

**INDIRA DEL CARMEN MOLO ALVARADO**

**VARIABILIDADE E ECOLOGIA DE *Pectobacterium carotovorum*  
SUBSP. *carotovorum*, AGENTE DA PODRIDÃO-MOLE EM  
COUVE-CHINESA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

**RECIFE-PE**

**JULHO, 2006**

Ficha catalográfica  
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

M728v Molo Alvarado, Indira del Carmen  
Variabilidade e ecologia de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, agente da podridão mole em couve chinesa / Indira del Carmen Molo Alvarado. -- 2006.  
100 f. : il.

Orientadora : Rosa de Lima Ramos Mariano  
Tese (Doutorado em Fitopatologia) -- Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Agronomia.  
Inclui bibliografia.

CDD 632.32

1. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*
  2. *Brassica pekinensis*
  3. Componentes epidemiológicos
  4. Sensibilidade a antibióticos
  5. Marcador molecular
  6. Podridão-mole
  7. Solos supressivos
  8. Solos conducivos
  9. Ecologia
  10. Fitopatologia
  11. Fitobacteriologia
- I . Mariano, Rosa de Lima Ramos  
II . Título

**VARIABILIDADE E ECOLOGIA DE *Pectobacterium carotovorum*  
SUBSP. *carotovorum*, AGENTE DA PODRIDÃO-MOLE EM  
COUVE-CHINESA**

**INDIRA DEL CARMEN MOLO ALVARADO**

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO**

Prof<sup>ª</sup>. Ph.D. Rosa de Lima Ramos Mariano – Orientadora

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff – Co-orientador

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Elineide Barbosa da Silveira – Co-orientadora

**RECIFE-PE**

**JULHO, 2006**

**VARIABILIDADE E ECOLOGIA DE *Pectobacterium carotovorum*  
SUBSP. *carotovorum*, AGENTE DA PODRIDÃO-MOLE EM  
COUVE-CHINESA**

**INDIRA DEL CARMEN MOLO ALVARADO**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora

**ORIENTADORA:**

---

Profa. Ph.D. Rosa de Lima Ramos Mariano

**EXAMINADORES:**

---

Profa. Dra. Uided Maaze Tiburcio Cavalcante (UFPE)

---

Profa. Dra. Elvira Maria Regis Pedrosa (UFRPE)

---

Profa. Dra. Andréa Maria André Gomes (FMN)

---

Prof. Dr. Rildo Sartori Barbosa Coelho (UFRPE)

---

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

**RECIFE-PE  
JULHO, 2006**

A **Deus** Todo poderoso e meu **Anjo** da guarda pela força que me dão cada dia para lutar por meus objetivos.

## **AGRADEÇO**

A meus pais **Diana** e **Julio**, a meus irmãos **Irania**, **Yahaira** e **Julito**. A minha querida, **Alba**, meus sobrinhos, **Julio César**, **Nancy Gabriela** e **Jonathan Adi Facundo**, meus queridos avôs, **Gliseria** e **Alberto** e a todos meus **grandes amigos**.

## **OFEREÇO**

Ao **Dr. Orencio Fernández** (*in memoriam*), meu Pai e Mestre na Fitopatologia.

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e a meu anjo da guarda, pela força que me dão cada dia para alcançar meus objetivos;

A minha família pela compreensão e pelo estímulo para persistir na realização desta nova meta alcançada;

Ao governo do Brasil, especialmente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela oportunidade de realizar o Curso de Doutorado em Fitopatologia;

À professora Rosa de Lima Ramos Mariano, pela amizade, apoio, paciência e ensinamentos e, sobretudo pela orientação;

Ao professor Sami Jorge Michereff, pela amizade, paciência, atenção e orientação dedicada para a culminação dos trabalhos;

À Dra. Alice Maria Quezado-Duval, pela amizade e toda a ajuda oferecida em Brasília e por suas orientações na parte molecular;

Ao Dr. Gustavo Mora Aguilera pelos incentivos e pela amizade oferecida apesar da distância;

Ao Dr. Rildo S. B. Coelho, Dr. Eduardo Mizubuti, Dra. Elineide Barbosa da Silveira, Dra. Elvira Maria Regis Pedrosa, Dr. Delson Laranjeira, Dra. Luciane Vilela Resende e ao Dr. Clístenes Williams A. Nascimento pelas suas contribuições;

À Coordenação e professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelos ensinamentos recebidos e pela amizade;

A toda a turma do Laboratório de Fitobacteriologia, especialmente a Myrzânia de Lira Guerra, Leandro Marinho de Abreu, Adriano M. F. Silva, Enildo Cardoso, Juliana Pereira da Silva e Kedma Maria Silva Pinto pelo apoio e a amizade em toda minha estada no Laboratório;

À minha querida Ivanise de Oliveira Viana, laboratorista da Fitobacteriologia, pela ajuda, amizade e pelo carinho demonstrado;

A toda a turma do Laboratório de Melhoramento Genético de Plantas, pela ajuda na parte molecular e pelos momentos de convívio.

A minhas queridas amigas, Marissônia Noronha, Íris Lettiere, Priscila Moreira, Maria Xavier Filha, Neilza Castro, Lílian Guimarães, Sandra Maranhão e Andréa Chaves pelo apoio e amizade durante este tempo de estudos e para todos meus amigos distantes que sempre estão em meus pensamentos e no meu coração;

E, finalmente, aos funcionários da Área de Fitossanidade e trabalhadores, especialmente Darci Martins e Luiz Manuel da Silva e a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	V
<b>SUMARIO</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>Capítulo I - Introdução Geral</b> .....	14
A couve-chinesa.....	14
Podridão-mole.....	15
Aspectos taxonômicos do gênero <i>Pectobacterium</i> .....	20
Identificação de isolados de <i>Pectobacterium</i> .....	24
Variabilidade de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> .....	29
Solos supressivos a <i>Pectobacterium carotovorum</i> .....	32
Referências bibliográficas.....	36
<b>Capítulo II. Caracterização e Variabilidade de Bactérias Causadoras de Podridão-mole em Couve-chinesa</b> .....	54
Resumo.....	55
Abstract.....	56
Introdução.....	56
Material e Métodos.....	59
Obtenção e caracterização dos isolados de bactérias causadoras de podridão-mole em couve-chinesa.....	59
Variabilidade de isolados de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> causadores de podridão-mole em couve-chinesa.....	61
Componentes epidemiológicos.....	61
Sensibilidade a antibióticos.....	63
Perfis genômicos obtidos por Rep-PCR.....	63
Agrupamento dos isolados e correlação entre variáveis.....	64
Resultados e Discussão.....	64
Caracterização dos isolados de bactérias causadoras de podridão-mole em couve-chinesa.....	64



Variabilidade de isolados de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> causadores de podridão-mole em couve-chinesa.....	65
Agradecimentos.....	69
Referências bibliográficas.....	69
<b>Capítulo III. Caracterização de solos de Pernambuco quanto à supressividade à <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>.....</b>	<b>79</b>
Resumo.....	79
Abstract.....	80
Introdução.....	81
Material e Métodos.....	83
Coletas das amostras de solo.....	83
Análises físicas, químicas e microbiológicas dos solos.....	83
Influência dos solos na população de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> .....	84
Caracterização da supressividade ou condutividade dos solos a <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> .....	86
Resultados e Discussão.....	86
Agradecimentos.....	92
Referências bibliográficas.....	92
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>99</b>

## RESUMO

A produção de couve-chinesa (*Brassica pekinensis*) pode ser limitada pela ocorrência da podridão-mole causada por bactérias pectinolíticas. No presente estudo, 39 isolados de bactérias causadoras de podridão-mole em couve-chinesa, oriundos de áreas de plantio de Camocim de São Félix, em Pernambuco, foram identificados e caracterizados como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) por testes bioquímicos confirmados por PCR. A variabilidade desses isolados foi avaliada com base em componentes epidemiológicos da doença, sensibilidade a antibióticos e marcadores moleculares. Os isolados foram distribuídos em grupos de similaridade, considerando-se 50% da distância total de ligação pelo método UPGMA. Com base nos componentes epidemiológicos período de incubação (PI), severidade inicial (SEVI), severidade final (SEVF) e área abaixo da curva de progresso da doença, os 39 isolados foram distribuídos em seis grupos de similaridade. Entre os componentes epidemiológicos, foi constatada correlação significativa ( $P \leq 0,05$ ) somente de PI com SEVI ( $r = -0,57$ ). Baseado na sensibilidade aos 12 antibióticos, os isolados de Pcc foram distribuídos em 14 grupos. Foram constatadas correlações significativas entre sensibilidade a gentamicina e PI ( $r = -0,41$ ), bem como entre sensibilidade a clindamicina e SEVF ( $r = -0,45$ ). A utilização dos marcadores moleculares REP, ERIC e BOX no Rep-PCR revelou grande variabilidade genética entre os 39 isolados, pois foram formados 32 grupos de similaridade. Não foram constatadas correlações significativas entre as distâncias de ligação registradas pelos marcadores moleculares e os componentes epidemiológicos da doença. Em outro estudo foi avaliada a influência dos solos na população de Pcc, utilizando-se mutante

resistente a rifampicina ( $Pcc127^{Rif}$ ). A taxa de extinção relativa da população (TEP) variou de 0,0547 a 0,6327 log (UFC)/dia. Seis solos mostraram-se supressivos a  $Pcc127^{Rif}$  enquanto cinco evidenciaram condutividade. Os grupos de solos baseados na TEP de  $Pcc127^{Rif}$  não apresentaram relação com os municípios de coleta, tipos de coberturas do solo na época da coleta ou classes texturais dos solos. Considerando-se todos os solos, não foram constatadas correlações significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre a TEP de  $Pcc127^{Rif}$  e as características químicas, físicas e microbiológicas dos solos. Nos seis solos mais supressivos, a TEP de  $Pcc127^{Rif}$  se correlacionou significativamente com a densidade aparente do solo ( $r = 0,76$ ), populações de bactérias totais ( $r = 0,82$ ) e *Bacillus* spp. ( $r = 0,80$ ). A população de *Bacillus* spp. se correlacionou com a densidade aparente, mas não com a população de bactérias totais. Nos cinco solos mais condutivos houve correlação entre a TEP de  $Pcc127^{Rif}$  e a população de *Bacillus* spp. ( $r = -0,86$ ). A elevada variabilidade verificada entre os isolados de Pcc aponta para a necessidade de maior atenção em estudos de identificação, detecção, epidemiologia e controle da podridão-mole em Pernambuco. A alta correlação observada entre a supressividade de alguns solos a Pcc e as populações de bactérias totais e *Bacillus* spp. é relevante para implementação efetiva de estratégias de manejo da doença.

## ABSTRACT

Yield of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*) may be limited by the occurrence of soft rot caused by pectinolytic bacteria. In this study 39 isolates of bacteria causing soft rot in Chinese cabbage obtained from planting areas of Camocim de São Félix, in Pernambuco State, were identified and characterized as *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) based upon biochemical tests confirmed by PCR. The variability of these isolates was evaluated through disease epidemiological components, sensitivity to antibiotics and molecular markers. The isolates were distributed in similarity groups considering 50% of the total linkage distance by the UPGMA method. Based on epidemiological components incubation period (PI), initial severity (SEVI), final severity (SEVF) and area under the disease curve progress the 39 isolates were distributed in six similarity groups. Among the epidemiological components significant Pierson correlation ( $P \leq 0.05$ ) was only found for PI and SEVI ( $r = -0.57$ ). Based on sensitivity to 12 antibiotics, the Pcc were distributed in 14 groups. There were significant correlations between sensitivity to gentamicin and PI ( $r = -0.41$ ), as well as between sensitivity to clindamicin and SEVF ( $r = -0.45$ ). The molecular markers REP, ERIC and BOX used in Rep-PCR revealed high genetic variability among the 39 isolates since 32 similarity groups were formed. No significant correlations were found among the linkage distances registered by molecular markers and the disease epidemiological components. In a second study it was evaluated soil influence on Pcc rifampicin resistant mutant (Pcc127<sup>Rif</sup>). The extinction rate of population was calculated (TEP) and ranged from 0.0547 to 0.6327 log (CFU)/d. Six soils showed suppressiveness to Pcc127<sup>Rif</sup> while five presented conductivity. The soil groups

based on the TEP of Pcc127<sup>Rif</sup> did not correlate with municipalities, types of vegetation cover at the sampling time or soil textural classes. Considering all soils there were no significant correlations ( $P \leq 0,05$ ) among TEP of Pcc127<sup>Rif</sup> and chemical, physical and microbiological characteristics of soils. Considering the six more suppressive soils the TEP of Pcc127<sup>Rif</sup> significantly correlated with soil apparent density ( $r = 0.76$ ), total bacterium population ( $r = 0.82$ ) and *Bacillus* spp. ( $r = 0.80$ ). The *Bacillus* spp. population correlated with apparent density, but not with total bacterium population. Considering the five more conducive soils there was correlation between TEP of Pcc127<sup>Rif</sup> and *Bacillus* spp. population ( $r = -0.86$ ). The high variability among Pcc isolates points out to the necessity of great attention in studies covering identification, detection, epidemiology and control of soft rot in Pernambuco. The elevated correlation between suppressiveness of some soils to *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* and total bacteria and *Bacillus* spp. populations is relevant to effective implementation of soft rot management strategies.

# **Capítulo I**

---

## **Introdução Geral**

## INTRODUÇÃO GERAL

### A Couve-chinesa

A família Brassicaceae compreende um grande número de culturas, incluindo diversas espécies botânicas de importância econômica, amplamente cultivadas em todos os continentes. No Brasil, destacam-se: brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica* L.), couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala* D.C.), couve-chinesa (*Brassica pekinensis* L.), couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) e repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), entre outras (SOUZA, 1980; FILGUEIRA, 2000).

A couve-chinesa é originária do Extremo Oriente. Cultivada na China há mais de 1.500 anos, foi introduzida no Japão no final do século XIX (MAROTO-BORREGO, 1995). É uma planta anual, cujas folhas apresentam uma nervura central destacada, de coloração branca, razão pela qual é também chamada de “acelga”, embora a verdadeira acelga seja denominada *Beta vulgaris* L. var. *cycla* L. As folhas da couve-chinesa se fecham formando uma cabeça compacta, globular-alongada. A maioria das cultivares produz melhor sob temperaturas amenas, ou seja, quando semeadas no outono-inverno. Entretanto, híbridos como ‘Shonan’ e ‘Komachi’ estão sendo introduzidos no Brasil, por apresentarem maior tolerância ao calor (FILGUEIRA, 2000). De acordo com Maroto-Borrego (1995), a couve-chinesa também é sensível a fotoperíodos longos e a temperaturas inferiores a 12 °C, que induzem a floração prematura. É semeada em bandeja ou em sementeira e as mudas são posteriormente transplantadas para o local definitivo, com espaçamento de 70 × 30 cm. As cabeças são colhidas 60-70 dias após a

semeadura e embaladas em sacos de malhas plásticas (FILGUEIRA, 2000) para o transporte até os centros de comercialização.

Segundo a CEASA-PE (2005), os municípios maiores produtores de couve-chinesa em Pernambuco são Camocim de São Félix (45%) e Vitória de Santo Antão (43%), seguidos em menor escala (12%) por Chã Grande, Garanhuns, Bonito, São Joaquim do Monte e Gravatá. No período de 2001a 2005, a produção média anual em Pernambuco foi de 75,6 toneladas.

A couve-chinesa similarmente a outras culturas olerícolas, pode ser afetada por diversas fitobacterioses, destacando-se a podridão-mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al. como a mais destrutiva e importante doença em muitas áreas produtoras do Brasil e do mundo (KIKUMOTO, 2000; KYEREMEH et al., 2000; MALAVOLTA JR et al., 1998; MESSIAEN et al., 1995; MEW et al., 1976; REN et al., 2001; SEO; TAKANAMI, 2002; TOGASHI et al., 2001).

## **Podridão-mole**

A podridão-mole ocorre em plantas no campo ou em pós-colheita, tanto no armazenamento como no transporte (PÉROMBELON; KELMAN, 1980). Embora algumas bactérias, incluindo saprofitas e fitopatogênicas, possuam a habilidade de produzir enzimas que degradam a parede celular, poucas podem estar associadas à podridão de tecidos vivos de plantas (PÉROMBELON; SALMOND, 1995). Dentre as fitobactérias capazes de causar doenças em ampla gama de hospedeiros, as *pectobactérias* são as mais importantes como patógenos primários de plantas em cultivo



e produtos em pós-colheita (PÉROMBELON; KELMAN, 1980). As perdas econômicas causadas pelas pectobactérias podem ser muito grandes, variando com o valor da cultura, severidade do ataque, condições ambientais, subespécies envolvidas, condições de cultivo, armazenamento, transporte e comercialização dos produtos (JABUONSKY et al., 1988; PÉROMBELON; KELMAN, 1980).

As duas espécies de *Pectobacterium* economicamente mais importantes, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. atrosepticum* causam podridão-mole em vários hospedeiros, entre os quais, alface (*Lactuca sativa*), batata (*Solanum tuberosum*), beterraba (*Beta vulgaris* var. *conditiva*), cenoura (*Daucus carota*), couve-chinesa (*Brassica pekinensis* L.), pimentão (*Capsicum annuum*), rabanete (*Brassica rapa* var. *rapa*), repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) e tomate (*Lycopersicon esculentum*) (PÉROMBELON, 2002; SEO; TAKANAMI, 2002; TOTH et al., 2003) em diferentes regiões (PÉROMBELON; KELMAN, 1980; PÉROMBELON, 2002; TOTH et al., 2003). As bactérias que causam podridão-mole em couve-chinesa pertencem à espécie *Pectobacterium carotovorum* (Jones) Hauben et al. com predominância da subespécie *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al. (Mew et al., 1976; Ren et al., 2001), apesar de *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (Gallois et al.) Hauben et al. (Seo et al., 2004) e *P. atrosepticum* (Van Hall) Hauben et al. (De Boer et al., 1987) já terem sido relatadas nesta hospedeira.

A principal característica das bactérias pectinolíticas é a produção de uma grande quantidade de enzimas (KOTOUJANSKY, 1987; PÉROMBELON; KELMAN, 1980; PÉROMBELON, 2002), entre as quais, em ordem de importância, as pectinases, celulases e proteases que causam o colapso da parede celular vegetal liberando

nutrientes para o crescimento da bactéria (BARRAS et al., 1994; PÉROMBELON, 2002).

As enzimas pectinolíticas ou pectinases podem ser do tipo, pectato liase, pectina liase, metilpoligalacturonase, poligalacturonase e pectina metil esterase (HAYWARD; MARIANO, 1997; PÉROMBELON, 2002; PÉROMBELON; KELMAN, 1980; RIED; COLLMMER, 1986; SIGEE, 1993; TOTH et al., 2003; WHITEHEAD et al., 2002). As enzimas pectinolíticas podem também ser divididas em dois tipos: exoenzimas, que degradam as moléculas de pectina e endoenzimas, que quebram a pectina de forma aleatória na região interna (SIGEE, 1993). Deve ser destacado que as enzimas pectinolíticas são os mais importantes fatores de patogenicidade e virulência de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (KÖIV; MÃE, 2001). Estão diretamente envolvidas na digestão da pectina presente na lamela média da parede celular, causando colapso e maceração do tecido (BARRAS et al., 1994; DE BOER, 2003; SIGEE, 1993).

Celulases, pectato liases, pectina metil esterase e poligalacturonase produzidas pela bactéria são secretadas através do sistema tipo II (SANDKVIST, 2001), um processo de duas etapas que inclui um estágio periplásmico intermediário (DE BOER, 2003). As proteases são secretadas pelo sistema tipo I, ou seja, diretamente através do envelope celular sem estágio periplásmico intermediário (DE BOER, 2003). Estas exoenzimas estão relacionadas ao processo dependente da densidade da célula, conhecido como “quorum sensing” (BYERS et al., 2002; WHITEHEAD et al., 2002). Neste processo, a bactéria produz e libera um pequeno sinal molecular difusível, chamado de autoindutor, cuja produção é incrementada quando a bactéria alcança o nível crítico populacional (WHITEHEAD et al., 2002). Em bactérias Gram-negativas, o autoindutor é uma acil-homoserina lactona, e, especificamente em *Pectobacterium*, o

autoindutor é a *N*-(3-oxohexanoil) homoserina lactona (MÃE et al., 2001; MILLER; BASSLER, 2001). Segundo Byers et al. (2002), *Pectobacterium* possui duas fases de “quorum sensing”: uma passiva ou pré-quorum sensing, durante a qual a bactéria se multiplica, mas não macera o tecido da planta e uma fase agressiva ou de pós-quorum sensing que é caracterizada pela produção das exoenzimas e outros produtos, tais como o antibiótico carbapenem. Mutantes de *Pectobacterium* que não produzem o autoindutor não causam doença (JONES et al., 1993).

Outro fator importante na patogênese de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* é a motilidade que parece ter um papel fundamental para o sucesso da invasão e da infecção em plantas (PÉROMBELON, 2002). Hossain et al. (2005) demonstraram que mutantes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* sem motilidade apresentavam redução na produção de enzimas e podridão-mole em couve-chinesa.

