

EFICIÊNCIA DE ANTI-SOROS PRODUZIDOS PARA PECTOBACTÉRIAS CAUSADORAS DE PODRIDÃO MOLE EM BATATA

JOSÉ RICARDO PFEIFER SILVEIRA¹, LUIS ANTÔNIO SUITA DE CASTRO², OLINDA MARIA MARTINS³, MERY ELIZABETH OLIVEIRA COUTO⁴, VALMOR BARNI⁵

RESUMO - Anti-soros produzidos a partir de células inteiras e não tratadas de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Pca), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) e *P. chrysanthemi* (Pch), foram testados em plantas de batata com sintomas de podridão mole. As hastes de batata, quando comparadas com raízes e folhas, foram melhores para indexação sorológica de *Pectobacterium* spp., porém, somente amostras com sintomas apresentaram antígenos suficientes para a viabilização do teste de aglutinação em látex. De 66 plantas de batata com sintomas de podridão mole, coletadas a campo e indexadas sorologicamente, 51 reagiram com pelo menos um dos anti-soros. Dos isolados bacterianos obtidos a partir destas amostras, somente 23 não foram considerados típicos para o gênero *Pectobacterium* pelos testes bioquímicos e não reagiram sorologicamente. Dos 43 isolados de *Pectobacterium* spp., 26 foram considerados Pca e 17 como Pcc, pelos testes bioquímicos e fisiológicos. Porém, apenas 17 isolados reagiram com os anti-soros para *P. carotovorum* (Pca e Pcc) e, mesmo assim, nem todos corresponderam à caracterização prévia pelos testes bioquímicos. O baixo número de reações sorológicas com os isolados bacterianos indicaram haver uma seleção involuntária de estirpes para diferentes sorogrupos. Nenhum isolado reagiu com o anti-soro para Pch. Concluiu-se que o teste imunológico de aglutinação em látex se constitui em um processo auxiliar e preliminar para identificação de bactérias do gênero *Pectobacterium*, principalmente, quando associado aos testes bioquímicos e fisiológicos.

Palavras-chave: *Pectobacterium*, *carotovorum*, *atrosepticum*, *chrysanthemi*, diagnose, sorologia, batata, *Solanum tuberosum*

EFFICIENCY OF ANTISERA PRODUCED TO SOFT-ROTTING PECTOBACTERIA IN POTATO

ABSTRACT - Antisera produced against intact and untreated cells of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Pca), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) and *P. chrysanthemi* (Pch) were used to index several plants of potatoe that exhibited syntoms of blackleg disease. The stalk samples were better than the root and leave samples for the serological evaluation of *Pectobacterium* spp. However, only several samples with blackleg syntoms had enough antigens for the visualization in the latex agglutination test. Of 66 plants with blackleg syntoms, collected in the field and indexed by serological methods, only 23 were considered as not typical for *Pectobacterium* by biochemical tests and did not react positively in the serological tests. Twenty six out of 43 isolates of *Pectobacterium* spp. were considered as Pca and 17 as Pcc by the biochemical and physiological tests. However, only 17 isolates reacted with the antisera for *P. carotovorum* (Pca and Pcc) and, not all of them correspond to the previous biochemical characterization. The low number of positive serological reactions with the bacterial isolates indicate that has occurred an involuntary selection of strains for different serotypes. No one of the isolates react with the antisera against Pch. The results allow to conclude that the latex agglutination test can be used for the preliminary identification of bacteria of the genus *Pectobacterium*, specially when associated with biochemical and physiological tests.

Key words: *Pectobacterium*, *carotovorum*, *atrosepticum*, *chrysanthemi*, diagnosis, serology, potato, *Solanum tuberosum*

¹Engenheiro Agrônomo, Doutor Pesquisador da FEPAGRO/Laboratório de Fitopatologia. Rua Gonçalves Dias 570, Bairro Menino Deus, CEP 90130-060, Porto Alegre/RS. E-mail: pfeifer@fepagro.rs.gov.br. Autor para correspondência

²Engenheiro Agrônomo, MSc. Pesquisador da EMBRAPA/Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas/RS

³Engenheira Agrônoma, Convênio EMATER/RS - EMBRAPA/Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado

