carotovorum* são positivas para maltose, mas estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* são negativas. No entanto, Hyman *et al.* (1998) mostraram que esta subespécie é positiva para maltose. Isto pode indicar uma diferença entre as estirpes brasileiras e de outros países. A produção de ácido de lactose e sorbitol (Tabela 2) por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* é consistente com a descrição das subespécies (Lelliot & Dickey, 1984; Duarte *et al.*, no prelo). As estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* não apresentaram colônias com centro vermelho em meio com α -metil glicosídeo

e cresceram a 37 °C, características que as diferenciam de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (De Boer & Kelman, 2001).

Dos oito isolados que não foram identificados pelos testes bioquímicos, três não cresceram a 37 °C e não formaram colônia com centro vermelho em meio com α -metil glicosídeo, descartando a hipótese de ser *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, bem como não produziram ácido de maltose, lactose e sorbitol. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *wasabiae* (Goto & Matsumoto) Hauben *et al.*, responsável por causar descoloração interna de rizomas de *Eutrema wasabi* Maxim. (Goto & Matsumoto, 1987), possui estas características e ainda não foi relatada em batata no Brasil. No entanto, o sistema BIOLOG identificou-os como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (79% de similaridade) e mostrou que usam melibiose e rafinose, diferentemente de *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* (Goto & Matsumoto, 1987).

Apesar do grande número de dados publicados sobre pectobactérias, referências sobre a ocorrência de formas intermediárias, nas condições brasileiras, ainda são muito escassas. Um levantamento de pectobactérias em diferentes hospedeiros e regiões do Brasil (Jabuonski *et al.*, 1986)

TABELA 2 - Resultados de testes bioquímicos e fisiológicos de 223 isolados de pectobactérias oriundos de batata (*Solanum tuberosum*)-semente

Identificação ¹	Número de isolados	Testes bioquímicos e fisiológicos (% positivos)							
		O/F ²	Crescimento a 37 °C	Sensibilidade a eritromicina	Produção de substâncias redutoras de sacarose	Utilização de α -metil glicosídeo	Produção de ácido de		
							Lactose	Maltose	Sorbitol
Pcc	95	100	100	0	0	0	100	1	0
Pcbr	120	100	100	0	100	100	100	2,5	2,5
ND	8	100	62,5	0	0	0	37,5	0	0

¹ Pcc, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; Pcbr, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*; ND, não determinada

²O/F- oxidação/fermentação

mostrou um grande número de estirpes formando ácido a partir de α -metil glicosídeo e de substâncias redutoras a partir de sacarose, características de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, mas crescendo a 37 °C. Estes isolados foram incluídos no grupo dos intermediários e não identificados. No entanto, as identificações anteriores não levaram em conta a grande homogeneidade genética, bioquímica e fisiológica destas estirpes, que culminou na proposição de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Duarte *et al.*, 2004). Da mesma forma, o relato da ocorrência em beterraba de uma pectobactéria com características bioquímicas de *P. chrysanthemi* e *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, denominada *P. carotovorum* subsp. *betavasculatorum* (Thomson *et al.*, 1981), e com conteúdo de G+C intermediária entre *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. chrysanthemi*, é uma indicação de que as formas intermediárias possuem uma importância epidemiológica significativa e podem ser encontradas com maior frequência a medida que levantamentos mais amplos sejam efetuados.

Todas as estirpes mostraram, através da PCR, a presença de dois fragmentos, citados como de \approx 510 pb e \approx 550 pb (Fessehaie *et al.*, 2002), da região IGS, característicos da espécie *P. carotovorum* (Figura 1A). A utilização de oligonucleotídeos iniciadores para *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Figura 1B) e *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Figura 1C), confirmaram a identidade das estirpes de *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e a ausência de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, respectivamente.

