

OCORRÊNCIA DAS BIOVARES 1 E 2 DE *Ralstonia solanacearum* EM LAVOURAS DE BATATA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

JOSÉ R. P. SILVEIRA, VALMIR DUARTE & MARCELO G. MORAES

Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Cx. Postal 776, CEP 90001-970, Porto Alegre, RS, e-mail: valmir@ufrgs.br

(Aceito para publicação em 24/07/2002)

Autor para correspondência: Valmir Duarte

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.

RESUMO

Com a finalidade de verificar a ocorrência e a distribuição de biovars de *Ralstonia solanacearum* no Estado do Rio Grande do Sul, plantas com sintomas de murcha-bacteriana foram coletadas, na primavera de 1999, em 25 lavouras de batata (*Solanum tuberosum*) em dez municípios das quatro áreas de produção: Serra do Nordeste, Planalto Superior, Depressão Central e Grandes Lagoas. A determinação da espécie foi feita com teste sorológico através de ELISA e

da biovar com base no metabolismo oxidativo de açúcares e álcoois. Noventa e quatro por cento dos 490 isolados foram identificados como biovar 2. A ocorrência da biovar 1 foi registrada na Serra do Nordeste e Depressão Central. A ocorrência das biovars não mostrou relação com a temperatura média local ou cultivar de batata.

Palavras-chave adicionais: epidemiologia, murcha-bacteriana, *Solanum tuberosum*.

ABSTRACT

Occurrence of biovars 1 and 2 of *Ralstonia solanacearum* in potato fields in the State of Rio Grande do Sul

Occurrence and distribution of biovars of *Ralstonia solanacearum* in the State of Rio Grande do Sul were assessed by harvesting potato (*Solanum tuberosum*) plants showing bacterial wilt symptoms in the spring of 1999. Plants were collected from 25 potato fields in ten counties in the four main production regions: Serra do Nordeste, Planalto Superior, Depressão Central and

Grandes Lagoas. Species and biovar determinations were based on serological test with ELISA and the oxidative metabolism of sugars and alcohols. Ninety-four percent of 490 strains were identified as biovar 2. Occurrence of biovar 1 was recorded in Serra do Nordeste and Depressão Central. The incidence of biovars showed no correlation with local temperature or potato cultivars.

INTRODUÇÃO

A murcha-bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* 1995 [sin. *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith 1914] é uma das maiores limitações ao cultivo da batata (*Solanum tuberosum* L.) em regiões de clima tropical, subtropical e zonas mais quentes de clima temperado em todo o mundo (Hayward, 1991). A bactéria é classificada por raças em relação à espécie hospedeira, e por biovars conforme a habilidade de utilizar ou oxidar determinados açúcares e álcoois (Hayward, 1994). Dois grupos de estirpes são capazes de infetar a cultura da batata, as estirpes da biovar 1, que correspondem à raça 1, com grande número de hospedeiros, maior capacidade de persistir no solo e predominar em regiões de clima quente, e as estirpes da biovar 2, correspondentes à raça 3, que infetam basicamente a batata em regiões de clima temperado e apresentam maior capacidade de produzir infecções latentes (Hayward, 1991; Lopes, 1994). As infecções latentes são de

particular importância na cultura da batata, e os tubérculos-semente infetados constituem a fonte de inóculo mais importante para a disseminação do patógeno (Hayward, 1991). De acordo com Lopes (1994), o comportamento das estirpes destes dois grupos é bastante diferente e leva à adoção de medidas diferenciadas para o manejo integrado da doença, sendo o controle mais satisfatório para as estirpes da biovar 2. A melhor forma de evitar o problema é assegurar que o solo e os tubérculos-semente utilizados para plantio estejam livres do patógeno (Elphinstone & Aley, 1993; Lopes, 1994). Nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil predomina a biovar 2 do patógeno, embora a biovar 1 também possa ser encontrada (Lopes *et al.* 1993; Maciel, 1999). No Rio Grande do Sul, onde o clima é subtropical úmido, a batata é cultivada em duas safras anuais, totalizando uma área superior a 48.000 ha, em pelo menos quatro regiões distintas, e *R. solanacearum* é considerada endêmica (Ramos *et al.*, 1998). Considerando a ausência de levantamentos com um número representativo de isolados de *R. solanacearum* em lavouras de batata do Rio

Grande do Sul, este levantamento objetivou testar a hipótese de que a ocorrência de *R. solanacearum* está restrita à biovar 2. Um resumo deste trabalho já foi publicado anteriormente (Silveira *et al.*, 2000).