⁴Engenheira Agrônoma, Ph.D. Pesquisador da EMBRAPA/Centro Nacional de Recursos Genéticos, Brasília/DF

⁵Engenheiro Agrônomo, MSc. Pesquisador da FEPAGRO/Centro de Pesquisa de Agroindústria, Caxias do Sul/RS
Recebido para publicação em 01-01-2002

INTRODUÇÃO

Ao contrário dos métodos microbiológicos para detecção e identificação de pectobactérias, os métodos imunológicos são menos laboriosos e podem ser usados em larga escala. Testes sorológicos para detecção de *Pectobacterium* spp. têm sido realizados em hastes e tubérculos de batata provenientes de lavouras comerciais ou de estoques para semente (VRUGGINK e DE BOER, 1978; DE BOER, 1983; MAHER et al., 1986), em estudos sobre a ecologia (VRUGGINK e MAAGEESTERANUS, 1975; PHILLIPS e KELMAN, 1982; POWELSON e APPLE, 1984) e de taxonomia (DE BOER et al., 1979; DE BOER e McNAUGHTON, 1987).

DE BOER et al. (1979) produziram anti-soros a partir de células inteiras de *P. carotovorum* e estabeleceram dezoito sorogrupos. Os isolados de *P. c.* subsp. *carotovorum* foram agrupados em dezesseis sorogrupos e os isolados de *P. c.* subsp. *atrosepticum* nos dois sorogrupos restantes (I e XVIII). Foram observadas, também, reações de parcial identidade entre os sorogrupos, indicando que as pectobactérias compartilham antígenos comuns.

A utilidade da sorologia para identificação de pectobactérias em espécies e subespécies é limitada. Atualmente, a distribuição de *P. carotovorum* em sorogrupos estendeu-se de dezoito para mais de cinquenta (DUARTE e EL TASSA, 2003). A especificidade é conferida por componentes da parede celular, principalmente lipopolissacarídeos (antígeno O) (DE BOER e McNAUGHTON, 1987). Os anticorpos produzidos são altamente específicos. No entanto, a existência de muitos sorogrupos para *P. c.* subsp. *carotovorum* tornam a identificação desta subespécie impraticável (DE BOER e KELMAN, 2001). De modo oposto, dos nove sorogrupos conhecidos de *P. c.* subsp. *atrosepticum*, baseados em antígenos de superfície, o sorogrupo I representa mais de 90% dos isolados na maioria dos países onde foi testado, confirmando ser este grupo mais homogêneo (DUARTE e EL TASSA, 2003).

DICKEY et al. (1984) produziram nove anti-soros a partir de isolados de *E. chrysanthemi* distinguidos em quatro sorogrupos. De um total de 404 isolados de Pch obtidos de 42 hospedeiros diferentes, 78% reagiram com um ou mais dos nove anti-soros; enquanto que nenhum dos 103 isolados de outras espécies ou subespécies de *Pectobacterium* reagiram com qualquer dos nove anti-soros.

YAKRUS e SCHAAD (1979) enfatizaram a variabilidade das propriedades antigênicas dos isolados testados, devido a heterogenicidade ter sido comum entre isolados de um hospedeiro específico e entre isolados de diferentes hospedeiros. DE BOER et al. (1987) observaram também reações com isolados de *P. carotovorum* obtidos de diferentes hospedeiros, com anti-soros produzidos a partir de isolados de batata.

A distribuição sorológica de *Pectobacterium* spp. em sorogrupos tem facilitado o estudo ecológico destas bactérias. POWELSON e APPLE (1984) demonstraram em três, de um total de cinco experimentos, que os inóculos primários de Pcc em batata eram sorologicamente diferentes dos inóculos inicialmente presentes nos tubérculos semente e no solo, sugerindo que outras fontes de inóculo, tais como a água de irrigação, poderiam estar envolvidas.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a utilização de anti-soros produzidos a partir de células inteiras e não tratadas de pectobactérias, como um método rápido e adequado para diagnose de *Pectobacterium* spp. causadoras de podridão mole em batata, visando a sua aplicabilidade em estudos sobre a ecologia dessas bactérias e em programas de produção de batata de elevada sanidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Indexação sorológica de amostras de plantas de batata inoculadas com *Pectobacterium* spp. - Foram produzidos anti-soros a partir de células bacterianas inteiras e não tratadas de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* obtida de *Allium cepa*, proveniente da coleção de bactérias da Universidade Federal de Viçosa, *P. carotovorum* subsp.

atrosepticum obtida de *Solanum tuberosum* proveniente da coleção de bactérias da EMBRAPA/CPACT e *P. chrysanthemi* obtida de *Arracacia xanthorrhiza* proveniente da coleção de bactérias da EMBRAPA/CNPQ.