Baseado nos resultados encontrados, pode-se considerar que a utilização de batata-semente com pectobactérias, na forma latente, pelos produtores do Rio Grande do Sul, podem estar contribuindo para a grande incidência de canela preta (Oliveira *et al.*, 2003) e podridão mole na produção de batata-consumo. A baixa qualidade fitossanitária dos tubérculos-semente, somado a outros fatores, pode explicar a menor produtividade do Rio Grande do Sul quando comparada a de outros Estados produtores (EPAGRI, 2002). Apesar de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* ser considerada o agente causal dos sintomas típicos de canela preta, e a única capaz de causar tais sintomas a partir do tubérculo infetado (Pérombelom & Kelman, 1980; De Boer, 2002), esta subespécie não foi detectada neste levantamento. Este fato

reforça a hipótese de que outras espécies e/ou subespécies de pectobactérias podem causar o mesmo sintoma.

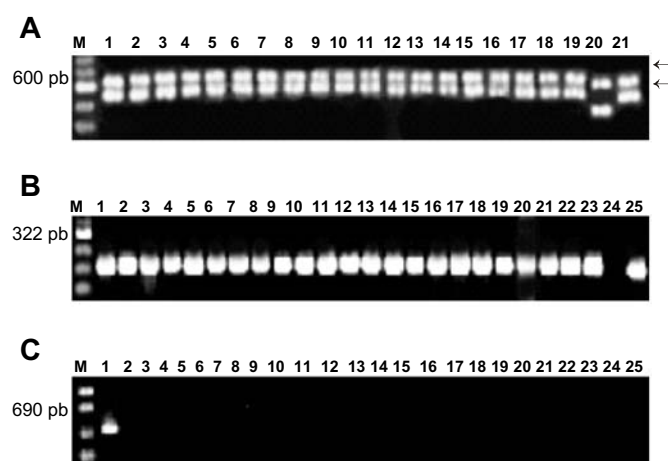


FIG. 1 - Amplificações de fragmentos de DNA de *Pectobacterium* spp. usando: **A)** oligonucleotídeos iniciadores da região IGS que separam *P. carotovorum* de *P. chrysanthemi*. M, marcador 100 pb; 1-15 e 17-19 *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*; 16, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*; 20, *P. chrysanthemi* IBSBF 920; 21, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* Pcbr 212^T. **B)** oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos a partir da região IGS, específicos para *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* e algumas estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. M, marcador 100 pb; 1-23, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*; 24, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* 31; 25, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* Pcbr 212^T. **C)** oligonucleotídeos iniciadores específicos para *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*. M, marcador 1Kb plus; 1, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* 31; 2, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* Pcbr 212^T; 3, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* IBSBF 1442; 4-21 e 23-24, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*; 22, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*; 25, controle negativo (sem DNA).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPOS, E., MAHER, E.A. & KELMAN, A. Relationship of pectolytic clostridia and *Erwinia carotovora* strains to decay of potato tubers in storage. *Plant Disease* 66:543-546. 1982.
- COLMER, A. & KEEN, N.T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 24:383-409. 1986.