MATERIAL E MÉTODOS

No período de setembro a dezembro de 1999, 20 plantas de batata com sintomas de murcha-bacteriana foram coletadas por lavoura, exceto em Silveira Martins (dez plantas), em 25 lavouras localizadas em dez municípios de quatro regiões produtoras: Depressão Central, Sub-região 1C (Santa Maria e Silveira Martins); Serra do Nordeste, Sub-região 4A (Carlos Barbosa, Farroupilha e Garibaldi); Planalto Superior, Sub-região 3B (Nova Prata, Ibiraiaras e São Jorge) e Grandes Lagoas, Sub-região 12A (Pelotas e São Lourenço) (Figura 1) (Rio Grande do Sul, 1994).

Obtenção de culturas puras de *Ralstonia solanacearum*

Hastes de plantas com sintomas foram desinfestadas 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 observação do fluxo bacteriano. Com uma pipeta de microtitulação, 20 µl da suspensão bacteriana foram transferidos para a superfície do meio de cultura SPA (sacarose 20; peptona 10; e agar 12 g/l), mais 0,05% de cloreto de trifênil tetrazólio (CTT) em placas de Petri. Após 48 h, a 28 °C, colônias fluidas, com centro vermelho e bordas brancas, foram transferidas para SPA e, após 24 h a 28 °C, submetidas aos testes de Gram, oxidase e DAS-ELISA com anti-soro policlonal reativo a *R. solanacearum* fornecido pela EMBRAPA-CPACT (Castro *et al.*, 1993). Os isolados foram armazenados em ADE, a 5 °C, e em glicerol-água (15:85), a -80 °C.

Testes bioquímicos para identificação da biovar

A capacidade dos isolados em utilizar diferentes fontes de carbono, para a determinação da biovar (Schaad, 1988), foi testada em placas de microtitulação (96 amostras/placa), contendo 150 µl de meio Ayers pH 7,2 (NH₄H₂PO₄ 1; KCl 0,2; MgSO₄·7H₂O 0,2; agar 6 g/l; pH 7,2), acrescido de 1 ml/l de azul de bromotimol 1,6%, e uma das seguintes fontes de carbono a 1%: celobiose, lactose, maltose, trealose, dulcitol, manitol e sorbitol. Culturas com 24 h de crescimento, cultivadas em meio SPA a 28 °C, foram transferidas, com auxílio de palito de dente esterilizado, para meio com a fonte de carbono específica contido nos orifícios da placa. Utilizaram-se três repetições (placa) para cada substrato, e o meio sem fonte de carbono foi utilizado como controle negativo. As placas foram então incubadas a 28 °C, e a capacidade do isolado utilizar a fonte de carbono fornecida foi avaliada através da mudança de cor do meio de verde para amarela, após 72 h. Como controle positivo, utilizaram-se seis isolados de *R. solanacearum* oriundos de plantas de

batata, fornecidos pelo Centro de Pesquisa Agropecuário de Clima Temperado (EMBRAPA-CPACT), Pelotas, RS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quatrocentos e noventa isolados de *R. solanacearum* foram obtidos nas quatro principais regiões produtoras de batata do Rio Grande do Sul. Destes, 94 e 6% foram identificados como biovars 1 e 2, respectivamente (Tabela 1). Estes resultados corroboram com a afirmação de que a biovar 2 é endêmica e predominante nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil (French *et al.*, 1993). Também Lopes *et al.* (1993) verificaram, em levantamento realizado em 15 lavouras de batata em sete municípios no Estado do Paraná, que quatro e 79 isolados eram biovars 1 e 2, respectivamente. Além disso, Maciel (1999) obteve resultado semelhante ao determinar que 95% dos 77 isolados, obtidos em uma lavoura de batata no município de Caxias do Sul, RS, pertenciam à biovar 2, mas que isto aconteceu apenas no cultivo de primavera (setembro a janeiro), quando as temperaturas são mais elevadas. A biovar 1 não foi detectada no cultivo de outono (fevereiro a junho) (Maciel, 1999). Este, no entanto, é o primeiro trabalho que envolve o levantamento de um número representativo de lavouras de diferentes regiões do Rio Grande do Sul.