Plantas de batata foram inoculadas para que amostras de raízes, hastes e folhas fossem indexadas sorologicamente. Os isolados inoculados nas plantas foram os mesmos utilizados para imunização dos coelhos e produção dos anti-soros: Pcc, Pca e Pch. Os inóculos foram cultivados em meio 523, por 24 horas à 27 °C. As placas foram lavadas com solução salina (NaCl 0,85%) e a suspensão de células bacterianas diluída no padrão 62,5% T; 550 nm (6 a 7 x 10⁷ UFC/ml).

Para a obtenção de plantas-teste de batata, foram utilizados tubérculos pré-básicos da cultivar Baronesa. Os tubérculos foram plantados em vasos de plástico, contendo solo peneirado, adubado e esterilizado. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, à temperatura de 25 °C e umidade do solo próxima à capacidade de campo. Quando as plantas atingiram uma altura de 25 a 30 cm foram inoculadas com 0,1 ml de suspensão bacteriana na concentração de 6 a 7 x 10⁷ UFC/ml.

Com o auxílio de uma seringa hipodérmica, o inóculo foi introduzido nas hastes da planta, na região do colo. No tratamento testemunha injetou-se apenas a solução salina. O teste foi realizado com quatro repetições por isolado incluindo a testemunha e avaliadas em 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

A reação das plantas às bactérias foi caracterizada pelos sintomas manifestados como aparecimento de podridão mole, talo oco, escurecimento e tombamento da haste.

As amostras das diferentes partes das plantas, tais como folhas, segmentos de hastes com 15 a 20 cm, cortados 5 cm acima do local de inoculação e raízes, previamente lavadas, foram passadas em uma prensa de cilindros giratórios. Os extratos foram coletados em tubos de ensaio e testados contra o anti-soro específico, pelo teste de aglutinação em látex, sem diluição e diluídos em série (fator 10), de

1:1 a 1:10000 em tampão Tris-HCl 0,05 M; pH 8,0 mais 1% mercaptoetanol.

Indexação sorológica de amostras de plantas de batata provenientes de infecção natural por *Pectobacterium* spp. - Para avaliar a utilização dos anti-soros na diagnose de plantas de batata cultivadas a campo, coletou-se 66 plantas que apresentavam o sintoma de podridão mole, em lavouras de produção nos municípios de Pelotas, São Lourenço, Cristal e Morro Redondo. As plantas foram acondicionadas separadamente em sacos de plástico e armazenadas sob refrigeração durante 24 h após a coleta.

Os extratos foram obtidos das hastes das plantas, utilizando-se uma prensa de cilindros giratórios e indexados com os anti-soros Pcc, Pca e Pch, conforme o procedimento citado.

Identificação de isolados de *Pectobacterium* spp. através de testes bioquímicos e fisiológicos - Das 66 plantas com sintomas de podridão mole, utilizadas no experimento anterior, foram obtidos isolados para identificação através de testes bioquímicos e fisiológicos, assim como foram avaliados os isolados Pcc, Pca e Pch, utilizados para imunização dos coelhos.

Utilizou-se frutos de pimentão como meio parcialmente seletivo para a recuperação e isolamento indireto de *Pectobacterium* spp. (TAKATSU et al., 1981). Para obtenção e manutenção provisória de culturas puras foram empregados os meios agar-NA (SCHAAD, 1988) e 523 (KADO e HESKETT, 1970).

Colônias apresentando crescimento rápido, opacas, brancas, bordos irregulares, causadoras de podridão mole, anaeróbicas facultativas e Gram negativas foram consideradas como *Pectobacterium* spp. (SCHAAD, 1988; JABUONSKI et al., 1986a).