As pectobactérias penetram nos tecidos da planta através de ferimentos e causam encharcamento ou anasarca (MARINGONI, 1997). Essas bactérias dependem em grande parte da temperatura e concentração de oxigênio, para iniciar a infecção, bem como para a produção e intensidade dos sintomas (HAYWARD; MARIANO, 1997; PÉROMBELON; KELMAN, 1980). Dentro da planta elas colonizam o tecido vascular e os espaços intercelulares, onde permanecem até que as condições ambientais incluindo água livre, baixa concentração de oxigênio e temperatura, tornem-se apropriadas para o desenvolvimento da doença (PÉROMBELON; KELMAN, 1980; TOTH et al., 2003). A temperatura tem um grande efeito na infecção de plantas de batata por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (PÉROMBELON; KELMAN, 1980). De acordo com Hasegawa et al. (2005), a *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* estirpe EC153 produziu maiores quantidades das enzimas pectato liase, poligalacturonase, celulase e protease a 34,5 °C

que a 28 °C e causou extensiva maceração do tecido foliar de couve-chinesa a 34,5 °C. Esses autores consideram esta estirpe uma exceção, pois não existem relatos prévios da produção de níveis significativos de pectato liase em altas temperaturas embora a bactéria seja capaz de crescer nessas condições.

Na couve-chinesa, os sintomas da podridão-mole se iniciam na nervura das folhas que ficam em contato com o solo (MESSIAEN et al., 1995), denominado solo da filosfera, quando a planta está no final do ciclo, próximo à colheita. (KIKUMOTO, 2000). A maceração dos tecidos progride rapidamente para o caule principal, resultando na morte da planta (REN et al., 2001).



Figura 1 – Couve-chinesa apresentando sintomas iniciais (A) e finais (B) de podridão-mole

A bactéria sobrevive no hospedeiro ou dissociada dele e se dissemina pela água de irrigação (MADDOX; HARRISON, 1988), tubérculos infectados (PÉROMBELON,

1972; PÉROMBELON; KELMAN, 1980; PÉROMBELON; SALMOND, 1995), insetos (KLOEPPER et al., 1979), movimento de solo, tratos culturais, implementos agrícolas (PÉROMBELON; KELMAN, 1980), aerossóis (QUINN et al., 1980) e sementes (HADAS et al., 2001), entre outros.

Para controle da doença recomenda-se o uso de variedades resistentes (REN et al., 2001) ou plantas transgênicas (FRAY et al., 1999; MÃE et al., 2001), controle biológico (DONG et al., 2000; 2004; MANEFIELD et al., 2001), uso de cálcio (FLEGO et al., 1997), indutores de resistência (acibenzolar-S-metil) (BENELLI et al., 2004) e emprego de antibióticos ou fungicidas cúpricos (ZAMBOLIM et al., 1997). Ren et al. (2001) consideram, no entanto, que o controle químico não é eficiente, mas as práticas culturais permitem reduzir a incidência da doença. Segundo esses autores, o controle da podridão-mole é dificultado pela ampla gama de plantas hospedeiras e pela sobrevivência de *Pectobacterium* em restos de cultura no solo. Maringoni (1997) salienta que para as Brassicaceae é importante evitar fermentos durante os tratos culturais, empregar adubação equilibrada com nitrogênio e boro, controlar insetos e fazer programas de rotação de culturas especialmente com gramíneas. Entretanto, muitas das estratégias de controle dependem do conhecimento da variabilidade do patógeno.

### **Aspectos Taxonômicos do gênero *Pectobacterium***

O gênero *Erwinia* Winslow et al. foi proposto para agrupar as bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos, peritríquias, fermentativas, com forma de bastonete, incluídas na família *Enterobacteriaceae*. Este gênero reuniu as bactérias

associadas a plantas como patógenos, endófitas e saprófitas (KWON et al., 1997; 2000; TOTH et al., 2001). O gênero *Erwinia*, inicialmente era formado pelos grupos: *Amylovora*, *Carotovora* e *Herbicola* (DYE, 1969). Em 1945, Waldee propôs que as espécies pectinolíticas (grupo *Carotovora*) fossem transferidas para o novo gênero *Pectobacterium* Waldee (DYE, 1969; ROBBS, 1981). Inicialmente, a idéia de separar as erwinias pectinolíticas das erwinias necrotróficas (grupo *Amylovora*) teve alguns seguidores, sendo posteriormente enfraquecida pelo surgimento de espécies intermediárias entre *Erwinia* e *Pectobacterium* e pela descoberta de patógenos com características análogas às de *Pectobacterium carotovorum* exceto a capacidade de produzir enzimas pectinolíticas (ROBBS, 1981). Proposta similar para colocar as erwinias pectinolíticas em gênero separado (*Pectobacterium*) foi feita também por Brenner et al. (1973), mas não foi aceita entre os fitobacteriologistas.

Hauben et al. (1998), analisando a seqüência do DNA ribossomal, rDNA 16S de 29 estirpes de bactérias associadas a plantas, representadas pelos gêneros *Erwinia*, *Pantoea* Gavini et al., *Brenneria* Hauben et al. e outras espécies da família *Enterobacteriaceae*, separaram o gênero *Erwinia* em três grupos filogenéticos.

O primeiro grupo foi formado pelas erwinias verdadeiras, incluindo: *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al., *Erwinia mallotivora* Goto, *Erwinia persicinus* Hao et al., *Erwinia psidii* Neto et al., *Erwinia rhapontici* (Millard) Burkholder e *Erwinia tracheiphila* (Smith) Bergey et al.

O segundo grupo, das erwinias pectinolíticas (Quadro 1), que incluía *Erwinia cacticida* Alcorn et al., *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (van Hall) Dye, *E. carotovora* subsp. *betavascularum* Thomson et al., *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey et al., *E. carotovora* subsp. *odorifera* Gallois et al., *E. carotovora* subsp.

*wasabiae* Goto and Matsumoto, *Erwinia chrysanthemi* Burkholder et al. e *Erwinia cypripedii* (Hori) Bergey et al., teve o gênero mudado para *Pectobacterium* com as seguintes modificações: *P. cacticidium* Hauben et al., *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum* (Thomson et al.) Hauben et al., *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (Gallois et al.) Hauben et al., *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* (Goto & Matsumoto) Hauben et al., *P. chrysanthemi* (Burkholder et al.) Brenner et al., *P. cypripedii* (Hori) Brenner et al.

O terceiro grupo incluindo *Erwinia alni* Surico et al., *Erwinia nigrifluens* Wilson et al., *Erwinia paradisiaca* Fernandez-Borrero & Lopez-Duque, *Erwinia quercina* Hildebrand & Schroth, *Erwinia rubrifaciens* Wilson et al. e *Erwinia salicis* (Day) Chester, foi renomeado de *Brenneria*, com as modificações que seguem: *B. alni* (Surico et al.) Hauben et al., *B. nigrifluens* (Wilson et al.) Hauben et al., *B. paradisiaca* (Fernandez-Borrero & Lopez-Duque) Hauben et al., *B. quercina* (Hildebrand & Schroth) Hauben et al., *B. rubrifaciens* (Wilson et al.) Hauben et al. e *B. salicis* (Day) Hauben et al.

Um quarto grupo incluía *Erwinia stewartii* (Smith) Dye, *Erwinia ananatis* (Serrano), *Erwinia milletiae* (Kawakami & Yoshida) Magrou e *Erwinia herbicola* (Lohnis) Dye. As duas primeiras espécies foram transferidas para o gênero *Pantoea*, *P. stewartii* (Smith) Mergaert et al., *P. ananatis* (Serrano) Mergaert et al., por Mergaert et al. (1993), enquanto as duas últimas foram renomeadas como *Pantoea agglomerans* (Ewing & Fife 1972) Gavini et al. (Toth et al., 2003). Este grupo não foi modificado por Hauben et al. (1998).

Uma segunda mudança na taxonomia do gênero *Pectobacterium* foi feita por Gardan et al. (2003), que analisaram uma coleção de 42 estirpes pertencentes a cinco

subespécies de *P. carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* e *P. carotovorum* subsp. *wasabiae*, além de onze estirpes de referência e estirpes tipos dos biovares de *P. chrysanthemi*, *P. cacticidium* e *B. paradisiaca*. Esse estudo foi realizado utilizando hibridação de DNA-DNA, taxonomia numérica de 120 características fenotípicas, sorologia e nova análise filogenética de seqüências de rDNA 16S, previamente relatadas em base de dados. Assim, foi proposta a elevação ao nível de espécie de *P. atrosepticum* (van Hall) Gardan et al., *P. betavasculorum* (Thomson et al.) Gardan et al. e *P. wasabiae* (Goto & Matsumoto) Gardan et al. Permaneceram como subespécies de *P. carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (Quadro 1).

Segundo De Boer (2003), a mudança na nomenclatura das erwinias pectinolíticas em nível taxonômico com base no estudo da hibridação DNA-DNA (GARDAN et al., 2003) tem maior confiabilidade do que aquela baseada na caracterização fenotípica e análise de um único fragmento de DNA (HAUBEN et al., 1998). No entanto, esta nova taxonomia ainda não foi amplamente aceita e existem controvérsias na comunidade científica, principalmente entre os pesquisadores que trabalham com *Pectobacterium* (PÉROMBELON, 2002; YAP et al., 2004).

Um terceiro trabalho relacionado à taxonomia de *Pectobacterium* foi realizado por Samson et al. (2005) (Quadro 1) que estudaram uma coleção de 75 estirpes de *P. chrysanthemi* (incluindo todos biovares e patovares) e estirpes tipos de *B. paradisiaca* e *P. cyripedii*, utilizando hibridação de DNA-DNA, taxonomia numérica de 121 características fenotípicas, sorológicas e análise filogenética do rDNA 16S. Com base na seqüência do rDNA 16S, foi deduzido que as estirpes de *P. chrysanthemi* e *B.*



*paradisiaca* formavam um grupo diferente dos gêneros *Pectobacterium* e *Brenneria*, sendo as mesmas transferidas para o novo gênero *Dickeya* Samson et al. As novas espécies foram denominadas *D. chrysanthemi* (Burkholder et al.) Samson et al., *D. dadantii* Samson et al., *D. dianthicola* Samson et al., *D. dieffenbachiae* Samson et al., *D. paradisiaca* (Fernandez-Borrero & Lopez-Duque) Samson et al. e *D. zea* Samson et al.

### **Identificação de isolados de *Pectobacterium***

Diversos métodos têm sido utilizados para a identificação de espécies e subespécies de *Pectobacterium*: testes bioquímicos, moleculares, sorológicos, bacteriófagos, eletroforese de proteínas, ácidos graxos, perfil de isoenzimas e crescimento em meio de cultura seletivo. A identificação de isolados de *P. carotovorum* baseada em características bioquímicas e fenotípicas é muito utilizada (PÉROMBELON; KELMAN, 1980; TOTH et al., 2001), embora limitada pelo longo tempo despendido e pouca precisão dos resultados. Como consequência, alguns isolados podem não ser caracterizados e consequentemente considerados como atípicos, ou seja, apresentando características intermediárias entre as espécies (TOTH et al., 2001).

**Quadro 1** – Evolução da nomenclatura de bactérias fitopatogênicas pectinolíticas pertencentes ao gênero *Erwinia* (GARDAN et al., 2003; HAUBEN et al., 1998; LELLIOT; DICKEY, 1984; SAMSON et al., 2005).

Lelliott; Dickey, 1984	Hauben et al., 1998	Gardan et al., 2003	Samson et al., 2005
<i>Erwinia cacticida</i> Alcorn et al.	<b><i>P. cacticidium</i> Hauben et al.<sup>1</sup></b>		
<i>Erwinia carotovora</i> (Jones) Bergey et al.	<b><i>Pectobacterium carotovorum</i> (Jones) Hauben et al.</b>		
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> (van Hall) Dye	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i> (van Hall) Hauben et al.	<b><i>P. atrosepticum</i> (van Hall) Gardan et al.</b>	
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>betavasculorum</i> Thomson et al.	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>betavasculorum</i> (Thomson et al.) Hauben et al.	<b><i>P. betavasculorum</i> (Thomson et al.) Gardan et al.</b>	
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (Jones) Bergey et al.	<b><i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (Jones) Hauben et al.</b>		
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>odorifera</i> Gallois et al.	<b><i>P. carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i> (Gallois et al.) Hauben et al.</b>		
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>wasabiae</i> Goto e Matsumoto	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>wasabiae</i> (Goto e Matsumoto) Hauben et al.	<b><i>P. wasabiae</i> (Goto and Matsumoto) Gardan et al.</b>	
<i>Erwinia chrysanthemi</i> Burkholder et al.	<i>P. chrysanthemi</i> (Burkholder et al.) Brenner et al.		<b><i>Dickeya chrysanthemi</i> (Burkholder et al.) Samson et al.</b>
<i>Erwinia cypripedii</i> (Hori) Bergey et al.	<b><i>P. cypripedii</i> (Hori) Brenner et al.</b>		

<sup>1</sup>Nomes em negrito são as denominações mais atualizadas, obtidas em literatura especializada.

Isolados de *Pectobacterium* são anaeróbicos facultativos, Gram negativos, não formadores de esporos e móveis por flagelos peritríquios (BRENNER et al., 1972; DE BOER; KELMAN, 2001; KWON et al., 2000; PÉROMBELON; KELMAN, 1980). Apresentam crescimento ótimo entre 28-30°C, todas as espécies são oxidase negativas, catalase positivas e muitas não reduzem nitratos. Fermentam glucose, produzem  $\beta$ -galactosidase e H<sub>2</sub>S, utilizam L-arabinose, D-galactose, D-glucose, glicerol, D-manose, D-ribose e sacarose, mas não produzem urease ou ácido a partir de adonitol (DE BOER; KELMAN, 2001; HYMAN et al., 2002).

Em geral, a partir de tecidos com podridão-mole, faz-se o isolamento seletivo em pimentão. O método consiste na introdução de palito de dente autoclavado no material decomposto e depois no fruto de pimentão verde, devendo este ser mantido a 25-30 °C, em saco plástico com alta umidade, por 24-30 h (TAKATSU et al., 1981). Daí a bactéria pode ser plaqueada diretamente para o meio cristal violeta-pectato (CVP) (CUPPELS; KELMAN, 1974) onde forma colônias translúcidas e iridescentes em depressões profundas. Neste meio, as pectobactérias diferenciam-se das *Pseudomonas* spp. fluorescentes pectinolíticas que formam depressões rasas e maiores (HYMAN et al., 2002 ).

O cultivo desses isolados em meio caseína ácida-peptona-glicose (CPG) com incubação a 24 °C por 48 h, permite a visualização em lupa, sob iluminação oblíqua, de colônias jovens de pectobactérias com aspecto de “vidro quebrado”. Esta característica também distingue as colônias de *Pectobacterium* de *Pseudomonas* spp. e de outras bactérias presentes no solo (KELMAN; DICKEY, 1995). Outros testes como crescimento a 37 °C, redução de sacarose, utilização de ceto-metilglucosídeo, produção de ácido a partir de sorbitol, melibiose, citrato, arabitol, rafinose e lactose, sensibilidade a eritromicina e produção de indol (Figura 2) permitem a separação das principais pectobactérias (DE BOER; KELMAN, 2001).

Além destes, a determinação da atividade pectinolítica em meio CVP é um critério auxiliar. Neste meio, após incubação por 48 horas, isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* formam depressões a 27 e 33,5 °C mas não a 37 °C; *P. atrosepticum* forma depressões apenas a 27 °C e *D. chrysanthemi* forma depressões a 27, 33,5 e 37 °C (HYMAN et al., 2002). No Rio Grande do Sul, Oliveira et al. (2003) basearam-se em características bioquímicas e PCR com iniciadores específicos para *P. atrosepticum*, para identificar as seguintes espécies e subespécies de *Pectobacterium*, todas relacionadas à canela preta da batata, *D. chrysanthemi*, *P. atrosepticum* e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. No entanto, oito isolados não foram identificados por não se ajustarem às características bioquímicas tradicionais. Igualmente, Seo et al. (2003) dividiram nove isolados obtidos de amoreira (*Morus* spp.) em dois grupos com base em testes bioquímicos. O grupo 1 foi formado por dois isolados com características típicas de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. O grupo 2 foi formado por sete isolados que apresentaram algumas características de subespécies de *P. carotovorum* mas não puderam ser enquadrados em nenhuma delas. Esses isolados aproximaram-se mais de *P. atrosepticum* diferindo apenas por crescerem a 36 °C, o que foi confirmado quando não amplificaram produtos em PCR com iniciadores específicos para *P. atrosepticum*. Portanto, apenas as características bioquímicas não são suficientes, na maioria dos casos, para a identificação de espécies e subespécies de pectobactérias, as quais formam um grupo muito heterogêneo (OLIVEIRA et al., 2003).

A identificação por ácidos graxos da parede celular permite a classificação taxonômica de bactérias fitopatogênicas (MOSS, 1981). Alguns grupos de bactérias têm perfis suficientemente característicos para permitir a diferenciação com base em poucos cálculos paramétricos, como é o caso da porcentagem individual de ácidos graxos (SEO; TAKANAMI, 2002). De Boer e Sasser (1986) estudando a composição de ácidos graxos, encontraram que estirpes de *P. carotovorum* e *P. atrosepticum* provenientes de batata eram qualitativamente similares, mas diferiam na quantidade e razão de certos ácidos graxos.

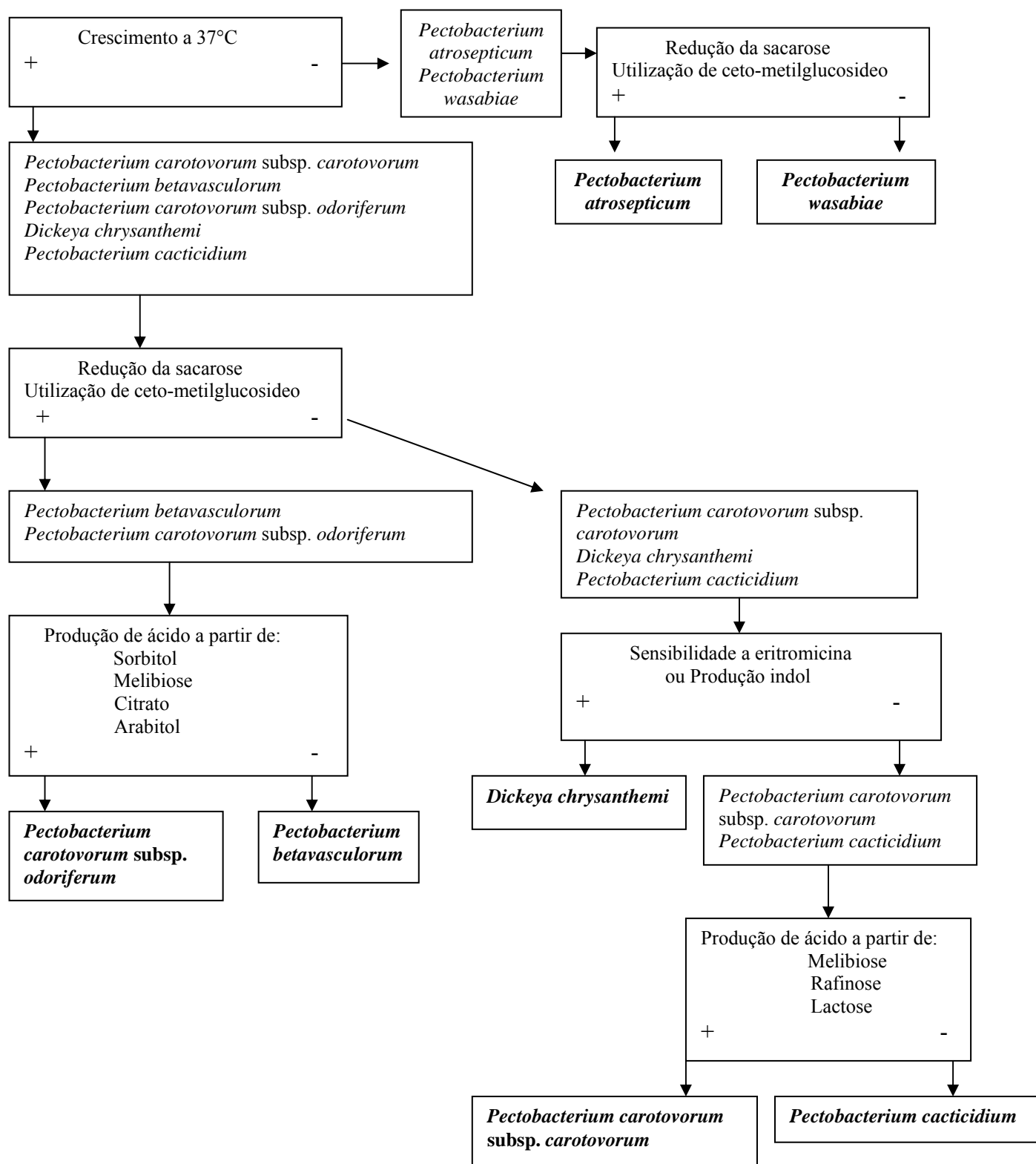


Figura 2 – Esquema para diferenciação das principais pectobactérias (Adaptado DE BOER; KELMAN, 2001)

A identificação por ácidos graxos da parede celular permite a classificação taxonômica de bactérias fitopatogênicas (MOSS, 1981). Alguns grupos de bactérias têm perfis suficientemente característicos para permitir a diferenciação com base em poucos cálculos paramétricos, como é o caso da porcentagem individual de ácidos graxos (SEO; TAKANAMI, 2002). De Boer e Sasser (1986) estudando a composição de ácidos graxos, encontraram que estirpes de *P. carotovorum* e *P. atrosepticum* provenientes de batata eram qualitativamente similares, mas diferiam na quantidade e razão de certos ácidos graxos.