A biovar 1 foi constatada na cultivar Sinfonia, no município de Garibaldi, e na cultivar Macaca, em Silveira Martins, em duas regiões distintas (Figura 1, Tabela 1). Em Garibaldi, 20 isolados obtidos de uma única lavoura foram identificados como biovar 1, o que elevou o percentual de isolados desta biovar para 19% na região da Serra do Nordeste. A temperatura média na região durante o período foi 17,1 °C, menor do que nas demais regiões (Tabela 1), indicando que outros fatores poderiam ser responsáveis pela alta incidência dessa biovar naquele local. A temperatura é um dos principais fatores que afeta a ocorrência das biovars de *R. solanacearum*, sendo a biovar 1 favorecida por temperaturas entre 26 e 36 °C (Hayward, 1991). No entanto, a constante introdução de estirpes desta biovar através de batata-semente e o conseqüente aumento da população no solo poderiam explicar a maior incidência apesar da menor temperatura. O fator cultivar também não parece relacionado, visto que a biovar 1 ocorreu nas cultivares Sinfonia e Macaca, as quais foram plantadas em outros locais, sem a presença desta biovar. Assim sendo, um trabalho de detecção das biovars de *R. solanacearum* em batata-semente utilizada no Rio Grande do Sul poderia esclarecer a razão da incidência, particularmente da biovar 1, em locais menos favoráveis.

Os testes bioquímicos realizados em placas de microtitulação facilitaram o trabalho com grande número de isolados, não apresentaram problemas de interpretação dos resultados e representaram economia de espaço e meio de cultura. Isolados considerados como biovar 2, utilizaram os açúcares lactose, maltose e celobiose, modificando a cor do meio de cultivo de verde para amarela, e não utilizaram o açúcar trealose e os álcoois manitol, sorbitol e dulcitol. Nestes casos, os meios de cultivo permaneceram na cor verde. Os

TABELA 1 – Incidência das biovars 1 e 2 de *Ralstonia solanacearum* em lavouras de produção de batata (*Solanum tuberosum*) de quatro regiões agroecológicas do Rio Grande do Sul, 2002

REGIÃO	MUNICÍPIO	NÚMERO DE ISOLADOS				
		LAVOURA			BIOVAR	
		1	2	3	1	2
SERRA DO NORDESTE (17,1 °C)*	CARLOS BARBOSA	20 ^{(Sin)**}	20 ^(Bar)	20 ^(Bar)	2	58
	FARROUPILHA	20 ^(Elv)	20 ^(Bar)	0	1	39
	GARIBALDI	20 ^(Sin)	0	0	20	0
					19%	81%
PLANALTO SUPERIOR (19,0 °C)	IBIRAIARAS	20 ^(Elv)	20 ^(Bar)	20 ^(Ast)	0	60
	NOVA PRATA	20 ^(Bar)	20 ^(Ast)	20 ^(Bar)	0	60
	SÃO JORGE	20 ^(Bar)	20 ^(Bar)	20 ^(Bar)	0	60
					0%	100%
DEPRESSÃO CENTRAL (20,4 °C)	SANTA MARIA	20 ^(Bar)	20 ^(Bar)	20 ^(Mac)	0	60
	SILVEIRA MARTINS	20 ^(Mac)	20 ^(Mac)	10 ^(Mac)	5	45
					5%	95%
GRANDES LAGOAS (18,8 °C)	PELOTAS	20 ^(Mac)	0	0	0	20
	SÃO LOURENÇO DO SUL	20 ^(Mac)	20 ^(Sin)	20 ^(SA)	0	60
					0%	100%
TOTAL			490		28	462
					6%	94%

* Temperatura média de setembro a dezembro de 1999.

** A abreviatura entre parênteses indica a cultivar plantada na lavoura amostrada:

Ast = Asterix; Bar = Baronesa; Elv = Elvira; Mac = Macaca; SA = Santo Amor; Sin = Sinfonia.