Os inóculos para os testes bioquímicos e fisiológicos (três repetições para cada isolado) foram preparados a partir de culturas com 24 a 48 h, cultivadas em meio 523, em temperatura de 27 °C. As suspensões de células bacterianas foram diluídas em água esterilizada e padronizadas na concentração 10⁸ UFC/ml (50% T; 550 nm).

Os principais testes realizados foram os de degradação de pectato (CVP) e crescimento em 37 °C, conforme TAKATSU (1983). Os testes de crescimento em meio anaeróbico, formação de fosfatase, produção de substâncias redutoras de sacarose e produção de ácidos a partir dos carboidratos: alfa-metil-glicosídeo, maltose, trealose e lactose, foram realizados conforme descrito por SCHAAD (1988).

Identificação sorológica de isolados de *Pectobacterium* spp.- Os isolados bacterianos obtidos a partir de colônias puras, anteriormente identificados através de testes bioquímicos e fisiológicos, foram testados sorologicamente contra os anti-soros Pcc, Pca e Pch. Para isso, os isolados foram cultivados em meio 523, por 24 h, a 27 °C, sendo as placas lavadas com solução salina (NaCl 0,85%) e as suspensões bacterianas padronizadas a 62,5% T; 550 nm, em espectrofotômetro (MICRONAL MD B382).

As suspensões bacterianas padronizadas foram testadas com os anti-soros para *Pectobacterium* spp., conforme procedimento descrito anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Indexação sorológica de amostras de plantas de batata inoculadas com *Pectobacterium* spp. - Aproximadamente 24 h após a inoculação, as plantas apresentaram murcha das folhas, que evoluiu de modo bastante acelerado, seguido de podridão úmida e escurecimento das hastes. No terceiro dia algumas hastes estavam comprometidas em quase toda a extensão, provavelmente devido às condições ideais para o desenvolvimento do patógeno o que, de acordo com JABUONSKI et al. (1986b), incluem alta umidade do solo, temperatura elevada, susceptibilidade do hospedeiro, sítio apropriado de inoculação e alta concentração de inóculo.

No primeiro dia de avaliação, 24 h após a inoculação, as hastes de nove plantas das doze inoculadas reagiram com os respectivos anti-soros, porém, raízes e folhas não apresentaram reações po-

sitivas (Tabela 1).

Nas plantas inoculadas com solução salina não se registrou qualquer reação com os anti-soros, nem apresentaram sintomas da enfermidade.

Nos dois dias subsequentes os sintomas foram mais evidentes para as plantas inoculadas com Pcc e Pca, sendo que, mesmo alguns pecíolos desenvolveram uma podridão úmida característica, e folhas e raízes revelaram reações sorológicas positivas (Tabela 1). Os anti-soros tratos diluídos até 1:100.

Tabela 1. Número de amostras positivas por teste imunológico de um total de quatro plantas de batata inoculadas com *Pectobacterium* spp.

ANTI-SORO/ INOCULO	LOCAL DA PLANTA	AVALIAÇÕES		
		1ª (24 h)	2ª (48 h)	3ª (72 h)
Pcc/Pcc ¹	Folha	0	3	3
	Haste	4	4	4
	Raiz	0	1	4
Pca/Pca	Folha	0	3	3
	Haste	3	4	4
	Raiz	0	2	4
Pch/Pch	Folha	0	0	0
	Haste	2	4	4
	Raiz	0	1	2

¹Pcc- *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; Pca - *P. c.* subsp. *atrosepticum*; Pch - *P. chrysanthemi*

Em plantas inoculadas com Pch poucas amostras de raízes apresentaram reações positivas, provavelmente devido a temperatura (25 °C) não favorecer desenvolvimento da espécie. Segundo PEROMBÉLON e KELMAN (1980), a faixa de temperatura ótima para crescimento de Pch oscila entre 34 e 37 °C, enquanto a de Pcc e Pca está entre 25 e 30 °C.