A biologia molecular e biotecnologia vêm sendo aplicadas no desenvolvimento de ferramentas de detecção de patógenos de plantas que sejam rápidas, específicas e sensíveis (MILLER; MARTIN, 1988). De acordo com Kang et al. (2003) a identificação de subespécies de *P. carotovorum* usando sorologia é problemática devido à complexidade da espécie. Uma alternativa é o uso de hibridação de DNA e técnicas de PCR, devido à sensibilidade e rapidez na detecção e identificação das estirpes.

Toth et al. (2001) usaram as técnicas ITS-PCR e ITS-RFLP reputando-as como mais simples, precisas e rápidas que outras técnicas moleculares e caracterização fenotípica, para a identificação de espécies e subespécies de *Pectobacterium*. ERIC-PCR foi empregada para diferenciar isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* de *P. atrosepticum* provenientes de batata, provando ser uma alternativa segura e sensível a ser usada como rotina em conjunto com testes bioquímicos (SEO et al., 2002b). Já Seo et al. (2004) analisaram isolados de *P. carotovorum* provenientes de batata e de couve-chinesa, utilizando testes bioquímicos e análise das seqüências de rDNA 16S e IGS 16S-23S. Com base na análise do rDNA 16S, foi possível a identificação dos isolados de couve-chinesa e batata, respectivamente como *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* e *P. wasabiae*.

### **Variabilidade de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum***

O entendimento da diversidade dentro e entre patógenos relacionados é um importante pré-requisito para classificação taxonômica, identificação e detecção do patógeno e para estudos epidemiológicos (AVROVA et al., 2002). Seo et al. (2000, 2001) reconhecem que é importante melhorar o conhecimento da diversidade de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* para a formulação de estratégias de controle mais eficientes.

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* forma um complexo taxon que envolve uma ampla diversidade de características sorológicas, fenotípicas, genotípicas, bioquímicas e patogênicas (SEO et al., 2002a, 2002c; YAP et al., 2004). Esta diversidade pode ser analisada com relação a componentes epidemiológicos da doença, sensibilidade a diferentes antibióticos e técnicas moleculares.

Os componentes epidemiológicos propiciam detectar diferenças entre os isolados quanto à velocidade de indução dos sintomas do hospedeiro e quantidade de doença induzida em diferentes períodos após a inoculação (COSTA et al., 2001; SILVEIRA et al., 2003). Não foram encontrados trabalhos que utilizem componentes epidemiológicos para o estudo da variabilidade de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Na maioria das pesquisas que envolvem testes de patogenicidade, as avaliações são realizadas 2 a 3 dias após a inoculação (SEO et al., 2001), não havendo preocupação com o início dos sintomas (PI) e o progresso dos mesmos (AACPD), mas somente com a severidade final (SEVF). Do ponto de vista epidemiológico, a variabilidade patogênica tem implicações diretas no manejo da doença (MCDONALD; LINDE, 2002). As variáveis SEVI, SEVF e AACPD no caso da podridão-mole em couve-chinesa podem ser influenciadas de diferentes maneiras em função do isolado e quantidade de inóculo do patógeno, da intensidade do ferimento no pecíolo, do genótipo e estágio fenológico do hospedeiro, e das condições ambientais predominantes (KIKUMOTO, 1980).

Nem sempre são encontrados antibióticos capazes de detectar variabilidade na virulência e/ou agressividade entre isolados, como relatado para *Xanthomonas campestris* pv.

*campestris* (Pammel) Dowson por Costa et al. (2001). Segundo Romeiro (2005), a resistência bacteriana a antibióticos é governada por mecanismos genéticos e os genes para resistência tanto podem estar no cromossomo principal como em plasmídeos. Em alguns casos, toda a população bacteriana já é naturalmente resistente a um ou vários antibióticos e existem vários exemplos em bacteriologia de plantas, sendo denominado resistência múltipla constitutiva.

Segundo Waleron et al. (2002) a variabilidade genética desta bactéria pode ser explicada em relação à origem geográfica e/ou pela extensa gama de plantas hospedeiras. De acordo com Yap et al. (2004) o conhecimento acerca da variabilidade de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* em campo é muito limitado. Estes autores utilizando técnicas moleculares verificaram que a diversidade genômica de estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* em um único nicho, plantas de batata, foi surpreendentemente grande se comparada com outros patógenos. Do ponto de vista evolutivo, a variabilidade genética das populações é importante por determinar o potencial de adaptação do organismo às diferentes condições sob as quais se encontra (MCDONALD; LINDE, 2002).

Diversos estudos moleculares em relação à diversidade e identificação de *P. carotovorum* têm sido realizados, entre os quais se destacam: RAPD (MÄKI-VALKAMA; KARJALAINEN, 1994; PARENT et al., 1996; SEO et al., 2003), gene *pel*-PCR (SEO et al., 2000; SEO et al., 2002d), análise do rDNA 16s-23s (FESSEHAIE et al., 2002), rDNA 16S (KWON et al., 1997; 2000; HAUBEN et al., 1998), gene *recA* (SEO et al., 2002c; WALERON et al., 2002), cDNA-AFLP (DELLAGI et al., 2000), AFLP (AVROVA et al., 2002), ERIC-PCR (SEO et al., 2000; SEO et al., 2001), sorologia (De BOER et al., 1987) e hibridação DNA-DNA (GARDAN et al., 2003).

Segundo Louws et al. (1999), os marcadores Rep-PCR são baseados em seqüências repetitivas conservadas dispersas no genoma bacteriano, sendo utilizados para estudar a diversidade genética em bactérias especialmente as Gram negativas, como é o caso do ERIC-



PCR (VERSALOVIC et al., 1991). Cada indicador gera um padrão de bandas específico que pode variar em tamanho e em distribuição. Seo et al. (2000) estudaram a diversidade genética de estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* provenientes de Tailândia através ERIC-PCR e gene *pel*-RFLP. O primeiro método demonstrou uma grande diversidade genética da bactéria, sendo formados 10 grupos dentro das 22 estirpes estudadas. Seo et al. (2002b) também utilizaram ERIC-PCR para diferenciar estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* de *P. atrosepticum*, encontrando que a similaridade das estirpes de *P. atrosepticum* dentro do grupo foi mais alta do que a das estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, confirmando a grande diversidade genética desta espécie. Esses autores sugerem o emprego de ERIC-PCR para analisar as características genéticas de *P. carotovorum* ao nível de subespécie e infraespécie. Yahiaoui-Zaidi et al. (2003) concordaram com esses resultados ao estudarem a diversidade bioquímica e molecular de estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, provenientes de batata na Algéria, pela análise do gene *peLY*-RFLP. Segundo os autores, os perfis mostraram-se muito mais heterogêneos entre as estirpes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* que entre as estirpes de *P. atrosepticum*.

### **Solos supressivos a *Pectobacterium carotovorum***

As características físicas, químicas e biológicas do solo, juntamente com os fatores ambientais e as plantas hospedeiras, podem influenciar a população de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, acelerando ou retardando o desenvolvimento da podridão-mole (PÉROMBELON; KELMAN, 1980). O fenômeno de alguns solos prevenirem naturalmente o estabelecimento de patógenos ou inibirem as suas atividades patogênicas é denominado supressividade e estes solos são chamados de supressivos, em oposição aos solos conducentes. A distinção entre supressão à doença e supressão ao patógeno deve ser efetuada, sendo esta

última a habilidade de um solo em reduzir a densidade de inóculo do patógeno e sua atividade saprofítica, enquanto a primeira, a capacidade do solo de reduzir a intensidade da doença, mesmo com alta densidade de inóculo e capacidade de sobrevivência do patógeno (COOK; BAKER, 1983).

A supressividade de solos é uma característica desejável, pois possibilita o controle de doenças com maior eficiência e menores danos ambientais. Fatores que determinam a supressividade devem ser estudados visando à utilização dessas informações na indução da supressividade em solos condutivos. Interações complexas entre fatores abióticos e bióticos do solo podem conduzir à supressividade, motivo pelo qual, propriedades do solo como textura e tipo de argila, teores de fósforo (P), potássio (K), carbono (C), nitrogênio (N) total, alumínio (Al), Cálcio (Ca), magnésio (Mg), sódio (Na) e matéria orgânica (MO), relação C/N, condutividade elétrica e potencial hidrogeniônico (pH), assim como densidade, biomassa e atividade microbiana, dentre outras, podem ser usadas como indicadoras da supressividade (BETTIOL; GHINI, 2005; CHELLEMI; PORTER, 2001; HORNBY, 1983). As propriedades físicas e químicas do solo agem na supressividade de forma direta interferindo no ciclo de vida do patógeno ou de forma indireta estimulando a atividade microbiana antagonista (BETTIOL; GHINI, 2005).

Não é possível destacar uma ou um conjunto de características responsáveis pela supressividade ou condutividade em todos os solos, pois os fatores responsáveis pela supressividade em determinado solo podem não exercer o mesmo papel em outros. Segundo Arshad e Martin (2002), a complexidade das interações entre as diferentes propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo torna difícil a identificação de indicadores de supressividade do solo que possam ser utilizados em diferentes situações. Isto reflete, segundo Höper e Alabouvette (1996) na dificuldade freqüentemente encontrada para distinção entre fatores primários e secundários responsáveis pela supressividade a doenças e/ou patógenos.

A densidade populacional e a sobrevivência dos microrganismos no solo dependem de vários fatores, destacando-se a capacidade de produzir estruturas de sobrevivência, os fatores que controlam ou afetam a produção destas estruturas, as condições que afetam a sobrevivência destas estruturas, a diversidade fisiológica, a eficiência na utilização de substratos, os números de hospedeiros principais e alternativos, a competitividade e grau de saprofiticidade, as estratégias de sobrevivência e a suscetibilidade a microbiostase e antibióticos presentes no solo (SIQUEIRA; FRANCO, 1988).

A disponibilidade de nutrientes e os níveis de pH no solo podem afetar as populações de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, pois foi constatado que valores elevados de pH, P, Ca e Mg propiciavam aumentos significativos nos níveis populacionais desta bactéria nesse habitat (KIKUMOTO, 1980; PÉROMBELON; HYMAN, 1989; ARMON et al., 1995). Segundo Pérombelon e Kelman (1980) a população de pectobactérias no solo é afetada pela pouca disponibilidade de nutrientes, pois as mesmas não acumulam compostos ricos em energia como glicogênio ou poli- $\beta$ -hidroxibutirato. Por outro lado, a podridão-mole em couve-chinesa foi eficientemente controlada em campo pela fertilização do solo com hidróxido de cálcio (KIM; YEOUNG, 2004).

A microbiota dos solos é continuamente influenciada pela interação entre as propriedades físicas, químicas e biológicas (SIQUEIRA; FRANCO, 1988). Populações de pectobactérias declinam muito rapidamente em solos no campo dependendo da população bacteriana no solo, além de outros fatores (MEW et al., 1976; PÉROMBELON; KELMAN, 1980). A redução da população de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* no solo pode ser atribuída à competição com bactérias nativas que utilizam os nutrientes mais eficientemente, a exemplo do constatado por Armon et al. (1995), mas o mecanismo de antibiose também pode estar envolvido, pois Kikumoto (2000) destacou que a diferença na habilidade de isolados desta bactéria sobreviverem no solo estava relacionada à sensibilidade a bacteriocinas. Kikumoto (2000) demonstrou o potencial do controle biológico da podridão-mole em couve-chinesa

baseado na utilização de isolados avirulentos de *P. carotovorum* produtores de bacteriocinas, entretanto nenhum método efetivo de controle foi estabelecido.

Os gêneros de bactérias mais comumente encontrados nos solos com capacidade antagonística a fitopatógenos são *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. que podem agir por antibiose, competição por espaço e nutrientes, parasitismo e indução de resistência (BETTIOL; GHINI, 2005; WELLER et al., 2002). Mew et al. (1976) observaram que a presença de *Pseudomonas* fluorescentes no solo influenciou significativamente na redução da severidade da podridão-mole em couve-chinesa. Segundo Mazzola (2004), a implementação efetiva de estratégias de manejo ou estímulo à comunidade microbiana antagonista do solo para a supressão de fitopatógenos habitantes desse ambiente requer inicialmente a identificação dos componentes biológicos envolvidos na supressividade e depois o monitoramento do impacto das práticas de manejo na abundância e atividade dessa população microbiana benéfica.

A influência de bactérias formadoras de endosporos na sobrevivência de *P. carotovorum* foi estudada por Kikumoto (1980), que verificou o decréscimo rápido na população do patógeno com o aumento das populações de bactérias formadoras de endosporos. Espécies de *Bacillus*, incluindo *B. thuringiensis* Berliner, *B. subtilis* (Ehrenberg) Cohn e *B. cereus* Frankland & Frankland têm se destacado como importantes agentes de biocontrole de fitopatógenos habitantes do solo (EMMERT; HANDELSMAN, 1999). Essas bactérias são produtoras de antibióticos, além de enzimas que degradam o sinal de “quorum sensing” de muitas bactérias (GARBEVA et al., 2004), a exemplo de *B. thuringiensis* no biocontrole de *P. carotovorum* (DONG et al., 2004). Mesmo considerando todos esses aspectos, um entendimento completo dos fatores biológicos responsáveis pela supressividade de um solo a um determinado patógeno ou doença requer um conhecimento aprofundado da identidade, frequência relativa e atividade biológica das diversas populações microbianas que habitam a rizosfera. Além disso, o balanço microbiano e a eficiência de um antagonista são dependentes

das características físico-químicas do solo, sendo difícil separar os fatores envolvidos na supressividade (WELLER et al., 2002).

Apesar da importância da podridão-mole para a cultura da couve-chinesa em Pernambuco, não existem estudos sobre caracterização, variabilidade de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e supressividade de solos a populações desta bactéria fitopatogênica no Nordeste do Brasil. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: (i) identificar pectobactérias causadoras de podridão-mole em couve-chinesa e investigar sua variabilidade (Capítulo II) e (ii) avaliar a taxa de extinção da população desse patógeno em solos de Pernambuco e analisar as características físicas, químicas e biológicas dos solos associadas com a supressividade ou condutividade ao patógeno (Capítulo III).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMON, R.; DOSORETZ, C.; YOIRISH, A.; SHELEF, G.; NEEMAN, I. Survival of the phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in sterile and non-sterile soil, sand and their admixture. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 79, p. 513-518, 1995.

ARSHAD, M. A.; MARTIN, S. Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 88, p. 153-160, 2002.

AVROVA, A. O.; HYMAN, L. J.; TOTH, R. L.; TOTH, I. K. Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1499-1508, 2002.

BARRAS, F.; VAN GIJSEGEM, F.; CHATTERJEE, A. K. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 201-234, 1994.

BENELLI, A. I. H.; DENARDIN, N. D.; FORCELINI, C. A. Ação do acibenzolar-S-metil aplicado em tubérculos e plantas de batata contra canela preta, incitada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* atípica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 263-267, 2004.

BRENNER, D. J.; FANNING, G. R.; STEIGERWALT, A. G. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of *Erwinia* and between *Erwinia* species and other *Enterobacteria*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 110, p. 12-17, 1972.

BRENNER, D. J.; STEIGERWALT, A. G.; MIKLOS, G. V.; FANNING, G. R. Deoxyribonucleic acid relatedness among *Erwiniae* and other enterobacteria. The soft-rot organisms (genus *Pectobacterium* Waldee). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 23, p. 205-216, 1973.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos supressivos. In: Michereff, F., Andrade, D.E.G.T. & Menezes, M. (Eds.) **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife. Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2005. pp. 125-152.

BYERS, J. T.; LUCAS, C.; SALMOND, G. P. C.; WELCH, M. Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum sensing signaling molecule. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, p. 1163-1171, 2002.

CEASA-PE. **Calendário de comercialização e outras informações de hortigranjeiros**

**CEASA-PE**. Recife: Secretaria de Agricultura, 2005. 4 p.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul. The American Phytopathological Society. 1983.

COSTA, V. S. O.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. Variabilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no Estado de Pernambuco. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 27, p. 182-189, 2001.

CUPPELS, D.; KELMAN, A. Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v.64, p.468-475, 1974.

CHELLEMI, D. O.; PORTER, I. J. The role of plant pathology in understanding soil health and its application to productive agriculture. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 30, n. 1, p. 103-109, 2001.

DE BOER, S. H.; KELMAN, A. *Erwinias* soft rot group. In: SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. (Eds.) **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3 ed. Saint Paul: APS, 2001. p. 56-72.

DE BOER S. H; SASSER M. Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on the basis of cellular fatty-acid composition. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 32, p. 796–800, 1986.

DE BOER, S. H.; VERDONCK, L.; VRUGGINK, H.; HARJU, P.; BANGS, H. O.; 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**, Oxford, v. 63, p. 487-495, 1987.

DE BOER, S. H. Characterization of pectolytic *Erwinias* as highly sophisticated pathogens of plants. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 893-899, 2003.

DELLAGI, A.; BIRCH, P. R. J.; HEILBRONN, J.; LYON, G. D.; TOTH, I. K. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia carotovora*. **Microbiology**, Reading, v. 146, p. 165-171, 2000.

DONG, Y. H.; XU, J. L.; LI, X. Z.; ZHANG, L. H. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, p. 3526-3531, 2000.

DONG, Y. H.; ZHANG, X. F.; XU, J. L.; ZHANG, L. H. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 954-960, 2004.

DYE, D. W. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The “carotovora” group. **New Zealand Journal of Science**, Wellington, v. 12, p. 81-97, 1969.



EMMERT, E. A. B.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 171, p. 1-9, 1999.

FESSEHAIE, A.; DE BOER, S. H.; LÉVESQUE, C. A. Molecular characterization of DNA encoding 16s-23s rRNA intergenic spacer regions and 16s rRNA of pectolytic *Erwinia* species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 387-398, 2002.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção de hortaliças. 1.ed. Viçosa: Editora UFV, 2000. 402 p.

FRAY, R. G.; THROUP, J. P.; DAYKIN, M.; WALLACE, A.; WILLIAMS, P.; STEWART, G. S. A. B.; GRIERSON, D. Plant genetically modified to produce *N*-acylhomoserine lactones communicate with bacteria. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, p. 1017-1020, 1999.

FLEGO, D.; PIRHONEN, M.; SAARILAHTI, H.; PALVA, T. K.; TAPIO P. E. Control of virulence gene expression by plant calcium in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 25, p. 831-838, 1997.

GARDAN, L.; GOUY, C.; CHRISTEN, R.; SAMSON, R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov., *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 381-391, 2003.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Saint Paul, v. 42, p. 243-270, 2004.

HADAS, R.; KRITZMAN, G.; GEFEN, T.; MANULIS, S. Detection, quantification and characterization of *Erwinia carotovora* spp. *carotovora* contaminating pepper seeds. **Plant Pathology**, British, v. 50, p. 117-123, 2001.

HASEGAWA, H.; CHATTERJEE, A.; CUI, Y.; CHATTERJEE, A. K. Elevated temperature enhances virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain EC153 to plants and stimulates production of the quorum sensing signal, *N* –acyl homoserine lactone, and extracellular proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 4655-4663, 2005.

HAUBEN, L.; MOORE, E. R.; VAUTERIN, L.; STEENACKERS, M.; MERGAERT, J.; VERDONCK, L.; SWINGS, J. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 21, p. 384-397, 1998.

HAYWARD, A. C.; MARIANO, R. L. R. Mecanismos de virulência e patogenicidade de procariotos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 5, p. 199-234, 1997.

HORNBY, D. Suppressive soils. **Annual Review of Phytopathology**, Saint Paul, v. 21, p. 65-85, 1983.

HÖPER, H.; ALABOUVETTE, C. Importance of physical and chemical soil properties in the suppressiveness of soil to plant diseases. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 32, p. 41-58, 1996.

HOSSAÍN, M. M.; SHIBATA, S.; AIZAWA, S. I.; TSUYUMU, S. Motility is an important determinant for pathogenesis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 66, p. 134-143, 2005.

HYMAN, L. J.; TOTH, I. K.; PÉROMBELON, M. C. M. Isolation and identification. In: PÉROMBELON, M. C. M.; VAN DER WOLF, J. M. **Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual**. 2. ed. Invergowrie: Scottish Crop Research Institute, 2002. p. 66-59.

JABUONSKI, R. E.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; TAKATSU, A. Influência da temperatura no dano causado por *Erwinia* spp. em tubérculos de batateira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, p. 317-319, 1988.

JONES, S. M.; YU, B.; BAINTON, N. J.; BIRDSALL, M.; BYCROFT, B. W.; CHHABRA, S. R.; COX, A. J.; GOLBY, P.; REEVES, P. J.; STEPHENS, S. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 12, p. 2477-2482, 1993.

KANG, H. W.; KWON, S. W.; GO, S. J. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. **Plant Pathology**, British, v. 52, p. 127-133, 2003.

KELMAN, A.; DICKEY, R. S. Detection of *Erwinia carotovora* and *E. chrysanthemi*. In: SAETTLER, A. W.; SCHAADN N. W.; ROTH, D. A. (Eds.) **Detection of bacteria en seed and other planting material**. Saint Paul: APS, 1995. p. 76-91.

KIKUMOTO, T. Ecological aspects of soft rot bacteria. **Report of the institute for Agricultural Research (Tohoku University)**, Sendai, v. 31, p. 19-41, 1980.

KIKUMOTO, T. Ecology and biocontrol of soft rot of Chinese cabbage. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 66, p. 275-277, 2000.

KIM, B. S.; YEOUNG, Y. R. Suppression of bacterial rot on Chinese cabbage by calcium fertilizer treatment. **Research in Plant Disease**, Saint Paul, v. 10, p. 82-85, 2004.