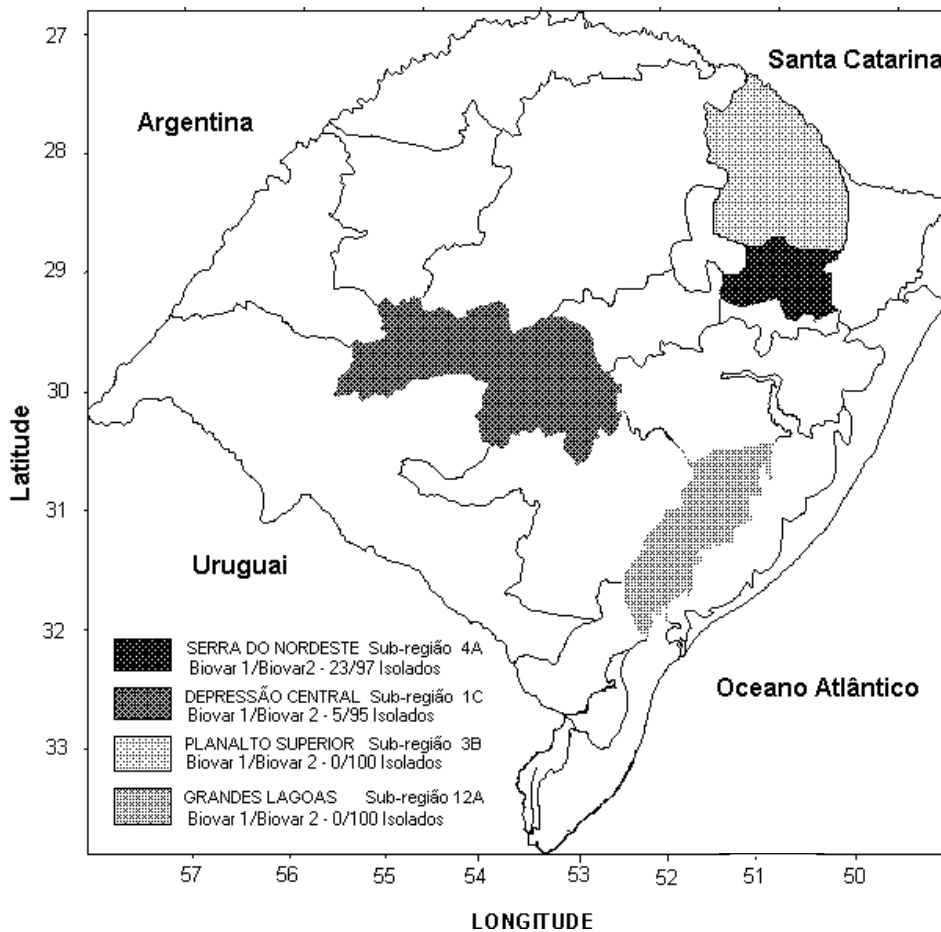


FIG. 1 - Regiões agroecológicas do Estado do Rio Grande do Sul onde foram coletadas plantas de batata (*Solanum tuberosum*) com sintomas de murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) em lavouras de produção. Porto Alegre, 2002.

isolados da biovar 1, utilizaram apenas trealose, não modificando a cor do meio de cultura com as demais fontes de carbono. Os controles negativos, meio de cultura sem fonte de carbono, também mantiveram a cor.

A biovar 2-T (ou N2), uma variante da biovar 2, que ocorre em regiões de clima tropical de baixa altitude, tem como centro de origem a Região Amazônica. Esta variante é geneticamente diferente da biovar 2 e utiliza a trealose (Hayward, 1994). A biovar 2-T não foi constatada entre as estirpes estudadas.