Somente amostras de locais necrosados das hastes, folhas e raízes das plantas inoculadas com *Pectobacterium* spp. reagiram positivamente no teste de aglutinação em látex. Este resultado está de acordo com os resultados dos trabalhos de VRUGGINK e MAASGESTERANUS (1975) e

VRUGGINK e DE BOER (1978), que avaliaram métodos para a obtenção de antígenos de *Pectobacterium* spp. em plantas e tubérculos de batata. Segundo os autores, o extrato das hastes e tubérculos com sintomas de podridão mole podem ser testados diretamente por sorologia quando obtidos das partes afetadas da planta, porém, nas infecções latentes é necessário aumentar-se a população bacteriana induzindo o aparecimento de sintomas. Deste modo, antes de testar tubérculos aparentemente saudáveis, deve-se induzir a manifestação da moléstia, colocando-os sob condições propícias tais como: umidade relativa e temperatura elevadas e baixo nível de oxigênio. DE BOER (1983) e MAHER et al. (1986) utilizaram diferentes meios de cultura, sólidos ou líquidos, como forma de isolamento e multiplicação de *Pectobacterium* spp., para posterior indexação sorológica.

Segundo SLACK e BALL (1990), a sensibilidade do teste de aglutinação em látex para bactérias, está na faixa de 107 UFC/ml, o que torna difícil a detecção do patógeno em amostras sem sintomas.

Indexação sorológica de amostras de plantas de batata provenientes de infecção natural por *Pectobacterium* spp. - Das 66 plantas indexadas sorologicamente com os anti-soros Pcc, Pca e Pch, 15 não reagiram. O número de plantas com reações positivas para Pca (49) foi bem superior ao número das que reagiram com Pcc (14) (Tabela 2), em concordância com PEROMBÉLON e KELMAN (1980). Para estes autores, Pca predomina em regiões temperadas e Pcc possui ampla distribuição geográfica, alcançando também as zonas temperadas.

DE BOER et al. (1979) trabalharam com 1001 isolados de *Pectobacterium carotovorum* agrupando 829 (83%) em 18 sorogrupos, onde apenas dois sorogrupos pertenciam à subespécie *atrosepticum* e o restante à subespécie *carotovorum*, indicando uma variabilidade muito maior para esta subespécie. Atualmente, a classificação sorológica de *E. carotovorum* estende-se para mais de 50 sorogrupos (DUARTE e EL TASSA, 2003).

PEROMBÉLON e KELMAN (1987) afir-

am que mais de uma espécie ou subespécie de *Pectobacterium* pode estar presente tanto em has-

Tabela 2 . Número de plantas de batata que reagiram sorologicamente de um total de 66 testadas para *Pectobacterium* spp.

ANTI-SOROS	PLANTAS
Pca ¹	37
Pcc	2
Pch	0
Pca e Pcc	11
Pca, Pcc e Pch	1

¹Pca - *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*; Pcc - *P.c.* subsp. *carotovorum*; Pch - *P. chrysanthemi*

tes aparentemente saudáveis quanto naquelas que apresentam os sintomas da moléstia. Deve-se considerar, também, o relacionamento sorológico entre as subespécies *carotovorum* e *atrosepticum* mostrado por VRUGGINK e MAASGEESTERANUS (1975) e DE BOER et al. (1979), em que isolados bioquimicamente diferentes mostraram-se sorologicamente idênticos.

Os lipopolissacarídeos (LPS), que constituem os antígenos O, obtidos de Enterobacteriaceae são os mais úteis para agrupamentos sorológicos, tendo-se extraído LPS de diversas pectobactérias. Os antígenos O são constituídos por vários fatores O, comuns para mais de um serogrupo, como mostrado pelas reações de parcial identidade (DE BOER et al., 1979).

No presente trabalho, o anti-soro para Pch não reagiu com o extrato de nenhuma das plantas amostradas, concordando com PEROMBÉLON e KELMAN (1980), que afirmam ser *E. chrysanthemi* restrita a regiões mais quentes. Quanto a especificidade do anti-soro para Pch, DICKEY et al. (1984) produziram nove anti-soros para *Pectobacterium chrysanthemi* e distinguiram quatro sorogrupos. De um total de 103 isolados de *P.*

carotovorum subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *betavasculatorum*, *P. cypripedii*, *Erwinia amylovora* e *E. rhapontici*, nenhum reagiu com qualquer dos anti-soros, demonstrando especificidade para a espécie.