KLOEPPER, J. W.; HARRISON, M. D.; BREWER, J. W. The association of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* and *Erwinia carotovora* var. *carotovora* with insects in Colorado. **American Potato Journal**, Orono, v. 56, p. 351-361, 1979.

KÕIV, V.; MÄE, A. Quorum sensing controls the synthesis of virulence factors by modulating *rsmA* gene expression in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 265, p. 287-292, 2001.

KOTOUJANSKY, A. Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot *Erwinia*. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 405-430, 1987.

KWON, S. W.; GO, S. J.; KANG, H. W.; RYU, J. C.; JO, J. K. Phylogenetic analysis of *Erwinia* species based on 16s rRNA gene sequence. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 1061-1067, 1997.

KWON, S. W.; CHEUN, M. S.; KIM, S. H.; LIM, C. K. Phylogenetic analysis of *Pectobacterium* species using the 16s-23s rRNA intergenic spacer regions. **Plant Pathology Journal**, Faisalabad, v. 16, p. 98-104, 2000.

KYEREMEH, A. G.; KIKUMOTO, T.; CHUANG, D. Y.; GUNJI, Y.; TAKAHARA, Y.; EHARA, Y. Biological control of soft rot of chinese cabbage using single and mixed treatments of bacteriocin-producing avirulent mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 66, p. 264-268, 2000.

LELLIOT, R. A.; DICKEY, R. S. Genus VII. *Erwinia*. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (Eds.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore. The Williams & Wilkins. 1984. p. 469-476.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, Detection, and Disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Saint Paul, v. 37, p. 81-125, 1999.

MADDOX, D. A.; HARRISON, M. D. Presence and population dynamics of *Erwinia carotovora* in irrigation water in South Central Colorado. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 64, p. 169-182, 1988.

MÃE, A.; MONTESANO, M.; KOIV, V.; PALVA, T. Transgenic plant producing the bacterial pheromone *N*-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, p. 1035-1042, 2001.

MÄKI-VALKAMA T.; KARJALAINEN R. Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *carotovora* by RAPD-PCR. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 125, p. 301–309, 1994.

MALAVOLTA JR. V. A.; ALMEIDA, I. M. G.; SINIGAGLIA, C.; MALAVOLTA, V. M. A. Podridão mole em couve-chinesa causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* no estado de São Paulo. **Biológico**, São Paulo, v. 60, p. 57-59, 1998.

MANEFIELD, M.; WELCH, M.; GIVSKOV, M.; SALMOND, G. P. C.; KJELLEBERG, S. Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 205, p. 131-138, 2001.

MARINGONI, A. C. Doenças das crucíferas (brócolis, couve, couve-chinesa, rabanete, repolho e rúcula). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doença das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 315-324.

MAROTO-BORREGO, J. V. M. **Horticultura herbácea especial**. Madrid: Mundi-Prensa, 1995. 615 p.

MAZZOLA, M. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. **Annual Review of Phytopathology**, Saint Paul, v. 42, p. 35-59, 2004.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Saint Paul, v. 40, p. 349-379, 2002.

MERGAERT, J.; VERDONCK, L.; KERSTERS, K. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, p.162-173, 1993.

MESSIAEN, C. M.; BLANCARD, D.; ROUXEL, F.; LAFON, R. **Enfermedades de las hortalizas**. Madrid: Grupo Mundi-Prensa, 1995. 576 p.

MEW, T. W.; HO, W. C.; CHU, I. Infectivity and survival of soft-rot bacteria in chinese cabbage. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, p. 1325-1327, 1976.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 55, p. 165-199, 2001.

MILLER, S. A.; MARTIN, R. R. Molecular diagnosis of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 26, p. 409-432, 1988.

MOSS, C. W. Gas-liquid chromatography as an analytical tool in microbiology. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 201, p. 337-347, 1981.

OLIVEIRA, A. M. R.; DUARTE, V.; SILVEIRA, J. R. P.; MORAES, M. G. Incidence of pectolytic *Erwinia* associated with blackleg of potato in Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 49-53, 2003.

PARENT, J. G.; LACROIX, M.; PAGÉ, D. Identification of *Erwinia carotovora* from soft rot diseased plants by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 494-499, 1996.

PÉROMBELON, M. C. M. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: overview of pathogenesis. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, p. 1-12, 2002.

PÉROMBELON, M. C. M. The extent and survival of contamination of potato stock in Scotland by *Erwinia carotovora* var *carotovora* e *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 71, p. 111-117, 1972.

PÉROMBELON, M. C. M.; HYMAN, L. J. Survival of soft rot *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in soil in Scotland. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 66, p. 95-106, 1989.

PÉROMBELON, M. C. M.; KELMAN, A. Ecology of the soft rot *Erwinias*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 18, p. 361-387, 1980.

PÉROMBELON, M. C. M.; SALMOND G. P. C. Bacterial soft rot. In: SINGH, U. S.; SINGH, R. P.; KOHMOTO, K. **Pathogenesis and host specificity in plant disease**.



**Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases.** Prokaryotes. Great Britain: Elsevier Science, 1995. v. 1, 321 p.

QUINN, C. E.; SELLS, I. A.; GRAHAM, D. C. Soft rot *Erwinia* bacteria in the atmospheric bacterial aerosol. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 49, p. 175-181, 1980.

REN, J.; PETZOLDT, R.; DICKSON, M. H. Genetics and population improvement resistance to bacterial soft rot chinese cabbage. **Euphytica**, Wageningen, v. 117, p. 197-207, 2001.

RIED, J. L.; COLLMER, A. C. Comparison of pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 52, p. 305-310, 1986.

ROBBS, C. F. Taxonomia, bio-ecologia e principais representantes do gênero *Erwinia* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 304-305, 1981.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2 ed. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 2005. 283 p.

SANDKVIST, M. Type II secretion and pathogenesis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, p. 3523-3535, 2001.

SAMSON, R.; LEGENDRE, J. B.; CHRISTEN, R.; ACHOUAK, W.; GARDAN, L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya*

*paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1415-1427, 2005.

SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. Variabilidade de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* provenientes de melão produzido no estado do Rio Grande do Norte. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 29, p. 255-261, 2003.

SEO, S. T.; FURUYA, N.; LIM, C. K.; TAKANAMI, Y.; TSUCHIYA, K. Phenotypic and genetic diversity of *Erwinia carotovora* spp. *carotovora* strain from Asia. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 150, p. 120-127, 2002a.

SEO, S. T.; FURUYA, N.; LIM, C. K.; TAKANAMI, Y.; TSUCHIYA, K. Phenotypic and genetic characterization of *Erwinia carotovora* from mulberry (*Morus* spp.). **Plant Pathology**, British, v. 52, p. 140-146, 2003.

SEO, S. T.; FURUYA, N.; LIM, C. K.; TSUCHIYA, K.; TAKANAMI, Y. Variation of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from Korea. **Journal of the Faculty of Agriculture (Kyushu University)**, Fukuoka, v. 45, p. 431-436, 2001.

SEO, S. T.; FURUYA, N.; TAKANAMI, Y. Genetic diversity in Thai strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* based on ERIC profiles and RFLP of *pel* gene. **Journal of the Faculty of Agriculture (Kyushu University)**, Fukuoka, v. 45, p. 15-19, 2000.

SEO, S. T.; FURUYA, N.; TAKESHITA, M.; TAKANAMI, Y. Differentiation de *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* and *carotovora* by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. **Journal of the Faculty of Agriculture (Kyushu University)**, Fukuoka, v. 47, p. 1-6, 2002b.

SEO, S. T.; FURUYA, N.; TAKESHITA, M.; TAKANAMI, Y. Genotyping of *Erwinia carotovora subsp. carotovora* strains from Asia based on *recA* gene Restriction fragment length polymorphisms. **Journal of the Faculty of Agriculture (Kyushu University)**, Fukuoka, v. 47, p. 7-12, 2002c.

SEO, S. T.; KOO, J. H.; HUR, J. H.; LIM, C. K. Characterization of Korean *Erwinia carotovora* strains from potato and chinese cabbage. **Plant Pathology Journal**, Faisalabad, v. 20, p. 283-288, 2004.

SEO, S. T.; TAKANAMI, Y. Characterization of *Erwinia carotovora subsp. carotovora* strain on the basis of cellular fatty acid composition. **Journal of the Faculty of Agriculture (Kyushu University)**, Fukuoka, v. 46, p. 251-256, 2002.

SIGEE, D. C. **Bacterial plant pathology: cell and molecular aspects**. Great Britain: Cambridge, 1993. 325 p.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotechnology do Solo – Fundamentos e Perspectivas**. Brasília. Ministério da Educação – ABEAS, ESAL/FAEPE. 1988.

SOUZA, R. J. Origem e botânica de algumas brássicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 9, p. 10-14, 1980.

TOGASHI, J.; UEDA, K.; NAMAI, T. Overwintering of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in diseased tissues in soil and its role as inoculum for soft rot of chinese cabbage (*Brassica campestris*, Pekinensis group). **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 67, p. 45-50, 2001.

TOTH, I. K.; AVROVA, A. O.; HYMAN, L. J. Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinias* by 16s-23s intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4070-4076, 2001.

TOTH, I. A.; BELL, K. S.; HOLEVA, M. C.; BIRCH, P. R. J. Soft rot *Erwiniae*: from genes to genomes. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, p. 17-13, 2003.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

WALERON, M.; WALERON, K.; PODHAJSKA, A. J.; KOJKOWSKA, E. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. **Microbiology**, London, v. 148, p. 583-595, 2002.

WELLER, D. M.; RAAIJMAKERS, J. M.; GARDENER, B. B. M.; THOMASHOW, L. S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 309-348, 2002.

WHITEHEAD, N. A.; BYERS, J. T.; COMMANDER, M.; CORBETT, M. J.; COULTHURST, S. J.; EVERSON, L.; HARRIS, A. K. P.; PEMBERTON, C. L.; SIMPSON, N. J. L.; SLATER, H.; SMITH, D. S.; WELCH, M.; WILLIAMSON, N.; SALMOND, G. P. C. The regulation of virulence in phytopathogenic *Erwinia* species: quorum sensing, antibiotic and ecological considerations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 81, p. 223-231, 2002.

YAHIAOUI-ZAIDI, R; JOUAN, B.; ANDRIVON, D. Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. **Plant Pathology**, British, v. 52, p. 28-40, 2003.

YAP, M. N.; BARAK, J. D.; CHARKOWSKI, A. O. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 3013-3023, 2004.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Eds.) **Controle integrado das doenças de hortaliças**. 1 ed. Viçosa: Imprensa Universitária de UFV, 1997. 122 p.

## **Capítulo III**

---

**Caracterização de solos de Pernambuco quanto à  
supressividade à *Pectobacterium carotovorum* subsp.  
*carotovorum***

---

## **Conclusões Gerais**

1 **Caracterização e Variabilidade de Bactérias Causadoras de Podridão-mole em**  
2 **Couve-chinesa \***

3  
4 **Indira del C.M. Alvarado<sup>1\*\*</sup>, Sami J. Michereff<sup>1\*\*\*</sup>, Rosa L.R. Mariano<sup>1\*\*\*</sup>, Elineide B.**  
5 **Silveira<sup>1</sup>, Alice M. Quezado-Duval<sup>2</sup>, Luciane V. Resende<sup>3</sup>, Eduardo S.G. Mizubuti<sup>4\*\*\*</sup> &**  
6 **Enildo Cardoso<sup>1</sup>**

7 <sup>1</sup>Área de Fitossanidade e <sup>3</sup>Fitotecnia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural  
8 de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife, PE, e-mail: rmariano@truenet.com.br; <sup>2</sup>Embrapa  
9 Hortaliças, CEP 70359-970, Brasília, DF, e-mail: alice@cnph.embrapa.br; <sup>4</sup>Departamento de  
10 Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36571-000, Viçosa, MG, e-mail:  
11 mizubuti@ufv.br

12  
13 (Aceito para publicação em: / / )

14 Autor para correspondência: Rosa L.R. Mariano

15 \_\_\_\_\_  
16 ALVARADO, I.C.M., MICHEREFF, S.J., MARIANO, R.L.R., SILVEIRA, E.B.,  
17 QUEZADO-DUVAL, A.M., RESENDE, L.V., MIZUBUTI, E.S.G. & CARDOSO, E.  
18 Caracterização e variabilidade de bactérias causadoras de podridão-mole em couve-chinesa.  
19 Fitopatologia Brasileira.

20 \_\_\_\_\_  
21 \*Parte da Tese de Doutorado da primeira autora. Universidade Federal Rural de Pernambuco  
22 (2006)

23 \*\*Bolsista da CAPES

24 \*\*\* Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq



## 25 RESUMO

26 A produção de couve-chinesa (*Brassica pekinensis*) pode ser limitada pela ocorrência  
27 de doenças, dentre as quais se destaca a podridão-mole causada por bactérias pectinolíticas.  
28 Trinta e nove isolados de bactérias causadoras de podridão-mole em couve-chinesa, oriundos  
29 de áreas de plantio de Camocim de São Félix, em Pernambuco, foram identificados e  
30 caracterizados como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* por testes bioquímicos  
31 confirmados por PCR. A variabilidade desses isolados foi avaliada com base em componentes  
32 epidemiológicos da doença, sensibilidade a antibióticos e marcadores moleculares. Os isolados  
33 foram distribuídos em grupos de similaridade, considerando-se 50% da distância total de  
34 ligação pelo método UPGMA. Com base nos componentes epidemiológicos período de  
35 incubação (PI), severidade inicial (SEVI), severidade final (SEVF) e área abaixo da curva de  
36 progresso da doença, os 39 isolados foram distribuídos em seis grupos de similaridade. Entre  
37 os componentes epidemiológicos, foi constatada correlação de Pearson significativa ( $P \leq 0,05$ )  
38 somente de PI com SEVI ( $r = -0,57$ ). Baseado na sensibilidade aos 12 antibióticos, os isolados  
39 de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* foram distribuídos em 14 grupos. Foram constatadas  
40 correlações significativas entre sensibilidade a gentamicina e PI ( $r = -0,41$ ), bem como entre  
41 sensibilidade a clindamicina e SEVF ( $r = -0,45$ ). A utilização dos marcadores moleculares  
42 REP, ERIC e BOX no Rep-PCR revelou grande variabilidade genética entre os 39 isolados,  
43 pois foram formados 32 grupos de similaridade. Não foram constatadas correlações  
44 significativas entre as distâncias de ligação registradas pelos marcadores moleculares e os  
45 componentes epidemiológicos da doença.

46 **Palavras-chave adicionais:** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*,  
47 *Brassica pekinensis*, componentes epidemiológicos, sensibilidade a antibióticos, marcadores  
48 moleculares.

49

50 **ABSTRACT**51 **Characterization and variability of bacteria causing soft rot in Chinese cabbage**

52 Yield of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*) may be limited by the occurrence of  
53 diseases mainly the soft rot caused by pectinolytic bacteria. Thirty-nine isolates of bacteria  
54 causing soft rot in Chinese cabbage obtained from planting areas of Camocim de São Félix, in  
55 the State of Pernambuco, were identified and characterized as *Pectobacterium carotovorum*  
56 subsp. *carotovorum* based on biochemical tests confirmed by PCR. The variability of these  
57 isolates was evaluated through disease epidemiological components, sensitivity to antibiotics  
58 and molecular markers. The isolates were distributed in similarity groups considering 50% of  
59 the total linkage distance by the UPGMA method. Based on epidemiological components  
60 incubation period (PI), initial severity (SEVI), final severity (SEVF) and area under the disease  
61 curve progress the 39 isolates were distributed in six similarity groups. Among the  
62 epidemiological components significant Pearson correlation ( $P \leq 0.05$ ) was only found for PI  
63 and SEVI ( $r = -0.57$ ). Based on sensitivity to 12 antibiotics, the *P. carotovorum* subsp.  
64 *carotovorum* were distributed in 14 groups. There were significant correlations between  
65 sensitivity to gentamicin and PI ( $r = -0.41$ ), as well as between sensitivity to clindamicin and  
66 SEVF ( $r = -0.45$ ). The molecular markers REP, ERIC and BOX used in Rep-PCR revealed  
67 high genetic variability among the 39 isolates since 32 similarity groups were formed. No  
68 significant correlations were found among the linkage distances registered by molecular  
69 markers and the disease epidemiological components.

70

71

72

---

**INTRODUÇÃO**

73

74 O Estado de Pernambuco é um dos principais produtores de couve-chinesa (*Brassica*  
75 *pekinensis* L.) no Nordeste brasileiro, com produção média anual de 75,6 toneladas no período  
76 2001 a 2005. O município de Camocim de São Félix, localizado na mesorregião do Agreste,  
77 destaca-se como o maior produtor dessa brássica em Pernambuco, sendo responsável por 45%  
78 da produção (CEASA-PE, 2005).

79 A produção de couve-chinesa pode ser limitada pela ocorrência de doenças, dentre as  
80 quais, a podridão-mole causada por bactérias pectinolíticas, considerada uma das doenças mais  
81 destrutivas dessa brássica no mundo (Mew *et al.*, 1976; Kikumoto, 1980; Ren *et al.*, 2001). Em  
82 Pernambuco, a podridão-mole tem grande importância, pois em levantamentos realizados em  
83 2004 foi constatada em 100% dos plantios de couve-chinesa nas mesorregiões da Zona da Mata  
84 e Agreste, atingindo até 67% de incidência dentro das lavouras (Silva, 2005). Os sintomas da  
85 podridão-mole em couve-chinesa se caracterizam inicialmente pela maceração dos tecidos da  
86 base das folhas em contato com o solo infestado, progredindo rapidamente para o caule  
87 principal e resultando no colapso de toda a planta (Kikumoto, 1980).

88 As bactérias que causam podridão-mole em couve-chinesa pertencem à espécie  
89 *Pectobacterium carotovorum* (Jones) Hauben *et al.*, com predominância da subespécie *P.*  
90 *carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben *et al.* (Mew *et al.*, 1976; Ren *et al.*, 2001).  
91 No entanto, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (Gallois *et al.*) Hauben *et al.* (Seo *et al.*, 2004) e  
92 *P. atrosepticum* (Van Hall) Hauben *et al.* (De Boer, 1987) também já foram relatadas  
93 ocorrendo nessa hospedeira.

94 A identificação de isolados de *Pectobacterium* é baseada principalmente no estudo de  
95 características bioquímicas e fenotípicas (Seo *et al.*, 2004). Uma característica importante é a  
96 capacidade de crescer e formar depressão em meio CVP (cristal violeta-pectato) (Hyman *et al.*,  
97 2002). De acordo com De Boer & Kelman (2001), *P. carotovorum* pode ser diferenciada das  
98 outras espécies do gênero considerando o crescimento a 37 °C, produção de ácido a partir de  $\alpha$ -  
99 metil glucosídeo, produção de indol, atividade da fosfatase e redução da sacarose. No entanto, a

100 identificação fenotípica de bactérias consome muito tempo e pode ser imprecisa (Toth *et al.*,  
101 2001), o que no caso de *Pectobacterium* se deve à grande diversidade genética e fenotípica  
102 dentro das espécies (Seo *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2002).

103 Métodos moleculares são amplamente utilizados para identificação e estudos de  
104 variabilidade de patógenos pela precisão, rapidez e sensibilidade (Ward & De Boer, 1990). A  
105 identificação e variabilidade genética de isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* têm  
106 sido estudadas com a utilização de técnicas como a análise por seqüenciamento ou por restrição  
107 enzimática (RFLP) das regiões 16S, 23S do rDNA (Fessehaie *et al.*, 2002) e intergênica 16S-  
108 23S (ITS) (Toth *et al.*, 2001), bem como a utilização da rep-PCR (Seo *et al.*, 2000). Na rep-  
109 PCR são utilizados os primers BOX, ERIC e REP, que correspondem a elementos repetitivos  
110 conservados que ocorrem dentro do genoma bacteriano (Louws *et al.*, 1999).

111 A diversidade de bactérias fitopatogênicas pode também ser analisada com relação a  
112 componentes epidemiológicos da doença e sensibilidade a diferentes antibióticos. Os  
113 componentes epidemiológicos possibilitam detectar diferenças entre os isolados quanto à  
114 velocidade de indução dos sintomas do hospedeiro e quantidade de doença induzida em  
115 diferentes períodos após a inoculação (Costa *et al.*, 2001; Silveira *et al.*, 2003).

116 O conhecimento da diversidade das bactérias causadoras de podridão-mole e da  
117 variabilidade de suas populações é essencial no desenvolvimento de estratégias de manejo da  
118 doença em couve-chinesa (Seo *et al.*, 2000). Dada a importância da doença e da cultura na  
119 região do Agreste no Estado de Pernambuco, bem como a ausência de estudos dessa natureza  
120 no Brasil, neste trabalho objetivou-se caracterizar as bactérias causadoras da podridão-mole em  
121 couve-chinesa nas principais áreas produtoras e analisar a variabilidade de isolados de *P.*  
122 *carotovorum* subsp. *carotovorum* obtidos nessas áreas, com base em componentes  
123 epidemiológicos da doença, sensibilidade a antibióticos e marcadores moleculares.