A baixa incidência da biovar 1 nas lavouras não garante sua ausência na batata-semente produzida no Rio Grande do Sul. Embora com menor aptidão para persistir como infecção latente nos tubérculos do que a biovar 2, a biovar 1 pode ser transmitida desta maneira e tornar-se predominante em lavouras de regiões com temperaturas mais elevadas. A análise de rotina de tubérculo-semente para detecção de *R. solanacearum*, através de técnicas de detecção sensíveis e específicas, deveria fazer parte de qualquer programa de incentivo à cultura da batata. De um modo geral, as áreas de produção de batata para consumo no Rio Grande do Sul são cultivadas de modo intensivo, nem sempre observando uma rotação de culturas adequada, em função da falta de opções de cultivo com outras espécies que possibilitem um retorno econômico, ou pela escassez de novas áreas disponíveis nas regiões tradicionais de cultivo de batata (Ramos *et al.*, 1998). A não utilização de batata-semente certificada, por parte dos produtores de batata para consumo, pode contribuir para a introdução do patógeno. Mesmo em áreas de certificação de batata no Brasil, a murcha-bacteriana tem sido responsável pela condenação de 8,8% da área plantada, o equivalente a 64,1% das condenações (Lopes *et al.*, 1990).

A biovar 2 foi registrada na Europa no início da década de 90 (Elphinstone *et al.*, 1996), ameaçando a produção de batata, particularmente batata-semente. A erradicação tem sido a estratégia utilizada. No Canadá e Estados Unidos, a tolerância é zero e a doença não tem sido registrada a campo. Assim, a ocorrência endêmica e predominante da biovar 2 no Rio Grande do Sul facilita a condução de pesquisas de campo com interesse internacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASTRO, L.A.S., DANIELS, J. & COUTO, M.E.O. Utilização do teste de ELISA na diagnose de *Pseudomonas solanacearum*. Fitopatologia Brasileira 18:296. 1993. (Resumo).
- ELPHINSTONE, J.G. & ALEY, P. Integrated control of bacterial wilt of potato in the warm tropics of Peru. In: Hartman, G.L. & Hayward, A.C. (Eds.) Bacterial Wilt. Canberra, ACIAR Proceedings. 1993. pp.267-283.
- ELPHINSTONE, J.G., HENNESSY, J., WILSON, J.K. & STEAD, D.E. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. EPPO Bulletin 26:663-678. 1996.
- FRENCH, E.R., ALEY, P., TORRES, E. & NYDEGGER, U. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* in Peru and Brazil. In: Hartman, G.L. & Hayward, A.C. (Eds.) Bacterial Wilt. Canberra, ACIAR Proceedings. 1993. pp. 70-77.
- HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29: 65-87. 1991.
- HAYWARD, A.C. Systematics 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: CAB International, 1994. pp.123-135.
- LOPES, C.A. Ecologia de *Pseudomonas solanacearum*. In: Lopes, C.A. & Espinosa, N. (Eds.) Memórias del taller sobre enfermedades bacterianas de la papa. Brasília, EMBRAPA/CNPq. 1994. pp.17-22.
- LOPES, C.A., NAZARENO, N.R.X. & FURIATTI, R.S. Prevalência mas não exclusividade, da raça 3 de *Pseudomonas solanacearum* em batata no Estado do Paraná. Fitopatologia Brasileira 18:312. 1993. (Resumo).
- LOPES, C.A., SANTOS, M., GOEPFERT JUNIOR, F. & NOGUEIRA, P. Condenação de campos de certificação de batata-semente pela murcha bacteriana no Brasil, safra 1986/1987. Horticultura Brasileira 8:14-16. 1990.
- MACIEL, J.L.N. Biovars e população de *Ralstonia solanacearum* em cultivares de batata. (Tese de Doutorado). Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1999.
- RAMOS, R.M., MORAES, J.L. & SOARES, M.H.G. Estudo da cadeia produtiva da batata no Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária/Secretaria da Ciência e Tecnologia do RS, 1998.
- RIO GRANDE DO SUL. Macrozoneamento Agroecológico e Econômico do Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Secretaria da Agricultura e Abastecimento-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/CNPq. 1994.
- SCHAAD, N.W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd ed. St Paul. American Phytopathological Society. 1988.
- SILVEIRA, J.R.P., MORAES, M.G. & DUARTE, V. Incidência de biovars 1 e 2 de *Ralstonia solanacearum* em lavouras de batata no Rio Grande do Sul. Fitopatologia Brasileira 25:331. 2000. (Resumo).
- YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., YANO, I., HOTTA, H. & NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an Alkaligenes species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiology and Immunology 39:897-904. 1995.