Identificação de isolados de *Pectobacterium* spp. Através de testes bioquímicos e fisiológicos - Para a identificação de espécies e subespécies de *Pectobacterium*, foram utilizados alguns testes bioquímicos e fisiológicos relacionados por JABUONSKI et al. (1986a) e SCHAAD (1988) (Tabela 3).

Dos isolados bacterianos obtidos de 66 plantas com sintomas de podridão mole, 23 não foram fermentativos para os testes de desenvolvimento anaeróbico e/ou não apresentaram a depressão característica no meio Cristal Violeta Pectato (CVP), não sendo consideradas, portanto, típicos do gênero *Pectobacterium*.

Foram considerados 26 isolados como Pca por apresentarem resultados negativos para crescimento rápido a 37 °C e formação de fosfatase e resultados positivos para produção de ácidos a partir de alfa-metil-glucosídeo e/ou produção de substâncias redutoras de sacarose. Dezesete isolados foram considerados como Pcc por apresentarem resultados negativos em todos os testes citados para Pca.

Os isolados Pca, Pcc e Pch utilizados para imunização dos coelhos corresponderam a sua identificação prévia, sendo que o isolado de Pch resultou positivo para os testes de crescimento rápido a 37 °C e formação de fosfatase e negativo para os testes de produção de substâncias redutoras de sacarose e produção de ácidos a partir de alfa-metil-glucosídeo.

Nos resultados obtidos com 43 isolados considerados típicos do gênero *Pectobacterium*, todos puderam ser classificados. De acordo com JABUONSKI et al. (1986a), as formas intermediárias e não identificáveis de *Pectobacterium* são essencialmente reportadas e, dentro do esquema vigente, são necessários poucos testes bioquímicos e fisiológicos para a classificação de *Pectobacterium* spp.

ológicos para a classificação de *Pectobacterium* spp.

O número de isolados da subespécie *carotovorum* (17) foi quase tão expressivo quanto o da subespécie *atrosepticum* (26). JABUONSKI et al. (1986a) testaram 22 isolados de *Pectobacterium* spp. em batata, no Estado do Rio Grande do Sul, identificando 18 da subespécie *atrosepticum* e quatro que não puderam ser classificados.

O teste de crescimento rápido a 37 °C em menos de 48 h diferencia Pch, pois o crescimento ótimo de Pca e Pcc dá-se entre 25 e 30 °C (TAKATSU, 1983).

O teste de degradação de pectato (CVP) determina a habilidade de *Pectobacterium* spp. em degradar substâncias pécticas (DE BOER e KELMAN, 1975; MAHER et al., 1986) e se evidencia por uma depressão característica no meio CVP. Nove isolados que foram positivos no teste OF, não degradaram pectato e, portanto, não foram considerados típicos do gênero *Pectobacterium*.

A produção de ácidos a partir de lactose, maltose e trealose não são úteis para a caracterização de *Pectobacterium* spp., segundo JABUONSKI et al. (1986a) e, no presente trabalho, apenas dois isolados de Pca apresentaram os resultados positivos nos testes com maltose. A produção de ácidos a partir de alfa-metil-glucosídeo e a produção de substâncias redutoras a partir de sacarose são os mais importantes para a diferenciação de Pca e Pcc, sendo que apenas um isolado de Pca não foi positivo para o teste de produção de substâncias redutoras a partir de sacarose.

Identificação sorológica de isolados de *Pectobacterium* spp. - Dos 43 isolados de *Pectobacterium* spp. identificados bioquimicamente, somente 17 apresentaram reações positivas com os anti-soros. Nenhum isolado apresentou reações cruzadas com os demais anti-soros.

Quando se testou o extrato das plantas (Tabela 2), 51 amostras reagiram com pelo menos um dos anti-soros. No entanto, dos isolados obtidos das 66 plantas com sintomas de podridão mole, apenas 17 reagiram sorologicamente com somente um dos anti-

Tabela 3. Reações apresentadas nos testes bioquímicos e fisiológicos por isolados bacterianos provenientes de plantas de batata com sintomas de podridão mole.