124

125

## MATERIAL E MÉTODOS

126

127

### 128 **Obtenção e caracterização dos isolados de bactérias causadoras de podridão-mole em** 129 **couve-chinesa**

130 Plantas de couve-chinesa com sintomas de podridão-mole foram coletadas em  
131 diferentes áreas produtoras do município de Camocim de São Félix (PE), nos anos 2004 e  
132 2005. Em laboratório, foi efetuado o isolamento seletivo para *Pectobacterium carotovorum* em  
133 pimentão, de acordo com a metodologia de Takatsu *et al.* (1981). A identificação preliminar  
134 dos isolados foi realizada em meio CPG (casamino ácido-peptona-glicose), no qual as colônias  
135 jovens (36-48 h) de pectobactérias visualizadas em lupa sob iluminação oblíqua apresentam  
136 aspecto de “vidro quebrado” (Kelman & Dickey, 1995). Trinta e nove isolados com essas  
137 características foram submetidos aos seguintes testes: coloração de Gram,  
138 oxidação/fermentação, oxidase, catalase, podridão em tubérculo de batata (Hyman *et al.*, 2002)  
139 e patogenicidade em folhas destacadas de couve-chinesa (cv. Komachi). Para identificação ao  
140 nível de subespécie, foram utilizados os seguintes testes: crescimento a 37 °C, redução da  
141 sacarose, utilização de  $\alpha$ -metil glucosídeo, produção de ácido a partir de sorbitol, melibiose e  
142 lactose, sensibilidade a eritromicina, crescimento em NaCl a 5%, produção de fosfatase e  
143 lecitinase (Hyman *et al.*, 2002). Adicionalmente, foram realizados os testes de hidrólise da  
144 caseína (Dye, 1969) e cor da colônia em meio NGM (ágar nutritivo-glicerol-MnCl<sub>2</sub>), para  
145 diferenciar *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* de *Dickeya chrysanthemi* (Burkholder *et al.*)  
146 Samson *et al.* (Lee & Yu, 2005). Posteriormente, os isolados foram preservados em água  
147 esterilizada e armazenados na Coleção de Culturas de Bactérias do Laboratório de  
148 Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

149 Para a caracterização molecular dos isolados, inicialmente foram adotados os  
150 procedimentos para extração do DNA genômico total. Culturas bacterianas com 36-48 h foram  
151 repicadas para tubos contendo 5 ml de caldo nutritivo e incubadas durante toda a noite em

152 agitação à temperatura ambiente ( $25 \pm 4$  °C). Após este período, a concentração do cultivo foi  
153 ajustada em fotocolorímetro para  $A_{600} = 0,30$ . O método de purificação utilizado foi o CTAB  
154 (brometo de amônio-hexadeciltrimetil) (Wilson, 1999), com algumas modificações, como  
155 descrito a seguir. Transferiu-se 1,5 ml da suspensão bacteriana para microtubos de 1,5 ml,  
156 centrifugando-se duas vezes a  $14.000 \times g$  por 2 minutos, descartando-se o sobrenadante. As  
157 células bacterianas precipitadas ou “pellet” bacteriano foram resuspendidas em água destilada  
158 esterilizada (ADE) e submetidas à centrifugação por  $14.000 \times g$  por 3 min, sendo a água  
159 completamente eliminada. O “pellet” bacteriano foi resuspendido em 567  $\mu$ l de tampão TE,  
160 pH=8. Posteriormente, foram adicionados 30  $\mu$ l de SDS a 10 % e 3  $\mu$ l de proteinase K (20  
161 mg/ml), seguindo-se a cada adição dos produtos uma agitação vigorosa em agitador tipo  
162 vórtex. Os microtubos foram incubados a 37 °C por 1,5 h em estufa. Após esse período,  
163 adicionou-se 100  $\mu$ l de NaCl 5 M e agitou-se novamente. Em seguida, foi adicionado  
164 CTAB/NaCl (4,1 g de NaCl e 10 g de CTAB em 100 ml de água), incubando-se em banho-  
165 maria por 10 min a 65 °C. Adicionou-se então 780  $\mu$ l de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1),  
166 agitou-se manualmente por 10 min e centrifugou-se a  $14.000 \times g$  por 5 min. O sobrenadante foi  
167 removido para novos microtubos, onde foi adicionado fenol-clorofórmio-álcool isoamílico  
168 (25:24:1), seguindo-se agitação manual por 10 min e centrifugação a  $14.000 \times g$  por 5 min. O  
169 sobrenadante foi removido para novos microtubos, sendo adicionados 360  $\mu$ l de isopropanol  
170 para promover a precipitação do DNA por agitação manual suave dos microtubos. Após a  
171 precipitação do DNA, os microtubos foram incubados por 10 min a -70 °C e centrifugados por  
172 20 min a  $14.000 \times g$ . Após o descarte do sobrenadante, efetuou-se uma lavagem do DNA em  
173 70 % de etanol com centrifugação a  $14.000 \times g$  por 10 min. Após o descarte do etanol, o  
174 precipitado foi seco em rotação a vácuo por 5 min. O DNA foi então suspendido em 50  $\mu$ l de  
175 tampão TE pH=8 com RNase (10  $\mu$ g/ml) e, no dia seguinte, armazenado a 4 °C. O DNA foi  
176 quantificado por eletroforese em gel de agarose a 0,9%, adicionando-se 2  $\mu$ l de *Sybr Gold*®  
177 (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos) a cada amostra e visualizando-se através de

178 fotodocumentador Vilber Lourmat. Os DNAs foram armazenados a 4 °C até o momento da  
179 utilização.

180 A identificação molecular foi realizada com os iniciadores EXPCCR (5'-  
181 GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG-3') e EXPCCF (5'-  
182 GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA-3'), seguindo-se o protocolo para URP-PCR descrito  
183 por Kang *et al.* (2003). Realizou-se em seguida o nested-PCR com os produtos do URP-PCR e  
184 os iniciadores INPCCR (5'-GGCCAAGCAGTGCCTGTATATCC-3') e INPCCF (5'-  
185 TTCGATCACGCAACCTGCATTACT-3') (Kang *et al.*, 2003). Em ambos os protocolos de  
186 PCR não foram utilizados a gelatina nem o KCl. Os produtos de PCR foram obtidos através de  
187 eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão de corrida TBE 0,5 % a 100 V por 1 hora e  
188 visualizados em fotodocumentador. Vilber Lourmat. Os isolados referência positivo e negativo  
189 utilizados foram respectivamente *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc 867 e *P.*  
190 *betavasculatorum* Pb 787, obtidos da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto  
191 Biológico.

192

### 193 **Variabilidade de isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causadores** 194 **de podridão-mole em couve-chinesa**

195 A variabilidade de 39 isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* causadores de  
196 podridão-mole em couve-chinesa, oriundos das áreas de plantio de Camocim de São Félix, foi  
197 avaliada com base em componentes epidemiológicos da doença, sensibilidade a antibióticos e  
198 marcadores moleculares.

199

### 200 **Componentes epidemiológicos**

201 Os isolados foram cultivados em tubos contendo meio NYDA (ágar nutritivo-extrato de  
202 levedura-dextrose) durante 36-48 h e incubados à temperatura de 28±2 °C. A suspensão de

203 cada isolado foi efetuada em ADE e ajustada em fotocolorímetro (M3, Metronic) para  $A_{570} =$   
204 0,36, que correspondia a aproximadamente  $10^9$  UFC/ml.

205 Plantas de couve-chinesa (cv. Komachi) com 43 dias de idade, cultivadas em casa de  
206 vegetação, foram inoculadas na base do pecíolo da segunda folha definitiva pelo método de  
207 picada. Este método consistiu no ferimento do tecido vegetal com palito de dente esterilizado e  
208 deposição de 5 $\mu$ l da suspensão bacteriana no ferimento com o auxílio de um micropipetador.  
209 Após a inoculação, as plantas foram submetidas à câmara úmida por 6 h, constituída por sacos  
210 plásticos umedecidos, à temperatura entre 25 e 30 °C. As avaliações foram realizadas  
211 inicialmente a cada hora durante as primeiras seis horas após a inoculação e, posteriormente, a  
212 intervalos de seis horas até 48 h, quanto à incidência e severidade de sintomas da podridão-  
213 mole, considerando-se os seguintes componentes epidemiológicos: a) período de incubação  
214 (PI), determinado pelo número de horas entre a inoculação e o surgimento dos sintomas da  
215 doença; b) severidade inicial da doença (SEVI), às seis horas após a inoculação, estimada com  
216 o auxílio de escala descritiva de 1 a 9 (Ren *et al.*, 2001), onde: 1 = sem lesão no ponto de  
217 inoculação; 2 = lesões menores que 5 mm; 3 = lesões entre 5 e 10 mm; 4 = lesões maiores que  
218 10 mm, porém não atingindo as folhas; 5 = lesão alcançando o limbo foliar e o caule principal;  
219 6 = caule infectado, porém sem atingir as folhas não inoculadas; 7 = caule e folhas não  
220 inoculadas infectadas; 8 = planta inteira próxima a morte; 9 = planta morta; c) severidade final  
221 da doença (SEVF), às 48 h após a inoculação, estimada com o auxílio da escala descritiva; d)  
222 área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), calculada pela expressão: AACPD =  
223  $[\sum (y_i + y_{i+1})/2 \cdot d_{ii}] / n$ , onde  $y_i$  e  $y_{i+1}$  são os valores de severidade observados em duas  
224 avaliações consecutivas,  $d_{ii}$  o intervalo entre as avaliações e  $n$  a duração do período de  
225 avaliação (Fry, 1978).

226 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo  
227 cada repetição constituída por uma planta por vaso.

228



## 229 **Sensibilidade a antibióticos**

230 A sensibilidade dos isolados a 12 antibióticos foi determinada através de antibiograma,  
231 pelo método de difusão em ágar. A partir de colônias crescidas por 36-48 h em tubos contendo  
232 NYDA, foi feita a suspensão concentrada em ADE. Alíquotas de 3 ml da suspensão bacteriana  
233 foram adicionadas a Erlenmeyer contendo 100 ml de meio NYDA semi-sólido fundente,  
234 homogeneizando-se manualmente e vertendo-se em placas de Petri. Após a solidificação do  
235 meio, discos dos antibióticos amoxicilina (AMO) 10 µg, cefoxitina (CFO) 30 µg, clindamicina  
236 (CLI) 2 µg, eritromicina (ERI) 15 µg, gentamicina (GEN) 10 µg, ácido nalidixico (NAL) 30  
237 µg, oxacilina (OXA) 1 µg, rifampicina (RIF) 5 µg, trimetoprim (TRI) 5 µg, teicoplanina (TEC)  
238 30 µg, tetraciclina (TET) 30 µg e vancomicina (VAN) 30 µg foram colocados em quatro  
239 pontos equidistantes da placa de Petri. As placas foram mantidas em incubadora B.O.D.  
240 (Biochemistry Oxygen Demand) a 28±2 °C durante 24 horas e a avaliação realizada pela  
241 medição do halo de inibição do crescimento bacteriano em dois sentidos diametralmente  
242 opostos, com auxílio de uma régua milimetrada.

243 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo  
244 cada repetição constituída por um disco do antibiótico por placa.

245

## 246 **Perfis genômicos obtidos por Rep-PCR**

247 A extração do DNA dos isolados foi realizada como descrito na caracterização  
248 molecular. O DNA obtido foi quantificado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, colorido  
249 com brometo de etídio e visualizado no fotodocumentador Eagle Eye II da Stratagene. No Rep-  
250 PCR dos isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* foram utilizados os iniciadores  
251 ERIC, BOX e REP e o protocolo descrito por Louws *et al.* (1994). Os produtos do PCR foram  
252 obtidos através de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão de corrida TBE 0,5 % a  
253 80 V por 2 horas e visualizados no fotodocumentador Eagle Eye II da Stratagene.

254

**255 Agrupamentos dos isolados e correlação entre variáveis**

256 Considerando o conjunto de variáveis para componentes epidemiológicos, sensibilidade  
257 a antibióticos e marcadores moleculares Rep-PCR, os isolados de *P. carotovorum* subsp.  
258 *carotovorum* foram submetidos à análise de agrupamento baseada nos níveis de similaridade  
259 utilizando a distância Euclidiana estimada pelo método UPGMA (agrupamento aos pares pela  
260 média aritmética não ponderada). Adicionalmente, pela análise de correlação de Pearson, ao  
261 nível de 1% de probabilidade, foi avaliada a correlação entre as variáveis relacionadas ao  
262 desenvolvimento da podridão-mole (PI, SEVI, SEVF e AACPD), bem como destas com as  
263 variáveis de sensibilidade a antibióticos e a distância de ligação verificada no agrupamento  
264 baseado em marcadores moleculares. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o  
265 auxílio do programa STATISTICA for Windows (StatSoft Inc., Tulsa - OK, USA, 2000).

266

**267 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

268

**269 Caracterização dos isolados de bactérias causadoras de podridão-mole em couve-chinesa**

270 Foram obtidos 39 isolados de pectobactérias, cujas colônias com 36-48 h em meio  
271 CPG, visualizadas em lupa sob iluminação oblíqua, apresentaram aspecto de “vidro quebrado”  
272 (Kelman & Dickey, 1995). Esses isolados foram Gram negativos, metabolismo oxidativo-  
273 fermentativo, oxidase negativos, catalase positivos, com capacidade de causar podridão em  
274 tubérculos de batata e patogênicos a folhas destacadas de couve-chinesa, sendo considerados  
275 do gênero *Pectobacterium*.

276 Pelos testes para identificação ao nível de espécie e subespécie todos os isolados se  
277 enquadraram como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, uma vez que cresceram a 37 °C, não  
278 utilizaram  $\alpha$ -metil glucosídeo, não produziram ácido a partir de sorbitol, produziram ácido a

279 partir de lactose, foram resistentes à eritromicina, cresceram em NaCl a 5% e não produziram  
280 fosfatase e lecitinase. Com relação à redução da sacarose, 10,2% dos isolados apresentaram  
281 esta característica, enquanto 12,8% não foram capazes de produzir ácido a partir de melibiose.  
282 Estes dois últimos resultados não são incomuns, pois segundo Avrova *et al.* (2002), *P.*  
283 *carotovorum* subsp. *carotovorum* apresenta a maior diversidade fenotípica e genotípica entre as  
284 subespécies de *P. carotovorum*, demonstrada pelos perfis de AFLP. Segundo Seo *et al.* (2002),  
285 o crescimento a 36 °C e a redução da sacarose não parecem suficientemente confiáveis para  
286 diferenciar *P. carotovorum* de *P. atrosepticum*. Nestes casos, outros métodos devem ser  
287 utilizados para confirmar a identificação da subespécie (Yap *et al.*, 2004). Os testes adicionais  
288 demonstrando a hidrólise da caseína (Dye, 1969) e a cor creme da colônia em meio NGM,  
289 confirmaram a subespécie *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, diferenciando-a de *D.*  
290 *chrysanthemi* (Lee & Yu, 2005). Além disso, a identidade dos isolados foi confirmada por  
291 PCR, uma vez que todos os isolados apresentaram as bandas de 555 pb no UPR-PCR e 380 pb  
292 no nested-PCR, características de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Kang *et al.*, 2003).

293

#### 294 **Variabilidade de isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causadores** 295 **de podridão-mole em couve-chinesa**

296 Com base nos componentes epidemiológicos período de incubação (PI), severidade  
297 inicial (SEVI), severidade final (SEVF) e área abaixo da curva de progresso da doença  
298 (AACPD), os 39 isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* foram distribuídos em seis  
299 grupos de similaridade quando considerado 50% da distância total de ligação pelo método  
300 UPGMA (Figura 1).

301 Não foram encontrados trabalhos que utilizem componentes epidemiológicos para o  
302 estudo da variabilidade de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Na maioria das pesquisas que  
303 envolvem testes de patogenicidade, as avaliações são realizadas 2 a 3 dias após a inoculação

304 (Seo *et al.*, 2001, 2002), não havendo preocupação com o início dos sintomas (PI) e o  
305 progresso dos mesmos (AACPD), mas somente com a severidade final (SEVF). No entanto,  
306 segundo Bartz (1981) o período de incubação da podridão-mole em frutos de tomate variou de  
307 menos de 24 h até três semanas. Os baixos períodos de incubação observados (de 4 a 5,4 h)  
308 evidenciaram a velocidade com que a bactéria infecta os tecidos a partir da base da folha,  
309 progredindo rapidamente para o caule e causando o colapso da planta. A SEVI variou de 0,6 a  
310 2,0 e a SEVF de 3,0 a 6,2 indicando a existência de variabilidade na virulência entre os  
311 isolados, confirmada pelos valores registrados de AACPD (2,01 a 4,16), variável que constitui  
312 uma forte medida da atuação do isolado no desenvolvimento da doença (Fry, 1978). Do ponto  
313 de vista epidemiológico, a variabilidade patogênica tem implicações diretas no manejo da  
314 doença (McDonald & Linde, 2002).

315 Entre os componentes epidemiológicos, foi constatada correlação significativa ( $P \leq 0,01$ )  
316 somente de PI com SEVI ( $r = -0,57$ ) (Tabela 1), indicando que a quantidade de podridão-mole  
317 está inversamente relacionada ao tempo de início dos sintomas. Considerando que essa doença  
318 é monocíclica (Kikumoto, 1980), a ausência de correlação de PI com SEVF e AACPD é  
319 compreensível, pois a velocidade da doença não é influenciada pelo período de incubação (Hau  
320 & Vallavieille-Pope, 1998). Da mesma forma, a ausência de correlações significativas entre  
321 SEVI, SEVF e AACPD indica a independência entre essas variáveis, que no caso da podridão-  
322 mole em couve-chinesa podem ser influenciadas de diferentes maneiras em função do isolado e  
323 quantidade de inóculo do patógeno, da intensidade do ferimento no pecíolo, do genótipo e  
324 estágio fenológico do hospedeiro, e das condições ambientais predominantes (Kikumoto,  
325 1980).

326 Baseado na sensibilidade aos 12 antibióticos, os isolados de *P. carotovorum* subsp.  
327 *carotovorum* foram distribuídos em 14 grupos de similaridade quando considerado 50% da  
328 distância total de ligação pela análise de agrupamento (Figura 2), indicando a existência de  
329 variabilidade entre os isolados quanto à sensibilidade aos antibióticos. Não foram encontrados

330 isolados com suscetibilidade ou resistência a todos os antibióticos analisados. A maioria dos  
331 antibióticos foi capaz de inibir em certo grau o crescimento de vários isolados da bactéria.  
332 Segundo Romeiro (2005), a resistência bacteriana a antibióticos é governada por mecanismos  
333 genéticos e os genes para resistência podem estar presentes, tanto no cromossomo principal  
334 como em plasmídeos. Em alguns casos, toda a população bacteriana já é naturalmente  
335 resistente a um ou vários antibióticos e existem vários exemplos em bacteriologia de plantas,  
336 sendo denominado resistência múltipla constitutiva, embora essa característica não tenha sido  
337 avaliada no presente estudo. Foram constatadas correlações significativas ( $P \leq 0,01$ ) entre  
338 sensibilidade a gentamicina e PI ( $r = -0,41$ ), bem como entre sensibilidade a clindamicina e  
339 SEVF ( $r = -0,45$ ) (Tabela 1), sugerindo que esses antibióticos podem ser utilizados para  
340 detectar variabilidade na virulência e/ou agressividade entre isolados de *P. carotovorum* subsp.  
341 *carotovorum*. Nem sempre são encontrados antibióticos capazes de estabelecer esta  
342 diferenciação, como relatado para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson  
343 por Costa *et al.* (2001).

344 A utilização dos marcadores moleculares REP, ERIC e BOX no Rep-PCR revelou  
345 grande variabilidade genética entre os isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, pois  
346 foram formados 32 grupos de similaridade quando considerado 50% da distância de ligação  
347 total (Figura 3). É importante destacar que os marcadores utilizados são baseados em  
348 seqüências repetitivas conservadas dispersas no genoma bacteriano (Louws *et al.*, 1999), sendo  
349 utilizados para estudar a diversidade genética em bactérias especialmente as Gram negativas  
350 (Versalovic *et al.*, 1991). Cada indicador gera um padrão de bandas específico que pode variar  
351 em tamanho e em distribuição. A variabilidade genética de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*  
352 já foi relatada com a utilização de outras técnicas moleculares como AFLP (Avrova *et al.*,  
353 2002), PCR-RFLP (Darrasse *et al.*, 1994; Helias *et al.*, 1998 e ERIC-PCR (Seo *et al.*, 2000,  
354 2001; 2002). Alta diversidade genética é freqüente nesta subespécie, mesmo quando os

355 isolados são provenientes de um único hospedeiro como a batata (Mäki-Valkama &  
356 Karjalainen, 1994) ou obtidos de uma mesma região na mesma estação de plantio (Yap *et al.*,  
357 2004). A diversidade dentro da população de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* pode resultar  
358 de diversos fatores tais como mudanças genéticas, grande gama de plantas hospedeiras e ampla  
359 distribuição geográfica (Avrova *et al.*, 2002; Seo *et al.*, 2002). Do ponto de vista evolutivo, a  
360 variabilidade genética das populações é importante por determinar o potencial de adaptação do  
361 organismo às diferentes condições sob as quais se encontraram (McDonald & Linde, 2002).  
362 Uma associação entre diversidade e o nicho ecológico parece ocorrer, já que grande  
363 diversidade tem sido encontrada em patógenos habitantes de ambientes heterogêneos como o  
364 solo, a exemplo de *Burkholderia cepacia* em rizosfera de plantas de milho (Dalmastrri *et al.*,  
365 1999) e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* no presente estudo.