- CUPPELS, D. & KELMAN, A. Evaluation of selective media for isolation of soft rot bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathology* 64:468-475. 1974.
- DE BOER, S.H. & KELMAN, A. *Erwinia* soft rot group. In: Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. (Eds.) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3th ed. St. Paul. American Phytopathological Society. 2001. pp.56-72.
- DE BOER, S.H. Relative incidence of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in stolon end and peridermal tissue of potato tubers in Canada. *Plant Disease* 86:960-964. 2002.
- DE BOER, S.H. & WARD, L.J. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology* 5:854-858. 1995.
- DUARTE, V., DE BOER, S.H., WARD, L.J. & OLIVEIRA, A.M.R. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* 96:535-545. 2004.
- DUARTE, V. & EL TASSA, S.O.M. Taxonomia do gênero *Pectobacterium*. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 11:1-41. 2003.
- DICKEY, R.S. & KELMAN, A. *Erwinia*: "Carotovora" or soft rot group. In: Schaad, N.W. (Ed.) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 2 ed. St. Paul. American Phytopathological Society. 1988. pp.44-59.
- ELPHINSTONE, J.G. Ecologia de espécies pectolíticas de *Erwinia* causantes de pudricion blanda y pierna negra de la papa. In: Lopes, C.A. & Espinoza R.N. (Eds). *Taller sobre enfermedades bacterianas de la papa*. Brasília. EMBRAPA/CNPq. 1993. pp.59-66.
- EPAGRI. *Sistemas de produção para batata-consumo e batata-semente em Santa Catarina*. 3 ed. Florianópolis. GMC/Epagri. 2002.
- FESSEHAIE, A., DE BOER, S.H. & LEVESQUE, C.A. Molecular characterization of DNA encoding 16S-23S RNA intergenic spacer regions and 16S rRNA of pectolytic *Erwinia* species. *Canadian Journal of Microbiology* 48:387-398. 2002.
- FRÉCHON, D., EXBRAYAT, P., HELLAS, V., HYMAN, L.J., JOUAN, B., LLOP, P., LOPEZ, M.M., PAYET, N., PÉROMBELON, M.C.M., TOTH, I.K., VAN BECKHOVEN, R.C.M., VAN DER WOLF, J.M. & BERTHEAU, Y. Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Potato Research* 41:163-173. 1998.
- GOTO, M. & MATSUMOTO, K. *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae* subsp. nov. isolated from diseased rhizomes and fibrous roots of japanese horseradish (*Eutrema wasabi* Maxim.). *International Journal of Systematic Bacteriology* 37:130-135. 1987.
- HYMAN, L.J., TOTH, I.K. & PÉROMBELON, M.C.M. Isolation and identification. In: Pérombelon, M.C.M. & Van Der Wolf, J.M. (Eds.). *Methods for the detection and quantification of Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes. *Laboratory Manual*. Invergowrie. Scottish Crop Research Institute. 1998. pp.60-65.
- IBGE. Brasília, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Contém informações institucionais, técnicas, indicadores estatísticos, notícias, publicações e serviços. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 04 nov. 2003.
- JABUONSKI, R.E., TAKATSU, A. & REIFSCHNEIDER, F.J.B. Levantamento e identificação de espécies de *Erwinia* de diferentes plantas hospedeiras e regiões do Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 11:185-195. 1986.
- KELMAN, A. & DICKEY, R.S. Detection of *Erwinia carotovora* and *E. chrysanthemi*. In: Saettler, A.W., Schaad, N.W. & Roth, D.A. (Eds.) *Detection of bacteria in seed and other planting material*. St. Paul. American Phytopathological Society. 1989. pp.76-91.
- LELLIOT, R.A. & DICKEY, R.S. Genus VII. *Erwinia* Winslow, Brodaghurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1920. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins. 1984. pp.469-476.
- OLIVEIRA, A.M.R., DUARTE, V., SILVEIRA, J.R.P. & MORAES, M.G. Incidence of pectolytic erwinias associated with blackleg of potato in Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira* 28:49-53. 2003.
- PÉROMBELON, M. & KELMAN, A. Blackleg and other potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: proposal for revision of terminology. *Plant Disease* 71:283-285. 1987.
- PÉROMBELON, M. & KELMAN, A. Ecology of the soft rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology* 12:361-387. 1980.
- PIERCE, L. & Mc CAIN, A.H. Selective medium for isolation of pectolytic *Erwinia* sp. *Plant Disease* 76:382-384. 1992.
- PIRHONEN, M., SAARILAHTI, H., KARLSSON, M.B. & PALVA, E.T. Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by transposons mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 4:276-283. 1991.
- SALMOND, G.P.C. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 32:181-200. 1994.
- SILVEIRA, J.R.P., DUARTE, V. & MORAES, M.G. Ocorrência das biovars 1 e 2 de *Ralstonia solanacearum* em lavouras de batata no Estado do Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira* 27:450-453. 2002.
- TAKATSU, A., MELLO, S. & GARCIA, E.J. Fruto do pimentão como meio parcialmente seletivo para isolamento de *Erwinia carotovora*. *Fitopatologia Brasileira* 6:550-551. 1981.
- THOMSON, S.V., HIDELBRAND, D.C. & SCHROTH, M.N. Identification and nutritional differentiation of the *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology* 71:1037-1042. 1981.