TESTES ¹	REAÇÕES	
	POSITIVAS	NEGATIVAS
Desenvolvimento anaeróbico (OF)	52	14
Degradação de pectato (CVP)	43	23
Gram	0	52
Crescimento à 37 °C	0	52
Formação de fosfatase	0	52
Produção de substâncias redutoras de sacarose	25	27
Produção de ácidos a partir de:		
Alfa-metil-glucosídeo	27	25
Lactose	52	0
Trealose	52	0
Maltose	11	41

¹Os testes OF e CVP foram realizados para 66 isolados. Os demais testes, apenas para os 52 isolados positivos para OF.

soros, sendo 11 Pca e 6 Pcc. Este baixo número de reações pode ser explicado por uma seleção involuntária durante os processos de isolamento, pois não apenas diferentes espécies ou subespécies de *Pectobacterium* podem estar presentes em hastes com sintomas de canela preta, conforme PEROMBÉLON e KELMAN (1987), mas também, estirpes de diferentes sorogrupos.

Os 23 isolados não identificados bioquimicamente como pertencentes ao gênero *Pectobacterium* não reagiram nos testes sorológicos. Estes resultados sugerem especificidade dos anti-soros produzidos.

De 11 isolados identificados sorologicamente como Pca, cinco haviam sido caracterizados bioquimicamente como Pcc, e de seis isolados identificados sorologicamente como Pcc, quatro haviam sido caracterizados bioquimicamente como Pca. Estes resultados confirmam o relacionamento sorológico entre as subespécies *carotovorum* e *atrosepticum*, mostrados por VRUGGINK e MAASGESTEERANUS (1975) e DE BOER et al. (1979). Os antígenos O, componentes dos LPS, podem ser completamente independentes das características bioquímicas das bactérias (DE BOER et al., 1979).

Com base no relacionamento sorológico entre as subespécies *atrosepticum* e *carotovorum*, DE BOER et al. (1979) estabeleceram 18 sorogrupos designados em seqüência numérica romana, acomodando deste modo, estirpes consideradas bioquimicamente diferentes, porém, sorologicamente idênticas, tanto quanto isolados considerados intermediários bioquimicamente.

Segundo SCHAAD (1979), anti-soros produzidos a partir de células bacterianas inteiras e não tratadas apresentam baixa especificidade em relação aos produzidos a partir de células tratadas pelo calor ou fixadas com gluteraldeído. Já, DE BOER et al. (1979) produziram anti-soros para *P. carotovorum* a partir de células não tratadas e tratadas com gluteraldeído, pelo calor e pelos dois simultaneamente, mas não relacionaram qualquer diferença de especificidade nos anti-soros.

Os 26 isolados caracterizados bioquimicamente como pertencentes à *P. carotovorum* e que não reagiram sorologicamente poderiam pertencer a outros sorogrupos, semelhantes aos descritos por DE BOER et al. (1979) e DICKEY et al. (1984).

CONCLUSÕES

Seguindo-se a metodologia utilizada para produção de anti-soro para Pca, Pcc e Pch, o teste de aglutinação em látex pode ser realizado com diluições nas proporções de 1:1 e 1:10 do extrato de plantas, levando-se em consideração que amostras de hastes com sintomas da enfermidade contém antígenos de *Pectobacterium* spp. em quantidade suficiente para a viabilização do teste.

Existe inter-relacionamento sorológico entre bactérias do gênero *Pectobacterium*, em nível de subespécie, em plantas de batata cultivadas nos municípios de Pelotas, São Lourenço, Cristal e Morro Redondo.

O processo de isolamento e multiplicação de bactérias do gênero *Pectobacterium* para obtenção de colônias puras sugere haver uma seleção involuntária de estirpes de diferentes sorogrupos, podendo ocasionar variações nos resultados do teste de aglutinação em látex.

O teste imunológico de aglutinação em látex constitui-se em um processo auxiliar e preliminar na identificação de Pca, Pcc e Pch, principalmente quando associado aos testes bioquímicos e fisiológicos, sendo viável a sua utilização em estudos ecológicos de pectobactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE BOER, S. Frequency and distribution of *Erwinia carotovora* serogroups associated with potato in the Pemberton Valley of British Columbia. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.5, p.279-284, 1983.