366         Correlações significativas entre as distâncias de ligação registradas pelos marcadores  
367 moleculares e os componentes epidemiológicos da doença não foram constatadas, ou seja, os  
368 marcadores utilizados não amplificaram regiões relacionadas com genes que codificam as  
369 características associadas à doença. Portanto, neste estudo não houve relação entre  
370 variabilidade genética e variabilidade patogênica dos isolados de *P. carotovorum* subsp.  
371 *carotovorum* oriundos de couve-chinesa. Observação semelhante foi relatada na Coreia quando  
372 utilizadas as técnicas de ERIC-PCR (Seo *et al.*, 2001) e RFLP para rDNA 16S, ISRs e gene *pel*  
373 Seo *et al.* (2002). Por outro lado, Yap *et al.* (2004) relataram que os isolados menos virulentos  
374 de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* apresentavam uma estrutura cromossômica incomum  
375 sugerindo que um pulsotipo (tipo obtido em eletroforese em gel de campo pulsado) particular  
376 estava correlacionado com virulência. Isto foi comprovado, pois o isolado menos virulento não  
377 era capaz de oxidar celobiose e não possuía vários genes *hrp* e *hrc*.

378         A ausência de correlações significativas dos componentes epidemiológicos com a  
379 maioria das variáveis indica a pouca validade da sensibilidade a antibióticos e de marcadores

380 moleculares do tipo Rep-PCR na detecção de variabilidade patogênica em populações de *P.*  
381 *carotovorum* subsp. *carotovorum*, apesar do esforço que tem sido dedicado ao estudo da  
382 variabilidade em fitopatógenos baseada em características não relacionadas à  
383 patogenicidade/virulência (Brown, 1998).

384 A elevada variabilidade verificada entre os isolados de *P. carotovorum* subsp.  
385 *carotovorum* oriundos de diferentes áreas cultivadas com couve-chinesa, no município de  
386 Camocim de São Félix, em Pernambuco aponta para a necessidade de uma maior atenção em  
387 estudos de identificação, detecção, epidemiologia e controle da podridão-mole, uma vez que  
388 isolados bem diversos dessa subespécie podem ser encontrados em habitats muito próximos e  
389 serem considerados como atípicos ou pertencentes a subespécies diferentes. As causas do  
390 surgimento da variabilidade entre os isolados do patógeno permanecem desconhecidas e  
391 necessitam ser investigadas.

392

393

#### AGRADECIMENTOS

394

395 Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de auxílio financeiro (Proc.  
396 479.622/2004-3) e bolsas de Produtividade em Pesquisa.

397

398

399

400

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

401 AVROVA, A.O., HYMAN, L.J., TOTH, R.L. & TOTH, I.K. Application of amplified  
402 fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot  
403 bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. Applied and Environmental  
404 Microbiology 68:1499-1508. 2002.

- 405 BROWN, J.K.M. Surveys of variation in pathogen populations and their application to disease  
406 control. In: Jones, D.G. (Ed.) The Epidemiology of Plant Diseases. Dordrecht. Kluwer. 1998.  
407 pp.73-102.
- 408 CEASA-PE. Calendário de comercialização e outras informações de hortigranjeiros CEASA-  
409 PE. Recife: Secretaria de Agricultura, 2005. 4 p.
- 410 COSTA, V.S.O., MARIANO, R.L.R & MICHEREFF, S.J. Variabilidade de isolados de  
411 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no Estado de Pernambuco. Summa Phytopathologica  
412 27:182-189.2001.
- 413 DALMASTRI, C., CHIARINI, L., CANTALE, C., BEVIVINO, A. & TABACCHIONI, S. Soil  
414 type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia*  
415 *cepacia* populations. Microbial Ecology 38:273-284. 1999.
- 416 DARRASSE, A., PRIOU, S., KOTOUJANSKY, A. & BERTHEAU, Y. PCR and restriction  
417 fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in  
418 relation to potato disease. Applied and Environmental Microbiology 60:1437-1443. 1994.
- 419 DE BOER, S.H, VERDONCK, L., VRUGGINK, H., HARJU, P., BAANG, H.O. & DE LEY,  
420 J. Serological and biochemical variation among potato strains of *Erwinia carotovora* subsp.  
421 *atroseptica* and their taxonomic relationship to other *E. carotovora* strains. Journal of applied  
422 bacteriology 63:487-495. 1987.
- 423 DE BOER, S.H. & KELMAN, A. *Erwinias* soft rot group. In: SCHAAD, N.W., JONES, J.B. e  
424 CHUN, W. (Eds.) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3 ed. Saint  
425 Paul: APS, 2001. pp. 56-72.
- 426 DYE, D.W.A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The “carotovora” group. New  
427 Zealand Journal of Science 12:81-97. 1969.
- 428 FESSEHAIE, A., DE BOER, S.H. & LÉVESQUE, C.A. Molecular characterization of DNA  
429 encoding 16s-23s rRNA intergenic spacer regions and 16s rRNA of pectolytic *Erwinia* species.  
430 Canadian Journal of Microbiology 48:387-398. 2002.



- 431 FRY, W.E. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide effects for  
432 integrated control of potato late blight. *Phytopathology* 68:1650-1655. 1978.
- 433 HÉLIAS, V., LE ROUX, A.C., BERTHEAU, Y.; ANDRIVON, D.; GAUTHIER, J. P. &  
434 JOUAN, B. Characterisation of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia*  
435 *carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based  
436 methods. *European Journal of Plant Pathology* 104:685-699.1998.
- 437 HYMAN, L. J., TOTH, I. K. & PÉROMBELON, M. C. M. Isolation and identification. In:  
438 PÉROMBELON, M.C.M. & VAN DER WOLF, J.M. Methods for the detection and  
439 quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp.  
440 *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. 2. ed. Invergowrie: Scottish Crop Research  
441 Institute, 2002. 82 p.
- 442 KANG, H.W., KWON, S.W. & GO, S.J. PCR-based specific and sensitive detection of  
443 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR  
444 fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology* 52:127-133. 2003.
- 445 KELMAN, A. & DICKEY, R.S. Detection of *Erwinia carotovora* and *E. chrysanthemi*. In:  
446 SAETTLER, A.W.; SCHAAD N.W. & ROTH, D.A. Detection of bacteria en seed and other  
447 planting material. Saint Paul: APS, 1995. pp. 76-91.
- 448 KIKUMOTO, T. Ecological aspects of soft rot bacteria. Report of the Institute for Agricultural  
449 Research (Tohoku University) 31:19-41. 1980.
- 450 LEE, Y.A. & YU, C.P. A differential medium for the isolation and rapid identification of a  
451 plant soft rot pathogen, *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Microbiology Methods* 64:200-206.  
452 2006.
- 453 LOUWS, F., FULBRIGHT, D.W., STEPHENS, C.T. & BRUIJN, F.J. Specific genomic  
454 fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains  
455 generated with repetitive sequence and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*  
456 60:2286-2295. 1994.

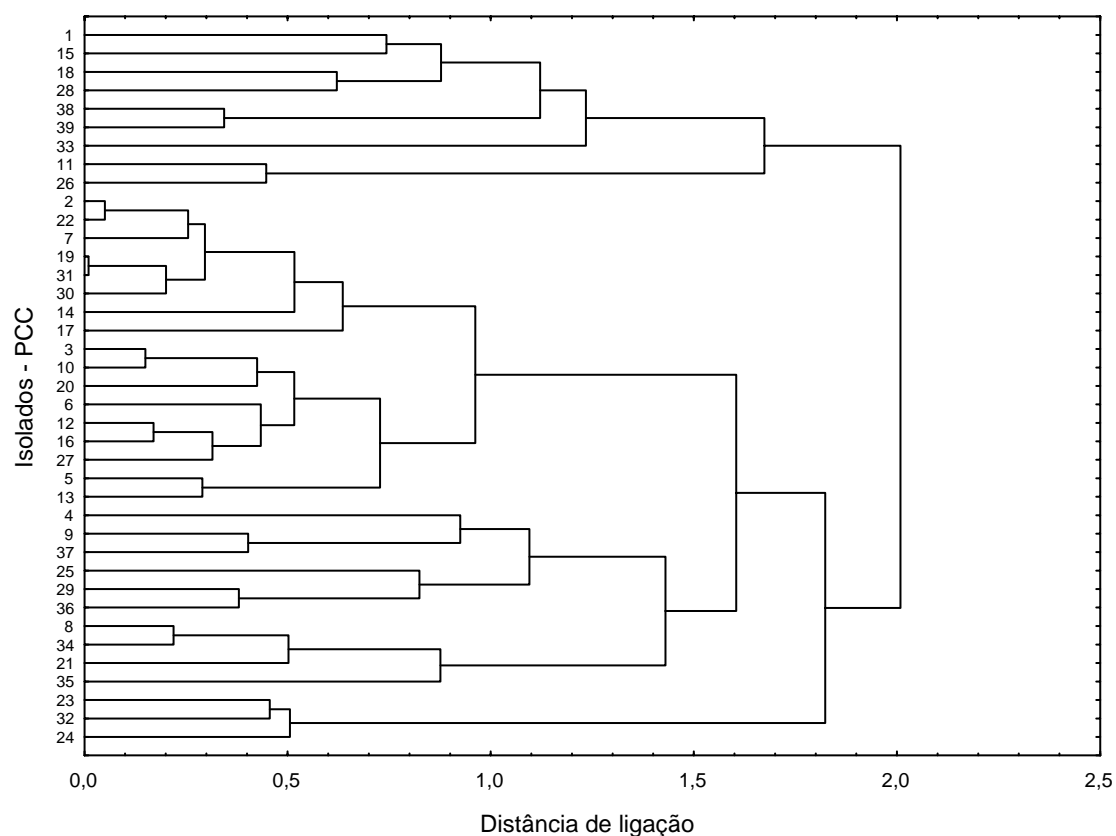
- 457 LOUWS, F.J., RADEMAKER, J.L.W. & DE BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based  
458 genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, Detection, and Disease diagnosis. Annual  
459 Review of Phytopathology 37:81-125. 1999.
- 460 MÄKI-VALKAMA T. & KARJALAINEN R. Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp.  
461 *atroseptica* and *carotovora* by RAPD-PCR. Annals of Applied Biology 125:301-309. 1994.
- 462 MEW, T.W., HO, W.C. & CHU, I. Infectivity and survival of soft-rot bacteria in Chinese  
463 cabbage. Phytopathology 66:1325-1327. 1976.
- 464 MCDONALD, B.A. & LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and  
465 durable resistance. Annual Review of Phytopathology 40:349-379. 2002.
- 466 REN, J., PETZOLDT, R. & DICKSON, M.H. Genetics and population improvement resistance  
467 to bacterial soft rot Chinese cabbage. Euphytica 117: 197-207. 2001.
- 468 ROMEIRO, R.S. Bactérias fitopatogênicas. 2 ed. Viçosa. Imprensa Universitária da UFV.  
469 2005.
- 470 SEO, S.T., FURUYA, N. & TAKANAMI, Y. Genetic diversity in Thai strains of *Erwinia*  
471 *carotovora* subsp. *carotovora* based on ERIC profiles and RFLP of *pel* gene. Journal of the  
472 Faculty of Agriculture (Kyushu University) 45:15-19. 2000.
- 473 SEO, S.T., FURUYA, N., LIM, C. K., TAKANAMI, Y. & TSUCHIYA, K. Phenotypic and  
474 genetic diversity of *Erwinia carotovora* spp. *carotovora* strain from Asia. Journal  
475 Phytopathology 150:120-127. 2002.
- 476 SEO, S.T., FURUYA, N., LIM, C.K., TSUCHIYA, K. & TAKANAMI, Y. Variation of  
477 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from Korea. Journal of the Faculty of  
478 Agriculture (Kyushu University) 45:431-436. 2001.
- 479 SEO, S.T., KOO, J.H., HUR, J.H. & LIM, C.K. Characterization of Korean *Erwinia*  
480 *carotovora* strains from potato and Chinese cabbage. Plant Pathology Journal 20:283-288.  
481 2004.

- 482 SILVA, A.M.F. Levantamento da intensidade da podridão-mole da alface e couve-chinesa nas  
483 regiões da mata e agreste do estado de Pernambuco e determinação do tamanho das amostras  
484 para avaliação da incidência da doença. (Dissertação de Mestrado). Recife. Universidade  
485 Federal Rural de Pernambuco. 2005.
- 486 SILVEIRA, E.B, MARIANO, R.L.R. & MICHEREFF, S.J. Variabilidade de isolados de  
487 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* provenientes de melão produzido no estado do Rio Grande  
488 do Norte. Summa Phytopathologica 29:255-261.2003.
- 489 TAKATSU, A., MELLO, S.C.M. & GARCIA, E.S.O.B. Fruto de pimentão como meio  
490 parcialmente seletivo para isolamento de *Erwinia carotovora*. Fitopatologia Brasileira 6:550-  
491 551. 1981.
- 492 TOTH, I.K., AVROVA, A. O. & HYMAN, L. J. Rapid identification and differentiation of the  
493 soft rot *Erwinias* by 16s-23s intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length  
494 polymorphism analyses. Applied and Environmental Microbiology 67:4070-4076. 2001.
- 495 VERSALOVIC, J., KOEUTH, T. & LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in  
496 eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research  
497 19:6823-6831. 1991.
- 498 WARD, L.J. & DE BOER, S.H. A DNA probe specific for serologically diverse strains of  
499 *Erwinia carotovora*. Phytopathology 80:665-669. 1990.
- 500 WILSON K. Preparation of genomic bacteria. In: AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.;  
501 KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A. & STRUHL, K. (Ed.).  
502 Short protocols in molecular biology. New York: John Wiley, 1999. pp. 2-14.
- 503 YAP, M.N., BARAK, J.D. & CHARKOWSKI, A.O. Genomic diversity of *Erwinia carotovora*  
504 subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. Applied and Environmental Microbiology  
505 70: 3013-3023. 2004.

506 **TABELA 1.** Matriz de correlações do período de incubação (PI), severidade inicial (SEVI),  
 507 severidade final (SEVF), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), com  
 508 sensibilidade aos antibióticos e distância de ligação (DLIG) por marcadores moleculares,  
 509 analisadas para 39 isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* procedentes  
 510 de diferentes áreas de plantio de couve-chinesa do município de Camocim de São Félix, estado  
 511 de Pernambuco

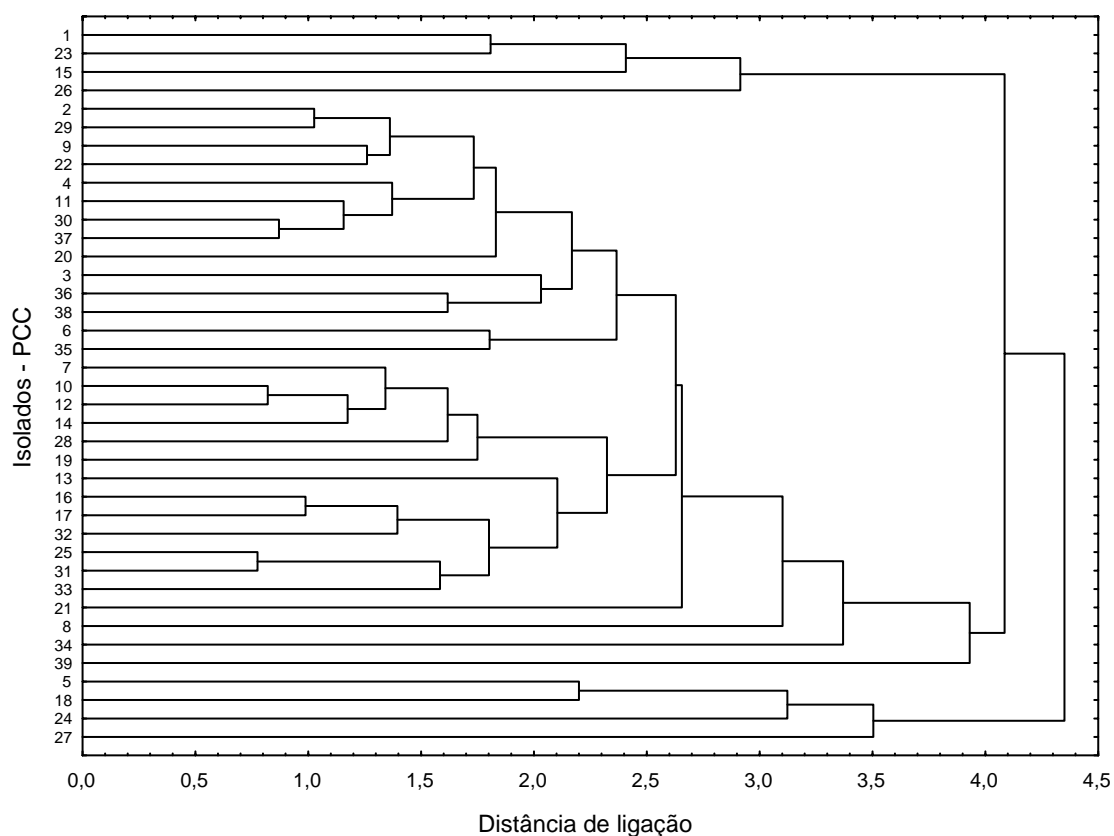
Variáveis	Coeficiente de correlação			
	PI	SEVI	SEVF	AACPD
SEVI	-0,57*	-	-	-
SEVF	-0,24	0,30	-	-
AACPD	-0,15	-0,01	0,34	-
AMO <sup>1</sup>	0,01	-0,04	-0,08	-0,36
CFO	0,18	-0,05	0,03	-0,12
CLI	0,07	-0,14	-0,45*	-0,18
ERI	0,03	0,19	0,13	-0,02
GEN	-0,41*	0,25	0,18	0,10
NAL	-0,16	0,18	0,18	0,01
OXA	0,05	-0,14	-0,32	-0,17
RIF	0,06	0,12	0,06	-0,15
TRI	-0,10	0,16	0,11	-0,21
TEC	-0,09	0,03	-0,10	-0,27
TET	0,09	-0,04	0,04	-0,29
VAN	0,13	-0,15	-0,22	0,20
DLIG	0,13	-0,04	0,21	-0,12

512  
 513 \*Coeficientes seguidos por asterisco são significativos a  $P \leq 0,01$ .  
 514 <sup>1</sup>Amoxicilina (AMO), cefoxitina (CFO), clindamicina (CLI), eritromicina (ERI), gentamicina  
 515 (GEN), ácido nalidixico (NAL), oxacilina (OXA), rifampicina (RIF), trimetoprim (TRI),  
 516 teicoplanina (TEC), tetraciclina (TET) e vancomicina (VAN).



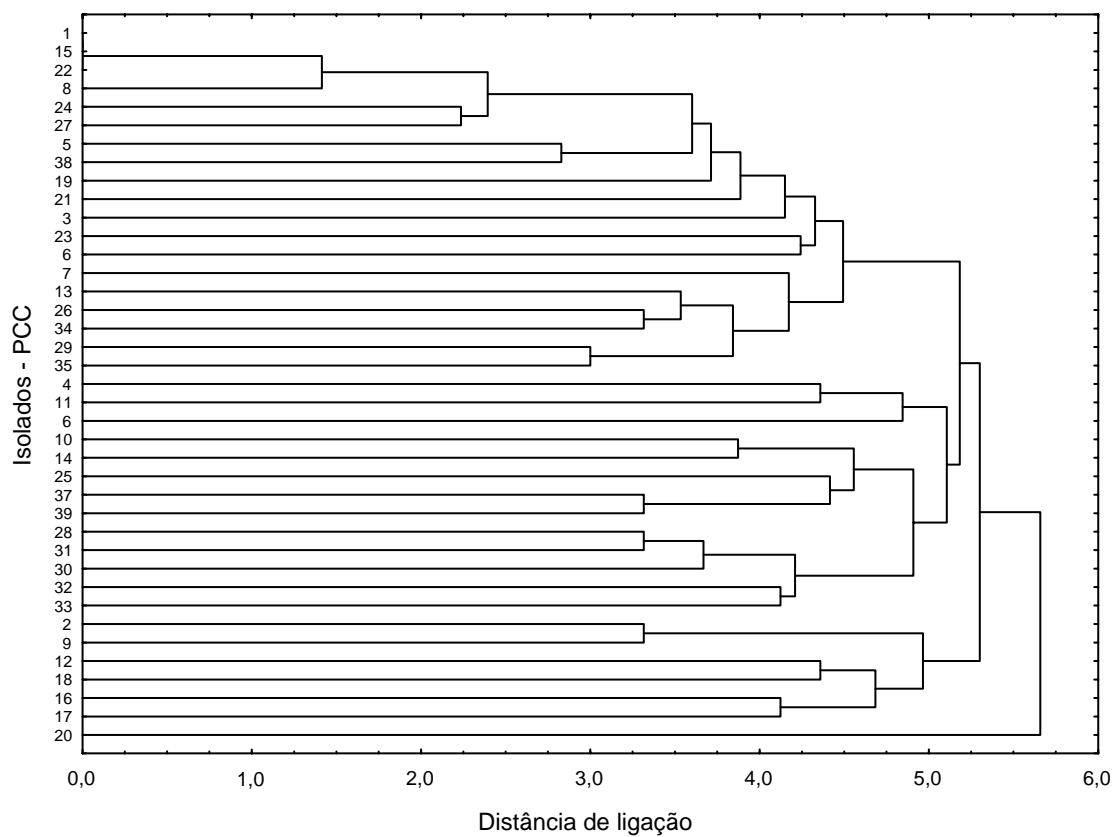
517

518 **FIGURA 1.** Agrupamento de 39 isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*  
 519 procedentes de diferentes áreas de plantio de couve-chinesa do município de Camocim de São  
 520 Félix, estado de Pernambuco, baseado no método UPGMA, considerando os componentes  
 521 epidemiológicos da podridão-mole: período de incubação, severidade inicial, severidade final e  
 522 área abaixo da curva de progresso da doença.