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**. St. Paul: APS, 2001. p.56-72.

DE BOER, S.H.; KELMAN, A. Evaluation of procedures for detection of pectolytic *Erwinia* spp. on potato tubers. **American Potato Journal**, Orono, v.52, p.117-123, 1975.

DE BOER, S.H.; McNAUGHTON, M.E. Monoclonal antibodies to lipopolysaccharide of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* serogroup I. **Phytopathology**, St. Paul, v.77, p.828-832, 1987.

DE BOER, S.H.; COPEMAN, R.; VRUGGINK, H. Serogroups of *Erwinia carotovora* potato strains determined with diffusible somatic antigens. **Phytopathology**, St. Paul, v.69, n.4, p.316-319, 1979.

DE BOER, S.; VERDONCK, L.; VRUGGINK, H.; HARJU, P. BANGS, H.; DE LEY, J. Serological and biochemical variation among potato strains of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and their taxonomic relationship to other *E. carotovora* strains. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.63, p.487-495, 1987.

DICKEY, R.; ROBERT S.; ZUMOFF, C.H.; UYEMOTO, J.K. *Erwinia chrysanthemi*: serological relationship among strains from several hosts. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, n.11, p. 1388-1394, 1984.

DUARTE, V.; EL TASSA, S.O.M. Taxonomia do gênero *Pectobacterium*. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICCININI, E.C. (Eds.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.11, p.1-37, 2003.

JABUONSKI, R.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F.J. Levantamento e identificação de espécies de *Erwinia* de diferentes plantas hospedeiras e regiões do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11, p.185-195, 1986a.

JABUONSKI, R.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F. Avaliação da patogenicidade de bactérias do gênero *Erwinia* isoladas de batatinha, tomateiro e de outras plantas hospedeiras. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.11, p.587-597, 1986b.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v.60, p.969-976, 1970.

MAHER, E. A.; DE BOER, S.H.; KELMAN, A. Serogroups of *Erwinia carotovora* involved in systemic infection of potato plants and infestation of progeny tubers. **American Potato Journal**, Orono, v.63, p.1-12, 1986.

PEROMBÉLON, M.; KELMAN, A. Blackleg and other potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: proposal for revision of terminology. **Plant Disease**, St. Paul, v.71, n.3, p.283-285, 1987.

PEROMBÉLON, M.; KELMAN, A. Ecology of the soft rot *Erwinia*. **Anual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.18, p.361-387, 1980.

PHILLIPS, J.A.; KELMAN, A. Direct fluorescent antibody stain procedure applied to insect transmission of *Erwinia carotovora*. **Phytopathology**, St. Paul, v.72, n.7, p.898-901, 1982.

POWELSON, M.; APPLE, J. Soil and seed tubers as sources of inoculum of *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* for stem soft rot of potatoes. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, p.429-432, 1984.

SCHAAD, N.W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: APS, 1988. 164 p.

- SCHAAD, N.W. Serological identification of plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.17, p.123-147, 1979.
- SLACK, S.A.; BALL, E.M. Látex agglutination for viruses and bacteria. In: HAMPTON, R.; BALL, E.; DE BOER, S. **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens**. St. Paul: APS, 1990, p.307-312.
- TAKATSU, A. *Erwinias* do grupo *carotovora* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.8, p.535-536, 1983.
- TAKATSU, A.; MELLO, S.; GARCIA, E.J. Fruto do pimentão como meio parcialmente seletivo para isolamento de *Erwinia carotovora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, p.550-551, 1981.
- VRUGGINK, H.; DE BOER, S.H. Detection of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* in potato tubers with immunofluorescence following induction of decay. **Potato Research**, Wagenigen, v.21, p.225-229, 1978.
- VRUGGINK, H.; MAAGEESTERANUS, H. Serological recognition of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*, the casual organism of potato blackleg. **Potato Research**, Wageningen, v.18, p.546-555, 1975.
- YAKRUS, M.; SCHAAD, N.W. Serological relationships among strains of *Erwinia chrysanthemi*. **Phytopathology**, St. Paul, v.69, p.517-522, 1979.