523

524 **FIGURA 2.** Agrupamento de 39 isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*  
 525 procedentes de diferentes áreas de plantio de couve-chinesa do município de Camocim de São  
 526 Félix, estado de Pernambuco, baseado no método UPGMA, considerando a sensibilidade aos  
 527 antibióticos amoxicilina, cefoxitina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, ácido nalidixico,  
 528 oxacilina, rifampicina, trimetoprim, teicoplanina, tetraciclina e vancomicina.



529

530 **FIGURA 3.** Agrupamento de 39 isolados de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*  
 531 procedentes de diferentes áreas de plantio de couve-chinesa do município de Camocim de São  
 532 Félix, estado de Pernambuco, baseado no método UPGMA, considerando as bandas obtidas  
 533 nos marcadores moleculares REP, ERIC e BOX utilizados no Rep-PCR.

## **Capítulo III**

---

**Caracterização de solos de Pernambuco quanto à  
supressividade à *Pectobacterium carotovorum* subsp.  
*carotovorum***



1 **Caracterização de solos de Pernambuco quanto à supressividade à *Pectobacterium***  
2 ***carotovorum* subsp. *carotovorum*\***

3  
4 **Indira del C.M. Alvarado<sup>1\*\*</sup>, Sami J. Michereff<sup>1\*\*\*</sup>, Rosa L.R. Mariano<sup>1\*\*\*</sup>, Adriano M.F.**  
5 **Silva<sup>1</sup> & Clístenes W.A. Nascimento<sup>2\*\*\*</sup>**

6  
7 Área de Fitossanidade<sup>1</sup> e Área de Solos<sup>2</sup>, Departamento de Agronomia, Universidade Federal  
8 Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife, PE, fax: (81) 3320-6205; e-mail:  
9 [rmariano@truenet.com.br](mailto:rmariano@truenet.com.br)

10  
11 (Aceito para publicação em: //)

12 Autor para correspondência: Rosa L.R. Mariano

13 \_\_\_\_\_  
14 ALVARADO, I.C.M., MICHEREFF, S.J., MARIANO, R.L.R., SILVA, A.M.F. &  
15 NASCIMENTO, C.W.A. Caracterização de solos de Pernambuco quanto a supressividade à  
16 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Fitopatologia Brasileira.

17 **RESUMO**

18 A podridão-mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc)

19 \_\_\_\_\_  
20 \*Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade Federal Rural de Pernambuco  
21 (2006)

22 \*\*Bolsista da CAPES

23 \*\*\* Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq

24 é fator limitante para o cultivo de olerícolas no estado de Pernambuco. As características do  
25 solo e os fatores ambientais podem influenciar a população de Pcc e o desenvolvimento da  
26 doença. Este trabalho objetivou avaliar a taxa de extinção da população de Pcc em 24 amostras  
27 de solos de Pernambuco e analisar as características físicas, químicas e microbiológicas dos  
28 solos associadas com a supressividade ou conducividade ao patógeno. No estudo da influência  
29 dos solos na população de Pcc, utilizou-se mutante resistente a rifampicina (Pcc127<sup>Rif</sup>), sendo  
30 calculada a taxa de extinção relativa da população (TEP) que variou de 0,0547 a 0,6327 log  
31 (UFC)/dia. Seis solos mostraram-se supressivos a Pcc127<sup>Rif</sup> enquanto cinco evidenciaram  
32 conducividade. Os grupos de solos baseados na TEP de Pcc127<sup>Rif</sup> não apresentaram relação  
33 com os municípios de coleta, tipos de coberturas do solo na época da coleta ou classes texturais  
34 dos solos. Considerando-se todos os solos, não foram constatadas correlações significativas  
35 ( $P \leq 0,05$ ) entre a TEP de Pcc127<sup>Rif</sup> e as características químicas, físicas e microbiológicas dos  
36 solos. Nos seis solos mais supressivos, a TEP de Pcc127<sup>Rif</sup> se correlacionou significativamente  
37 com a densidade aparente do solo ( $r = 0,76$ ), populações de bactérias totais ( $r = 0,82$ ) e *Bacillus*  
38 spp. ( $r = 0,80$ ). A população de *Bacillus* spp. se correlacionou com a densidade aparente, mas  
39 não com a população de bactérias totais. Nos cinco solos mais condutivos houve correlação  
40 entre a TEP de Pcc127<sup>Rif</sup> e a população de *Bacillus* spp. ( $r = -0,86$ ).

41 **Palavras-chave adicionais:** podridão-mole, solos supressivos, solos condutivos, ecologia.

## 42 **ABSTRACT**

43 **Characterization of soils from Pernambuco State related to suppressiveness to**  
44 ***Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum***

45 The soft-rot caused by *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) is a limiting factor for  
46 vegetable cropping in the Pernambuco State. Soil characteristics and environmental factors  
47 may influence Pcc population and development of soft-rot. This work aimed to evaluate the  
48 extinction rate of Pcc population in 24 soil samples of Pernambuco and analyze physical,

49 chemical and microbiological soil characteristics associated with suppressiveness or conductivity  
50 to the pathogen. In the study of soil influence on Pcc population a rifampicin resistant mutant  
51 was utilized (Pcc127<sup>Rif</sup>). The extinction rate of population (TEP) was calculated and ranged  
52 from 0.0547 to 0.6327 log (CFU)/d. Six soils showed suppressiveness to Pcc127<sup>Rif</sup> while five  
53 presented conductivity. The soil groups based on the TEP of Pcc127<sup>Rif</sup> did not correlate with  
54 municipalities, types of vegetation cover at the sampling time or soil textural classes.  
55 Considering all soils there were no significant correlations ( $P \leq 0,05$ ) among TEP of Pcc127<sup>Rif</sup>  
56 and chemical, physical and microbiological characteristics of soils. Considering the six more  
57 suppressive soils the TEP of Pcc127<sup>Rif</sup> significantly correlated with soil apparent density ( $r =$   
58 0.76), total bacterium population ( $r = 0.82$ ) and *Bacillus* spp. ( $r = 0.80$ ). The *Bacillus* spp.  
59 population correlated with apparent density, but not with total bacterium population.  
60 Considering the five more conducive soils there was correlation between TEP of Pcc127<sup>Rif</sup> and  
61 *Bacillus* spp. population ( $r = -0.86$ ).

---

## 62

## 63

## 64 INTRODUÇÃO

## 65

66 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben *et al.* é uma  
67 enterobactéria que causa podridão-mole em ampla gama de plantas hospedeiras em todo o  
68 mundo (Pérombelon & Kelman, 1980). A podridão-mole é uma doença de importância  
69 econômica em diversas culturas, incluindo couve-chinesa (*Brassica pekinensis* L.) (Kikumoto,  
70 1980), alface, beterraba, couve, pimentão, repolho e tomate (Pérombelon, 2002). Em  
71 levantamentos realizados no estado de Pernambuco em 2004, a podridão-mole teve prevalência  
72 de 100% em cultivos de couve-chinesa e de 45,2% em cultivos de alface, evidenciando a  
73 importância da doença para essas olerícolas (Silva, 2005).

74 O controle da podridão-mole é muito difícil, uma vez que *P. carotovorum* subsp.  
75 *carotovorum* sobrevive em restos culturais infectados, na rizosfera de plantas cultivadas ou  
76 invasoras, na água, no solo, como epifítica na filosfera de plantas hospedeiras ou invasoras e  
77 em insetos (Kikumoto, 1980; Pérombelon & Kelman, 1980). As características do solo,  
78 juntamente com os fatores ambientais, podem influenciar na população de *P. carotovorum*  
79 subsp. *carotovorum*, acelerando ou retardando o desenvolvimento da podridão-mole  
80 (Pérombelon & Kelman, 1980).

81 O fenômeno de alguns solos prevenirem naturalmente o estabelecimento de patógenos  
82 ou inibirem as suas atividades patogênicas é denominado supressividade e estes solos de  
83 supressivos, o oposto de solos condutivos. A distinção entre supressão à doença e supressão ao  
84 patógeno deve ser efetuada, sendo esta última a habilidade de um solo em reduzir a densidade  
85 de inóculo do patógeno e sua atividade saprofítica, enquanto a primeira a capacidade do solo de  
86 reduzir a intensidade da doença, mesmo com alta densidade de inóculo e capacidade de  
87 sobrevivência do patógeno (Cook & Baker, 1983).

88 A supressividade de solos é uma característica desejável, pois possibilita o controle de  
89 doenças com maior eficiência e menores danos ambientais. Fatores que determinam a  
90 supressividade devem ser estudados visando à utilização dessas informações na indução da  
91 supressividade em solos conducentes. Interações complexas entre fatores abióticos e bióticos  
92 do solo podem conduzir à supressividade, motivo pelo qual, propriedades do solo como textura  
93 e tipo de argila, densidade de partículas e densidade aparente, teores de nitrogênio (N) total,  
94 fósforo (P), potássio (K), carbono (C), alumínio (Al), cálcio (Ca), magnésio (Mg), sódio (Na) e  
95 matéria orgânica (MO), relação C/N, condutividade elétrica e potencial hidrogeniônico (pH),  
96 assim como densidade, biomassa e atividade microbiana, dentre outras, podem ser usadas  
97 como indicadores da supressividade (Hornby, 1983; Chellemi & Porter, 2001; Bettiol & Ghini,  
98 2005).

99 Não existem estudos sobre a supressividade de solos a populações de *P. carotovorum*  
100 subsp. *carotovorum* em regiões tropicais, motivo pelo qual este trabalho teve como objetivos  
101 avaliar a taxa de extinção da população desse patógeno em solos de Pernambuco e analisar as  
102 características físicas, químicas e biológicas dos solos associadas com a supressividade ou  
103 condutividade ao patógeno.

104

105

## MATERIAL E MÉTODOS

106

### 107 **Coletas das amostras de solo**

108 Foram coletadas amostras de solo em 24 áreas selecionadas ao acaso, localizadas no  
109 estado de Pernambuco (Tabela 1). As coletas foram efetuadas durante os meses de maio e  
110 junho de 2005, sendo que em cada área foram removidas, aleatoriamente, seis sub-amostras de  
111 5 kg de solo a uma profundidade de 0-20 cm, totalizando 30 kg de solo/área. Em cada área  
112 foram obtidas informações adicionais sobre a cultura plantada e a localização geográfica foi  
113 avaliada pelo Sistema de Posicionamento Global (GPS 48 Personal Navigator, Garmin  
114 International, Olathe, KS, USA).

115 As amostras de solo foram secas em ambiente coberto durante dez dias e depois  
116 peneiradas para retirada de resíduos, sendo mantidas em sacos de nylon, em casa de vegetação  
117 até o processamento.

118

### 119 **Análises físicas, químicas e microbiológicas dos solos**

120 As amostras de solos foram submetidas a análises físicas e químicas, que consistiram na  
121 determinação da densidade aparente ( $\text{g/cm}^3$ ), densidade da partícula ( $\text{g/cm}^3$ ), porcentagem de  
122 areia, argila e silte, pH em água, K, Ca, Mg, Na e Al trocáveis ( $\text{cmolc/dm}^3$ ), acidez potencial

123 (H+Al) (cmolc/dm<sup>3</sup>), C orgânico (g/kg), soma de bases (SB), saturação de bases (v) e saturação  
124 por alumínio (m) (EMBRAPA, 1997).

125 Nas análises microbiológicas, de cada amostra de solo foram retiradas 10 sub-amostras  
126 de 10 g, as quais foram homogeneizadas, sendo efetuadas diluições em série (1:10) e  
127 plaqueamento nos meios BDA (batata-dextrose-ágar), com e sem adição de 250 ppm de  
128 tetraciclina, para isolamento de fungos totais e bactérias totais, respectivamente; e meio B de  
129 King (KB) para isolamento de *Pseudomonas* spp. fluorescentes. No isolamento de *Bacillus*  
130 spp. as diluições foram submetidas a banho-maria de 80 °C por 20 minutos, com posterior  
131 distribuição em meio BDA, sem adição de antibiótico. As culturas foram incubadas a 25±2 °C,  
132 sob alternância luminosa (12 h claro/12 h escuro), em incubadoras tipo B.O.D. (Biochemistry  
133 Oxygen Demand). As populações bacterianas foram avaliadas após 48 horas de incubação,  
134 enquanto os fungos foram avaliados após cinco dias. Cada população resultou do número  
135 médio de colônias em seis placas, sendo expressas em unidades formadoras de colônias por  
136 grama de solo (UFC/g).

137

### 138 **Influência dos solos na população de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum***

139 Foram utilizadas as 24 amostras de solo e um isolado de *P. carotovorum* subsp.  
140 *carotovorum* (Pcc127<sup>Rif</sup>), mutante espontâneo resistente ao antibiótico rifampicina (100 ppm),  
141 obtido a partir do isolado selvagem Pcc127, proveniente de planta de couve-chinesa (*Brassica*  
142 *pekinensis* L.) com sintomas típicos de podridão-mole. O isolado Pcc127<sup>Rif</sup> apresentou  
143 comportamento similar ao isolado selvagem em relação ao crescimento em meio líquido NYD  
144 (caldo nutritivo-extrato de levedura-dextrose) e patogenicidade a plantas de couve-chinesa (cv.  
145 Komachi).

146 No preparo do inóculo de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc127<sup>Rif</sup>), a partir de  
147 cultura com 36-48 h em meio NYDA (ágar nutritivo-extrato de levedura-dextrose) foi

148 preparada suspensão bacteriana em água destilada esterilizada, com concentração de  $1 \times 10^9$   
149 UFC/ml, ajustada em fotocolorímetro ( $A_{570} = 0,36$ ) de acordo com equação previamente  
150 estabelecida. Os diferentes solos foram colocados em caixas tipo Gerbox<sup>®</sup> (200 g de  
151 solo/caixa) e a cada caixa foram adicionados 50 ml de suspensão bacteriana de Pcc127<sup>Rif</sup>,  
152 homogeneizando-se com auxílio de bastão de vidro. As caixas foram incubadas em B.O.D. à  
153 temperatura constante de  $25 \pm 2$  °C.

154 Para avaliação dos níveis populacionais de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, foram  
155 processadas semanalmente amostras de 0,5 g de solo, até que em duas amostragens  
156 consecutivas, a bactéria não fosse detectada. As amostras foram colocadas em tubos contendo  
157 4,5 ml de água destilada esterilizada, os quais foram agitados em agitador tipo vórtex, na  
158 potência 10 durante 30 seg. Em condições assépticas, foram realizadas diluições até  $10^{-3}$ ,  
159 plaqueando-se 0,1 ml de cada suspensão em meio NYDA contendo 100 ppm de rifampicina e  
160 250 ppm do fungicida clorotalonil (NYDA<sup>Rif/Cl<sub>t</sub></sup>). O fungicida foi selecionado previamente  
161 como inibidor eficiente dos contaminantes fúngicos existentes nos solos. As placas foram  
162 incubadas por 36 h a  $28 \pm 2$  °C em B.O.D., quando foi realizada a contagem do número de  
163 colônias, determinando-se o número de UFC/g de solo. Em cada amostra de solo, os dados  
164 populacionais de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* foram utilizados para o cálculo da taxa  
165 de extinção relativa da população (TEP), pela expressão  $TEP = - ((\log Y_f - \log Y_0)/(T_f - T_0))$ ,  
166 onde  $Y_0$  é a população aos sete dias após a infestação do solo,  $Y_f$  a população na última  
167 avaliação antes de zerar,  $T_f$  o tempo (em dias) da última avaliação sem zerar e  $T_0$  o tempo da  
168 primeira avaliação (dia = 7) (Kocks *et al.*, 1998).

169 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo  
170 cada repetição constituída por uma caixa Gerbox<sup>®</sup>. Os dados foram submetidos à análise de  
171 variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

172

173 **Caracterização da supressividade ou condutividade dos solos a *Pectobacterium***  
174 ***carotovorum* subsp. *carotovorum***

175 Para caracterizar os possíveis fatores envolvidos na supressividade ou condutividade  
176 dos solos a *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, foram efetuadas comparações dos valores  
177 médios da TEP com as demais variáveis avaliadas em cada solo, pela análise de correlação de  
178 Pearson, ao nível de 5% de probabilidade. Essas comparações foram realizadas em três etapas:  
179 na primeira foram comparados todos os 24 solos, na segunda os seis solos com maiores níveis  
180 de supressividade e na terceira os cinco solos com maiores níveis de condutividade, conforme  
181 os resultados da análise de Scott-Knott. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o  
182 auxílio do programa SAEG<sup>®</sup> 9.0 (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, Universidade  
183 Federal de Viçosa, 2005).

184

185 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

186

187 As taxas de extinção relativa das populações (TEP) de *P. carotovorum* subsp.  
188 *carotovorum* (Pcc127<sup>Rif</sup>) nos solos de Pernambuco variaram de 0,0547 log (UFC)/dia a 0,6327  
189 log (UFC)/dia, sendo formados seis diferentes grupos de solos pelo teste de agrupamento de  
190 Scott-Knott (P=0,05) (Tabela 1). As maiores TEP foram observadas nos solos CF-1, SA-1,  
191 BG-1, CO-1, GR-1 e GR-2, enquanto as menores taxas foram constatadas nos solos IG-1, CO-  
192 2, CF-7, CF-8 e CF-9 (Tabela 1).

193 A diferença na TEP de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* em vários solos com a  
194 mesma densidade inicial de inóculo, como verificado no presente estudo, indica a variabilidade  
195 do potencial de inóculo em diferentes tipos de solo, entendendo-se como potencial de inóculo a  
196 energia de crescimento do organismo patogênico que está disponível para a infecção do  
197 hospedeiro, resultante da densidade de inóculo ou número de propágulos, da energia exógena e



198 endógena dos propágulos por unidade, da virulência dos propágulos e dos fatores ambientais,  
199 bióticos e abióticos, determinantes da atividade do inóculo (Lockwood, 1988). Essa  
200 variabilidade existente entre os solos permite, segundo Huber & Schneider (1982), classificá-  
201 los em supressivos ou condutivos. Nesse contexto, os solos CF-1, SA-1, BG-1, CO-1, GR-1 e  
202 GR-2 mostraram-se supressivos a *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, enquanto IG-1, CO-2,  
203 CF-7, CF-8 e CF-9 evidenciaram condutividade. A maioria dos solos apresentou  
204 comportamento intermediário em relação a esses extremos.

205 A formação dos grupos de solos baseada na TEP de *P. carotovorum* subsp.  
206 *carotovorum* não apresentou relação com os locais (municípios) de coleta das amostras dos  
207 solos, tipos de coberturas do solo na época da coleta ou classes texturais dos solos. Era  
208 esperado que solos sem cultivo de crucíferas se apresentassem mais supressivos à *P.*  
209 *carotovorum* subsp. *carotovorum*, pois existem relatos de declínio das populações de  
210 pectobactérias no solo até um nível não detectável quando inexitem plantas hospedeiras em  
211 cultivo ou restos de cultura não decompostos (Togashi, 1972; Mew *et al.*, 1976; Kikumoto,  
212 1980). Segundo Kikumoto (2000), a bactéria se desenvolve seletivamente na rizosfera de  
213 algumas espécies de plantas, indicando que algumas plantas podem não exsudar nutrientes de  
214 suas raízes para manter o crescimento de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

215 A ausência de associação entre histórico de cultivo e populações de *P. carotovorum*  
216 subsp. *carotovorum*, como constatado no presente estudo, foi previamente relatada por  
217 Pérombelon & Hyman (1989), baseado em estudo realizado na Escócia no período de 1981 a  
218 1983, envolvendo três campos previamente cultivados com batata. O histórico de cultivo na  
219 área pode ter alguma influência, mas a interação com o hospedeiro é um fator determinante  
220 para o aumento populacional de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* no solo. Nesse contexto,  
221 na maioria das vezes é impossível estabelecer uma relação entre o nível populacional de *P.*  
222 *carotovorum* subsp. *carotovorum* no solo e o início da podridão-mole em couve-chinesa, tendo  
223 em vista a grande influência da presença de ferimentos no pecíolo do hospedeiro, bem como da

224 umidade e da temperatura do solo (Togashi & Sakamoto, 1966). Em geral, a bactéria existe no  
225 solo em baixos níveis populacionais, menos que  $10^2$  UFC/g solo, mas se multiplica  
226 rapidamente no solo em contato com o pecíolo ou solo rizosférico do hospedeiro (Togashi,  
227 1972; Mew *et al.*, 1976). Portanto, como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* possui um tempo  
228 de geração curto, uma pequena quantidade de inóculo primário sobrevivente no solo pode  
229 produzir rapidamente uma epidemia na presença de condições favoráveis (Schuster & Coyne,  
230 1974).

231 Na análise dos possíveis indicadores da supressividade ou conducividade dos solos à  
232 população de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, não foram constadas correlações  
233 significativas ( $P=0,05$ ) entre a TEP e as características químicas, físicas e microbiológicas  
234 quando todos os solos foram considerados (Tabela 2). Esse resultado indica que não é possível  
235 destacar uma ou um conjunto de características responsáveis pela supressividade ou  
236 conducividade em todos os solos. Portanto, os fatores responsáveis pela supressividade em  
237 determinado solo podem não exercer o mesmo papel em outros, confirmando as observações  
238 de Arshad & Martin (2002) sobre a complexidade das interações entre as diferentes  
239 propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, o que torna difícil a identificação de  
240 indicadores de supressividade do solo que possam ser utilizados em diferentes situações, e  
241 reflete, segundo Höper & Alabouvette (1996) na dificuldade freqüentemente encontrada para  
242 distinção entre fatores primários e secundários responsáveis pela supressividade a doenças e/ou  
243 patógenos.

244 Quando considerados somente os seis solos mais supressivos, a TEP de *P. carotovorum*  
245 subsp. *carotovorum* se correlacionou significativamente ( $P\leq 0,05$ ) com a densidade aparente do  
246 solo ( $r = 0,76$ ), com as populações de bactérias totais ( $r = 0,82$ ) e *Bacillus* spp. ( $r = 0,80$ ). A  
247 população de *Bacillus* spp. se correlacionou com a densidade aparente ( $r = 0,96$ ), mas não com  
248 a população de bactérias totais ( $r = 0,71$ ) (dados não apresentados), o que pode ser

249 conseqüência da diferença nos métodos de quantificação das duas populações. Nos cinco solos  
250 mais condutivos, houve correlação negativa entre a TEP de *P. carotovorum* subsp.  
251 *carotovorum* e a população de *Bacillus* spp. ( $r = -0,86$ ) (Tabela 2). Por outro lado, as  
252 características químicas do solo não se correlacionaram com a TEP nas diferentes combinações  
253 de solos (Tabela 2).

254 A densidade populacional e a sobrevivência de microrganismos no solo dependem de  
255 vários fatores, destacando-se a capacidade de produzir estruturas de sobrevivência, os fatores  
256 que controlam ou afetam a produção destas estruturas, as condições que afetam a sobrevivência  
257 destas estruturas, a diversidade fisiológica, a eficiência na utilização de substratos, os números  
258 de hospedeiros principais e alternativos, a competitividade e grau de saprofiticidade, as  
259 estratégias de sobrevivência e a suscetibilidade a microbiostase e antibióticos presentes no solo  
260 (Siqueira & Franco, 1988).

261 A disponibilidade de nutrientes e os níveis de pH no solo parecem não ter afetado as  
262 populações de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* nesse estudo. No entanto, já foi constatado  
263 que valores elevados de pH, P, Ca e Mg propiciam aumentos significativos nos níveis  
264 populacionais desta bactéria no solo (Kikumoto, 1980; Pérombelon & Hyman, 1989; Armon *et*  
265 *al.*, 1995). Por outro lado, a podridão-mole em couve-chinesa foi eficientemente controlada em  
266 campo pela fertilização do solo com hidróxido de cálcio (Kim & Yeoung, 2004).

267 A importância das propriedades físicas do solo na supressividade de fungos  
268 fitopatogênicos habitantes desse ambiente foi destacada por Höper & Alabouvette (1996), mas  
269 inexistem informações sobre a influência da densidade aparente do solo na população de *P.*  
270 *carotovorum* subsp. *carotovorum*, motivo pelo qual o resultado obtido na presente investigação  
271 constitui uma observação pioneira. A densidade aparente do solo é determinada pela  
272 quantidade de espaços porosos e sólidos do solo, sendo que solos com elevada proporção de  
273 espaços porosos em relação aos sólidos têm densidades menores do que outros mais compactos  
274 e com menos espaços porosos (Brady, 1989). Como o nível de porosidade pode exercer efeito

275 seletivo sobre a capacidade de colonização por determinados microrganismos (Siqueira &  
276 Franco, 1988), a correlação positiva entre densidade aparente do solo e TEP de *P. carotovorum*  
277 subsp. *carotovorum* pode ser consequência do nível de porosidade, uma vez que as populações  
278 de bactérias são geralmente desfavorecidas pela reduzida porosidade do solo e,  
279 conseqüentemente, elevada densidade aparente.

280 Os solos constituem um sistema dinâmico, onde complexas interações entre as  
281 propriedades físicas, químicas e biológicas, se integram continuamente, influenciando e  
282 diversificando a microbiota (Siqueira & Franco, 1988). Os solos analisados nesse estudo foram  
283 obtidos de áreas diferentes e com histórico de culturas diferentes e, por conseguinte, suas  
284 microbiotas apresentaram diversidade, influenciando em maior ou menor grau a sobrevivência  
285 de *P. carotovorum*. Nesse sentido, a elevada correlação observada entre supressividade do solo  
286 a *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e as populações de bactérias totais era esperada, pois as  
287 populações de pectobactérias declinam muito rapidamente em solos no campo dependendo da  
288 população bacteriana no solo, além de outros fatores (Mew *et al.*, 1976; Pérombelon &  
289 Kelman, 1980). A redução da população de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* no solo pode  
290 ser atribuída à competição com bactérias nativas que utilizam os nutrientes mais  
291 eficientemente, a exemplo do constatado por Armon *et al.* (1995), mas o mecanismo de  
292 antibiose também pode estar envolvido, pois Kikumoto (2000) destacou que a diferença na  
293 habilidade de isolados desta bactéria sobreviverem no solo estava relacionada à sensibilidade a  
294 bacteriocinas. Este autor demonstrou o potencial do controle biológico da podridão-mole em  
295 couve-chinesa baseado na utilização de isolados avirulentos de *P. carotovorum* produtores de  
296 bacteriocinas, entretanto nenhum método efetivo de controle foi estabelecido.

297 Os gêneros de bactérias mais comumente encontrados nos solos com capacidade  
298 antagonística a fitopatógenos são *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. (Weller *et al.*, 2002;  
299 Bettiol & Ghini, 2005). Nesse estudo, as populações de *Pseudomonas* fluorescentes não se  
300 correlacionaram com a TEP de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* em nenhuma das situações

301 analisadas, embora Mew *et al.* (1976) tenham observado que a presença de *Pseudomonas*  
302 fluorescentes no solo influenciou significativamente na redução da severidade da podridão-  
303 mole em couve-chinesa. Por outro lado, a influência das populações de *Bacillus* spp. na  
304 supressividade a *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* verificada no presente estudo constitui  
305 um aspecto relevante, pois segundo Mazzola (2004), a implementação efetiva de estratégias de  
306 manejo ou estímulo à comunidade microbiana antagonista do solo para a supressão de  
307 fitopatógenos habitantes desse ambiente requer inicialmente a identificação dos componentes  
308 biológicos envolvidos na supressividade e depois o monitoramento do impacto das práticas de  
309 manejo na abundância e atividade dessa população microbiana benéfica.

310 A influência de bactérias formadoras de endosporos na sobrevivência de *P.*  
311 *carotovorum* foi estudada por Kikumoto (1980), que verificou o decréscimo rápido na  
312 população do patógeno com o aumento das populações de bactérias formadoras de endosporos.  
313 Espécies de *Bacillus*, incluindo *B. thuringiensis* Berliner, *B. subtilis* (Ehrenberg) Cohn e *B.*  
314 *cereus* Frankland & Frankland têm se destacado como importantes agente de biocontrole de  
315 fitopatógenos habitantes do solo (Emmert & Handelsman, 1999). Essas bactérias são  
316 produtoras de antibióticos, além de enzimas que degradam o sinal de “quorum sensing” de  
317 muitas bactérias (Garbeva *et al.*, 2004), a exemplo de *B. thuringiensis* no biocontrole de *P.*  
318 *carotovorum* (Dong *et al.*, 2004). Mesmo considerando todos esses aspectos, um entendimento  
319 completo dos fatores biológicos responsáveis pela supressividade de um solo a um  
320 determinado patógeno ou doença requer um conhecimento aprofundado da identidade,  
321 frequência relativa e atividade biológica das diversas populações microbianas que habitam a  
322 rizosfera. Além disso, o balanço microbiano e a eficiência de um antagonista são dependentes  
323 das características físico-químicas do solo, sendo difícil separar os fatores envolvidos na  
324 supressividade (Weller *et al.*, 2002), o que ficou evidente no presente estudo com a constatação  
325 de correlação significativa entre a população de *Bacillus* spp. e a densidade aparente do solo.

326 Um aspecto a ser considerado na dificuldade da caracterização dos possíveis  
327 mecanismos envolvidos na supressividade dos solos de Pernambuco à população de *P.*  
328 *carotovorum* subsp. *carotovorum* é a metodologia empregada, uma vez que foram utilizados  
329 indicadores tradicionais de supressividade (Hornby, 1983; Chellemi & Porter, 2001). De  
330 acordo com Van Bruggen & Semenov (1999), os resultados obtidos utilizando indicadores  
331 tradicionais são muito difíceis de interpretar, motivo pelo qual sugeriram um procedimento  
332 alternativo, baseado na mensuração de respostas biológicas a distúrbios ou estresse, assumindo  
333 que um solo sadio é um solo estável com resistência ao estresse. A resposta ao estresse em  
334 termos de amplitude e resistência da comunidade microbiana poderia ser um melhor indicador  
335 universal para supressão à doença que qualquer outro fator físico, químico ou biológico  
336 mensurado somente uma vez a longos intervalos de tempo. Portanto, novos estudos devem ser  
337 realizados para a caracterização dos mecanismos de supressividade ou conducividade dos solos  
338 de Pernambuco a *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, visando contribuir efetivamente para o  
339 manejo integrado da podridão-mole em couve-chinesa.

340

341

### AGRADECIMENTOS

342

343 Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de auxílio financeiro (Proc.  
344 479.622/2004-3) e bolsas de Produtividade em Pesquisa.

345

346

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

347

348 ARMON, R., DOSORETZ, C., YOIRISH, A., SHELEF, G. & NEEMAN, I. Survival of the  
349 phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in sterile and non-sterile soil, sand and  
350 their admixture. *Journal of Applied Bacteriology* 79:513-518. 1995.

- 351 ARSHAD, M.A. & MARTIN, S. Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-  
352 ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 88:153-160. 2002.
- 353 BETTIOL, W. & GHINI, R. Solos supressivos. In: Michereff, F., Andrade, D.E.G.T. &  
354 Menezes, M. (Eds.) *Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais*. Recife.  
355 Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2005. pp.125-152.
- 356 BRADY, N.C. *Natureza e Propriedade dos Solos*. 7. ed. Rio de Janeiro. Freitas Bastos. 1989.
- 357 CHELLEMI, D.O. & PORTER, I.J. The role of plant pathology in understanding soil health  
358 and its application to productive agriculture. *Australasian Plant Pathology* 30:103-109. 2001.
- 359 COOK, R.J. & BAKER, K.F. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant*  
360 *Pathogens*. St. Paul. The American Phytopathological Society. 1983.
- 361 DONG, Y.H.; ZHANG, X.F.; XU, J.L. & ZHANG, L.H. Insecticidal *Bacillus thuringiensis*  
362 silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal  
363 interference. *Applied and Environmental Microbiology* 70:954-960. 2004.
- 364 EMBRAPA. *Manual de Métodos de Análises de Solo*. 2. ed. Rio de Janeiro. EMBRAPA-  
365 CNPS. 1997.
- 366 EMMERT, E.A.B. & JO HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive  
367 perspective. *FEMS Microbiology Letters* 171:1-9. 1999.
- 368 GARBEVA, P., VAN VEEN, J.A. & VAN ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: selection  
369 of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness.  
370 *Annual Review of Phytopathology* 42:243-270. 2004.
- 371 HÖPER, H. & ALABOUVETTE, C. Importance of physical and chemical soil properties in the  
372 suppressiveness of soil to plant diseases. *European Journal of Soil Biology* 32:41-58. 1996.
- 373 HORNBY, D. Suppressible soils. *Annual Review of Phytopathology* 21:65-85. 1983.
- 374 HUBER, D.M. & SCHNEIDER, R.W. The description and occurrence of suppressive soils. In:  
375 Schneider, R.W. (Eds.) *Suppressive Soils and Plant Disease*. St. Paul. The American  
376 Phytopathological Society. 1982. pp.1-7.

- 377 KIKUMOTO, T. Ecological aspects of soft rot bacteria. Report of the Institute for Agricultural  
378 Research (Tohoku University) 31:19-41. 1980.
- 379 KIKUMOTO, T. Ecology and biocontrol of soft rot of Chinese cabbage. Journal of General  
380 Plant Pathology 66:275-277. 2000.
- 381 KIM, B-S. & YEOUNG, Y.R. Suppression of bacterial rot on Chinese cabbage by calcium  
382 fertilizer treatment. Research in Plant Disease 10:82-85. 2004.
- 383 KOCKS, C.G., RUISSEM, M.A., ZADOKS, J.C. & DUIJKERS, M.G. Survival and extinction  
384 of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in soil. European Journal of Plant Pathology  
385 104:911-923. 1998.
- 386 LOCKWOOD, J.L. Evolution of concepts associated with soilborne plant pathogens. Annual  
387 Review of Phytopathology 26:93-121. 1988.
- 388 MAZZOLA, M. Assessment and management of soil microbial community structure for  
389 disease suppression. Annual Review of Phytopathology 42:35-59. 2004.
- 390 MEW, T.W., HO, W.C. & CHU, L. Infectivity and survival of soft-rot bacteria in Chinese  
391 cabbage. Phytopathology 66:1325-1327. 1976.
- 392 PÉROMBELON, M.C.M. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: overview of  
393 pathogenesis. Plant Pathology 51:1-12. 2002.
- 394 PÉROMBELON, M.C.M. & HYMAN, L.J. Survival of soft rot *Erwinia carotovora* subsp.  
395 *carotovora* and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in soil in Scotland. Journal of Applied  
396 Bacteriology 66:95-106. 1989.
- 397 PÉROMBELON, M.C.M. & KELMAN, A. Ecology of the soft rot *Erwinias*. Annual Review  
398 of Phytopathology 18:361-387. 1980.
- 399 SCHUSTER, M.L. & COYNE, D.P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria.  
400 Annual Review Phytopathology 12:199-221. 1974.
- 401 SILVA, A.M.F. Levantamento da intensidade da podridão-mole da alface e couve-chinesa nas  
402 regiões da mata e agreste do estado de Pernambuco e determinação do tamanho das amostras



- 403 para avaliação da incidência da doença. (Dissertação de Mestrado). Recife. Universidade  
404 Federal Rural de Pernambuco. 2005.
- 405 SIQUEIRA, J.O. & FRANCO, A.A. Biotecnologia do Solo – Fundamentos e Perspectivas.  
406 Brasília. Ministério da Educação – ABEAS, ESAL/FAEPE. 1988.
- 407 TOGASHI, J. Studies on the outbreak of the soft-rot disease of Chinese cabbage by *Erwinia*  
408 *aroideae* (Townsend) Holl. Report of the Institute for Agricultural Research (Tohoku University)  
409 23:17-52. 1972.
- 410 TOGASHI, J. & SAKAMOTO, M. Studies on the outbreak of the soft-rot disease of Chinese  
411 cabbage. Report of the Institute for Agricultural Research (Tohoku University) 17:17-26. 1966.
- 412 VAN BRUGGEN, A.H.C. & SEMENOV, A.M. A new approach to the search for indicators of  
413 root disease suppression. Australasian Plant Pathology 28:4-10. 1999.
- 414 WELLER, D.M., RAAIJMAKERS, J.M., GARDENER, B.B.M. & THOMASHOW, L.S.  
415 Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annual  
416 Review of Phytopathology 40:309-348. 2002.

417 **TABELA 1.** Influência de solos do estado de Pernambuco na taxa de extinção da população  
 418 (TEP) de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*  
 419

<b>Código do solo</b>	<b>Local (município)</b>	<b>Cobertura<sup>1</sup></b>	<b>Textura</b>	<b>TEP<sup>2</sup></b>
CF-1	Camocim de São Félix	couve-chinesa	Franco arenoso	0,6327 a <sup>3</sup>
SA-1	Sairé	milho	Franco argilo arenoso	0,5439 b
BG-1	Barra de Guabiraba	sem plantio	Franco argilo arenoso	0,4011 c
CO-1	Condado	cana-de-açúcar	Argila	0,3682 c
GR-1	Gravatá	couve-chinesa	Franco arenoso	0,3357 c
GR-2	Gravatá	pimentão	Franco arenoso	0,3145 c
CF-2	Camocim de São Félix	couve-chinesa	Franco argilo arenoso	0,2801 d
AL-1	Abreu e Lima	cana-de-açúcar	Areia franca	0,2315 d
CG-1	Chã Grande	brócoli	Franco arenoso	0,2301 d
CF-3	Camocim de São Félix	couve-chinesa	Franco argilo arenoso	0,2004 d
BO-1	Bonito	mata	Argila	0,2003 d
SJ-1	São Joaquim do Monte	pimentão	Franco argilo arenoso	0,1992 d
CF-4	Camocim de São Félix	pimentão	Franco argilo arenoso	0,1722 d
SJ-2	São Joaquim do Monte	pimentão	Franco arenoso	0,1667 d
CG-2	Chã Grande	pimentão	Franco arenoso	0,1519 e
CF-5	Camocim de São Félix	couve-chinesa	Franco argilo arenoso	0,1483 e
GR-3	Gravatá	couve-chinesa	Franco argilo arenoso	0,1397 e
CF-6	Camocim de São Félix	couve-chinesa	Franco argilo arenoso	0,1238 e
AN-1	Aliança	cana-de-açúcar	Franco arenoso	0,1121 e
IG-1	Igarassu	inhame	Franco arenoso	0,0914 f
CO-2	Condado	cana-de-açúcar	Franco arenoso	0,0806 f
CF-7	Camocim de São Félix	couve-chinesa	Franco argilo arenoso	0,0799 f
CF-8	Camocim de São Félix	couve-chinesa	Franco arenoso	0,0718 f
CF-9	Camocim de São Félix	couve-chinesa	Franco arenoso	0,0547 f
C.V. (%)				10,34

420 <sup>1</sup>Tipo de cobertura do solo na época da coleta.

421 <sup>2</sup>Taxa de extinção da população de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* no solo [log (UFC)/dia], calculada  
 422 conforme Kocks *et al.* (1998).

423 <sup>3</sup>Médias de quatro repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste  
 424 de Scott-Knott (P=0,05).

425  
 426 **TABELA 2.** Correlações entre taxa de extinção relativa da população de *Pectobacterium*  
 427 *carotovorum* subsp. *carotovorum* (TEP) e variáveis físicas, químicas e microbiológicas dos  
 428 solos de Pernambuco, considerando todos os solos analisados (geral) e somente os  
 429 classificados como supressivos ou condutivos  
 430

Variáveis <sup>1</sup>	Coeficiente de correlação <sup>1</sup>		
	Geral	Supressivos	Condutivos
Areia (Ar)	-0,29	-0,03	-0,26
Argila (Ar)	0,14	-0,05	-0,07
Silte (Si)	0,46	0,14	0,74
Reação Silte/Argila (Si/Ar)	0,20	0,14	0,56
Densidade aparente (DA)	0,08	0,76*	0,50
Densidade de partículas (DP)	0,05	0,68	-0,40
pH (H <sub>2</sub> O)	-0,06	-0,23	0,65
Potássio (K)	0,02	-0,08	0,58
Sódio (Na)	0,12	0,47	-0,05
Cálcio (Ca)	0,01	-0,01	0,39
Cálcio + Magnésio (Ca+Mg)	0,11	-0,06	0,52
Alumínio (Al)	0,20	-0,25	-0,10
Carbono orgânico (CO)	-0,02	-0,03	0,65
Acidez potencial (H+Al)	0,04	0,35	-0,31
Soma de bases (SB)	0,11	-0,05	0,54
Saturação de bases (v)	0,06	-0,17	0,43
Saturação por alumínio (m)	0,16	-0,24	-0,08
Relação Ca/Mg (Ca/Mg)	-0,10	0,09	-0,40
Relação Ca/K (Ca/Mg)	0,10	-0,15	-0,20
Bactérias totais (BT)	0,07	0,82*	0,35
<i>Pseudomonas</i> fluorescentes (PF)	-0,09	-0,02	0,58
<i>Bacillus</i> spp. (BC)	0,03	0,80*	-0,86*
Fungos totais (FT)	0,26	-0,16	0,17

431 <sup>1</sup>Coeficientes de correlação de Pearson seguidos por asterisco são significativos a P≤0,05.

432

433

434

---

## **Conclusões Gerais**

## CONCLUSÕES GERAIS

- *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* é o principal agente causal de podridão-mole em couve-chinesa, em áreas de plantio de Camocim de São Félix, em Pernambuco.

- Os baixos períodos de incubação da doença evidenciam a velocidade com que a bactéria infecta os tecidos e causa o colapso da planta.

- Os isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* apresentam variabilidade na virulência, demonstrada pelos valores de severidade inicial, severidade final e área abaixo da curva de progresso da doença.

- A quantidade inicial de podridão-mole está inversamente relacionada ao tempo de início dos sintomas.

- Os isolados apresentam variabilidade quanto à sensibilidade aos antibióticos.

- Os isolados apresentam grande variabilidade genética, demonstrada pelos marcadores moleculares REP, ERIC e BOX em Rep-PCR.

- A variabilidade genética e a variabilidade patogênica dos isolados não estão relacionadas.

- A sensibilidade a antibióticos e o uso de marcadores moleculares Rep-PCR têm pouca validade na detecção de variabilidade patogênica em populações de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

- A elevada variabilidade verificada entre os isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* oriundos de diferentes áreas cultivadas com couve-chinesa em Pernambuco aponta para a necessidade de uma maior atenção em estudos de identificação, detecção, epidemiologia e controle da podridão-mole.

- A formação dos grupos de solos baseada na taxa de extinção de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* não apresenta relação com municípios de coleta, tipos de coberturas do solo na época da coleta ou classes texturais dos solos.
- Não é possível destacar uma ou um conjunto de características responsáveis pela supressividade ou conducividade em todos os solos.
- Em solos supressivos a *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* no estado de Pernambuco há correlação positiva entre densidade aparente do solo e taxa de extinção da bactéria.
- A elevada correlação observada entre supressividade do solo a *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e as populações de bactérias totais e *Bacillus* spp. é relevante para implementação efetiva de estratégias de manejo da doença.